UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

ISAC GEORGE ROSSET

Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação

São Carlos
2011

ISAC GEORGE ROSSET

Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Físico-Química

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

**São Carlos
2011**

Aos meus queridos pais Isac Sérgio Rosset e Hirma Grecco Rosset, pelas palavras de conforto e sabedoria que me sustentaram em meio às tempestades, pelo apoio, dedicação, compreensão e por sempre acreditar que eu poderia chegar até aqui: realizar um sonho.

Ao meu grande e especial irmão Jean Sérgio Rosset, companheiro e fiel amigo, uma pessoa composta dos melhores e mais nobres elementos existentes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente àquele que vive por toda a eternidade, que está dentro de mim; Deus, obrigado pelo dom da vida, saúde, sabedoria e oportunidades. Tu és minha maior motivação, o meu sustento. Palavras não descrevem o que faz por mim.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, pelo apoio, dedicação, ensinamentos e orientação durante a realização desse trabalho.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e a Universidade de São Paulo (USP) pelo oferecimento da estrutura e pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Em especial ao Prof. Dr. Cristiano Raminelli (FACET-UFMG) pelo apoio e parceria nos trabalhos desenvolvidos no laboratório e pela grande amizade.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Biocatálise: Lenilson, Ana Maria, Mariana, Julieta, Sandra, Gliseida, Rodrigo, Thales, Kátia, Camila, aos técnicos João e Marília pelo apoio e em especial a Yara e também a Maria Cecília (Lab. Catálise) pelas conversas e pela grande contribuição ao meu trabalho.

Ao pessoal da secretária da pós-graduação do IQSC-USP, em especial a Silvia e a Andréia.

Aos meus grandes colegas da República Blackout: Carlos e Camilo pelo agradável tempo de convivência. E também ao Rafael (Chavez) e o Deodato.

A todos os outros meus amigos do IQSC-USP, em especial ao Vagner e Viviana (Lab. Síntese Orgânica). E a todos os outros que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho e também pela amizade.

O conhecido é finito, o desconhecido é infinito; intelectualmente estamos em uma ilha no meio de um ilimitado oceano de inexplicabilidade. Nossa tarefa, a cada geração, é reclamar por um pouco mais de terra.

T. H. Huxley

RESUMO

ROSSET, I. G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Neste trabalho prepararam-se ésteres de ácidos graxos por esterificação do ácido oléico e transesterificação do óleo de soja e do triéster oléico via catálise enzimática. Determinou-se a composição dos produtos obtidos por RMN ^1H e CG-FID. Os padrões dos ésteres do ácido oléico via esterificação ácida foram preparados empregando ácido sulfúrico, os padrões dos ésteres do óleo de soja por transesterificação básica com hidróxido de sódio e o padrão do triéster oléico foi sintetizado utilizando ácido *p*-tolueno sulfônico como catalisador. A melhor enzima para essas reações foi determinada através de reações de esterificação do ácido oléico e transesterificação do óleo de soja com etanol na ausência de co-solventes, sendo que foi selecionada a lipase de *Candida antarctica*. A mesma enzima foi empregada nas esterificações enzimáticas do ácido oléico com diversos alcoóis (metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol), na transesterificação enzimática do óleo de soja e do triéster oléico com etanol. Em ambos os estudos, foram avaliados os fatores que influenciam as reações: quantidade de enzima; tempo de reação; água adicionada ao álcool e reuso do biocatalisador. Na esterificação enzimática do ácido oléico, o uso do etanol forneceu o melhor rendimento (96,5%) com 5,0% (m/m) de enzima em 24 horas de reação. Quando uma quantidade de 4,0% de água foi adicionada ao álcool, a reação utilizando metanol mostrou maior eficiência (98,5%) e os rendimentos com os outros alcoóis não foram alterados significativamente (acima de 90%). Também foi possível utilizar a enzima por até 10 ciclos sem perda de rendimento, com exceção do metanol, onde ocorreu um decréscimo acentuado de rendimentos nos ciclos seguintes. Na transesterificação enzimática do óleo de soja, os mesmos fatores foram avaliados e com 5,0% de enzima, após 24 horas, foi obtido um rendimento de 84,1% e com a adição de água o rendimento não foi significativamente alterado (83%). Na transesterificação, os métodos de quantificação por RMN ^1H e CG-FID foram comparados sendo que uma maior diferença foi observada para as reações com baixos rendimentos por RMN ^1H , porém em altos rendimentos a diferença entre os dois métodos não foi significativa. Monoglicerídeos e diglicerídeos foram quantificados por CG-FID e por RMN ^1H onde foi possível calcular a razão dos produtos formados através de uma equação desenvolvida, sendo que a diferença entre esses tipos de análises foi pequena, de apenas 1,4%. A transesterificação enzimática do triéster oléico foi obtida em bom rendimento (90,4%) e uma pequena quantidade de mono- e diglicerídeos foi produzida. Em todas as reações de transesterificação, o glicerol não foi detectado após a lavagem dos produtos. A metodologia empregando a lipase de *Candida antarctica* mostrou-se eficiente para a produção de biodiesel a partir do óleo de soja e do ácido oléico com diferentes tipos de alcoóis.

Palavras-chave: Biocatálise; biodiesel; quantificação por RMN ^1H e CG-FID; lipase de *Candida antarctica*.

ABSTRACT

ROSSET, I. G. Biodiesel production employing biocatalysis by esterification and transesterification reactions. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

In this work, it was prepared esters of the fatty acid by esterification of the oleic acid and transesterification of the soy oil through enzymatic catalysis. It was determined the composition of the products obtained by ^1H NMR and GC-FID. The standards of esters of the oleic acid by acid esterification was prepared employing sulfuric acid, the standards of esters of the soy oil by alkaline transesterification with sodium hydroxide and the standard of the oleic triester was synthesized employing *p*-toluene sulfonic acid as catalyst. The best enzyme for those reactions was determined through reactions of esterification of the oleic acid and transesterification of the soy oil with ethanol and free co-solvents, and lipase from *Candida antarctica* was selected. The same enzyme was employed in the enzymatic esterifications of the oleic acid with various alcohols (methanol, ethanol, propanol and butanol), in the enzymatic transesterification of soy oil and the oleic triester with ethanol. In both studies, was assessed the factors that influence the reactions: amount of catalyst, reaction time, water added in the alcohol and the turnover of biocatalyst. In the enzymatic esterification of the oleic acid, the ethanol showed the better yield (96,5%) with 5,0% (m/m) of enzyme at 24 hours of reaction. When 4,0% of water was added to the alcohol, the methanol showed the high efficiency (98,5%) and the yield with another alcohols were not affected. It was also possible to use the enzyme for 10 cycles without lose yield, except for the methanol. In the enzymatic transesterification of the soy oil, the same factors were assessed using 5,0% of enzyme, after 24 hours, a yield of 84,1% was obtained and with the water addition the yield was not modified (83%). On the transesterification, ^1H NMR and GC-FID were compared and a great difference was observed for low yields, but on high yields, the difference between methods was small. Monoglycerides and diglycerides were quantified by GC-FID and detected by ^1H NMR, it was possible to calculate the ratio between them on the products formed through an equation developed and the difference for this type of analysis was small, only 1.4% . The enzymatic transesterification of the oleic triester was obtained with good yield (90,4%) and a small amount of the monoglycerides and diglycerides was produced. In all the transesterifications reactions, glycerol was not detected after washing mixture of products. The methodology employing *Candida antarctica* lipase was efficient for biodiesel production by soybean oil and oleic acid with different alcohols.

Key-words: Biocatalysis; biodiesel; ^1H NMR and GC-FID quantification; *Candida antarctica* lipase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise de óleos e gorduras	23
Figura 2. Estrutura geral de um triglicerídeo.....	24
Figura 3. Esquema de designação do número de átomos de carbono e de insaturações nos ácidos graxos	25
Figura 4. Reação geral de esterificação de um ácido graxo	27
Figura 5. Reação geral de transesterificação para a preparação do biodiesel	28
Figura 6. Esquema geral das etapas de transesterificação de um triglicerídeo	28
Figura 7. Exemplo de uma etapa da transesterificação de um triglicerídeo catalisado por base	29
Figura 8. Reações secundárias que podem ocorrer durante a transesterificação de ésteres em meio básico: (1) hidrólise, (2) saponificação e (3) neutralização dos ácidos graxos	30
Figura 9. Etapas da transesterificação de um triglicerídeo catalisada por ácido.....	31
Figura 10. Estrutura geral de um polipeptídeo.....	31
Figura 11. Modelos de interação do substrato com a enzima. (A) Modelo de chave e fechadura. (B) Modelo de encaixe induzido	33
Figura 12. Tipos de reações promovidas por lipases.....	34
Figura 13. Fluxogramas do processo de produção do biodiesel por via química e enzimática	37
Figura 14. Mecanismo enzimático da hidrólise de um éster	39
Figura 15. Etapas da transesterificação enzimática de um triglicerídeo	40
Figura 16. Representação esquemática dos sinais na quantificação por padrão interno	42
Figura 17. Exemplo de uma curva analítica obtida pelo método do padrão interno	43
Figura 18. Estrutura da tricaprina utilizada como P.I.....	43
Figura 19. Estrutura do 1,2,4-butanotriol utilizado como P.I.....	44
Figura 20. Representação esquemática dos sinais por quantificação pelo método do padrão externo.....	44
Figura 21. Exemplo de uma curva analítica obtida pelo método do padrão externo	45
Figura 22. Preparação do padrão de biodiesel do óleo de soja por catálise básica	51
Figura 23. Aparelhagem para a preparação dos padrões de biodiesel.....	51
Figura 24. Preparação do padrão de biodiesel do óleo de soja por catálise ácida.....	52
Figura 25. Preparação dos ésteres do ácido oléico por catálise ácida	53

Figura 26. Aparelhagem para a preparação dos padrões dos ésteres do ácido oléico com diferentes alcoóis.....	53
Figura 27. Reação de preparação do padrão do triéster oléico do glicerol.....	54
Figura 28. Reação geral da transesterificação enzimática do óleo de soja com lipase de <i>C. antarctica</i>	56
Figura 29. Reação de esterificação enzimática do ácido oléico com lipase de <i>C. antarctica</i>	57
Figura 30. Transesterificação do triséster oléico empregando lipase de <i>C. antarctica</i>	59
Figura 31. Ampliação dos sinais característicos nos espectros de RMN ^1H dos padrões de ésteres do ácido oléico: A. Oleato de metila; B. Oleato de etila; C. Oleato de propila; D. Oleato de butila	64
Figura 32. Ampliação dos sinais característicos nos espectros de RMN ^{13}C dos padrões de ésteres do ácido oléico: A. Oleato de metila; B. Oleato de etila; C. Oleato de propila; D. Oleato de butila	64
Figura 33. Espectros de RMN ^1H : A. Óleo de soja; B. Padrão por transesterificação básica com etanol; C. Padrão por transesterificação básica com metanol	65
Figura 34. Espectros de RMN ^{13}C : A. Óleo de soja; B. Padrão por transesterificação básica com etanol; C. Padrão por transesterificação básica com metanol	66
Figura 35. Ampliações dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos padrões de biodiesel produzidos por transesterificação do óleo de soja por catálise básica. A. Óleo de soja; B. Biodiesel etílico e C. Biodiesel metílico	67
Figura 36. Ampliação do espectro de RMN ^1H do padrão da transesterificação por catálise ácida usando metanol	68
Figura 37. Espectros de RMN ^1H e ampliações dos sinais d e i do óleo de soja: A. Óleo de soja; B. Triéster oléico do glicerol	69
Figura 38. Espectros de RMN ^{13}C do óleo de soja (A) e do triéster oléico (B). Ampliações das regiões das ligações duplas (δ 120-140 ppm)	70
Figura 39. Cromatograma da mistura dos ésteres do ácido oléico: 1. Oleato de metila; 2. ácido oléico; 3. Oleato de etila; 4. Oleato de propila; 5. Oleato de butila; 6 P.I. (tricaprina).....	72
Figura 40. Curvas analíticas utilizadas na quantificação das reações de esterificação do ácido oléico: A. Oleato de metila; B. Oleato de etila; C. Oleato de propila; D. Oleato de butila	73
Figura 41. Cromatogramas obtidos pela análise em CG-FID. (a) (1) Biodiesel (ésteres etílicos) obtidos por catálise básica; (b) (2).Biodiesel (ésteres etílicos) obtidos por	

transesterificação enzimática do óleo de soja (reação 4, Tabela 13, p. 96); (3) padrão interno tricaprina; (c) padrões comerciais: MAG (monooleína) (4); DAG (1,3-dioleína) (5); TAG (trioleína) (6)	74
Figura 42. Curva analítica obtida por CG-FID utilizada para a quantificação das reações de transesterificação do óleo de soja com etanol por lipase de <i>C. antarctica</i>	74
Figura 43. Cromatograma do biodiesel antes da lavagem com água, mostrando os sinais do glicerol e do 1,2,4-butenotriol (P.I.) com ampliação da região do cromatograma.....	75
Figura 44. Curva analítica obtida por CG usada para a quantificação de glicerol no biodiesel antes da lavagem com água.....	76
Figura 45. Sinais dos prótons usados na quantificação da transesterificação de triglicerídeos com metanol	77
Figura 46. Representação estrutural da conformação mais estável de um triglicerídeo	78
Figura 47. Sobreposição dos sinais dos triglicerídeos (a') com o do etil éster (a'') usados para a quantificação da reação de transesterificação por RMN ¹ H.....	78
Figura 48. Expansões dos sinais no espectro de RMN ¹ H na região entre δ 4,00-4,40 ppm das amostras de 0, 30, 50, 70 e 100% de biodiesel, respectivamente.....	79
Figura 49. Expansões dos sinais no espectro de RMN ¹ H na região entre δ 4,00-4,40 ppm em todas as amostras analisadas para a construção da curva analítica	80
Figura 50. A. Curva analítica exponencial obtida e B. Regressão linear da curva exponencial	81
Figura 51. Rendimentos obtidos por CG-FID das reações de transesterificação e esterificação do óleo de soja e do ácido oléico com várias enzimas (1. <i>Candida antarctica</i> ; 2. <i>Candida rugosa</i> ; 3. <i>Candida cylindracea</i> ; 4. <i>Porcine pancreas</i> ; 5. <i>Hog pancreas</i> ; 6. <i>Rhizopus niveus</i> e 7. <i>Pseudomonas fluorescens</i>)	82
Figura 52. Componentes presentes nos produtos (biodiesel, mono-, di-, triglicerídeos e glicerol) nas reações de transesterificação empregando várias enzimas (1. <i>Candida antarctica</i> ; 2. <i>Candida rugosa</i> ; 3. <i>Candida cylindracea</i> ; 4. <i>Porcine pancreas</i> ; 5. <i>Hog pancreas</i> ; 6. <i>Rhizopus niveus</i> e 7. <i>Pseudomonas fluorescens</i>). * Glicerol não detectado após lavagem dos produtos	83
Figura 53. Estudo da quantidade de catalisador empregada na reação de esterificação do ácido oléico com a lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação	85
Figura 54. Estudo do tipo de álcool empregado na reação de esterificação do ácido oléico com a lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação.....	86

Figura 55. Estudo do tempo de reação na esterificação do ácido oléico empregando lipase de <i>C. antarctica</i>	87
Figura 56. Estudo da quantidade de água adicionada no álcool (hidratação) na esterificação do ácido oléico empregando a lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação	88
Figura 57. Estudo do reuso da enzima na esterificação enzimática do ácido oléico empregando lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação.....	90
Figura 58. Estudo da quantidade de enzima na etanólise do óleo de soja empregando lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação.....	92
Figura 59. Estudo do tempo de reação na etanólise do óleo de soja empregando lipase de <i>C. antarctica</i>	93
Figura 60. Estudo da adição de água ao álcool na etanólise do óleo de soja empregando a lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação	94
Figura 61. Estudo do reuso da enzima na etanólise do óleo de soja empregando a lipase de <i>C. antarctica</i> após 24 horas de reação	95
Figura 62. Composição do biodiesel produzido por etanólise do óleo de soja por lipase de <i>C. antarctica</i> em diferentes tempos reacionais e quantificado por CG-FID.....	98
Figura 63. Comparação dos espectros de RMN ¹ H. (A) Óleo de soja (triglicerídeos); (B) Padrão do biodiesel produzido por catálise básica; (C) Reação 4 (2,5% de enzima)	99
Figura 64. Ampliação do espectro de RMN ¹ H entre δ 3,55-5,24 ppm do produto reação 4 (2,5% de enzima) destacando as regiões dos quintetos l e o (região A), dos multipletos a e a'+a''+m (região B) e dos dubletos n e k (região C)	99
Figura 65. Compostos presentes no biodiesel produzido via catálise com lipase de <i>C. antarctica</i> . Produtos detectados por RMN ¹ H.....	100
Figura 66. Compostos não detectados por RMN ¹ H no biodiesel produzido via catálise com lipase de <i>C. antarctica</i>	101
Figura 67. Expansão do espectro de RMN ¹ H das reações enzimáticas (experimento 1): região A (quintetos o e l em δ 4,93 e 5,08 ppm, respectivamente), região B (multipletos entre δ 4,04-4,27 ppm) e região C (dubletos n e k em δ 3,83 e 3,73 ppm, respectivamente)	102
Figura 68. Ampliações dos dubletos k (δ 3,73 ppm) e n (δ 3,83 ppm) e suas áreas calculadas	103
Figura 69. Ampliações da região dos dubletos 1 e 4 dos mono- e diglicerídeos formados como intermediários da transesterificação do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i>	105

Figura 70. Comparação entre os processos de extração do biodiesel enzimático para a remoção do glicerol. Cromatograma (A) antes da lavagem com água destilada e cromatograma (B) após lavagem com água destilada.....	106
Figura 71. Espectros de RMN do óleo de soja comercial: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	111
Figura 72. Espectros de RMN do biodiesel metílico produzido via catálise básica: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	113
Figura 73. Espectros de RMN do biodiesel etílico produzido via catálise básica: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	115
Figura 74. Espectros de RMN do ácido oléico comercial: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	117
Figura 75. Espectros de RMN do oleato de metila padrão: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	119
Figura 76. Espectros de RMN do Oleato de etila padrão: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	121
Figura 77. Espectros de RMN do oleato de propila padrão: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	123
Figura 78. Espectros de RMN do oleato de butila padrão: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	125
Figura 79. Espectros de RMN do triéster oléico padrão: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	127
Figura 80. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> (1h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	129
Figura 81. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> (4h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	130
Figura 82. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> (8h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	131
Figura 83. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> (15h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	132
Figura 84. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> (24h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	133
Figura 85. Espectros de RMN da etanolise do óleo de soja com lipase de <i>C. antarctica</i> (0,1% de enzima): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3).....	134

Figura 86. Espectros de RMN da etanólise do óleo de soja com lipase de <i>C. antarctica</i> (1,0% de enzima): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)	135
Figura 87. Espectros de RMN da etanólise do óleo de soja com lipase de <i>C. antarctica</i> (5,0% de enzima): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)	136
Figura 88. Cromatograma do ácido oléico comercial: 1. Ácidos graxos; 2. Ácido oléico; 3. Tricaprina	137
Figura 89. Cromatograma do oleato de metila padrão: 1. Ácidos graxos; 2. Oleato de metila; 3. Tricaprina	137
Figura 90. Cromatograma do oleato de etila padrão: 1. Ácidos graxos; 2. Oleato de etila; 3. Tricaprina	138
Figura 91. Cromatograma do oleato de propila padrão: 1. Ácidos graxos; 2. Oleato de propila; 3. Tricaprina.....	138
Figura 92. Cromatograma do oleato de butila padrão: 1. Ácidos graxos; 2. Oleato de butila; 3. Tricaprina	139
Figura 93. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> empregando metanol (90,8% de rendimento): 1. ácido oléico; 2. Oleato de metila; 3. tricaprina	139
Figura 94. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> empregando etanol (96,5% de rendimento): 1. ácido oléico; 2. Oleato de etila; 3. tricaprina.....	140
Figura 95. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> empregando propanol (95,0% de rendimento): 1. ácido oléico; 2. Oleato de propila; 3. tricaprina	140
Figura 96. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de <i>C. antarctica</i> empregando butanol (91,0% de rendimento): 1. ácido oléico; 2. butil éster; 3. tricaprina.....	141
Figura 97. Cromatograma do óleo de soja comercial: 1. ácidos graxos; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos	141
Figura 98. Cromatograma do biodiesel metílico produzido via catálise alcalina: 1. ésteres metílicos (biodiesel)	142
Figura 99. Cromatograma de uma amostra comercial padrão contendo: 1. monooleína; 2. dioleína e 3. trioleína.....	142
Figura 100. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de <i>C. antarctica</i> (0,1% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos	143

- Figura 101.** Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (0,25% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos 143
- Figura 102.** Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (0,5% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos 144
- Figura 103.** Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (1,0% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos 144
- Figura 104.** Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (2,5% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos 145
- Figura 105.** Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (5,0% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras	24
Tabela 2. Classificação das enzimas	33
Tabela 3. Trabalhos sobre produção enzimática de biodiesel empregando diversas enzimas comerciais e células livres	35
Tabela 4. Trabalhos sobre produção enzimática de biodiesel empregando lipase de <i>Candida antarctica</i>	36
Tabela 5. Comparação entre o processo de produção do biodiesel por via química e enzimática	38
Tabela 6. Condições experimentais usadas na transesterificação do óleo de soja empregando lipase de <i>C. antarctica</i>	56
Tabela 7. Condições experimentais usadas na esterificação do ácido oléico empregando lipase de <i>C. antarctica</i>	58
Tabela 8. Misturas preparadas e analisadas por RMN ^1H para a obtenção da curva analítica	61
Tabela 9. Sinais dos ésteres do ácido oléico correspondentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C	63
Tabela 10. Rendimentos das reações de transesterificação do óleo de soja com várias enzimas	83
Tabela 11. Rendimentos das reações de esterificação do ácido oléico com várias enzimas	84
Tabela 12. Rendimentos das reações em todos os parâmetros avaliados na esterificação do ácido oléico com a lipase de <i>C. antarctica</i>	91
Tabela 13. Produção de biodiesel por etanólise do óleo de soja com lipase de <i>C. antarctica</i>	96
Tabela 14. Ésteres etílicos (EE) produzidos por etanólise com óleo de soja empregando lipase de <i>C. antarctica</i>	97
Tabela 15. Deslocamentos químicos dos sinais dos mono- e diglicerídeos no biodiesel produzido por catálise enzimática	100
Tabela 16. Comparação entre as quantidades de DAG e MAG pelas técnicas de RMN ^1H e CG-FID	104
Tabela 17. Componentes presentes nos produtos da transesterificação do triéster oléico com lipase de <i>C. antarctica</i>	105
Tabela 18. Composição do biodiesel produzido via catálise enzimática sem lavagem e após lavagem com água destilada	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANP	Agência Nacional de Petróleo de Gás Natural
ASTM	American Standard Testing Methods
CG	Cromatografia a Gás
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAG	Diglicerídeo
DAGo	Diglicerídeo oléico
EE	Ésteres etílicos
ES	Enzima-Substrato
FID	Flame ionization detector
ISSO	International Organization for Standardization
IV	Infravermelho
MAG	Monoglicerídeo
MAGo	Monoglicerídeo oléico
P.I.	Padrão interno
P.A.	Padrão analítico
PNPB	Programa Nacional de Uso e Produção do Biodiesel
PROBIODIESEL	Plano de Produção de Biodiesel
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TAG	Triglicerídeo
TAGo	Triglicerídeo oléico (Triéster oléico)
TMS	Tetrametilsilano
°C	graus Celsius
μL	micro Litros
α-C	Carbono na posição alfa
B20	20% de biodiesel no óleo diesel
pK _a	Constante de acidez
Kg	Kilograma
S	Sigleto
D	Dubleto
T	Tripleto
Q	Quarteto
Dd	Duplo dubleto
M	Multipeto

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1. Aspectos gerais	20
1.2. Óleos e gorduras como combustível (biodiesel).....	23
1.3. Catálise enzimática	31
1.3.1 Produção enzimática de biodiesel.....	33
1.4. Métodos de análise.....	41
1.5. Considerações finais	45
2. Objetivos.....	48
3. Procedimento experimental.....	50
3.1. Solventes e reagentes	50
3.2. Equipamentos.....	50
3.2.1. Cromatógrafo a Gás (CG).....	50
3.2.2. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	50
3.3. Preparação dos padrões de biodiesel.....	51
3.3.1. Transesterificação do óleo de soja por catálise básica	51
3.3.2. Transesterificação do óleo de soja por catálise ácida	52
3.3.3. Esterificação do ácido oléico por catálise ácida	53
3.3.4. Preparação do padrão do triéster oléico por catálise ácida.....	54
3.4. Preparação do biodiesel por catálise enzimática.....	54
3.4.1. Transesterificação e esterificação com várias enzimas	55
3.4.2. Transesterificação enzimática do óleo de soja empregando lipase de <i>Candida antarctica</i>	55
3.4.3. Esterificação enzimática do ácido oléico empregando lipase de <i>Candida antarctica</i>	57
3.4.4. Transesterificação enzimática do triéster oléico.....	59
3.5. Quantificação dos produtos obtidos.....	59
3.5.1. Cromatografia a Gás	59
3.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	60
4. Resultados e discussão	63
4.1. Caracterização dos padrões.....	63

4.1.1.	Padrões dos ésteres do ácido oléico.....	63
4.2.1.	Padrões da transesterificação do óleo de soja.....	65
4.2.	Quantificação dos produtos	70
4.2.1.	Cromatografia a Gás	70
4.2.2.	Ressonância Magnética Nuclear.....	76
4.3.	Reações enzimáticas	81
4.3.1.	Esterificação e transesterificação com várias enzimas	81
4.3.2.	Esterificação enzimática do ácido oléico empregando lipase de <i>Candida antarctica</i>	84
4.3.3.	Transesterificação enzimática do óleo de soja empregando lipase de <i>Candida antarctica</i>	92
4.3.4.	Transesterificação enzimática do triéster oléico.....	104
4.4.	Glicerol	106
5.	Conclusões.....	108
6.	Perspectivas.....	109
7.	Anexos	111
8.	Referências.....	146

Introdução

1.Introdução

1.1. Aspectos gerais

Desde a Revolução Industrial, a competitividade econômica dos países e a qualidade de vida de seus cidadãos são intensamente influenciadas pela energia. Em um mercado global e em face das crescentes preocupações com o meio ambiente, essa influência se mostra cada vez mais decisiva. O mundo tem buscado um desenvolvimento sustentável, ambientalmente correto, socialmente justo e economicamente viável. Nesse contexto, as economias que melhor se posicionam quanto ao acesso dos recursos energéticos de menor custo e de baixo impacto ambiental obtêm importantes vantagens em relação aos seus competidores (TOLMASQUIM; GUERREIRO; GORINI, 2007).

É conhecido que o setor petroquímico é em grande parte, responsável pelos danos ambientais. No entanto, a crise do petróleo que se instaurou nas últimas décadas, aliada ao aumento de demanda por combustíveis e a crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. As pesquisas tem se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, o que coloca a biomassa em um papel de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (SUAREZ et al., 2007).

A queima de combustíveis derivados do petróleo resulta no acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa. Também, as atividades industriais baseadas no petróleo não são auto-sustentáveis, seus produtos não têm como característica principal a biodegradabilidade e são fontes finitas (BASHA; GOPAL; JEBARAJ, 2009). As mudanças climáticas, induzidas em grande parte pelo uso desses combustíveis fósseis, associadas à preocupação com o desenvolvimento sustentável, tornam as fontes renováveis de energia necessárias, principalmente aquelas que causam menos danos ao meio ambiente. Nesse aspecto, a biomassa tem atraído muita atenção dos pesquisadores (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001).

Existe um grande número de tecnologias de conversão energética da biomassa para aplicações em pequenas e em grandes escalas. Elas incluem métodos de produção de calor e eletricidade, uso de resíduos sólidos urbanos e gás de aterros sanitários como fonte de energia além dos biocombustíveis para o setor de transportes. No entanto, a dependência de fontes de

energias vindas do petróleo ainda é grande, agravando os problemas ambientais já existentes. (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

Os relatórios do Painel Intergovernamental para as Alterações Climáticas - Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) - têm mostrado até mesmo para os cientistas mais céticos e aos políticos que o clima mundial está passando por mudanças e que as emissões antropogênicas de gases atmosféricos são um dos principais contribuintes para o efeito estufa e o aquecimento global (MIRASGEDIS et al., 2002).

Em 1997 (5 anos após a ECO-92¹) foi assinado o Protocolo de Kyoto, um instrumento internacional instituído para lidar com a redução do aquecimento global. Este protocolo exige que os países industrializados signatários reduzam em 5,2% - em relação aos níveis de 1990 - suas emissões de Gases de Efeito Estufa (GEEs²). Segundo os cientistas, esses gases têm provocado um aumento no efeito estufa, que é um dos principais contribuintes para o aquecimento global e espera-se que as metas de redução sejam cumpridas até 2012 (IZIQUE, 2005). A partir do Protocolo de Kyoto ficou claro que o mercado poderia auxiliar no processo de redução das emissões de Gases de Efeito Estufa, através da criação de um mercado de cotas de emissões desses gases (GARCIA, 2006).

O protocolo estabelece três “mecanismos de flexibilização”, dentre eles o MDL - Mecanismo de Desenvolvimento Limpo. A proposta do MDL consiste em que cada tonelada de CO₂ deixada de ser emitida ou retirada da atmosfera por um país em desenvolvimento poderá ser negociada no mercado mundial. As empresas nos países desenvolvidos que não conseguirem (ou não desejarem) reduzir suas emissões, poderão comprar Certificados de Emissões Reduzidas (CREs) em países em desenvolvimento e usá-los para cumprir suas obrigações. Os países em desenvolvimento, por sua vez, deverão utilizar o MDL para promover seu desenvolvimento sustentável (IZIQUE, 2005).

Espera-se que em 2040, o mundo tenha entre 9-10 bilhões de habitantes, ocorrendo dessa forma um significativo aumento do consumo energético, o que poderá prejudicar ainda mais o meio ambiente. O desejável é que todos possam viver bem e não poluir o Planeta ou mudar o clima. A principal questão que permeia esse cenário, o crescimento tecnológico sustentável, é possuir tecnologia para que isso seja possível (OKKERSE; VAN BEKKUM, 1999).

Em 2004, cerca de 80% de toda a energia produzida no mundo provinha de fontes fósseis (petróleo, carvão e gás natural). Além desses combustíveis, energia nuclear e hidroelétrica

¹ Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (CNUMAD), realizada entre 3 e 14 de junho de 1992 no Rio de Janeiro. O seu objetivo principal foi buscar meios de conciliar o desenvolvimento sócio-econômico com a conservação e proteção dos ecossistemas da Terra.

² GEEs: gases traço causadores do efeito estufa. Os mais importantes são dióxido de carbono e metano.

tinham pequenas participações, bem como as fontes renováveis de energia (solar, eólica, geotérmica e pequenas centrais hidroelétricas). Estas fontes representavam 10% da produção de energia, os outros 10% se originam na biomassa, sendo que 8,4% era usada de forma primitiva (queima), não sustentável, principalmente pelas populações da África, Ásia e parte da América Latina. O restante era usado para a geração de eletricidade ou produzindo carvão vegetal para a indústria siderúrgica. Em 1850, a biomassa representava 85% do consumo mundial de energia, hoje, a fração da biomassa usada em diferentes regiões do mundo varia muito, desde 2% nos países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), como por exemplo, os Estados Unidos e o Canadá e até 60% em certas regiões da África (GOLDEMBERG, 2009).

Atualmente, a biomassa é considerada uma fonte estratégica de energia para a solução de problemas relacionados ao aquecimento global, pois o balanço de massa de CO₂ é nulo, isto é, o CO₂ emitido para a atmosfera na queima de combustíveis derivados de biomassa é absorvido durante a formação da mesma. No entanto, essa evidência é real somente se a biomassa for consumida sustentavelmente, sem que a fonte de produção diminua com o tempo, fato que muitas vezes não é real (NONHEBEL, 2005).

Outra questão que permeia a utilização de biomassa para produzir combustíveis é o dilema entre a produção de alimentos e energia (SUAREZ et al., 2009). Globalmente, precisa-se de ambos, porém, a crescente demanda de energia tem gerado preocupações sobre o potencial de produção de combustíveis a partir de vegetais, sejam aqueles utilizados para a produção de alimentos ou não (TILMAN; HILL; LEHMAN, 2006). Entretanto, no Brasil existem áreas para a produção de alimentos e para o cultivo de matérias-primas para a produção de biocombustíveis para abastecer o mercado. Porém, a maioria dos países possui problemas de impacto na produção de alimentos. Esta conjuntura torna imperativo o desenvolvimento de novas tecnologias e a busca por matérias-primas alternativas no sentido de melhorar a produção energética e o potencial econômico de um país (SUAREZ et al., 2009).

No Brasil, dentre as fontes de biomassa disponíveis para a produção de biocombustíveis encontra-se a cana-de-açúcar para a produção de etanol e os óleos vegetais para a produção de biodiesel (NONHEBEL, 2005).

1.2. Óleos e gorduras como combustível (biodiesel)

As primeiras pesquisas sobre a constituição de óleos e gorduras foram realizadas pelo químico e físico francês Michel-Eugène Chevreul no início do século XIX (GUNSTONE, 1967). Chevreul mostrou que a hidrólise de óleos e gorduras dava origem a ácidos graxos e glicerol (Figura 1).

Figura 1. Reação de hidrólise de óleos e gorduras

Com isso, os óleos e gorduras passaram a ser chamados de ésteres de glicerol (glicerídeos, acilglicerídeos, triglicerídeos ou triacilglicerídeos). Dessa forma, um triglicerídeo (a) é um éster formado a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa, ou seja, ácidos graxos (b) e glicerol (c).

Os ácidos graxos, constituintes dos triglicerídeos, mais comuns apresentam 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono. Embora ácidos com menor ou maior número de átomos de carbono possam ser encontrados em vários óleos e gorduras. Devido à variedade de ácidos graxos fica evidente que os óleos e gorduras são compostos de muitos tipos de triglicerídeos com diferentes ácidos graxos saturados e insaturados e algumas vezes os ácidos graxos podem estar oxidados com grupos alcoóis na cadeia, como é o caso do ricinoléico (Tabela 1) (BAUMANN et al., 1988).

Introdução

Tabela 1. Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras

Óleo ou gordura	Composição em ácidos graxos (% em massa)							Outros ácidos graxos
	Láurico 12:0	Mirístico 14:0	Palmítico 16:0	Estearico 18:0	Oléico 18:1	Linoléico 18:2	Linolênico 18:3	
babaçu	44,0-45,0	15,0-16,5	5,8-8,5	2,5-5,5	12,0-16,0	1,4-2,8	-	8:0 (4,1-4,8); 10:0 (6,6-7,8) 18:1-OH ^a (89,0);
mamona	-	-	0,8-1,1	0,7-1,0	2,0-3,3	4,1-4,7	0,5-0,7	20:1 (0,5), 18:0-2OH ^b (0,6-1,1)
coco	44,0-51,0	13,0-18,5	7,5-11,0	1,0-3,0	5,0-8,2	1,0-2,6	-	8:0 (7,8-9,5); 10:0 (4,5-9,7)
milho	-	-	7,0	3,0	43,0	39,0	-	-
algodão	-	1,5	22,0	5,0	19,0	50,0	-	-
linhaça	-	-	6,0	4,0	13,0-37,0	5,0-23,0	26,0-58,0	-
oliva	-	1,3	7,0-16,0	1,4-3,3	64,0-84,0	4,0-15,0	-	-
dendê	-	0,6-2,4	32,0-45,0	4,0-6,3	38,0-53,0	6,0-12,0	-	8:0 (2,7-4,3); 10:0 (3,0-7,0) 20:0 (1,5); 22:0 (3,0-3,5)
amendoim	-	0,5	6,0-11,4	3,0-6,0	42,3-61,0	13,0-33,5	-	22:1 (40,0-60,0)
colza	-	1,5	1,0-4,7	1,0-3,5	13,0-38,0	9,5-22,0	1,0-10,0	-
soja	-	-	2,3-11,0	2,4-6,0	23,5-31,0	49,0-51,5	2,0-10,5	-
girassol	-	-	3,6-6,5	1,3-3,0	14,0-43,0	44,0-68,0	-	-
sebo	-	3,0-6,0	25,0-37,0	14,0-29,0	26,0-50,0	1,0-2,5	-	-

a Ácido ricinoléico

b Ácido diidroxiesteárico

Os ácidos graxos ocorrem na natureza como substâncias nas formas livres e esterificadas. A maior parte dos ácidos graxos naturais encontra-se esterificada com o glicerol, componente dos óleos e gorduras comestíveis. Os óleos e gorduras, misturas relativamente complexas de triacilglicerídeos, são os lipídios mais amplamente distribuídos na natureza. As propriedades químicas, físicas e nutricionais dos óleos e gorduras dependem fundamentalmente da natureza (grau de insaturação) e do número de átomos de carbono (Figura 2) (VIANNI; BHATTACHARYA, 1995).

Figura 2. Estrutura geral de um triglicerídeo

Nos ácidos graxos saturados, os átomos de carbono estão ligados por ligações simples (σ) e nos ácidos graxos insaturados há a presença de ligações duplas (π). Com base no número de ligações duplas presentes na cadeia, os ácidos graxos são denominados mono-, di-, tri- e poliinsaturados. As ligações duplas dos ácidos insaturados estão localizadas na cadeia de forma não conjugada (sistema 1,4-diênico), frequentemente separadas por um grupo metilênico (α -CH₂). As insaturações encontram-se frequentemente numa configuração espacial do tipo *cis* (Z) (VIANNI; BHATTACHARYA, 1995). A designação das insaturações dos ácidos graxos é mostrada na figura 3.

Figura 3. Esquema de designação do número de átomos de carbono e de insaturações nos ácidos graxos

Os lipídios (triacilglicerídeos) desempenham funções biológicas importantes para o metabolismo, como armazenamento e transporte de combustível metabólico, componente estrutural das membranas biológicas, isolamento térmico, elétrico e mecânico para a proteção de células e órgãos e também podem ser convertidos nos sais correspondentes por hidrólise alcalina, sendo que esses sais obtidos são utilizados no preparo de sabões e detergentes e ainda podem ser usados como biocombustíveis (VIANNI; BHATTACHARYA, 1995).

O uso de óleos vegetais como combustíveis não é recente, pois seu uso já foi investigado antes mesmo das crises energéticas (KNOTHE; GERPEN, 2005). Rudolf Diesel (1858-1913), o inventor do motor que leva o seu nome, teve interesse por esses combustíveis, o qual apresentou um motor abastecido com óleo de amendoim em uma exposição em Paris em 1900 (SHAY, 1993).

A utilização de combustíveis de origem vegetal em motores diesel é bastante atrativa, tendo em vista o aspecto ambiental e por ser oriundo de uma fonte renovável de energia (ROBLES-MEDINA et al., 2009). No entanto, apesar de energeticamente favorável, o uso direto de óleos vegetais como combustíveis para motores é problemático, principalmente pela sua alta viscosidade (aproximadamente 11 a 17 vezes maior que a do óleo diesel de petróleo),

baixa volatilidade, combustão incompleta, formação de depósitos de carbono nos sistemas de injeção, obstrução dos filtros e dos sistemas de injeção, comprometendo a durabilidade do motor (TASHTOUSH; AL-WIDYAN; AL-SHYOUKH, 2003) e formação de acroleína (uma substância altamente tóxica e cancerígena) obtida pela decomposição térmica do glicerol (SCHWAB et al., 1988).

Assim, visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas para permitir o seu uso em motores a diesel sem qualquer problema operacional, tais como: microemulsão, pirólise e reação de transesterificação com etanol ou metanol para a produção de biodiesel (SCHWAB; BAGBY; FREEDMAN, 1987).

Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples, promovendo a obtenção do biodiesel com propriedades similares ao diesel de petróleo. A transesterificação tem sido largamente utilizada para redução da viscosidade dos triglicerídeos, melhorando as propriedades físico-químicas dos combustíveis para o motor diesel. Somente as reações de transesterificação levam ao produto conhecido como biodiesel (KNOTHE; GERPEN, 2005).

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis. Pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais, existindo várias espécies de plantas no Brasil que podem ser utilizadas, tais como mamona, palma, girassol, babaçu, amendoim, pinhão-manso e soja, dentre outras. Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biodiesel é um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil” (“Portal do Biodiesel”).

O biodiesel é virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos, possui teor médio de oxigênio em torno de 11%, tem maior viscosidade e ponto de fulgor que o diesel convencional (MA; HANNA, 1999). Além disso, o biodiesel é biodegradável e não tóxico, reduz sensivelmente as emissões de material particulado, monóxido de carbono e é ausente de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Além disso, o biodiesel permite a valorização de subprodutos de atividades agroindustriais, como a soja e o pinhão manso e tem a vantagem de se utilizar diferentes plantas produtoras de óleo de acordo com a região de produção (COSTA NETO et al., 2000).

Com relação ao custo, se o processo de aproveitamento do principal subproduto (glicerina) e a recuperação do catalisador for otimizada, e se houverem incentivos fiscais por parte do Governo, a produção de biodiesel poderá ser obtida a custo competitivo com o óleo

diesel vendido nas bombas dos postos de abastecimento (COSTA NETO et al., 2000). No Brasil o custo de produção de 1 litro de biodiesel está em média 70 a 80 centavos mais caro do que o diesel de petróleo. No entanto, a comercialização desse biocombustível no Brasil está amparada pelo Programa Nacional de Uso e Produção do Biodiesel (PNPB), lançado em 2004 pelo Governo Federal que atualmente determina o uso de 5% de biodiesel no diesel (B5), dessa forma, o sua comercialização torna-se garantida (“Portal do Biodiesel”).

Com relação à produção, o biodiesel pode ser obtido tanto pela reação de transesterificação de triglicerídeos presentes em óleos vegetais e gorduras animais quanto pela esterificação de ácidos graxos livres (AGLs). A esterificação de AGLs com alcoóis de baixo peso molecular é usada como um pré-tratamento para a reação de transesterificação via catálise básica, para converter ácidos graxos livres em ésteres (metílicos ou etílicos) dessa forma evitando a saponificação, especialmente quando o teor de ácidos graxos livres é superior a 3% (Figura 4) (FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984).

Figura 4. Reação geral de esterificação de um ácido graxo

Em geral, a reação de esterificação de ácidos graxos é mais rápida do que a transesterificação de triglicerídeos (WARABI; KUSDIANA; SAKA, 2004). Isso porque a esterificação de ácidos graxos ocorre em uma única etapa enquanto que a transesterificação de triglicerídeos consistem em três etapas reacionais, formando como intermediários diglicerídeos e monoglicerídeos, além do glicerol como subproduto. A solubilidade de ácidos graxos em alcoóis de cadeia curta também contribui para o aumento da velocidade reacional (ARANDA et al., 2007).

No caso da produção de biodiesel, os triglicerídeos (**1**) (ésteres presentes em óleos e gorduras) reagem com um álcool de cadeia curta (**2**), geralmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador (geralmente homogêneo) como o NaOH para produzir novos ésteres (mono ésteres de ácidos graxos - biodiesel) (**3**), di-(**4**) e monoglicerídeos (**5**) como intermediários em pequenas quantidades e glicerol (**6**), como subproduto (Figura 5) (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Neste tipo de catálise, o catalisador está presente na mesma fase dos reagentes, assim é definida como catálise homogênea, ou seja, o catalisador está molecularmente disperso na solução reacional (LEISTEN, 1964).

Figura 5. Reação geral de transesterificação para a preparação do biodiesel³

Na transesterificação para a produção de biodiesel, o processo global é normalmente uma sequência de três etapas consecutivas, as quais são todas reações reversíveis (Figura 6). Na primeira etapa, moléculas de diglicerídeos (DAGs) são formadas a partir de moléculas de triglicerídeos (TAGs) na presença de um álcool e catalisador. Na etapa seguinte, os DAGs formados são convertidos em monoglicerídeos (MAGs) nas mesmas condições da etapa anterior. E por último, os MAGs são convertidos em moléculas de glicerol. Mono ésteres de ácidos graxos (biodiesel) são produzidos nas três etapas reacionais. A relação estequiométrica entre o óleo e o álcool é de 1:3. No entanto, um excesso de álcool é normalmente utilizado para favorecer o deslocamento do equilíbrio melhorando o rendimento da reação para o produto desejado (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Diglicerídeos e monoglicerídeos são formados como intermediários na reação de transesterificação e suas concentrações podem variar de reação para reação dependendo das condições empregadas e da matéria-prima (KNOTHE; GERPEN, 2005).

Figura 6. Esquema geral das etapas de transesterificação de um triglicerídeo

Ocorre uma redução de massa molecular de cerca de três vezes (1/3) em relação aos triglicerídeos na reação de transesterificação. Após a reação de transesterificação, a composição resultante consiste em uma mistura de ésteres de ácidos graxos (biodiesel), glicerol, álcool, catalisador e baixas quantidades de mono-, di- e triglicerídeos. O biodiesel

³ Os coeficientes estequiométricos utilizados nessa equação são apenas para expressar o balanceamento da mesma. A proporção estequiométrica correta é de 1:3 triglicerídeo:álcool.

puro (100% de ésteres de ácidos graxos) é chamado de B100. Quando misturado com o diesel de petróleo, a designação indica a quantidade de biodiesel na mistura, por exemplo, B20 significa que a mistura consiste de 20% de biodiesel e 80% de diesel (PINTO et al., 2005).

Os catalisadores usados na reação de produção do biodiesel podem ser classificados como: (a) alcalinos: hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), metóxido de sódio (NaOMe); (b) ácidos: ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido clorídrico (HCl); (c) enzimáticos (lipases) e (d) inorgânicos heterogêneos: óxido de magnésio (MgO) (ROBLES-MEDINA et al., 2009). Atualmente, praticamente 100% do biodiesel é produzido por catalisadores alcalinos (total produzido no mundo em 2007 foi de 8,5 milhões de toneladas) (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

O emprego da catálise básica é preferível devido ao maior rendimento e menor tempo de reação mesmo em temperatura ambiente quando comparada com a catálise ácida, além dos catalisadores alcalinos serem facilmente manipuláveis e menos corrosivos que os catalisadores ácidos (FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984). Na figura 7 é mostrada a sequência geral de uma etapa da transesterificação catalisada por base.

Figura 7. Exemplo de uma etapa da transesterificação de um triglicerídeo catalisado por base

No entanto, as reações de transesterificação de óleos vegetais em meio alcalino têm o inconveniente de produzirem sabões, tanto pela neutralização dos ácidos graxos livres quanto pela saponificação dos glicerídeos e/ou dos ésteres monoalquílicos formados. A quantidade de ácidos graxos livres e água no meio são parâmetros importantes para determinar a viabilidade do processo de transesterificação. Para que a reação ocorra de forma satisfatória por catálise

básica, é necessário que o óleo contenha menos que 3% de ácidos graxos livres. Quanto maior a acidez do óleo e o teor de água, menor é a eficiência da conversão, pois ocorre a formação de sabões (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006). Essas reações secundárias prejudicam o processo, pois consomem parte do catalisador, diminuindo o rendimento da transesterificação e dificultando o processo de separação do glicerol e a purificação do biodiesel (Figura 8) (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

Figura 8. Reações secundárias que podem ocorrer durante a transesterificação de ésteres em meio básico: (1) hidrólise, (2) saponificação e (3) neutralização dos ácidos graxos

No caso da transesterificação via catálise ácida, os ácidos de Brönsted são os mais utilizados principalmente os sulfônicos e os sulfúricos. Esses catalisadores fornecem bons rendimentos, porém as reações são relativamente lentas (superiores há 3 horas) comparadas com as reações catalisadas por bases (30 minutos) e requerem normalmente maiores temperaturas. As etapas da transesterificação em meio ácido é mostrado na figura 9.

Figura 9. Etapas da transesterificação de um triglicerídeo catalisada por ácido

1.3. Catálise enzimática

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores acelerando a velocidade das reações nos processos biológicos. Quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molecular (entre 62 a 2500 resíduos de aminoácidos) formadas por subunidades de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (Figura 10). Os resíduos de aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro aminoácido, constituindo cadeias polipeptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial e estrutural complexo (VOET; VOET, 1995).

Figura 10. Estrutura geral de um polipeptídio

As enzimas são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações que ocorrem sob condições brandas, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo da neutralidade. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem chegar até 10^{12} vezes maiores do que as não catalisadas. Uma enzima geralmente catalisa uma única reação química ou um conjunto de reações intimamente ligadas e o grau de especificidade para o substrato é

normalmente alto. A velocidade de uma reação enzimática é influenciada pela concentração do substrato, pH, concentração da enzima (NELSON; COX, 2004).

Muitas reações enzimáticas, em concentrações muito baixas, a reação procede vagarosamente. Por outro lado, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade aumenta proporcionalmente em função da frequência de colisões entre a enzima e as moléculas dos reagentes. Quando a enzima se aproxima da velocidade máxima em que ela pode combinar com o reagente e formar produtos, o efeito do aumento da concentração do substrato diminui. Nesse ponto, a enzima estabelece uma interação com o reagente que mesmo aumentando a concentração deste, ela não terá efeito na velocidade da reação e, portanto estará saturada. Porém, para reações não catalisadas por enzimas, a velocidade é aumentada quase que indefinidamente com o aumento da concentração dos reagentes. Tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas aumenta geralmente com a temperatura, dentro de certa faixa na qual ela é estável e mantém a sua atividade intacta (NELSON; COX, 2004).

Grande parte do poder catalítico das enzimas deve-se à capacidade delas em interagirem com o substrato em orientações favoráveis na formação dos complexos enzima-substrato (ES). As enzimas possuem um “sítio ativo”, onde se processam as reações químicas. Este é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica que se encontra em íntima e mútua proximidade espacial. O substrato liga-se ao centro ativo da enzima e parte da especificidade catalítica da mesma depende também da natureza das ligações envolvidas. Acredita-se que os aminoácidos do sítio ativo formam na superfície da enzima uma espécie de “fenda”, na qual o substrato pode ajustar-se. Este sítio deve possuir um formato definido e ajustável, que acomoda algumas moléculas, como os substratos e inibidores, mas que dificulte outras espécies de entrar em contato com o sítio ativo da enzima (PALMER, 1995) (NELSON; COX, 2004).

Para adaptar-se ao sítio ativo, um substrato deve ter uma forma complementar a este, conhecido como modelo chave e fechadura (Figura 11 **A**). No entanto, as formas dos sítios ativos de algumas enzimas são levemente modificadas pela interação com o substrato. Os sítios ativos dessas enzimas têm formas que são complementares à do substrato, mas somente depois de ligado. Esse processo de reconhecimento dinâmico é chamado de encaixe induzido (Figura 11 **B**) (CAMPBELL; FARRELL, 2005).

Figura 11. Modelos de interação do substrato com a enzima. (A) Modelo de chave e fechadura. (B) Modelo de encaixe induzido

Pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology), as enzimas podem ser classificadas de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Classificação das enzimas

Classe de enzimas	Algumas subclasses	Tipos de reação
Oxiredutases	Desidrogenases; oxidasas; redutases	Reações de oxidação e redução, formação de ligação dupla por eliminação de H_2 , oxigenação de ligações C-H, C-C e C=C
Transferases	Quinases; transaminases	Transferência de grupo aldeídico, cetônico, acil, glicosídeo, fosforil, amino
Hidrolases	Lipases; nucleases; proteases	Hidrólise-formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos
Liases	Descarboxilases; desidrases	Adição-eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C=N, C=O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico, epimerização
Ligases		Formação-rompimento de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

1.3.1 Produção enzimática de biodiesel

As lipases são enzimas que são produzidas por diversas plantas, animais e microrganismos (GHALY et al., 2010). Classificadas como enzimas hidrolíticas, ou seja, podem hidrolisar triglicerídeos para ácidos graxos e glicerol, são muito importantes para a biotecnologia, não somente para a indústria de alimentos e óleos, mas também na preparação de intermediários quirais. As lipases também são muito úteis em síntese orgânica, pois

promovem diversos tipos de reações em condições brandas e seletivas (Figura 12) (FABER, 2004).

Figura 12. Tipos de reações promovidas por lipases

As vantagens de se utilizar lipases para a produção de biodiesel são: habilidade de se trabalhar em diferentes meios, tanto na presença de solventes hidrofílicos quanto hidrofóbicos; são enzimas versáteis e robustas; muitas lipases mostram considerável atividade para catalisar reações de transesterificação com alcoóis de cadeia longa ou ramificada, o que é difícil se usar catalisadores alcalinos; se a enzima for imobilizada, poderá ser reutilizada (GHALY et al., 2010).

Muitos trabalhos foram publicados na literatura sobre o uso de enzimas e células livres para a produção de biodiesel. Na grande maioria, enzimas comerciais foram usadas. Na tabela 3 estão mostrados alguns resultados.

Introdução

Tabela 3. Trabalhos sobre produção enzimática de biodiesel empregando diversas enzimas comerciais e células livres

Referência	Enzima (E); Célula livre (CL)	Óleo ou gordura animal	Álcool	Temp. (°C)	Outras condições	Rendimento (%)
(KAIEDA et al., 2001)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (E)	Soja	MeOH	35°C	MeOH adicionado em 3 etapas, 150 rpm	90%
(SOU MONOU e BORN SCHEUER, 2001)	<i>Rhizomucor miehi</i> (E)	Girassol	MeOH	40°C	200 rpm	80%
(JIN et al., 2009)	<i>Rhizopus oryzae</i> (CL)	Canola	MeOH	t.a.	250 rpm	73,9%
(JIN et al., 2009)	<i>Rhizopus oryzae</i> (CL)	Óleo usado	MeOH	t.a.	250 rpm	57,2%
(DENG et al., 2005)	<i>Pseudomonas cepacia</i> (E)	Girassol	<i>n</i> -butanol	40°C	150 rpm	88,4%
(PAULA et al., 2007)	<i>Porcine pancreas</i> (E)	Babaçu	<i>n</i> -butanol	45°C	150 rpm	95%

t.a. = Temperatura ambiente.

Uma das lipases mais empregada em estudos para a produção de biodiesel é a lipase de *Candida antarctica*. Essa lipase de origem microbiana é muito usada em reações para produção de alcoóis secundários enantiomericamente puros e em transformações de ácidos carboxílicos (KIRK; CHRISTENSEN, 2002). A lipase de *C. antarctica* mostra boa atividade na transesterificação do óleo de soja com metanol (97% de rendimento) (MITTELBAACH, 1990). Porém, com o aumento da cadeia do álcool, foi mostrado que o rendimento diminui proporcionalmente (RODRIGUES et al., 2008). A tabela 4 mostra os trabalhos publicados envolvendo lipase de *C. antarctica* na produção de biodiesel.

Tabela 4. Trabalhos sobre produção enzimática de biodiesel empregando lipase de *Candida antarctica**

Referência	Óleo ou gordura animal	Álcool	Solvente	Temp. (°C)	Outras condições	Rendimento (%)
(MITTELBACH, 1990)	Girassol	MeOH	Sem solvente	-	-	3
(MITTELBACH, 1990)	Girassol	MeOH	Éter etílico	-	-	79
(BÉLAFI-BAKÓ et al., 2002)	Girassol	MeOH	-	50	12h, 130 rpm	97
(DENG et al., 2005)	Girassol	MeOH	Propanol	-	24h	93
(SAMUKAWA et al., 2000)	Soja	MeOH	-	-	-	97
(HA et al., 2007)	Soja	MeOH	Líquido iônico [Emim][Tof]	40	12h	80
(DU et al., 2004)	Soja	MeOAc	Sem solvente	40	14h, 150 rpm	92
(LEE; FOGLIA; CHANG, 2002)	Sebo	MeOH	-	30	72h, 200 rpm	74
(LI, et al., 2006)	Canola	MeOH	<i>t</i> -butanol	-	-	95
(ROYON et al., 2007)	Algodão		<i>t</i> -butanol	-	-	97
(MODI et al., 2007)	Pinhão-manso	2-propanol	Hexano	50	8h, 150 rpm	92
(ROSSET et al., 2011)	Soja	EtOH	Sem solvente	32°C	24h, 130 rpm	84,1

*A lipase foi utilizada na forma imobilizada.

Atualmente, a produção comercial de biodiesel é por via química, o que passa por várias etapas, encarecendo o produto final, mas o processo enzimático tem despertado o interesse da comunidade científica, pois emprega menos etapas no processo de produção (Figura 13).

Figura 13. Fluxogramas do processo de produção do biodiesel por via química e enzimática

Na metanólise empregando a lipase de *C. antarctica*, a melhor temperatura varia entre 30-40°C, porém depende do tipo de óleo ou gordura empregada na reação transesterificação. Dessa forma, é necessário um estudo para verificar as melhores condições reacionais para serem empregadas na produção de biodiesel (JEONG; PARK, 2007).

O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação, para estabelecer características que as tornam disponíveis para futuras aplicações industriais. Entretanto, uma vez otimizado o processo enzimático, este poderá apresentar vantagens em relação ao processo químico (Tabela 5) (WATANABE et al., 2001; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Tabela 5. Comparação entre o processo de produção do biodiesel por via química e enzimática

Processo	Vantagens	Desvantagens
Químico	Simplicidade; Alto rendimento; Curto tempo de reação.	Em alguns casos é difícil a separação do catalisador; Impossibilidade de reutilização do catalisador; Obtenção de produtos com menor grau de pureza.
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador (se imobilizado); Possibilidade de utilizar etanol hidratado na reação; Menor energia consumida durante o processo; Reduz significativamente o uso de água na etapa de purificação.	Longo tempo de reação; Alto custo das enzimas; Em muitos casos, baixo rendimento (dependendo do tipo de lipase).

O mecanismo de hidrólise enzimática de ésteres é muito similar com a hidrólise química (Figura 14). Um grupo nucleófilo do sítio ativo da enzima promove o ataque ao grupo carbonílico do substrato (éster). Este nucleófilo pode ser um grupo hidróxi de uma serina, um grupo carboxilato de um ácido aspártico (aspartato) ou um grupo tiol de uma cisteína. No mecanismo mostrado, dois grupos adicionais de aminoácidos (Asp e His) localizados juntos com um resíduo de serina no sítio catalítico, atuam como agentes nucleofílicos formando uma tríade catalítica. O arranjo espacial desses três grupos afeta o valor de pK_a do grupo hidróxi da serina, tornando-a mais nucleofílica e facilitando o ataque em um grupo carbonila do substrato $R_1\text{-CO-OR}_2$ (etapa 1). Então a porção acil do substrato se torna ligado covalentemente com a enzima, formando um intermediário acil-enzima e liberando o grupo de saída na forma de um álcool ($R_2\text{-OH}$). Em seguida, um nucleófilo, usualmente a H_2O , pode atacar o intermediário acil-enzima, regenerando a enzima e liberando o ácido carboxílico ($R_1\text{-COOH}$) (FABER, 2004).

Figura 14. Mecanismo enzimático da hidrólise de um éster

Na transesterificação, os triglicerídeos, e da mesma forma os di- e monoglicerídeos, primeiramente eles reagem com a tríade catalítica da lipase, posteriormente o intermediário acil-enzima reage com o álcool gerando ésteres monoalquílicos (SCHMID; VERGER, 1998). E ainda, ácidos graxos livres presentes em determinados óleos podem ser facilmente convertidos aos ésteres monoalquílicos (WATANABE et al., 2002).

No mecanismo da transesterificação (Figura 15), a etapa 1 consiste de uma adição nucleofílica para formar o complexo enzima-substrato, onde o nucleófilo é o grupo OH de um resíduo de aminoácido (serina). Na etapa 2 ocorre uma transferência de próton do ácido conjugado da amina para o átomo de oxigênio glicérico do substrato, assim, com a quebra da ligação C-O da enzima-substrato, ocorre a formação de uma molécula de diglicerídeo. Na etapa 3, uma molécula de álcool (R_4 -OH) promove o ataque ao grupo carbonila do intermediário acil enzima para formar o complexo acilado álcool-enzima. Na etapa 4, a ligação C-O do complexo formado rompe-se com uma transferência de próton do ácido conjugado da amina, resultando em uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e dessa forma a enzima é regenerada. Na etapa 2, após a formação da molécula de diglicerídeo, este sofrerá o ataque do grupo OH de um resíduo de serina, continuando o ciclo com a formação de uma molécula de monoglicerídeo, e este é transformado no glicerol (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007).

Figura 15. Etapas da transesterificação enzimática de um triglicerídeo

A transesterificação de triglicerídeos pode ser promovida por diversas lipases sob temperaturas de 30 a 40 °C, com ou sem solventes e na presença de diferentes alcoóis (WATANABE et al., 2002). Porém, o tempo despendido nesse tipo de catálise ainda é muito elevado, geralmente em torno de 24 a 48 horas (ISO et al., 2001). Considerando tais fatores, os processos enzimáticos ainda não são viáveis em escala industrial devido aos elevados custos associados e longos períodos de reação (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996).

A vantagem em se utilizar a catálise enzimática nas reações de transesterificação é que a glicerina produzida apresenta alto grau de pureza. Atualmente, mais de 97% do volume de glicerol utilizado em aplicações industriais apresenta elevada pureza. O custo da purificação deste produto é de US\$ 400,00/ton e o seu preço varia entre US\$ 1,30 a US\$ 2,00/kg. A glicerina bruta (50% a 90% em glicerol) é vendida por preços inferiores, que dependem do conteúdo de glicerol, do tipo e quantidade de contaminantes presentes. Portanto, sua produção por transesterificação com elevada pureza sem a necessidade de processos de purificação é um fator chave na comercialização desse produto, dessa forma a transesterificação enzimática

é preferível e o glicerol poderá se tornar uma importante matéria-prima para o setor químico (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

1.4. Métodos de análise

Durante o processo de transesterificação, algumas substâncias são formadas, geralmente em menores quantidades como glicerol, mono- e diglicerídeos as quais podem permanecer junto ao biodiesel. Além disso, os triglicerídeos que não sofreram o processo de transesterificação também podem estar presentes, bem como ácidos graxos livres, resíduos de álcool e catalisador. Esses contaminantes podem provocar danos operacionais, como depósitos no motor, entupimento de filtros ou até a deterioração do combustível (KNOTHE; GERPEN, 2005). Devido a esses fatores, o controle da qualidade do biodiesel é importante para sua comercialização. Além disso, a determinação de níveis de mistura de compostos na análise do biodiesel é determinante para sua qualidade (KNOTHE, 2006).

A cromatografia e a espectroscopia são os métodos analíticos mais usados em análises de biodiesel bem como procedimentos baseados em propriedades físicas como a viscosidade (KNOTHE, 2001).

Os parâmetros mais importantes do biodiesel (mono ésteres de ácidos graxos, ácidos graxos, glicerol, mono-, di- e triglicerídeos) são comumente analisados por cromatografia a gás (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CG tem sido a técnica mais usada devido a sua alta precisão para a quantificação de compostos minoritários. Porém, análises por CG necessitam frequentemente de derivatização da amostra para facilitar a separação cromatográfica dos componentes. Embora atualmente encontram-se colunas cromatográficas comerciais que permitem a análise direta sem derivatização das amostras. A detecção por ionização em chama (Flame ionization detector - FID) é a mais utilizada em CG (MONTEIRO et al., 2008).

Um método preliminar para uma análise qualitativa do biodiesel é a cromatografia em camada delgada (CCD), pois é um método rápido, fácil, e pode ser usado para acompanhar o andamento da reação (PINTO et al., 2005). Porém, para uma determinação precisa por CG dos componentes presentes no biodiesel, é necessário o uso de padrões internos (P.I.) (KNOTHE; GERPEN, 2005). Um padrão interno é uma substância quimicamente similar a substância analisada e deve ser um componente originalmente ausente nas amostras a serem analisadas sendo que o seu sinal deve ser bem resolvido, sua área deve ser similar em magnitude ao componente de interesse e deve ser adicionado em quantidade constante em

todas as amostras, brancos e padrões. A correlação é feita entre as razões das concentrações do analito e do P.I. com a razão das áreas medidas do analito e do P.I. (HARRIS, 1998).

A altura e a área de picos cromatográficos são afetadas não somente pela quantidade de amostra adicionada, mas também por flutuações na taxa de fluxo do gás de arraste, a coluna, o detector e as temperaturas usadas, ou seja, variações nesses fatores também influenciam a sensibilidade e a precisão na análise. O efeito dessas variações pode ser eliminado com o uso do método do padrão interno. O procedimento consiste na adição de uma quantidade constante do padrão interno para um volume fixo de diversas misturas as quais contêm quantidades conhecidas, porém variadas do componente a ser determinado. As misturas são analisadas e a curva analítica é construída (MENDHAM et al., 2000). Esquematicamente, a área do analito na curva irá variar e a área do P.I. se manterá constante (Figura 16).

Figura 16. Representação esquemática dos sinais na quantificação por padrão interno

A análise da amostra desconhecida é feita da mesma forma, ou seja, a mesma quantidade de padrão interno adicionada nas amostras da curva analítica é adicionada nas amostras desconhecidas, analisadas e calculadas as áreas. Com o valor encontrado, é possível conhecer a concentração com base na equação da reta que a curva analítica forneceu (Figura 17) (MENDHAM et al., 2000).

The diagram illustrates the chemical structure of a triglyceride. It features a glycerol backbone on the left, represented by a vertical line with three horizontal branches. Each branch is connected to an oxygen atom (O), which is part of an ester linkage. Each oxygen atom is bonded to a carbonyl group (C=O), where the oxygen is double-bonded above the carbon. The carbonyl carbon is then bonded to a long, zigzag hydrocarbon chain, representing the fatty acid tails. There are three such fatty acid chains, one for each ester group, all extending to the right.

O controle da quantidade de glicerol no biodiesel, o qual é o subproduto majoritário produzido pela reação de transesterificação de óleos e gorduras também é fundamental, pois, se permanecer em altas concentrações pode causar danos aos motores (PLANK; LORBEER, 1995). De acordo com a legislação da Agência Nacional de Petróleo (ANP), apenas 0,02% de glicerol livre é permitido no biodiesel (GONÇALVES FILHO; MICKE, 2007).

Etapas de purificação como a lavagem pode remover o glicerol presente no biodiesel, no entanto, encarecendo o processo, principalmente quando presentes em altas concentrações. Na

quantificação do glicerol, o P.I. comumente utilizado é o 1,2,4-butanotriol (Figura 19). É também conhecido como 1,2,4-triidroxibutano ou triol 124, o qual tem estrutura similar ao glicerol, porém não presente ou produzido como subproduto da reação de transesterificação e apresenta diferente tempo de retenção no cromatograma (KNOTHE; GERPEN, 2005).

Figura 19. Estrutura do 1,2,4-butanotriol utilizado como P.I.

Além da cromatografia gasosa, métodos espectroscópicos, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Infravermelho (IV) são utilizados para análise da qualidade do biodiesel, bem como na quantificação de reações de transesterificação e esterificação. A RMN pode ser empregada para análise quantitativa baseado no fato que a área dos sinais dos hidrogênios (RMN ^1H) é proporcional ao número desses átomos contidos na molécula, dessa forma, pode ser utilizada para a quantificação dos ésteres na produção de biodiesel (MIYAKE; YOKOMIZO; MATSUZAKI, 1998).

Estudos sobre curvas de calibração para análise de RMN ^1H da transesterificação utilizando etanol já foram reportados na literatura (COSTA NETO et al., 2004), onde foi empregado o método do padrão externo o qual relaciona diretamente a quantidade do analito com sua área de resposta, nesse caso, misturas do analito (etil ésteres) e do reagente de partida (óleo de soja) foram preparadas em várias concentrações conhecidas e analisadas (Figura 20).

Figura 20. Representação esquemática dos sinais por quantificação pelo método do padrão externo

Com todas as concentrações conhecidas e as áreas dos sinais calculadas para cada concentração, é construído um gráfico e se obtém a equação da reta que pode ser utilizada para a quantificação de amostras desconhecidas. No entanto, o uso dessa técnica para a quantificação do biodiesel produzido por transesterificação enzimática utilizando etanol foi reportado apenas uma vez (ROSSET et al., 2011) (Figura 21). Estudos empregando a RMN para quantificação da transesterificação utilizando etanol foi um dos objetivos de estudo dessa dissertação.

Figura 21. Exemplo de uma curva analítica obtida pelo método do padrão externo

Para quantificação por RMN 1H pelo método do padrão externo, são necessários ao menos dois sinais para a quantificação e a razão entre esses sinais em diversas amostras em diferentes concentrações resulta numa curva analítica que pode ser usada para a quantificação do biodiesel por RMN.

1.5. Considerações finais

Atualmente o biodiesel vem sendo produzido de diversas fontes, incluindo óleos vegetais, gorduras animais e óleos de fritura, e cada vez mais o biodiesel vem chamando a atenção pelo seu potencial uso (KNOTHE; GERPEN, 2005).

Nas próximas décadas, essa questão se apresenta para o Brasil a um só tempo como um desafio e uma oportunidade. Desafio, porque o desenvolvimento econômico e social demandará uma expressiva quantidade de energia e com isso um alto grau de segurança e de sustentabilidades energéticas. Oportunidade, porque o Brasil dispõe de recursos energéticos renováveis e de tecnologia para transformar suas riquezas naturais em energia e dessa forma,

agregar valor à sua produção de riqueza. No entanto, mais estudos devem ser realizados sobre novas matérias primas para a produção de biodiesel bem como em novas tecnologias de produção (TOLMASQUIM; GUERREIRO; GORINI, 2007).

Para enfrentar esse desafio e aproveitar essa oportunidade, é necessário atrair investidores, empreendedores e consumidores do setor energético. Nesse sentido, é fundamental a contribuição das instituições e equipes responsáveis pelo planejamento energético nacional, antecipando as situações, mapeando as alternativas, sugerindo estratégias, enfim, norteando as decisões. As transformações no setor energético nacional nos próximos 25 anos compreendem capacitação tecnológica, capacidade de gestão e inovação, viabilização de recursos para os investimentos e capacidade de articulação institucional, entre outras ações (“Empresa Brasileira de Pesquisa Energética”).

Analisando todos esses fatores, o biodiesel pode cumprir um papel importante no fortalecimento da base agroindustrial brasileira e no incremento da sustentabilidade da matriz energética nacional com geração de empregos e benefícios ambientais relevantes (“Ambiente Brasil”).

Objetivos

2. Objetivos

Preparação do biodiesel por catálise enzimática por reações de esterificação e transesterificação empregando diferentes alcoóis alifáticos de cadeia curta.

- Preparação dos padrões de biodiesel metílico e etílico por catálise básica e ácida para uso como padrões nas análises de CG-FID e RMN.
- Avaliar a melhor enzima para promover as reações de esterificação e transesterificação enzimática.
- Estudar a reação de transesterificação etanólica do óleo de soja com lipase de *Candida antarctica* e os fatores que influenciam na reação: quantidade de catalisador, tempo de reação, adição de água e reuso do catalisador.
- Estudar os fatores que influenciam a reação de esterificação do ácido oléico com lipase de *Candida antarctica* com diferentes alcoóis.
- Investigar a reação de transesterificação enzimática do triglicerídeo do ácido oléico (trioleato do glicerol).
- Quantificação das reações enzimáticas por RMN e CG-FID.

Procedimento Experimental

3. Procedimento experimental

3.1. Solventes e reagentes

Solventes: Metanol e etanol grau cromatográfico (Tedia), *n*-propanol e *n*-butanol grau PA (Artlab), *n*-hexano e acetato de etila grau PA (Quimis), clorofórmio deuterado para RMN (CIL, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). *Reagentes:* Hidróxido de sódio, ácido sulfúrico (Vetec), bicarbonato de sódio (Synth), sulfato de sódio anidro (Quemis), tricaprina e 1,2,4-butanotriol (Sigma-Aldrich) como padrões internos em CG e tetrametilsilano (TMS) como calibração interna para RMN, *Enzimas:* *Candida antarctica* Novozyme 435[®] (Novo Nordisk Bioindustrial) *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Hog pancreas*, *Porcine pancreas*, *Rhizopus niveus*, *Pseudomas fluorescens* (Sigma Aldrich). Óleo de soja refinado comercial (Liza[®]), ácido oléico PA (Vetec), glicerol PA (Vetec). *Revelador:* Vapor de iodo e placas cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄ (Whatman)

3.2. Equipamentos

Câmara de UV (Bottom) com comprimentos de onda em 254 e 325 nm, agitador orbital horizontal (Tecnal) modelo TE-421 e agitador orbital de bancada (Nova Ética) modelo 430-RDBP.

3.2.1. Cromatógrafo a Gás (CG)

Cromatógrafo a gás (SHIMADZU) modelo GC-2010 equipado com auto injetor modelo AOC-29i, detector FID e coluna cromatográfica para a análise de biodiesel *Select Biodiesel for Glycerides UltiMetal* (15 m x 0,32 mm x 0,45 µm) (Varian). Os tempos de retenção foram expressos em minutos (min) e o melhor método foi estabelecido.

3.2.2. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (BRUKER) modelo AC-200 (CAQUI-IQSC). Os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamentos (*J*) em Hertz (Hz). As multiplicidades apresentadas como: **s** (singleto), **d** (dubleto) **dd** (duplo dubleto), **t** (triplete), **q** (quarteto), **quint** (quinteto) e **m** (multiplete).

3.3. Preparação dos padrões de biodiesel

3.3.1. Transesterificação do óleo de soja por catálise básica

Primeiramente, foi realizada a preparação dos padrões por transesterificação do biodiesel do óleo de soja por catálise básica utilizando procedimento descrito na literatura (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986) com algumas modificações (Figura 22).

Figura 22. Preparação do padrão de biodiesel do óleo de soja por catálise básica

Em um balão de três bocas de 250 mL equipado com um condensador de refluxo, foi introduzido o óleo de soja refinado (50g, 54 mL), que permaneceu sob agitação moderada até atingir a temperatura de 70°C em banho de óleo sob agitação magnética. Paralelamente, foi adicionado NaOH (0,5 g, 12,5 mmol, 1,0% m/m com relação ao óleo de soja) em 25mL de metanol e a mistura foi adicionada vagarosamente ao óleo de soja aquecido com auxílio de uma seringa de vidro. Na outra abertura do balão acoplou-se um termômetro para monitoramento da temperatura (Figura 23).

Figura 23. Aparentagem para a preparação dos padrões de biodiesel

A mistura ficou sob aquecimento e agitação por 30 minutos, sendo que a reação foi acompanhada por CCD. Em seguida foi transferida para um funil de separação onde permaneceu por 24 horas à temperatura ambiente para a separação das fases. A fase inferior (glicerol) foi separada e a fase superior (biodiesel) foi concentrada em evaporador rotativo, lavada com água destilada (3 x 100 mL) para retirar traços de etanol, glicerol e catalisador, seguida por lavagem com solução 10% de HCl (3 x 50 mL) e novamente com água destilada (1 x 100 mL). O resíduo de água foi removido por secagem com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) seguido por filtração simples. O produto então foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C . O rendimento da reação foi quantitativo.

3.3.2. Transesterificação do óleo de soja por catálise ácida

No mesmo sistema mostrado na figura 23, foi preparado o padrão de biodiesel por catálise ácida. Foi adicionado o óleo de soja refinado (50 g, 54 mL), o balão que permaneceu sob agitação e aquecimento (70°C) Posteriormente, 40 mL de metanol foi adicionado ao óleo e com o auxílio de uma seringa de vidro foi adicionado lentamente o ácido sulfúrico concentrado (1,36 mL; 2,5 g; 5,0% m/m em relação à quantidade de óleo). A mistura reacional foi monitorada por CCD e o tempo de reação foi de 8 horas (Figura 24).

Figura 24. Preparação do padrão de biodiesel do óleo de soja por catálise ácida

A mistura obtida foi retirada do balão e colocada em um funil de separação onde permaneceu por 24 horas à temperatura ambiente para promover a separação das fases. Após a retirada da fase inferior, a fase superior foi lavada com água destilada (3 x 100 mL) e em seguida com solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% (3 x 50 mL) e novamente lavada com água destilada (1 x 100 mL). O biodiesel foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C . O rendimento da reação foi de 80%.

3.3.3. Esterificação do ácido oléico por catálise ácida

Foram preparados os padrões dos ésteres do ácido oléico com metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol via catálise ácida (Figura 25). Em um balão de 50 mL, acoplado a um condensador tipo Dean-Stark, adicionou-se o ácido oléico (2,0 g; 7,05 mmol; 2,23 mL), 6,0 mL do respectivo álcool, 20 mL de tolueno e com auxílio de uma seringa de vidro foi adicionado o ácido sulfúrico concentrado (0,2g; 0,11 mL; 1,0% m/m em relação à quantidade do ácido oléico).

Figura 25. Preparação dos ésteres do ácido oléico por catálise ácida

O sistema permaneceu sob refluxo por 15 horas em banho de óleo e agitação magnética (Figura 26). A reação foi acompanhada por CCD e os produtos revelados em vapor de iodo.

Figura 26. Aparelhagem para a preparação dos padrões dos ésteres do ácido oléico com diferentes alcoóis

Para a extração, o produto foi lavado com água destilada (3 x 10 mL), com solução de bicarbonato de sódio 10% (3 x 10 mL) e novamente com água destilada (3 x 10 mL). O álcool e o tolueno remanescente foram removidos por evaporação à pressão reduzida e o produto foi seco com NaSO₄ seco. O produto foi submetido à purificação por coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* como fase estacionária e um sistema eluente de *n*-hexano:acetato de

etila (98:02) como fase móvel. Os ésteres preparados foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C . Os rendimentos das reações foram todos superiores a 95%.

3.3.4. Preparação do padrão do triéster oléico por catálise ácida

Foi realizado a esterificação do glicerol com o ácido oléico via catálise ácida. Esse padrão foi preparado para posterior transesterificação enzimática empregando lipase de *C. antarctica*. O sistema esquematizado na figura 26 foi empregado. O procedimento para a síntese foi o mesmo utilizado na preparação dos mono ésteres de ácidos graxos a partir do ácido oléico (item 3.3.3), diferindo apenas no uso do ácido *p*-tolueno sulfônico como catalisador ao invés do ácido sulfúrico, pelo seu caráter não oxidante.

Figura 27. Reação de preparação do padrão do triéster oléico do glicerol

Em um balão reacional de 250 mL acoplado com um condensador tipo Dean-Stark, foi adicionado o glicerol (2,0g, 21,7 mmol), ácido oléico (24,5g, 27,5 mL, 86,9 mmol) (razão glicerol:ácido oléico 1:4), tolueno (50 mL) e ácido *p*-tolueno sulfônico (10,0 mg; 0,6 mmol; 0,5% m/m em relação à quantidade de glicerol) (Figura 27). A mistura reacional ficou sob agitação magnética e refluxo por 15 horas. A reação foi acompanhada por CCD. O produto foi extraído com *n*-hexano (3 x 50 mL), lavado com água destilada (3 x 50 mL), solução de bicarbonato de sódio 10% (3 x 25 mL) e novamente lavado com água destilada (3 x 50 mL). O produto foi seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e submetido à evaporação a pressão reduzida. O triéster foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C . O rendimento da reação foi de 82%.

3.4. Preparação do biodiesel por catálise enzimática

Foi realizada a esterificação do ácido oléico e a transesterificação do óleo de soja refinado via catálise enzimática para a produção de biodiesel utilizando procedimento descrito na literatura para as diversas lipases comerciais com algumas modificações (SHIMADA et al., 1999).

3.4.1. Transesterificação e esterificação com várias enzimas

Primeiramente as reações de esterificação e transesterificação enzimática foram realizadas para verificar qual a melhor enzima para promover as reações com etanol. As enzimas utilizadas nestes ensaios foram as lipases: *Candida antarctica* (Novozyme 435[®]), *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Hog pancreas*, *Porcine pancreas*, *Rhizopus niveus* e *Pseudomas fluorescens*.

As reações enzimáticas foram realizadas em tubos Eppendorf[®], onde, tanto a esterificação do ácido oléico quanto a transesterificação do óleo de soja refinado, foram adicionados o ácido oléico para a esterificação (250 mg; 280 µL; 0,88 mmol) ou óleo de soja para a transesterificação (250 mg, 270 µL), etanol (750 µL) e as lipases (25 mg, 5,0% m/m em relação à quantidade do ácido oléico ou do óleo). As reações foram executadas em agitador orbital de bancada (Nova Ética), a 32°C e 130 rpm por 24 horas. Para a extração, os produtos foram lavados com água destilada (3 x 1 mL), secos com Na₂SO₄ anidro, filtrados e o excesso de álcool foi retirado por evaporação a pressão reduzida. Os rendimentos das reações foram determinados por CG-FID utilizando a tricaprina como padrão interno e os resultados expressos em % de conversão de ésteres (Tabela 10, p. 83 e Tabela 11, p. 84).

3.4.2. Transesterificação enzimática do óleo de soja empregando lipase de *Candida antarctica*

Para o estudo da transesterificação enzimática do óleo de soja refinado foi utilizado a lipase de *Candida antarctica*. Foram realizados quatro experimentos, avaliando dessa forma os fatores que podem influenciar a reação de transesterificação enzimática, os quais foram: quantidade do biocatalisador (experimento 1), tempo de reação (experimento 2), quantidade de água adicionada (experimento 3) e reuso do biocatalisador (experimento 4). No total, foram realizadas 20 reações. Em todos os experimentos, as reações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL com tampa onde foi adicionado o óleo de soja (5,0 g, 5,4 mL), etanol (15,0 mL) e a enzima (Tabela 6). As reações foram executadas em agitador orbital (Tecnal) a 32°C, 130 rpm (Figura 28).

Procedimento Experimental

Figura 28. Reação geral da transesterificação enzimática do óleo de soja com lipase de *C. antarctica*⁴

As condições reacionais empregadas são mostradas na tabela 6.

Tabela 6. Condições experimentais usadas na transesterificação do óleo de soja empregando lipase de *C. antarctica*

Reação	Enzima m(g); (%) [*]	Tempo (h)	Quantidade de água (%)	Reuso (ciclos)
Experimento 1 – Quantidade de biocatalisador				
1	0,005; (0,1)	24	-	-
2	0,025; (0,5)	24	-	-
3	0,05; (1,0)	24	-	-
4	0,125; (2,5)	24	-	-
5	0,25; (5,0)	24	-	-
Experimento 2 – Tempo de reação				
6	0,25; (5,0)	1	-	-
7	0,25; (5,0)	4	-	-
8	0,25; (5,0)	8	-	-
9	0,25; (5,0)	15	-	-
10	0,25; (5,0)	24	-	-
Experimento 3 – Presença de água				
11	0,25; (5,0)	24	0,5	-
12	0,25; (5,0)	24	1,0	-
13	0,25; (5,0)	24	1,5	-
14	0,25; (5,0)	24	2,0	-
15	0,25; (5,0)	24	4,0	-
Experimento 4 – Reuso do biocatalisador				
16	0,25; (5,0)	24	-	1
17	0,25; (5,0)	24	-	2
18	0,25; (5,0)	24	-	3
19	0,25; (5,0)	24	-	4
20	0,25; (5,0)	24	-	5

^{*}% m/m em relação à quantidade de óleo de soja utilizado.

⁴ Rendimento obtido por CG-FID da reação 5, Tabela 13.

No experimento 1, foi variada a quantidade de catalisador de 0,1-5,0 % m/m em relação a quantidade de óleo de soja utilizada. No experimento 2, com a melhor quantidade do biocatalisador avaliada (5,0%, experimento 1), fez-se o estudo do tempo na reação variando-se de 1-24h. No experimento 3 foi avaliado a influência da quantidade de água adicionada, para verificar se a enzima catalisa a reação na presença do etanol hidratado. Para realizar esse experimento, foram preparadas cinco misturas de etanol anidro e água destilada (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0% de água). No experimento 4, cinco ciclos reacionais foram executados empregando a mesma enzima em todos os ciclos. Ao final de cada reação, a enzima foi filtrada em papel filtro qualitativo e lavada com *n*-hexano (1 x 20 mL) e seca à temperatura ambiente. As reações foram monitoradas por CCD e os produtos resultantes foram extraídos filtrando-se a enzima em papel filtro qualitativo, lavados com água destilada (3 x 20 mL), secos com Na₂SO₄ anidro e evaporados sob pressão reduzida. Em todos os experimentos não foi obtida a separação de fases biodiesel-glicerol. Os rendimentos das reações foram determinados por CG-FID e RMN ¹H e os resultados expressos em % de conversão de ésteres (Tabela 13, p. 96 e Tabela 14, p. 97).

3.4.3. Esterificação enzimática do ácido oléico empregando lipase de *Candida antarctica*

Nesse estudo foi avaliado alguns fatores que podem influenciar a reação de esterificação enzimática do ácido oléico com diversos alcoóis empregando lipase de *C. antarctica* (Figura 29).

Figura 29. Reação de esterificação enzimática do ácido oléico com lipase de *C. antarctica*

Foram avaliados quatro alcoóis (metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol) de acordo com os seguintes parâmetros: quantidade do catalisador (experimento 1), tempo de reação (experimento 2), quantidade de água adicionada no álcool (experimento 3) e reuso do catalisador (experimento 4).

Ao total foram realizadas 25 reações para cada álcool, resultando num total de 100 reações, as quais foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL com tampa onde foi adicionado ácido oléico (0,5 g, 0,56 mL), o respectivo álcool (1,5 mL) e a enzima (condições mostradas

Procedimento Experimental

na Tabela 7). As reações foram executadas em agitador orbital de bancada (Nova Ética) a 32°C, 130 rpm.

Tabela 7. Condições experimentais usadas na esterificação do ácido oléico empregando lipase de *C. antarctica*

Reação ^a				
Álcool				Fator estudado
MeOH	EtOH	PrOH	BuOH	Quantidade do biocatalisador (m(g); (%))
1A	1B	1C	1D	0,005; (0,1)
2A	2B	2C	2D	0,010; (0,25)
3A	3B	3C	3D	0,025; (0,5)
4A	4B	4C	4D	0,05; (1,0)
5A	5B	5C	5D	0,125; (2,5)
6A	6B	6C	6D	0,25; (5,0)
MeOH	EtOH	PrOH	BuOH	Tempo de reação (h)
7A	7B	7C	7D	1
8A	8B	8C	8D	4
9A	9B	9C	9D	8
10A	10B	10C	10D	15
11A	11B	11C	11D	24
MeOH	EtOH	PrOH	BuOH	Presença de água (%) ^b
12A	12B	12C	12D	0,5
13A	13B	13C	13D	1,0
14A	14B	14C	14D	1,5
15A	15B	15C	15D	2,0
16A	16B	16C	16D	4,0
MeOH	EtOH	PrOH	BuOH	Reuso do biocatalisador (nº de ciclos)
17A	17B	17A	17D	1
18A	18B	18A	18D	2
19A	19B	19A	19D	3
20A	20B	20A	20D	4
21A	21B	21A	21D	5
22A	22B	22A	22D	6
23A	23B	23A	23D	7
24A	24B	24A	24D	8
25A	25B	25A	25D	9
26A	26B	26A	26D	10

^aReações: **A** (metanol); **B** (etanol); **C** (*n*-propanol) e **D** (*n*-butanol).

Todas as reações foram monitoradas por CCD e os produtos foram extraídos filtrando-se a enzima em papel filtro qualitativo, lavados com água destilada (3 x 2,0 mL), secos com

Na₂SO₄ anidro e evaporados sob pressão reduzida. Os rendimentos das reações foram determinados por CG-FID empregando a tricaprina como P.I. e os resultados expressos em % de conversão de ésteres (Tabela 12, p. 91). No caso do estudo do reuso do biocatalisador, para cada ciclo a enzima foi filtrada em papel de filtro qualitativo, lavada com *n*-hexano (1 x 2,0 mL), seca a temperatura ambiente e utilizada novamente.

3.4.4. Transesterificação enzimática do triéster oléico

A transesterificação enzimática do triéster oléico foi realizada em tubos Eppendorf® na posição horizontal, onde foi adicionado o triéster (500 mg; 280 µL), etanol anidro (750 µL) e a lipase de *C. antarctica* (25 mg, 5,0% m/m em relação à quantidade do triéster oléico) (Figura 30).

Figura 30. Transesterificação do triséster oléico empregando lipase de *C. antarctica*

Cinco reações foram executadas em agitador orbital de bancada (Nova Ética), a 32°C e 130 rpm por um intervalo de tempo entre 1-24h (1, 4, 8, 15 e 24 horas). Para a extração, os produtos foram lavados com água destilada (3 x 1 mL), secos com Na₂SO₄ anidro e o excesso de álcool foi removido por evaporação a pressão reduzida. Os rendimentos das reações foram determinados por CG-FID utilizando a tricaprina como padrão interno e os resultados expressos em % de conversão de ésteres (Tabela 17, p. 105). Todos os produtos obtidos foram identificados por RMN ¹H e ¹³C.

3.5. Quantificação dos produtos obtidos

A caracterização de todos os padrões e a quantificação dos produtos obtidos foi realizada por Cromatografia a Gás (CG) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C).

3.5.1. Cromatografia a Gás

A CG foi empregada na quantificação de todas as reações realizadas nesse trabalho. Para isso, foi desenvolvido um método cromatográfico usado tanto na quantificação das reações de esterificação do ácido oléico quanto na quantificação dos ésteres produzidos nas reações de transesterificação do óleo de soja bem como o glicerol remanescente. Assim, foi possível

comparar os tempos de retenção dos componentes em vários tipos de amostras. O método foi desenvolvido de acordo com as seguintes condições: nitrogênio como gás de arraste, razão de *split* 1:20, volume de injeção de 1 µL, temperatura do injetor de 270°C e do detector de 350°C, temperatura inicial da coluna de 100°C permanecendo por 1 minuto, taxa de aquecimento de 15°C/min até 180°C, posteriormente aquecimento a uma taxa de 7°C/min até 225°C e 30°C/min até 350°C permanecendo nessa temperatura por 5 min, resultando em um tempo total de análise de 21 minutos e 56 segundos. A coluna utilizada foi a *Select Biodiesel for Glycerides UltiMetal* (Varian).

Como não foi detectado glicerol no biodiesel via catálise enzimática após a lavagem com água por CG-FID e por RMN, foi realizado um teste para verificar a sua presença. Após a filtragem da enzima da reação 5 (Tabela 6, p. 56, - 5,0% de lipase, 24 horas de reação), o mesmo foi dividido em duas partes: a primeira não foi submetida ao processo de lavagem com água destilada e a segunda parte foi lavada com água destilada. Os produtos resultantes foram submetidos à evaporação por pressão reduzida para retirar o excesso de álcool e em seguida realizou-se as análises por CG-FID.

3.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A quantificação por RMN ^1H foi utilizada para a determinação do conteúdo de ésteres etílicos nas reações de transesterificação enzimática do óleo empregando a lipase de *C. antarctica* e para análise qualitativa dos padrões preparados tanto por esterificação do ácido oléico como por transesterificação do óleo de soja. Na quantificação das reações de metanólise, o rendimento pode ser calculado diretamente, como será discutido nos resultados e discussão. Para a quantificação por RMN na etanólise do óleo de soja, foi utilizado o método do padrão externo, na qual, misturas binárias do analito (ésteres etílicos) e do material de partida (óleo de soja refinado) foram preparadas resultando num total de 13 misturas (Tabela 8).

Tabela 8. Misturas preparadas e analisadas por RMN ^1H para a obtenção da curva analítica

Misturas	Ésteres etílicos (%)	Óleo de soja (%)
B0	0	100
B5	5	95
B10	10	90
B20	20	80
B30	30	70
B40	40	60
B50	50	50
B60	60	40
B70	70	30
B80	80	20
B90	90	10
B95	95	5
B100	100	0

Essas misturas foram analisadas por RMN ^1H e a partir de sinais característicos dos espectros (Figura 47, p. 78, discutido posteriormente) foram calculadas as áreas desses sinais (calculadas com o auxílio do programa *ACD/NMR Processor Academic Edition 12.0*) dos ésteres etílicos e comparadas de acordo com as concentrações conhecidas mesmos.

Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente e usando o TMS como calibração interna. Os tempos de relaxação foram medidos para todas as amostras usando uma sucessão de pulso inversão-recuperação. Os parâmetros usados foram: largura espectral, 2604 Hz; tempo de repetição, 3,14 s; largura de pulso, 5 μs (62,5°) e número de varredura de 64. Detalhes sobre os cálculos e construção da curva analítica serão discutidos posteriormente nos resultados e discussão.

Todos os gráficos de rendimentos neste trabalho foram construídos com o auxílio do programa *Microcal Origin 6.0*. A manipulação e tratamentos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram realizados no programa *1D NMR Processor Academic Edition*. As simulações dos espectros foram obtidas com o auxílio dos programas *ACD/HNMR Spectrum 6.0 (Complete)* e no *ChemBioDraw Ultra 11.0*.

Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização dos padrões

Todos os padrões preparados foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e ^{13}C).

4.1.1. Padrões dos ésteres do ácido oléico

Na preparação dos padrões por reação de esterificação do ácido oléico com diversos alcoóis, o material de partida (ácido oléico) e seus ésteres (padrões preparados) apresentam sinais característicos no espectro de RMN ^1H e ^{13}C . Para a análise de RMN ^1H , os sinais que identificam os produtos estão representados na tabela 9 e os espectros ampliados mostrados na figura 31.

Tabela 9. Sinais dos ésteres do ácido oléico correspondentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C

Padrão (sinal)	Próton/Carbono correspondente	Deslocamento do sinal ^1H δ (ppm), J (Hz)	Deslocamento do sinal ^{13}C (ppm)
Oleato de metila (metoxila)		s, 3H, δ 3,67	δ 51,38
Oleato de etila (etoxila)		q, 2H, δ 4,15, $J=7,02$	δ 60,15
Oleato de propila (propoxila)		t, 2H, δ 4,03, $J=6,68$	δ 65,83
Oleato de butila (butoxila)		t, 2H, δ 4,07, $J=6,68$	δ 64,08
$\text{R} = \text{---}(\text{H}_2\text{C})_7\text{---}\text{CH}=\text{CH}\text{---}(\text{CH}_2)_7\text{---CH}_3$

Figura 31. Ampliação dos sinais característicos nos espectros de RMN 1H dos padrões de ésteres do ácido oléico: **A.** Oleato de metila; **B.** Oleato de etila; **C.** Oleato de propila; **D.** Oleato de butila

Nos espectros de RMN ^{13}C , os correspondentes ésteres também apresentam sinais característicos na região entre δ 51,38-65,83 ppm o que levam a confirmação de sua formação (Figura 32).

Figura 32. Ampliação dos sinais característicos nos espectros de RMN ^{13}C dos padrões de ésteres do ácido oléico: **A.** Oleato de metila; **B.** Oleato de etila; **C.** Oleato de propila; **D.** Oleato de butila

Cabe ressaltar que o ácido oléico não possui qualquer sinal na região descrita acima nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Assim é possível identificar os produtos formados e usar os sinais para a identificação e quantificação dos produtos nas reações enzimáticas. Os espectros completos correspondentes aos padrões discutidos acima se encontram nos anexos.

4.2.1. Padrões da transesterificação do óleo de soja

Para a transesterificação do óleo de soja, os padrões foram preparados por catálise básica com metanol e etanol e por catálise ácida com metanol. Os espectros de RMN ^1H do óleo de soja e dos padrões de biodiesel metílico e etílico preparados por catálise básica estão mostrados na figura 33.

Figura 33. Espectros de RMN ^1H : **A.** Óleo de soja; **B.** Padrão por transesterificação básica com etanol; **C.** Padrão por transesterificação básica com metanol

Pela figura 33 é possível observar que o espectro do óleo de soja puro apresenta os **dd** (duplos dubletos) na região de δ 4,22 ppm (espectro **A**), característicos dos prótons metilênicos glicerólicos (**a** e **a'**). Após a reação de transesterificação por catálise básica com etanol (espectro **B**) o padrão produzido apresentou somente um quarteto (**q**) em δ 4,12 ppm dos prótons metilênicos da etoxila ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; **a''**). O mesmo ocorreu na catálise básica

com metanol (espectro **C**), onde se observou apenas um singlete (s) intenso em δ 3,66 ppm dos prótons da metóxila dos ésteres produzidos ($-\text{O}-\text{CH}_3$; **k**). Tanto nos espectros de RMN ^1H para o biodiesel produzido por catálise básica com metanol ou etanol, não foi observado à presença de **dd** dos prótons metilênicos glicerólicos (**a** e **a'**), além disso, os espectros de RMN ^{13}C dos ésteres metílicos e etílicos não apresentaram sinais entre δ 62-69 ppm, característicos dos picos glicerólicos de TAG, DAG, MAG e glicerol assim evidenciando um rendimento quantitativo (Figura 34).

Figura 34. Espectros de RMN ^{13}C : **A.** Óleo de soja; **B.** Padrão por transesterificação básica com etanol; **C.** Padrão por transesterificação básica com metanol

As ampliações dos principais sinais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do óleo de soja, ésteres metílicos e ésteres etílicos estão mostradas na figura 35.

R = cadeia carbônica de ácidos graxos saturados e/ou insaturados

Figura 35. Ampliações dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos padrões de biodiesel produzidos por transesterificação do óleo de soja por catálise básica. **A.** Óleo de soja; **B.** Biodiesel etílico e **C.** Biodiesel metílico

Com relação à reação visando à preparação do padrão de biodiesel a partir do óleo de soja empregando metanol por catálise ácida (H_2SO_4), pode-se observar que, apesar do maior tempo reacional (8h) em relação à catálise básica (30 min), a reação não foi completa, ou seja, restou uma quantidade significativa de triglicerídeos remanescentes (Figura 36, p. 68). Analisando a ampliação do espectro de RMN ^1H , percebe-se claramente que, apesar de possuir um sinal intenso (s, δ 3,66 ppm) correspondente aos prótons da metoxila ($-\text{O}-\text{CH}_3$) dos ésteres metílicos produzidos, ainda existe um conjunto de sinais (dd, δ 4,22 ppm) dos prótons metilênicos glicerólicos dos triglicerídeos. O rendimento dessa reação foi de 80%, calculado de acordo com a equação discutida a seguir.

Figura 36. Ampliação do espectro de RMN ^1H do padrão da transesterificação por catálise ácida usando metanol

Nesse tipo de catálise, o ácido mais usado é o H_2SO_4 (FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984) e dependendo das condições e da matéria prima, pode resultar em bons rendimentos, porém a reação é muito lenta comparada com a catálise alcalina (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007), também é necessário utilizar uma razão molar óleo:álcool muito grande (igual ou superior a 1:30) (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000) e raramente esse tipo de catálise é utilizada em escala industrial, pois acarreta a corrosão de equipamentos e das tubulações. No entanto, quando o conteúdo de ácidos graxos na matéria prima for alto (acima de 3%), a catálise ácida é preferível, pois apresenta a vantagem de não formar sabão (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

O triéster oléico, que foi preparado e caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C , apresenta sinais muito similares com os espectros do óleo de soja no qual contém triglicerídeos em sua grande parte (>99%). A principal diferença é que no espectro de RMN ^1H do triéster oléico não apresenta o tripleto dos prótons bis-álílicos ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{}$) entre ligações duplas (**d**, δ 2,77

ppm, espectro **A**) e o tripleto dos prótons metilênicos α -metílicos (**i**, δ 0,97 ppm, espectro **A**) (Figura 37).

Figura 37. Espectros de RMN ^1H e ampliações dos sinais **d** e **i** do óleo de soja: **A.** Óleo de soja; **B.** Triéster oléico do glicerol

Os espectros de RMN ^{13}C do óleo de soja e do triéster oléico também apresentam grande similaridade. No entanto, o espectro de RMN ^{13}C de óleo de soja apresenta vários sinais de ligações duplas na região entre δ 127,93-130,22 ppm e o espectro de RMN ^{13}C do triéster oléico apresenta somente dois sinais de ligações duplas (δ 129,72; 130,03ppm) (Figura 38, p. 70).

Isso ocorre porque os triglicerídeos do óleo de soja contêm uma maior variedade de ácidos graxos insaturados em sua cadeia alquílica, enquanto que o triéster oléico apresenta apenas uma única ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 (18:1, 9c) localizada no mesmo local da cadeia carbônica do ácido graxo (oléico) que compõe sua estrutura, dessa forma, apresenta apenas dois sinais de ligações duplas no espectro de RMN ^{13}C .

Figura 38. Espectros de RMN ^{13}C do óleo de soja (A) e do triéster oléico (B). Ampliações das regiões das ligações duplas (δ 120-140 ppm)

4.2. Quantificação dos produtos

4.2.1. Cromatografia a Gás

A cromatografia a gás foi utilizada para a quantificação dos ésteres de ácidos graxos produzidos tanto por reação de esterificação do ácido oléico quanto por transesterificação do óleo de soja. Os outros compostos produzidos na reação de transesterificação (mono- e diglicerídeos) bem como os triglicerídeos remanescentes foram quantificados com base nos ésteres de ácidos graxos produzidos. O glicerol presente em pequenas quantidades no biodiesel, foi quantificado com o uso do padrão interno 1,2,4-butanotriol. Tanto na esterificação quanto na transesterificação foi empregado o método do padrão interno.

Para a quantificação do biodiesel produzido nas reações de esterificação do ácido oléico com os quatro alcoóis via catálise enzimática, quatro curvas analíticas foram preparadas. As razões das áreas ($A_{\text{analito}}/A_{\text{P.I.}}$) e das concentrações ($C_{\text{analito}}/C_{\text{P.I.}}$) foram plotadas em um gráfico, sendo possível obter as equações das retas para serem utilizadas na quantificação das reações enzimáticas.

Com os valores das áreas dos sinais, foi possível conhecer a razão das concentrações e das áreas dos mesmos e dessa forma construir um gráfico para obter a equação da reta ($Y = A + BX$), onde A = coeficiente linear, B = coeficiente angular, X = razão das concentrações e Y = razão das áreas, que foi utilizada para a quantificação do analito nas reações enzimáticas. Como na equação da reta o eixo Y é representado por ($A_{\text{analito}}/A_{\text{P.I.}}$) e o eixo X por ($C_{\text{analito}}/C_{\text{P.I.}}$), para se encontrar a concentração do seu analito na amostra desconhecida, usou-se o seguinte cálculo:

$$C_A = \frac{C_P(Y - A)}{B} \quad (1)$$

Onde C_A é a concentração do analito na amostra desconhecida; C_P é a concentração do padrão interno; Y é a razão ($A_{\text{analito}}/A_{\text{P.I.}}$); A é o coeficiente linear e B o coeficiente angular, sendo que A e B foram obtidos através da equação da reta.

No caso da transesterificação do óleo de soja, foi utilizado o padrão preparado por catálise básica como analito (item 3.3.1). Cinco misturas do padrão de biodiesel via catálise básica (analito em concentrações conhecidas) e do P.I. (tricaprina em concentração fixa) foram preparadas. Essas amostras foram analisadas por CG-FID e as razões das áreas ($A_{\text{analito}}/A_{\text{P.I.}}$) e das concentrações ($C_{\text{analito}}/C_{\text{P.I.}}$) foram plotadas em um gráfico, sendo assim possível obter as equações das retas que foram utilizadas na quantificação das reações de transesterificação enzimática.

Para a quantificação do glicerol, o mesmo método foi utilizado, porém o padrão interno foi o 1,2,4-butanotriol. Um total de 8 misturas de glicerol e do P.I. foram preparadas, analisadas por CG-FID e as áreas dos picos obtidas por integração, sendo assim possível o cálculo das razões ($A_{\text{analito}}/A_{\text{P.I.}}$) e ($C_{\text{analito}}/C_{\text{P.I.}}$), obtendo uma equação da reta que foi utilizada para a quantificação das reações de transesterificação enzimática.

O ácido oléico e os seus ésteres produzidos apresentaram diferentes tempos de retenção (1 oleato de metila em 7,48 min., 2 ácido oléico em 7,95 min., 3 oleato de etila em 8,30 min., 4 oleato de propila em 9,62 min. e 5 oleato de butila em 9,92 min.) no método cromatográfico usado, dessa forma foi possível, com o auxílio do P.I., quantificar todos os produtos formados nas reações enzimáticas. O cromatograma da mistura dos padrões preparados, juntamente com o ácido oléico e a tricaprina é mostrada na figura 39.

Figura 39. Cromatograma da mistura dos ésteres do ácido oléico: **1.** Oleato de metila; **2.** ácido oléico; **3.** Oleato de etila; **4.** Oleato de propila; **5.** Oleato de butila; **6** P.I. (tricaprina)

Para cada éster do ácido oléico produzido com diferentes alcoóis, foi construída uma curva analítica, resultando num total de quatro curvas, as quais foram usadas para a quantificação das reações de esterificação enzimáticas. A seguir, estão representadas as curvas analíticas obtidas para todos os alcoóis usados onde foi possível obter boas correlações entre os pontos (Figura 40, p. 73). Os rendimentos das reações de preparação dos ésteres do ácido oléico foram acima de 95%, dessa forma foram submetidos à purificação por cromatografia *flash* para que pudessem servir como padrões na curva analítica.

Figura 40. Curvas analíticas utilizadas na quantificação das reações de esterificação do ácido oléico: **A.** Oleato de metila; **B.** Oleato de etila; **C.** Oleato de propila; **D.** Oleato de butila

Todas as reações de transesterificação enzimática do óleo de soja foram quantificadas por CG-FID. Porém, as reações de transesterificação do óleo de soja com etanol empregando a lipase de *C. antarctica*, também foram quantificadas por RMN ^1H . Após preparadas as soluções e analisadas por CG-FID, foram obtidos os cromatogramas conforme mostrados na figura 41 (p. 74).

Figura 41. Cromatogramas obtidos pela análise em CG-FID. (a) (1) Biodiesel (ésteres etílicos) obtidos por catálise básica; (b) (2).Biodiesel (ésteres etílicos) obtidos por transesterificação enzimática do óleo de soja (reação 4, Tabela 13, p. 96); (3) padrão interno tricaprina; (c) padrões comerciais: MAG (monooleína) (4); DAG (1,3-dioleína) (5); TAG (trioleína) (6)

Com os valores das integrais das áreas dos picos cromatográficos e de acordo com a concentração analisada do analito, foi possível obter uma curva analítica que foi usada na quantificação dos ésteres etílicos produzidos pelas reações enzimáticas por lipase de *C. antarctica* (Figura 42).

Figura 42. Curva analítica obtida por CG-FID utilizada para a quantificação das reações de transesterificação do óleo de soja com etanol por lipase de *C. antarctica*

Para a análise do glicerol, ou seja, para quantificar o conteúdo de glicerol no biodiesel produzido nas reações de transesterificação para a preparação dos padrões de biodiesel metílico e etílico e para sua quantificação nas reações de transesterificação enzimáticas

também foi utilizado o método do padrão interno, porém o P.I. usado foi o 1,2,4-butanotriol. A seguir, está representado a ampliação dos cromatogramas contendo glicerol e 1,2,4-butanotriol (Figura 43).

Figura 43. Cromatograma do biodiesel antes da lavagem com água, mostrando os sinais do glicerol e do 1,2,4-butanotriol (P.I.) com ampliação da região do cromatograma

Em todas as amostras dos produtos resultantes da transesterificação, tanto nos padrões analisados não foi detectado glicerol após a lavagem do biodiesel com água destilada. No entanto, o glicerol foi detectado em pequenas quantidades antes da lavagem. Para fazer essa quantificação, uma curva analítica foi construída e usada na quantificação do glicerol antes da lavagem com água. Essa metodologia foi empregada para provar que o procedimento de lavagem foi eficiente. A curva é mostrada na figura 44 (p. 76).

É importante ressaltar que o método descrito no procedimento experimental para a análise dos ésteres produzidos por reação de esterificação do ácido oléico e transesterificação do óleo de soja também foi utilizado na quantificação do glicerol, ou seja, foi possível com o mesmo método cromatográfico, quantificar todos esses compostos no biodiesel.

Figura 44. Curva analítica obtida por CG usada para a quantificação de glicerol no biodiesel antes da lavagem com água

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

A RMN foi utilizada na quantificação dos padrões produzidos via catálise ácida e alcalina e nas reações de transesterificação enzimáticas com etanol empregando lipase de *C. antarctica*.

O primeiro estudo na literatura sobre a utilização da RMN ^1H para a análise quantitativa de reações de transesterificação usando metanol foi em 1995 utilizando o óleo de canola (GELBARD et al., 1995). O método proposto utilizou uma relação entre as áreas dos sinais referentes aos prótons metilênicos α -carbonílicos ($-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$, t, δ 2,30 ppm) e a área do prótons metoxílicos ($\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-$, s em δ 3,66 ppm). Em nosso trabalho, foram usados os mesmos sinais descritos acima nas reações de transesterificação empregando metanol (Figura 45, p. 77).

Figura 45. Sinais dos prótons usados na quantificação da transesterificação de triglicerídeos com metanol

Como não houve nenhuma sobreposição dos sinais de interesse no espectro de RMN ^1H , o rendimento da reação pode ser calculado diretamente pela equação abaixo:

$$C = 100. \left(\frac{2A_{Me}}{3A_{\alpha-CH_2}} \right) \quad (2)$$

Onde C é a percentagem de conversão dos triglicerídeos nos correspondentes ésteres metílicos, A_{Me} é o valor da integral dos prótons da metoxila do biodiesel (s, 3H, 3,66 ppm) e $A_{\alpha-CH_2}$ o valor da integral dos prótons α -metilênicos (t, 2H, 2,30 ppm, $J=7,02$). Os coeficientes usados na equação são referentes à quantidade de prótons presentes na molécula dos ésteres metílicos, ou seja, 2 e 3 derivam a partir do fato de que o carbono da metoxila contém 3 prótons e o carbono α -metilênico contém 2 prótons (KNOTHE; GERPEN, 2005).

No espectro de RMN ^1H do óleo de soja (triglicerídeos), existe um conjunto de sinais característicos (duplos dubletos, **dd**, δ 4,22 ppm) que influenciam de forma significativa a quantificação no cálculo da área por RMN ^1H para a determinação do rendimento da reação de transesterificação com etanol (ROSSET et al., 2011). Esses duplos dubletos são resultados de um sistema presente nos triglicerídeos conhecido como glicerólico, pois é derivado do glicerol (JIN et al., 2007). A estrutura da conformação mais estável de uma molécula de triglicerídeo é mostrada na figura 46 (p. 78).

Figura 46. Representação estrutural da conformação mais estável de um triglicerídeo

O deslocamento químico do próton H_A aparece em campo mais baixo no espectro que o $H_{A'}$, isso ocorre, pois o próton H_A situa-se entre os grupos $-O-CO-R_2$ e $-CH_2-O-CO-R_1$, o que resulta na formação de duplos dubletos (**dd**, 2H, δ 4,13, $J_{a1}=11,90$ e $J_{a2}=4,58$ e **dd** δ 4,30, 2H, $J_{a'1}=11,90$ e $J_{a'2}=4,58$) nos triglicerídeos. Na quantificação da reação de transesterificação com etanol ocorre sobreposição de sinais dos prótons da etoxila ($-O-CH_2-CH_3$, **q**, 2H δ 4,12, $J=7,02$) do éster etílico produzido (biodiesel) com os prótons metilênicos do triglicerídeo (**dd** δ 4,10-4,34 ppm) (Figura 47).

Figura 47. Sobreposição dos sinais dos triglicerídeos (**a'**) com o do etil éster (**a''**) usados para a quantificação da reação de transesterificação por RMN 1H

No caso da transesterificação empregando etanol, o primeiro método proposto para a quantificação por RMN 1H da reação foi descrito por Costa Neto em 2004. O mesmo método

foi empregado em nosso trabalho, no entanto, com o objetivo de ser utilizado na quantificação das reações enzimáticas. Assim, misturas do analito (biodiesel etílico) e do material de partida (óleo de soja) foram preparadas em várias concentrações conhecidas (procedimento experimental, item 3.5.2) e analisadas por RMN ^1H . Quando a conversão de triglicerídeos em biodiesel é completa, essa sobreposição não afeta a quantificação, pois o espectro de RMN ^1H do etil éster produzido apresentará apenas os sinais dos prótons da etoxila (**q**, δ 4,12 ppm). No entanto, quando a conversão é parcial, não é possível calcular as áreas desses sinais de forma segura, assim sendo necessária a obtenção de uma curva analítica (COSTA NETO et al., 2004).

Nessa dissertação, para uma melhor visualização, o duplos dubletos nos triglicerídeos em δ 4,13 ppm foram divididos em duas partes, sendo que a designação **a'** corresponde ao sinal em δ 4,13 ppm, **a** corresponde ao sinal em δ 4,30 ppm e o quarteto da etoxila do etil éster produzido ficou designado como **a''**, que corresponde ao sinal em δ 4,12 ppm. Neste caso, os sinais designados **a'** e **a''** estão sobrepostos nestas regiões (Figura 47, p. 78).

As misturas, preparadas em concentrações crescentes de biodiesel em relação ao óleo de soja foram analisadas por RMN ^1H . Na figura 48 são mostradas algumas ampliações dos sinais nas amostras que contêm 0, 30, 50, 70 e 100% de biodiesel em óleo de soja respectivamente.

Figura 48. Expansões dos sinais no espectro de RMN ^1H na região entre δ 4,00-4,40 ppm das amostras de 0, 30, 50, 70 e 100% de biodiesel, respectivamente

Na amostra que contém apenas óleo de soja (0% de biodiesel), os sinais foram designados como **a** e **a'** e na última amostra a qual contém apenas biodiesel (100%) o único sinal foi designado como **a''**. Em todas as outras 11 misturas (5,0-95,0% de biodiesel em relação ao óleo de soja) os sinais resultantes da sobreposição de **a'** e **a''** (δ 4,07-4,18 ppm) foi chamado de **a'+a''**, pois contém tanto o sinal **a'** do triglicerídeo (δ 4,13 ppm) quanto o sinal **a''** do etil éster formado (δ 4,12 ppm) (Figura 48). Para a construção da curva analítica pelo método do

padrão externo, foi calculada a razão das áreas desses sinais. As ampliações dos espectros de RMN ^1H de todas as 13 amostras analisadas são mostradas na figura 49.

Figura 49. Expansões dos sinais no espectro de RMN ^1H na região entre δ 4,00-4,40 ppm em todas as amostras analisadas para a construção da curva analítica

A partir dos valores das integrais calculados para esses conjuntos de sinais, foi construída uma curva analítica com um decaimento exponencial de primeira ordem fornecendo a equação $y = y_0 + A_1 e^{x/t_1}$, onde x é a razão das áreas ($a/a' + a''$), y é a porcentagem de biodiesel, e y_0 , A_1 e t_1 são os valores do decaimento exponencial como descrito pela equação diferencial de primeira ordem (Figura 50 A). Para simplificar os cálculos de conversão de biodiesel, foi realizada uma regressão linear da curva exponencial, obtendo uma equação da reta na forma $Y = A + Bx$, onde A é o coeficiente linear, B é o coeficiente angular e x é a razão das áreas ($a/a' + a''$) (Figura 50 B).

Figura 50. A. Curva analítica exponencial obtida e B. Regressão linear da curva exponencial

Dessa forma, a partir da curva analítica obtida, foi possível quantificar as reações de transesterificação enzimática com etanol para a produção de biodiesel. Os rendimentos de todas as reações enzimáticas são discutidos a seguir.

4.3. Reações enzimáticas

4.3.1. Esterificação e transesterificação com várias enzimas

Foram avaliadas sete enzimas em reações de esterificação do ácido oléico e de transesterificação do óleo de soja. Lipases de *Candida antarctica* (Novozyme 435[®]), *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Hog pancreas*, *Porcine pancreas*, *Rhizopus niveus* e *Pseudomas fluorescens*. Os resultados foram expressos em percentagem de conversão (Tabela 10, p. 83 e Tabela 11, p. 84).

A lipase que apresentou o melhor desempenho nas duas reações foi a lipase de *Candida antarctica* (Novozyme 435[®]) (Figura 51). Várias enzimas já foram reportadas na literatura para a produção de biodiesel com diversos óleos e alcoóis em condições reacionais variadas. Estudos semelhantes mostram que a lipase de *C. antarctica* em reações de transesterificação forneceu altos rendimentos (79,1%) empregando óleo de girassol (MITTELBAACH, 1990); (DENG et al., 2005), pinhão-mansão (91,3%) (MODI et al., 2007) e óleo de peixe (100%) (BREIVIK; HARALDSSON; KRISTINSSON, 2007).

Figura 51. Rendimentos obtidos por CG-FID das reações de transesterificação e esterificação do óleo de soja e do ácido oléico com várias enzimas (1. *Candida antarctica*; 2. *Candida rugosa*; 3. *Candida cylindracea*; 4. *Porcine pancreas*; 5. *Hog pancreas*; 6. *Rhizopus niveus* e 7. *Pseudomonas fluorescens*)

Muitos trabalhos demonstram que dentre todas as lipases usadas em reações de transesterificação nos mais diferentes tipos óleos e gorduras (soja, girassol, babaçu, pinhão-mansão, palma, coco, algodão, farelo de arroz, peixe, óleo de fritura e gordura animal) empregando diversos alcoóis (metanol, etanol, propanol, 2-propanol, butanol, *t*-butanol), as lipases do gênero *Candida* (*C. antarctica*, *C. rugosa*, *C. cylindracea* e *Candida* sp.) são as que apresentaram os melhores rendimentos para conversão em mono ésteres (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Pelo gráfico da figura 52 (p. 83) pode-se observar que a lipase de *C. antarctica* (1) apresentou melhor conversão dos triglicerídeos em etil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (83,6%), o restante (16,3%) são mono- e diglicerídeos formados e uma pequena quantidade triglicerídeos remanescente (0,1%) e não foi detectado glicerol após lavagem do produto. Todas as outras lipases apresentaram menores rendimentos de biodiesel (<25%) sendo que dentre as outras lipases a de *Pseudomonas fluorescens* (7) apresentou um maior rendimento de biodiesel (23,7%), porém restou uma grande quantidade de triglicerídeos que não sofreram transesterificação (40,7%) (Tabela 10, p. 83). Um estudo realizado por Deng e colaboradores em 2005 demonstrou que essa mesma lipase forneceu um rendimento de 45,3% na transesterificação do óleo de girassol com isobutanol e que essa lipase prefere alcoóis alifáticos de maior caráter hidrofóbico (DENG et al., 2005). Em todas as amostras, a CG-FID foi utilizada como o método de quantificação.

Figura 52. Componentes presentes nos produtos (biodiesel, mono-, di-, triglicerídeos e glicerol) nas reações de transesterificação empregando várias enzimas (1. *Candida antarctica*; 2. *Candida rugosa*; 3. *Candida cylindracea*; 4. *Porcine pancreas*; 5. *Hog pancreas*; 6. *Rhizopus niveus* e 7. *Pseudomonas fluorescens*). *Glicerol não detectado após lavagem dos produtos

Todas as outras lipases empregadas nas reações de transesterificação apresentaram baixos rendimentos de conversão em biodiesel (<15%) nas condições reacionais empregadas (Tabela 10). Trabalhos na literatura mostram que a lipase de *C. rugosa* apresentou ótimo rendimento (97%) na reação de transesterificação do óleo de canola empregando um álcool de maior cadeia (2-etil-1-hexanol) (LINKO, et al., 1998). Outro estudo demonstrou que a lipase de *C. cylindracea* forneceu um rendimento de 97% frente à transesterificação do óleo de soja com metanol, porém, foi empregado óleo diesel como co-solvente e não na forma livre como foi utilizada pelo nosso grupo de pesquisa (ROYON et al., 2007). Em nosso estudo não foi detectado glicerol nas amostras de biodiesel após lavagem com água destilada.

Tabela 10. Rendimentos das reações de transesterificação do óleo de soja com várias enzimas

Enzima	Biodiesel (%) ^a	Monoglicerídeos (%)	Diglicerídeos (%)	Triglicerídeos (%)	Glicerol (%) ^{b,c}
<i>Candida antarctica</i>	83,6	13,6	2,7	0,1	nd
<i>Candida rugosa</i>	16,2	1,5	19,3	63,1	nd
<i>Candida cylindracea</i>	1,8	nd	6,9	91,2	nd
<i>Porcine pancreas</i>	2,7	0,1	8,4	88,7	nd
<i>Hog pancreas</i>	13,8	2,2	15,2	68,9	nd
<i>Rhizopus niveus</i>	0,2	0,3	6,7	92,7	nd
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23,7	2,6	33,0	40,7	nd

^a Quantificado com o uso do P. I. tricaprina.

^b Quantificado com o uso do P. I. 1,2,4-butenotriol.

^c Rendimento calculado após lavagem do produto com água.

nd = não detectado.

Com relação à reação de esterificação do ácido oléico, todas as enzimas utilizadas (com excessão da *Pseudomonas fluorescens*) apresentaram melhores conversões para o éster etílico do ácido oléico (oleato de etila) do que nas transesterificações do óleo de soja. Novamente, a lipase de *C. antarctica* mostrou maior eficiência na conversão do ácido oléico para oleato de etila frente as outras enzimas (96,5%) (Figura 51). Os rendimentos estão mostrados na tabela 11.

Tabela 11. Rendimentos das reações de esterificação do ácido oléico com várias enzimas

Enzima	Conversão para oleato de etila (%) ^a
<i>Candida antarctica</i>	96,5
<i>Candida rugosa</i>	23,4
<i>Candida cylindracea</i>	11,1
<i>Porcine pâncreas</i>	4,2
<i>Hog pâncreas</i>	22
<i>Rhizopus niveus</i>	nd
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	nd

^aQuantificado por CG-FID.

A grande maioria dos trabalhos na literatura apresenta resultados de transesterificações de óleos e gorduras frente a diversos alcoóis, porém, trabalhos referentes a reações de esterificação enzimáticas de ácidos graxos livres não são comumente explorados. Um único trabalho empregando a lipase de *C. antarctica* na esterificação do ácido oléico foi descrito. Nele, a lipase de *C. antarctica* forneceu um rendimento de 95% de oleato de etila em condições semelhantes (MARCHETTI; ERRAZU, 2008). Esse resultado corrobora com o obtido nesse trabalho, mostrando que essa enzima é eficiente nesse tipo de reação.

Com os resultados apresentados acima, a lipase de *C. antarctica* foi selecionada para os próximos estudos, devido a sua eficiência.

4.3.2. Esterificação enzimática do ácido oléico empregando lipase de *Candida antarctica*

A reação de esterificação enzimática do ácido oléico com lipase de *C. antarctica* e vários alcoóis (MeOH, EtOH, PrOH e BuOH) foi avaliada sobre diversos fatores que influenciam nesse tipo de catálise, os quais foram: quantidade de enzima, tipo do álcool, tempo de reação, água adicionada no meio e reuso do biocatalisador.

No estudo da quantidade de enzima empregada, foi observado que quanto maior a quantidade de biocatalisador, maior o rendimento da reação (Figura 53, p. 85 e Tabela 12, p.

91). Quando usado etanol e *n*-propanol na esterificação do ácido oléico, 1,0% de enzima já foi suficiente para que o rendimento da reação ultrapassasse 90% (93,1 e 91,1% respectivamente) após 24 horas de reação (Tabela 12, p. 91). Um recente trabalho na literatura mostrou que 2,24% da lipase de *C. antarctica* (Novozyme 435®) em condições reacionais semelhantes forneceu um rendimento de 95% com etanol após 24 horas (MARCHETTI; ERRAZU, 2008). Para o *n*-butanol, foram necessários 2,5% de enzima para alcançar 90% de rendimento.

Figura 53. Estudo da quantidade de catalisador empregada na reação de esterificação do ácido oléico com a lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

Foi possível perceber também que com a utilização de metanol na esterificação enzimática do ácido oléico, a curva apresentou um comportamento muito diferente em relação aos demais alcoóis, sendo que foram necessários 5,0% de enzima para que o rendimento da reação ultrapassasse os 90% (90,8%). Isso deve ter ocorrido devido à presença do metanol estar inibindo ou inativando a enzima de alguma forma. Mais detalhes serão discutidos posteriormente sobre o efeito do metanol na reação.

Para o estudo do tipo de álcool empregado, a quantidade de enzima foi estabelecida em 5,0% e um tempo de reação de 24 horas. Comparando-se os quatro alcoóis, o rendimento da reação não foi alterado significativamente, mostrando que a enzima promove a esterificação do ácido oléico com todos esses alcoóis com bons rendimentos. O melhor resultado foi obtido com o uso do etanol (96,5% de rendimento) (Figura 54, p. 86 e Tabela 12, p. 91).

Figura 54. Estudo do tipo de álcool empregado na reação de esterificação do ácido oléico com a lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

Alcoóis primários e secundários de cadeia não ramificada são os mais empregados em reações de esterificação e transesterificação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Alcoóis de cadeia longa (acima de 6 carbonos) também mostram-se efetivos, no entanto forneceram um rendimento inferior ao obtido com metanol (COGGON; VASUVEDAN; SANCHEZ, 2007). Os alcoóis mais comumente utilizados são: metanol, etanol, *n*-propanol, 2-propanol, *n*-butanol e iso-butanol (ISO et al., 2001). Estudos da reação de transesterificação com lipase de *Pseudomonas cepacia* com os alcoóis acima mostrou que o metanol apresentou o menor rendimento (40%) em relação ao etanol (93%) e *n*-propanol (99%) (SALIS et al., 2005).

O tempo de reação é um dos fatores que mais requer atenção para um processo ser aplicado industrialmente por catálise enzimática. Otimizações de tempo reacionais devem ser feitas para que o processo possa ser aplicado. Desde o início dos estudos para a produção de biodiesel via catálise enzimática, praticamente todos os trabalhos citam que o uso de enzimas nesse processo necessita de maior tempo para que a reação ocorra em comparação à catálise básica. De fato, a taxa de velocidade reacional do processo enzimático comparada, por exemplo, com o processo alcalino é consideravelmente menor (ZHANG et al., 2003).

Os nossos resultados neste trabalho mostraram que para um tempo reacional variando de 1-24 horas, somente o *n*-propanol conseguiu um rendimento superior a 90% (91,7%) após 8 horas de reação (Figura 55, p. 87 e Tabela 12, p. 91). Esse é um tempo que pode ser equiparado com a catálise ácida (PINTO et al., 2005). Para os outros alcoóis (etanol e *n*-butanol), foram necessárias 15 horas para que o rendimento alcançasse 90% (92,0 e 89,9%

respectivamente). Somente para o metanol foi preciso um tempo de 24 horas para que obtivesse um rendimento satisfatório (90,8%).

Figura 55. Estudo do tempo de reação na esterificação do ácido oléico empregando lipase de *C. antarctica*

Na literatura, o tempo de reação na esterificação do ácido oléico com lipases foi pouco explorado. Um trabalho de Marchetti e colaboradores em 2008 mostrou que foram necessárias 24 horas de reação para que a lipase de *C. antarctica* fornecesse um rendimento superior a 95% na presença de etanol. Nesse mesmo estudo, a lipase *Lipozyme* TL 110L[®] foi empregada na esterificação do ácido oléico e mesmo com 72 horas de reação (3 dias) seu rendimento foi menor que 10% (MARCHETTI; ERRAZU, 2008). Esses resultados sugerem que o tempo de reação é diretamente influenciado pelas características da enzima.

Outro fator que é fundamental nesse tipo de reação é a quantidade de água presente no álcool, ou seja, seu grau de hidratação. Biocatalisadores frequentemente requerem uma quantidade de água presente para manter sua atividade (JEGANNATHAN et al., 2008). Esse é um importante fator em reações de transesterificação e esterificação quando catalisadas enzimaticamente. A água é essencial para manter a estrutura tridimensional específica da enzima e sua total remoção pode levar a mudanças irreversíveis em sua estrutura (LU et al., 2009). A ativação da enzima envolve o desmascaramento e a reestruturação do seu sítio ativo através de mudanças conformacionais, a qual requer a presença da interface óleo-água. A atividade da lipase geralmente depende da área interfacial disponível. Com o aumento da adição de água, a quantidade de água disponível para formar gotículas óleo-água aumenta, assim, aumentando a área interfacial disponível. O conteúdo ótimo de água está de acordo

entre a mínima hidrólise e a máxima atividade da enzima na reação (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005).

Em nosso estudo, mistura de álcool e água foram preparadas (entre 0,5-4,0% de água) para serem usadas nas reações de esterificação do ácido oléico. Os resultados sugerem que a presença de água afeta diretamente o rendimento da reação utilizando metanol. Quando se utilizou apenas metanol anidro, o rendimento da reação foi de 90,8% com 5,0% de enzima. Porém, o acréscimo de 0,5% de água no meio fez com que o rendimento aumentasse em 7,6%, indo para 98,4% (Figura 56, p. 88 e Tabela 12, p.91). Isso pode ter ocorrido devido que na ausência de água, o metanol pode estar removendo a água estrutural da enzima e desidratando-a, dessa forma fazendo com que perca sua atividade pela modificação de sua estrutura. Na presença de água, esse efeito é suprido, assim aumentando sua eficiência. O rendimento da reação seguiu de acordo com o comprimento da cadeia dos alcoóis (98,4% para metanol até 92,1% para *n*-butanol).

Figura 56. Estudo da quantidade de água adicionada no álcool (hidratação) na esterificação do ácido oléico empregando a lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

A quantidade ideal de água é dependente de fatores como: sistema usado, matéria-prima (óleo, gordura ou ácido graxo), tipo de lipase (fonte e imobilização), estabilidade da enzima e tipo do álcool usado (JEGANNATHAN et al., 2008). Para algumas lipases, como por exemplo, *Candida rugosa*, *Pseudomona cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*, se o meio reacional estiver ausente de água a reação praticamente não ocorre. Essas lipases mostram um aumento expressivo na taxa de reação com o aumento do conteúdo de água entre 1 a 20% (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). Em reações de transesterificação, a lipase de *Candida antarctica* mostra um decréscimo de rendimento na presença de água

(DENG et al., 2005). Nas reações realizadas pelo nosso grupo, pôde-se observar que houve um pequeno decréscimo no rendimento para todos os alcoóis, comparando entre 0,5-4,0% de água. A diminuição do rendimento foi menos acentuada para o etanol (0,3%) e mais para o *n*-butanol (3,8%). É importante ressaltar que o subproduto da reação de esterificação é água, o que também pode afetar o resultado da reação. Deve-se destacar que o uso da catálise enzimática na presença de grande quantidade de ácidos graxos não prejudica a reação, como ocorre na transesterificação via catálise básica, pois a grande quantidade desses compostos pode resultar em reações paralelas, como formação de sabões.

A reciclagem e o reuso de enzimas é um fator crucial para seu emprego na produção de biodiesel. Para que sua utilização possa se tornar viável, além de abaixar os preços, é necessário que as enzimas sejam reutilizadas, mas que continuem mantendo seu alto desempenho (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). A imobilização da enzima é uma importante ferramenta usada para melhorar sua estabilidade, longevidade e durabilidade, além de facilitar sua recuperação por uma simples filtração (BHUSHAN et al., 2008).

Em nosso trabalho, as reações de reuso da lipase de *C. antarctica* foram executadas em 10 ciclos consecutivos de reações foram realizados para cada álcool, resultando num total de 40 reações. Excelentes resultados foram obtidos para todos os alcoóis, com exceção do metanol (Figura 57, p. 90 e Tabela 12, p. 91). Com o uso do metanol ao final dos 10 ciclos reacionais, o rendimento que era de 90,8% (ciclo 1) caiu drasticamente para 0,09% (ciclo 10). Essa enorme queda vem do fato que o metanol possa estar inibindo ou até mesmo inativando (desnaturando) a enzima pela modificação na sua estrutura tridimensional.

Figura 57. Estudo do reuso da enzima na esterificação enzimática do ácido oléico empregando lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

Estudos mostram que o grau de desativação é inversamente proporcional ao número de átomo de carbono presente no álcool, na qual, o metanol apresenta maior influência (CHEN; WU, 2003; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008) e que o uso do etanol sobre o metanol aumenta a taxa de velocidade de reações de esterificação e transesterificação (ANTCZAK et al., 2009). Já foi reportado que a lipase foi desativada com o uso do metanol (insolúvel) na forma de gotas em óleos e gorduras (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007; SALIS et al., 2005). Além do mais, o glicerol formado durante a reação pode aderir à superfície do suporte da enzima e inativá-la (KUMARI et al., 2009). Em reações de transesterificação, a lipase imobilizada de *C. antarctica* (Novozyme 435®) foi inativada com o uso de 1,5 equivalentes de metanol em relação ao óleo. Entretanto, esse efeito pode ser minimizado se o metanol for adicionado em etapas (SHIMADA et al., 1999).

Os rendimentos das reações em todos os experimentos descritos acima estão mostrados na tabela 12 (p. 91).

Resultados e Discussão

Tabela 12. Rendimentos das reações em todos os parâmetros avaliados na esterificação do ácido oléico com a lipase de *C. antarctica*

Parâmetro	Rendimento (% de éster oléico) ^a			
Quantidade de catalisador m(g); (%)	MeOH	EtOH	PrOH	BuOH
0,005; (0,1)	1,0	46,3	40,6	17,8
0,0125; (0,25)	2,1	67,0	62,8	34,0
0,025; (0,5)	2,5	82,4	79,6	54,4
0,05; (1,0)	6,3	93,1	91,1	74,1
0,125; (2,5)	21,9	95,1	94,0	89,7
0,25; (5,0)	90,8	96,5	95,0	91,0
Tempo de reação ^b (h)				
1	31,5	35,2	30,1	24,2
4	46,7	52,4	79,5	60,1
8	72,1	78,9	91,7	78,3
15	80,2	92,4	92,0	89,9
24	90,8	96,5	95,0	91,0
Água ^b (%)				
0,5	98,4	95,4	94,3	92,1
1,0	98,5	95,7	94,0	91,6
1,5	98,1	95,8	93,5	91,2
2,0	98,0	95,2	93,2	90,4
4,0	97,1	95,1	91,0	88,3
Reuso ^b (ciclos)				
1	90,8	96,5	95,0	91,0
2	73,2	96,3	95,2	91,5
3	45,4	96,9	94,8	91,2
4	34,6	96,8	94,9	91,3
5	14,7	95,6	94,6	90,9
6	6,4	95,7	94,4	90,8
7	2,3	95,3	94,7	91,0
8	1,3	95,7	94,3	90,7
9	0,2	95,0	94,6	90,4
10	0,09	95,8	94,2	90,1

^a Rendimentos obtidos por CG-FID.^b 5,0% (m/m) de lipase.

4.3.3. Transesterificação enzimática do óleo de soja empregando lipase de *Candida antarctica*

Para a reação de transesterificação do óleo de soja com lipase de *C. antarctica* foram avaliados alguns fatores que influenciam esse tipo de catálise, os quais foram: quantidade de enzima, tempo de reação, água adicionada no meio e reuso do biocatalisador.

Nesse estudo, foram empregados dois tipos de análises quantitativas: RMN ^1H e CG-FID. Todas as reações enzimáticas foram submetidas às análises por essas duas técnicas, as quais foram comparadas. Como já mencionado, a RMN fornece muitas informações a nível molecular, porém a CG-FID apresenta maior precisão na análise, principalmente de compostos minoritários e é a técnica mais utilizada para análise de biodiesel (MONTEIRO et al., 2008). Portanto, os resultados expressos nos gráficos a seguir foram todos obtidos através da CG-FID.

No experimento que avaliou a quantidade de enzima empregada, pode-se observar que o melhor rendimento foi alcançado com 5,0% de enzima (83,6%) (Figura 58; Tabela 13, p. 96). Como mostrado anteriormente, a reação de esterificação do ácido oléico com etanol utilizando a mesma enzima apresentou um rendimento semelhante (82,4%) com apenas 0,5% de enzima (Tabela 12, p. 91).

Figura 58. Estudo da quantidade de enzima na etanolise do óleo de soja empregando lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

Neste experimento, é importante ressaltar que o uso de 0,1% de enzima (reação 1, Tabela 13, p. 96), o rendimento de ésteres etílicos foi de 35,1% em comparação com os 82,4% de ésteres etílicos obtidos com 5,0% de lipase (reação 5, Tabela 13, p. 96). Dessa forma, fazendo

uma relação entre esses resultados, com uma quantidade de catalisador 50 vezes maior, o rendimento foi superior em 2,4 vezes. Para que o uso de enzimas (livres ou imobilizadas) possa ser aplicado industrialmente, é necessário que se melhore as condições reacionais para que com uma menor quantidade de enzima utilizada se obtenha melhores rendimentos, somente assim, um melhor custo-benefício será alcançado.

Em relação ao tempo de reação na etanolise do óleo de soja, a lipase de *C. antarctica* forneceu um rendimento satisfatório após 24 horas de reação (82,4%) (Figura 59; Tabela 13, p. 96).

Figura 59. Estudo do tempo de reação na etanolise do óleo de soja empregando lipase de *C. antarctica*

Na esterificação do ácido oléico com etanol nas mesmas condições experimentais, após 15 horas, a reação de esterificação forneceu um rendimento superior (92,4%) ao obtido com 24 horas na reação de transesterificação (Tabela 12, p. 91). A reação de esterificação de ácidos graxos é mais rápida do que a transesterificação de triglicerídeos (WARABI; KUSDIANA; SAKA, 2004). Isso ocorre porque a esterificação de ácidos graxos ocorre em apenas uma única etapa, enquanto que a transesterificação de triglicerídeos consistem em três etapas reacionais, formando como intermediários diglicerídeos e monoglicerídeos e glicerol como subproduto (ARANDA et al., 2007).

Porém, é necessário encontrar um balanço entre tempo de reação e quantidade de catalisador. Se a enzima não se mostra muito eficiente, o que não foi o caso, não resolve utilizar uma grande quantidade de catalisador para que a reação ocorra mais rapidamente, pois o uso de uma maior quantidade de enzima não é economicamente viável, devido aos altos custos das lipases em geral.

A quantidade de água adicionada ao etanol também foi avaliada na transesterificação enzimática do óleo de soja. Os resultados mostraram que um acréscimo de até 4,0% de água ao etanol anidro não afetou o rendimento da reação (Figura 60; Tabela 13, p. 96).

Figura 60. Estudo da adição de água ao álcool na etanólise do óleo de soja empregando a lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

Todas as reações apresentaram rendimentos muito próximos, independente da quantidade de água adicionada (0,5-4,0% de água), conforme mostrado na tabela 13 (p. 96). Esses resultados mostram que é possível a utilização do etanol hidratado na reação de transesterificação do óleo de soja com lipase de *C. antarctica*. Todos esses estudos já foram reportados na literatura (ROSSET et al., 2011). Neste caso, é importante destacar que o uso da catálise enzimática com etanol hidratado para a produção de biodiesel é uma das maiores vantagens frente à catálise alcalina, pois nesta última, a presença de água dificulta a obtenção do biodiesel por hidrólise dos ésteres, além da produção de subprodutos indesejáveis como a formação de sabões. Além disso, o etanol anidro usado atualmente nos processos alcalinos para a produção de biodiesel é muito mais caro quando comparado com o etanol hidratado (R\$ 1,23 e R\$ 1,10, respectivamente⁵) (CEPEA).

Nossos resultados mostraram que a enzima de *C. antarctica* pode ser utilizada por 5 ciclos reacionais sem perder a eficiência (Figura 61, p. 95 Tabela 13, p. 96). Quando a enzima é imobilizada, a mesma pode ser reutilizada por muitos ciclos, dependendo das condições experimentais, pois a imobilização mantém sua estabilidade e durabilidade, além de facilitar sua recuperação por filtração (BHUSHAN et al., 2008).

⁵ Preço sem frete e sem impostos.

Figura 61. Estudo do reuso da enzima na etanolise do óleo de soja empregando a lipase de *C. antarctica* após 24 horas de reação

Em nosso estudo, a lipase de *C. antarctica* foi lavada uma vez a cada ciclo com 20 mL com *n*-hexano. O rendimento não foi significativamente alterado após os cinco ciclos reacionais (82,9-84,0%, Tabela 13, p. 96). Muitos estudos têm mostrado que a lavagem da enzima entre o seu uso contribui para aumentar a longevidade da mesma. Um recente trabalho mostrou que a lipase imobilizada de *Rhizopus oryzae* lavada com *t*-butanol entre sua utilização possibilitou seu uso por até 200 ciclos na metanolise de óleo de canola (LI; DU; LIU, 2007). A tabela 13 (p. 96) mostra todos os rendimentos obtidos por CG-FID dos experimentos discutidos.

Tabela 13. Produção de biodiesel por etanolise do óleo de soja com lipase de *C. antarctica*^a

Reação	Enzima m (g); (%)	Tempo (h)	Água (%)	Reuso (ciclos)	EE ^b (%) ^c	MAG ^b (%) ^c	DAG ^b (%) ^c	TAG ^b (%) ^c
Experimento 1 – Quantidade de enzima								
1	0,005 (0,1)	24	-	-	35,1	2,6	17,2	45,1
2	0,025 (0,5)	24	-	-	43,4	7,4	17,9	31,3
3	0,050 (1,0)	24	-	-	46,4	9,3	17,6	26,7
4	0,125 (2,5)	24	-	-	64,3	12,1	14,1	9,6
5	0,250 (5,0)	24	-	-	83,6	13,6	2,7	0,1
Experimento 2 – Tempo de reação								
6	0,250 (5,0)	1	-	-	11,2	3,4	18,2	67,2
7	0,250 (5,0)	4	-	-	30,1	6,7	21,9	41,3
8	0,250 (5,0)	8	-	-	48,4	7,9	21,3	22,4
9	0,250 (5,0)	15	-	-	64,5	9,8	17,2	8,5
10	0,250 (5,0)	24	-	-	84,1	12,9	2,8	0,2
Experimento 3 – Água adicionada ao álcool								
11	0,250 (5,0)	24	0,5	-	82,9	12,8	3,5	0,4
12	0,250 (5,0)	24	1,0	-	84,0	14,3	2,6	0,9
13	0,250 (5,0)	24	1,5	-	83,5	13,9	2,8	0,2
14	0,250 (5,0)	24	2,0	-	83,1	13,2	3,3	0,3
15	0,250 (5,0)	24	4,0	-	82,9	12,8	3,5	0,4
Experimento 4 – Reuso da enzima								
16	0,250 (5,0)	24	-	1	83,5	13,9	2,8	0,2
17	0,250 (5,0)	24	-	2	83,9	14,1	3,1	0,1
18	0,250 (5,0)	24	-	3	84,0	14,3	2,6	0,09
19	0,250 (5,0)	24	-	4	83,1	13,2	3,3	0,3
20	0,250 (5,0)	24	-	5	82,9	12,8	3,5	0,4

^a Glicerol não foi detectado por CG-FID após extração seguida de lavagem com água.^b Ésteres etílicos (**EE**); Monoglicerídeos (**MAG**); Diglicerídeos (**DAG**); Triglicerídeos (**TAG**).^c Todos os rendimentos foram determinados por CG-FID.

Para comparar as duas técnicas de análise, o conteúdo de biodiesel (ésteres etílicos, **EE**) também foi quantificado por RMN ¹H com o auxílio do padrão produzido por catálise básica. A tabela 14 mostra os rendimentos de **EE** quantificados por RMN ¹H.

Tabela 14. Ésteres etílicos (**EE**) produzidos por etanólise com óleo de soja empregando lipase de *C. antarctica*

Reação	Enzima m (g); (%)	Tempo (h)	Água (%)	Reuso (ciclos)	EE (%) ^a
Experimento 1 – Quantidade de enzima					
1	0,005; (0,1)	24	-	-	11
2	0,025; (0,5)	24	-	-	21
3	0,050; (1,0)	24	-	-	32
4	0,125; (2,5)	24	-	-	56
5	0,250; (5,0)	24	-	-	88
Experimento 2 – Tempo de reação					
6	0,250; (5,0)	1	-	-	12
7	0,250; (5,0)	4	-	-	32
8	0,250; (5,0)	8	-	-	54
9	0,250; (5,0)	15	-	-	68
10	0,250; (5,0)	24	-	-	87
Experimento 3 – Água adicionada ao álcool					
11	0,250; (5,0)	24	0,1	-	87
12	0,250; (5,0)	24	0,5	-	88
13	0,250; (5,0)	24	1,0	-	89
14	0,250; (5,0)	24	2,0	-	86
15	0,250; (5,0)	24	4,0	-	87
Experimento 4 – Reuso da enzima					
16	0,250; (5,0)	24	-	1	89
17	0,250; (5,0)	24	-	2	87
18	0,250; (5,0)	24	-	3	88
19	0,250; (5,0)	24	-	4	86
20	0,250; (5,0)	24	-	5	87

^a Todos os rendimentos foram determinados por RMN ¹H.

(**EE**) Ésteres etílicos (biodiesel etílico).

Comparando as reações de **1-10**, observa-se que quando foi utilizada pequena quantidade de catalisador (0,1-2,5%, reações **1-4**) ou em baixos tempos reacionais (1-15h, reações **6-9**), os resultados, em termos de conversão para **EE** entre as duas técnicas apresentam uma grande diferença, como pode ser observado na reação **1** quantificada por CG-FID (35,1%, Tabela 13, p. 96) e a mesma reação quantificada por RMN ¹H (11%, Tabela 14). Essa diferença entre as análises, principalmente nas reações com baixos rendimentos, resulta do fato de que a conversão em biodiesel ainda não foi alta (abaixo de 80%) e que existe uma quantidade relativamente grande de diglicerídeos formados como intermediários da transesterificação, conforme os sinais em δ 4,04-4,21 ppm, como mostrado na figura 63 e figura 64 (p. 99). Pelo gráfico da figura 62 (p. 98) é possível observar que com 15 horas de reação, a quantidade de diglicerídeos presentes no produto ainda é alta (17,2%), porém, após 24 horas a quantidade desses compostos diminui em mais de 6 vezes (2,8%).

Figura 62. Composição do biodiesel produzido por etanólise do óleo de soja por lipase de *C. antarctica* em diferentes tempos reacionais e quantificado por CG-FID

No espectro de RMN ^1H , quando se integra a região de δ 4,06-4,19 ppm em produtos com baixas conversões em biodiesel, há a sobreposição dos sinais **a'**+**a''** (Figura 47, p. 78) (sinal do triglicerídeo e do biodiesel etílico, respectivamente, já discutido anteriormente). Portanto, o valor do rendimento obtido por RMN ^1H não corresponde com o obtido por CG-FID. Essa diferença é devida nessa região ainda conter o sinal **m** (prótons metilênicos) dos diglicerídeos formados como intermediários da reação. Assim, resulta em um valor de integração não real para os espectros de RMN ^1H e, portanto, a curva analítica não se mostra efetiva para o cálculo do rendimento por RMN ^1H em baixas conversões para **EE**.

No espectro de RMN ^1H do biodiesel produzido através da catálise enzimática (espectro **C**, reação **4**, 2,5% de enzima, Figura 63, p. 99) é possível observar a presença de sinais característicos de mono- e diglicerídeos. Esses sinais são: **d**, 2H, δ 3,73 ppm, $J = 4,77$ Hz (**k**); **d**, 4H, 3,83 ppm, $J = 4,77$ Hz (**n**); **quint**, 1H, 4,93 ppm, $J = 4,77$ Hz (**o**); **quint**, 1H, 5,08 ppm, $J = 4,77$ Hz (**l**) (Tabela 15).

Figura 63. Comparação dos espectros de RMN ^1H . (A) Óleo de soja (triglicerídeos); (B) Padrão do biodiesel produzido por catálise básica; (C) Reação 4 (2,5% de enzima)

A ampliação do espectro **C** está mostrada na figura 64.

Figura 64. Ampliação do espectro de RMN ^1H entre δ 3,55-5,24 ppm do produto reação 4 (2,5% de enzima) destacando as regiões dos quintetos **l** e **o** (região A), dos multipletos **a** e **a'+a''+m** (região B) e dos dupletos **n** e **k** (região C)

Tabela 15. Deslocamentos químicos dos sinais dos mono- e diglicerídeos no biodiesel produzido por catálise enzimática

Expansão	Multiplicidade dos sinais; deslocamento químico e constantes de acoplamento
Região A	MAG: (o), q , 4,93 ppm, $J = 4,77$ Hz DAG: (l), q , 5,08 ppm, $J = 4,77$ Hz
Região B	Biodiesel (a), m , entre 4,24-4,27 ppm e (a' + a'' + m), m , entre 4,04-4,21 ppm
Região C	MAG: (n), d , 3,83 ppm, $J = 4,77$ Hz DAG: (k), d , 3,73 ppm, $J = 4,77$ Hz

MAG=monoglicerídeo; DAG=diglicerídeo; TAG=triglicerídeo

É importante ressaltar que a multiplicidade observada, juntamente com os deslocamentos químicos obtidos, reforça a hipótese de que a formação dos diglicerídeos ocorre primeiramente pela hidrólise em um dos carbonos primários (**a** ou **a'**) dos triglicerídeos, formando diglicerídeos hidrolisados nas posições 1 e 2 ou 2 e 3, como observado pela presença do quinteto **l** (δ 5,08 ppm) (Figura 64, p. 99). Já para a formação dos monoglicerídeos, a hidrólise ocorre preferencialmente nos carbonos primários (**a** e **a'**), formando monoglicerídeos hidrolisados na posição 2, pois somente assim é possível formar o quinteto **o** (δ 4,93 ppm), como observado na ampliação do espectro de RMN ^1H na figura 64 (p. 99). Os compostos detectados por RMN ^1H presentes nas amostras do biodiesel produzido via catálise com lipase de *C. antarctica* estão mostrados na figura 65.

Figura 65. Compostos presentes no biodiesel produzido via catálise com lipase de *C. antarctica*. Produtos detectados por RMN ^1H

Se a hidrólise para a formação dos diglicerídeos ocorresse na posição 2 (carbono secundário **b**) do triglicerídeo para formar o diglicerídeo (1,3), o quinteto **l** (δ 5,08 ppm) formado, estaria em uma região em menor deslocamento químico no espectro de RMN ^1H ,

pois o próton do carbono **b** seria carbinólico e não ligado ao grupo éster. Da mesma forma para os monoglicerídeos, se a hidrólise de um triglicerídeo ocorresse nas posições 1 e 2 (carbonos primários **a** ou **a'** e no carbono secundário **b**), o produto formado seria o monoglicerídeo (3). Porém, monoglicerídeos na posição 3 não foram observados pelo espectro de RMN ^1H , pois se estivessem presentes, o quinteto **o** (δ 4,93 ppm) estaria em um deslocamento químico mais baixo no espectro de RMN ^1H , pois esses hidrogênios pertencentes ao carbono secundário **b** estariam ligados a um carbono carbinólico e não a um carbono carbonílico, como no monoglicerídeo 2 (Figura 65, p. 100). As substâncias não detectadas por RMN ^1H estão representadas na figura 66.

Figura 66. Compostos não detectados por RMN ^1H no biodiesel produzido via catálise com lipase de *C. antarctica*

Todas essas sugestões foram baseadas pela literatura (GARCIA, 2006) e por simulações realizadas pelos programas *ACD/HNMR DB Spectrum 6.0 (Complete)* e *ChemBioDraw Ultra 11.0*.

A figura 67 (p. 102) apresenta as expansões dos espectros de RMN ^1H mostrando os dubletos e os quintetos dos mono- e diglicerídeos presentes em diferentes amostras de biodiesel obtidas em diferentes quantidades de enzima.

Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^1H das reações enzimáticas (experimento 1): região **A** (quintetos **o** e **l** em δ 4,93 e 5,08 ppm, respectivamente), região **B** (multipletos entre δ 4,04-4,27 ppm) e região **C** (dubletos **n** e **k** em δ 3,83 e 3,73 ppm, respectivamente)

Pelas expansões das regiões A e C do espectro mostradas na figura 67, é possível observar a relação entre os quintetos **o** e **l** e os dubletos **k** e **n** dos mono- e diglicerídeos. À medida que aumenta a quantidade da enzima, a relação entre esses sinais se torna diferente. Com 0,1% de enzima, a intensidade do quinteto **o** (δ 4,93 ppm) referentes ao monoglicerídeos é pequena, porém com o aumento da quantidade da lipase, a relação de intensidade entre os quintetos (**l** e **o**) se inverte. Esse efeito é ainda mais pronunciado nos dubletos **k** e **n**. Com 0,1% de enzima, a intensidade do dubleto **k** (δ 3,73 ppm) dos diglicerídeos é maior do que no dubleto **n** (δ 3,83 ppm) dos monoglicerídeos (Figura 67). Estes resultados são concordantes e mostram que à medida que se aumenta a quantidade de enzima, o triglicerídeo vai sendo convertido mais rapidamente em diglicerídeo e este em monoglicerídeo e por último em

glicerol, sendo que em todas as etapas há a produção de biodiesel. Dessa forma, esses resultados confirmam a sequência mecanística apresentada na figura 15.

Pode-se observar que aumentando a quantidade do biocatalisador, a reação ocorre com maior rapidez, assim, com mais enzima no meio (2,5%) a proporção entre mono- e diglicerídeos foi praticamente à mesma (Tabela 13, p. 96). As razões de mono- e diglicerídeos também foram obtidas por RMN ^1H e comparadas com CG-FID. As áreas dos dubletos **k** e **n** foram calculadas, e através do mesmo raciocínio empregado por Knothe e Gerpen em 2005 no desenvolvimento da equação 2 (p. 73), foi possível propor uma nova equação para encontrar a razão entre DAG e MAG por RMN ^1H (Figura 68). A equação é mostrada abaixo:

$$Razão_{DAG/MAG} = \frac{2A_k}{A_n} \quad (3)$$

Os coeficientes 2 e 1 são referentes às quantidades de prótons de cada dubleto: a área de **k** é multiplicada por 2, pois é um dubleto com 2 prótons dos diglicerídeos e a área de **n** é multiplicada por 1, pois é um dubleto com 4 prótons dos monoglicerídeos. Os resultados obtidos por RMN ^1H estão sumarizados na tabela 16 (p. 104).

Figura 68. Ampliações dos dubletos **k** (δ 3,73 ppm) e **n** (δ 3,83 ppm) e suas áreas calculadas

As razões obtidas por CG-FID foram calculadas de forma direta com os valores das porcentagens de conversões de di- e monoglicerídeos. As duas razões obtidas (RMN ^1H e CG-FID) para diferentes quantidades de catalisador foram comparadas (Tabela 16, p. 104).

Tabela 16. Comparação entre as quantidades de DAG e MAG pelas técnicas de RMN ^1H e CG-FID

% de enzima	A_k	A_n	A_k/A_n	Razão _{DAG/MAG} (RMN ^1H) ^a	Razão _{DAG/MAG} (CG-FID)	Diferença ^b
0,1%	0,22	0,10	2,20	4,4	6,6	2,2
0,5%	0,37	0,37	1,00	2,0	2,4	0,4
1,0%	0,39	0,44	0,89	1,8	1,9	0,1
2,5%	0,30	0,60	0,50	1,0	1,1	0,1
5,0%	0,16	0,84	0,19	0,3	0,2	0,1

^a Calculado através da equação 3.^b Diferença entre as razões dos DAG e MAG calculadas por RMN ^1H e CG-FID.

A quantificação desses componentes é internacionalmente aceita por CG-FID (USA ASTM), no entanto, é possível observar que a razão entre DAG e MAG não apresentou grandes diferenças entre os dois métodos. Por exemplo, é possível observar na tabela 16, que para 5,0% de enzima, a razão DAG/MAG por CG-FID foi de 0,2 e a mesma razão calculada por RMN ^1H foi de 0,3. A diferença observada foi de 0,1, o que resulta em uma diferença em percentagem de 1,4% de DAG e MAG entre as análises. A boa correlação entre essas técnicas é devido que os sinais **k** e **n** no espectro de RMN ^1H estão bem resolvidos, não ocorrendo nenhuma sobreposição. Portanto, para esse tipo de análise, a CG-FID e a RMN ^1H apresentaram excelentes correlações, assim a RMN também pode ser utilizada para esse tipo de análise.

4.3.4. Transesterificação enzimática do triéster oléico

A transesterificação enzimática do triéster oléico forneceu rendimentos de biodiesel superiores aos obtidos na transesterificação enzimática do óleo de soja, porém, a principal diferença de resultados foi na quantidade de intermediários (monoglicerídeos e diglicerídeos) gerados nas duas reações. Na transesterificação enzimática do óleo de soja, a quantidade mínima de mono- e diglicerídeos (somados) formados foi de 15,7% e a máxima de 29,2%, já para a transesterificação enzimática do triéster oléico, a quantidade mínima de mono- e diglicerídeo (oléico, **MAGo** e **DAGo**) foi de 1,9% e a máxima de 2,1% em relação a quantidade total de componentes avaliados (Tabela 17, p. 105).

Tabela 17. Componentes presentes nos produtos da transesterificação do triéster oléico com lipase de *C. antarctica*^a

Reação	Tempo (h)	EO ^b (%) ^c	MAGo ^b (%) ^c	DAGo ^b (%) ^c	TAGo ^b (%) ^c
1	1	39,1	nd	2,1	58,8
2	4	56,8	0,1	1,9	41,2
3	8	65,4	0,2	1,7	32,7
4	15	80,3	0,7	1,4	17,6
5	24	90,4	0,8	1,3	7,5

^a Glicerol não foi detectado por CG-FID após extração e lavagem com água.^b Oleato de etila (EO); Monoglicerídeo (oléico) (MAGo); Diglicerídeo (oléico) (DAGo); Triglicerídeo (oléico) (TAGo).^c Todos os rendimentos foram determinados por CG-FID.

nd = não detectado.

O rendimento superior de biodiesel oléico obtido na transesterificação enzimática do triéster oléico (24h, 90,4%) em comparação com a transesterificação do óleo de soja (24h, 84,1%) deve-se principalmente ao fato de que o óleo de soja é uma mistura complexa de compostos (triglicerídeos e outros compostos minoritários, como monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos, glicolípidios, fosfatídeos, esteróis, etc). Ainda, o óleo de soja foi adquirido comercialmente, como é um óleo refinado, também pode conter aditivos e substâncias antioxidantes, quando comparado com o triéster oléico, que foi sintetizado e purificado.

Como a quantidade de mono- e diglicerídeos do ácido oléico produzida foi pequena, a definição exata dos sinais dos mesmos no espectro do RMN ¹³C ficou comprometida. No entanto, com a ampliação da região entre δ 3,50-4,00 ppm dos espectros de RMN ¹H dos produtos formados, foi possível observar os sinais dos dubletos dos monoglicerídeos (**1**, 4H, δ 3,83 ppm, $J=4,77$ Hz) e dos diglicerídeos (**4**, 2H, δ 3,73 ppm, $J=4,77$ Hz) formados (Figura 69).

Figura 69. Ampliações da região dos dubletos 1 e 4 dos mono- e diglicerídeos formados como intermediários da transesterificação do triéster oléico com lipase de *C. antarctica*

4.4. Glicerol

Em todas as reações de transesterificação de óleos e gorduras o principal subproduto é o glicerol, porém, nas reações de transesterificação enzimática, não foi observado a presença do glicerol após lavagem dos produtos, tanto por CG-FID quanto por RMN ^1H e ^{13}C . Um estudo mais detalhado mostrou que o simples processo de lavagem com água destilada empregado em todos os casos eliminou o glicerol livre. Como descrito no procedimento experimental, as amostras de biodiesel com e sem lavagem obtido via catálise enzimática com lipase de *C. antarctica* (reação 5, Tabela 13, p. 96) foram analisadas por CG-FID e os cromatogramas estão mostrados na figura 70.

Figura 70. Comparação entre os processos de extração do biodiesel enzimático para a remoção do glicerol. Cromatograma (A) antes da lavagem com água destilada e cromatograma (B) após lavagem com água destilada

Pode-se observar pelos cromatogramas da figura 70, que um simples processo de lavagem com água destilada foi suficiente para retirar o glicerol remanescente no biodiesel. A composição total de glicerol está descrito tabela 18 (p. 107). Dessa forma que a catálise enzimática facilita o processo de extração do biodiesel e o glicerol é produzido com alta pureza e em baixa quantidade, sendo também uma vantagem da catálise enzimática sobre a catálise alcalina, pois esta última requer sucessivas lavagens com água.

Tabela 18. Composição do biodiesel produzido via catálise enzimática sem lavagem e após lavagem com água destilada

Sem lavagem com água destilada				
EE (%)	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)	GL (%)
82,00	14,56	2,60	0,10	0,74
Com lavagem com água destilada				
EE (%)	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)	GL (%)
82,80	14,20	2,80	0,20	nd

EE = ésteres etílicos; MAG = monoglicerídeos; DAG: diglicerídeos; TAG = triglicerídeos; GL = glicerol.
 nd = não detectado.

5. Conclusões

Dentro dos objetivos propostos, foi possível preparar o biodiesel empregando a biocatálise via reações de esterificação e transesterificação. A esterificação do ácido oléico empregando lipase de *C. antarctica* mostrou alta eficiência para todos os alcoóis testados, tanto no reuso da enzima quanto no uso do álcool hidratado. Neste último, os melhores resultados foram obtidos com metanol contendo 4,0% de água. Na transesterificação enzimática usando etanol, todas as reações apresentaram bons rendimentos e também foi observado que o uso do etanol hidratado não interferiu no rendimento da reação. Dessa forma, tanto em reações de esterificação do ácido oléico quanto em transesterificação do óleo de soja com lipase de *C. antarctica* é possível utilizar álcool hidratado (etanol), sendo que com o uso deste último, as reações forneceram melhores rendimentos.

O método de quantificação desenvolvido por RMN ^1H para as reações de transesterificações enzimáticas pode ser aplicado quando as conversões forem altas, apresentando boa correlação com a CG-FID. Em nosso estudo, foi avaliada quantitativamente a formação de intermediários, como MAG e DAG na transesterificação do óleo de soja via etanólise com lipase de *C. antarctica*. O método por RMN ^1H mostrou-se eficiente, rápido e sem a necessidade de tratamento prévio das amostras.

Concluí-se que a biocatálise, através da utilização de lipases é uma metodologia promissora para a obtenção de biodiesel em escala laboratorial e que futuramente poderá ser aplicada industrialmente, especialmente no caso da etanólise com óleo de soja, uma vez que permite o uso do etanol hidratado, bem como a fácil remoção do glicerol obtido, diminuindo os custos do processo. Através de análises detalhadas dos produtos formados em reações enzimáticas por RMN e CG-FID, é possível entender mais profundamente as etapas envolvidas no processo e, dessa forma, aprimorar os métodos de produção, tornando-o mais eficiente e garantindo uma melhor qualidade do produto.

6. Perspectivas

Vários trabalhos envolvendo catálise enzimática são encontrados na literatura, juntamente com diversas técnicas de análise, porém, uma investigação mais detalhada sobre os intermediários obtidos nas reações enzimáticas de transesterificação, principalmente por RMN não são frequentemente reportados.

É necessário um estudo com outras lipases que apresentarem bons rendimentos e expandir as investigações em reações para empregar células livres de microorganismos, bem como todos os fatores que podem influenciar o processo, barateando dessa forma a produção do biodiesel e tornando viável seu emprego na indústria.

Anexos

7. Anexos

7.1. Óleo de soja refinado comercial (Liza[®]) – (Triglicerídeo modelo)

(A) RMN ¹H – Óleo de soja

Nome: Triglicerídeo, triacilglicerídeo, triéster do glicerol (óleo de soja comercial refinado, Liza[®]).

Aspecto físico: Óleo amarelo pouco viscoso.

RMN ¹H⁶ (200 MHz, CDCl₃, δ ppm, *J* Hz): 5,21-5,45 (**m**, 9H, prótons vinílicos e 1H, H₃ glicerínico); 4,22 (**dd**, 2H, *J*₁=11,90, *J*₂=4,58, H₂, H₂', glicerínicos; **dd**, 2H, *J*₁=11,90 e *J*₂=4,58, H₄ e H₄', glicerínicos); 2,77 (**t**, 3H, *J*=5,49, H₅₆, bis-alílicos); 2,31 (**t**, 5H, *J*=7,02, H₈, H₁₁ e H₁₄, α-carbonílicos); 2,03-2,06 (**m**, 8H, H₃₈, H₄₁, H₅₃ e H₅₉, alílicos); 1,58-1,64 (**m**, 6H, H₁₆, H₃₂ e H₄₈ β-carbonílicos); 1,25-1,35 (**m**, 50H, prótons metilênicos); 0,97 (**t**, 1H, *J*=7,32, H₅₉, α-metílicos) e 0,89 (**t**, 7H, *J*=6,04, H₃₁, H₄₇ e H₆₀, metílicos).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 173,25 (2C, C₇ e C₁₀, carbonílicos); 172,82 (1C, C₁₃ carbonílico); 127,93-130,22 (6C, C₃₈, C₃₉, C₅₄, C₅₅, C₅₇ e C₅₈, vinílicos); 68,92 (1C, C₃ glicerínico); 62,12 (2C, C₂ e C₄, glicerínicos); 34,20 (1C, C₁₄, α-carbonílico); 34,04 (2C, C₈ e C₁₁, α-carbonílicos); 22,59-31,94 (carbonos alílicos, bis-alílico e metilênicos) e 14,08 (3C, C₃₁, C₄₇ e C₆₀, metílicos)⁷.

⁶ Valores referentes às integrais no espectro de RMN ¹H.

⁷ Devido ao número indefinido de átomos presentes na molécula, não é possível atribuir todos os sinais a cada hidrogênio e carbono especificamente, especialmente aos grupamentos metilênicos (CH₂). Isso somente é válido para a amostra de óleo de soja e o biodiesel produzido a partir do óleo de soja.

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The x-axis represents the chemical shift in ppm, ranging from -0.5 to 7.5. The spectrum shows several peaks with integration values indicated below them.

Key peaks and integration values:

- Aromatic region (5.2-5.5 ppm):
 - 5.41, 5.40, 5.39, 5.38, 5.34, 5.29, 5.26 (integration: 4.31)
- Singlet at 3.66 ppm (integration: 3.01)
- Aliphatic region (0.8-2.8 ppm):
 - 2.80, 2.77, 2.74 (integration: 1.60)
 - 2.34, 2.26, 2.30, 2.06, 2.03, 2.00 (integration: 2.05)
 - 1.65, 1.62, 1.59 (integration: 2.00)
 - 1.31, 1.26 (integration: 24.07)
 - 0.98, 0.92, 0.91, 0.86, 0.85 (integration: 0.55)
 - 0.89, 0.88 (integration: 3.91)

The figure displays two NMR spectra of compound 1. The top spectrum is the ^1H NMR spectrum, showing peaks from 10 to 30 ppm. The bottom spectrum is the ^{13}C NMR spectrum, showing peaks from 13 to 174 ppm. The ^{13}C NMR spectrum has peaks at 174.12, 131.80, 129.89, 130.05, 127.94, 127.79, 127.63, 127.00, 77.00 (triplet), 51.27, 33.96, 29.59, 31.44, 29.50, 27.09, 24.85, 24.45, and 13.97 ppm.

Figura 72. Espectros de RMN do biodiesel metílico produzido via catálise básica: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

Nome: Éster metílico do óleo de soja, oleato de etila do óleo de soja (biodiesel)

Aspecto físico: Óleo amarelo claro pouco viscoso.

RMN ^1H ⁸ (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,26-5,41 (**m**, 4H, H_{12} , H_{13} , H_{15} e H_{16} , vinílicos); 3,66 (**s**, 3H, H_5 , metoxílicos); 2,77 (**t**, 2H, $J=5,49$, H_{14} , bis-alílicos); 2,30 (**t**, 2H, $J=7,02$, H_1 , α -carbonílicos); 2,03 (**m**, 4H, H_{11} e H_{17} , alílicos); 1,62 (**m**, 2H, H_6 , β -carbonílicos); 1,28 (**m**, prótons metilênicos); 0,98 (**t**, $J=7,32$, α -metílicos); 0,89 (**t**, 4H, $J=6,04$, prótons metílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 174,12 (1C, C_2 , carbonílico); 127,63-130,05 (C_{12} , C_{13} , C_{15} e C_{16} , carbonos vinílicos); 51,27 (1C, C_5 , metoxílico); 33,96 (1C, C_1 , α -carbonílico); 22,49-31,83 (2C, C_{11} e C_{17} , alílicos; 1C, C_{14} , bis-alílico e 4C, C_7 - C_{10} , metilênicos); 13,97 (1C, C_{18} , metílico)⁹.

⁸ Valores referentes às integrais no espectro de RMN ^1H .

⁹ Devido ao número indefinido de átomos presentes na molécula, não é possível atribuir todos os sinais a cada hidrogênio e carbono especificamente, especialmente aos grupamentos metilênicos (CH_2). Isso somente é válido para a amostra de óleo de soja e o biodiesel produzido a partir do óleo de soja.

7.3. Padrão biodiesel etílico (catálise básica) – (Éster etílico modelo)

(A) RMN ^1H – Padrão biodiesel etílico

(B) RMN ^{13}C – Padrão biodiesel etílico

Figura 73. Espectros de RMN do biodiesel etílico produzido via catálise básica: (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

Nome: Éster etílico do óleo de soja, oleato de etila do óleo de soja (biodiesel)

Aspecto físico: Óleo amarelo claro pouco viscoso.

RMN $^1\text{H}^{10}$ (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,26-5,44 (**m**, 4H, H_{13} , H_{14} , H_{16} e H_{17} , vinílicos) e 4,12 (**q**, 2H, $J=7,02$, H_5 , metilênicos etoxílicos); 2,77 (**t**, 2H, $J=5,49$, H_{15} , bis-alílicos); 2,28 (**t**, 2H, $J=7,02$, H_1 , α -carbonílicos); 2,00-2,06 (**m**, 4H, H_{12} e H_{18} , alílicos); 1,58-1,65 (**m**, 2H, H_7 , β -carbonílicos); 1,25-1,31 (**m**, 24H, prótons metilênicos); 0,97 (**t**, $J=7,32$, α -metílicos); 0,89 (**t**, 3H, $J=6,04$, prótons metílicos)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 173,87 (1C, C_2 , carbonílico); 127,76-130,22 (C_{13} , C_{14} , C_{16} e C_{17} , carbonos vinílicos); 60,15 (1C, C_5 , etoxílico); 34,40 (1C, C_1 , α -carbonílico); 22,60-31,94 (2C, C_{11} e C_{18} , alílicos; 1C, C_{15} , bis-alílico e 4C C_8 - C_{11} , metilênicos); 14,28 (1C, C_6 , etoxílico); 14,08 (1C, C_{18} , metílico)¹¹.

¹⁰ Valores referentes às integrais no espectro de RMN ^1H .

¹¹ Devido ao número indefinido de átomos presentes na molécula, não é possível atribuir todos os sinais a cada hidrogênio e carbono especificamente, especialmente aos grupamentos metilênicos (CH_2). Isso somente é válido para a amostra de óleo de soja e o biodiesel produzido a partir do óleo de soja.

7.4. Ácido oléico

(A) RMN 1H – Ácido oléico (B) RMN ^{13}C – Ácido oléico

Figura 74. Espectros de RMN do ácido oléico comercial: (A) RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$)

Nome: Ácido 9Z-octadecenóico, ácido oléico

Aspecto físico: Óleo amarelo viscoso.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,32-5,37 (**m**, 2H, H_9 e H_{10} , vinílicos); 2,35 (**t**, 2H, $J=7,34$, H_{17} , α -carboxílicos); 2,01-2,02 (**m**, 4H, H_8 e H_{11} , alílicos); 1,60-1,67 (**m**, 2H, H_{16} , β -carboxílicos); 1,26-1,32 (**m**, 20H, H_{12} - H_{15} e H_2 - H_7 , metilênicos); 0,88 ppm (**t**, 3H, $J=6,04$, H_1 , metílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 180,56 (1C, C_{18} , carboxílico); 129,67 (1C, C_{10} , vinílico); 129,96 (1C, C_9 , vinílico); 34,09 (1C, C_{17} , α -carboxílico); 22,66-31,90 (13C, C_{11} - C_{16} e C_2 - C_8 , metilênicos); 14,07 (1C, C_1 , metílico).

7.5. Oleato de metila

Chemical Formula: $C_{19}H_{36}O_2$ (A) RMN 1H – Oleato de metila (B) RMN ^{13}C – Oleato de metila

Figura 75. Espectros de RMN do oleato de metila padrão: (A) RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$)

Nome: (9Z)-octadecenoato de metila, oleato de metila, éster metílico do ácido oléico.

Aspecto físico: Óleo levemente amarelado e pouco viscoso.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,32-5,37 (**m**, 2H, H_9 e H_{10} , vinílicos); 3,67 (**s**, 3H, H_{21} , metoxílicos) 2,30 (**t**, $J=7,34$, 2H, H_{17} , α -carbonílicos); 2,02 (**m**, 4H, H_8 e H_{11} , alílicos); 1,63 (**m**, 2H, H_{16} , β -carbonílicos); 1,28 (**m**, 20H, H_{12} - H_{15} e H_2 - H_7 , metilênicos); 0,88 (**t**, 3H, $J=6,04$, H_1 , metílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 180,56 (1C, C_{18} , carbonílico); 129,67 (1C, C_9 , vinílico) 129,96 (1C, C_{10} , vinílico); 34,09 (1C, C_{17} , α -carbonílico); 22,66-31,90 (14C, C_{11} - C_{16} e C_2 - C_6 , metilênicos); 14,07 (1C, C_1 , metílico).

7.6. Oleato de etila

Chemical Formula: $C_{20}H_{38}O_2$ (A) RMN 1H – Oleato de etila (B) RMN ^{13}C – Oleato de etila **Figura 76.** Espectros de RMN do Oleato de etila padrão: (A) RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$)

Nome: (9Z)-octadecenoato de etila, oleato de etila, éster etílico do ácido oléico.

Aspecto físico: Óleo levemente amarelado e pouco viscoso.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,31-5,36 ppm (**m**, 2H, H_9 e H_{10} , vinílicos); 4,15 (q, 2H, $J=7,31$, H_{21} , etoxílicos) 2,31 (t, 2H, $J=7,34$, H_{17} , α -carbonílicos); 1,99-2,02 (**m** 4H, H_8 e H_{11} alílicos); 1,58-1,65 (**m**, 2H, H_{16} , β -carbonílicos); 1,21-1,30 ppm (**m**, 20H, H_{12} - H_{15} e H_2 - H_7 , metilênicos e 3H, H_{22} , etoxílicos) e 0,91 (t, 3H, $J=6,04$, H_1 , metílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 173,85 (1C, C_{18} , carbonílico); 129,78 (1C, C_9 , vinílico); 130,02 (1C, C_{10} vinílico); 60,15 (1C, C_{21} , etoxílico); 34,42 (1C, C_{17} , α -carbonílico); 22,73-31,98 (13C, C_{11} - C_{16} e C_2 - C_8 , metilênicos); 14,28 (1C, C_{22} , etoxílico) e 14,13 (1C, C_1 , metílico).

7.7. Oleato de propila

Chemical Formula: $C_{21}H_{40}O_2$ (A) RMN 1H – Oleato de propila (B) RMN ^{13}C – Oleato de propila

Figura 77. Espectros de RMN do oleato de propila padrão: (A) RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$)

Nome: (9Z)-octadecenoato de propila, oleato de propila, éster propílico do ácido oléico.

Aspecto físico: Óleo levemente amarelado e pouco viscoso.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,31-5,37 (**m**, 2H, H_9 e H_{10} , vinílicos); 4,03 (**q**, 2H, $J=6,68$, H_{21} , propoxílicos) 2,29 (**t**, 2H, $J=7,34$, H_{17} , α -carbonílicos); 2,00-2,03 (**m**, 4H, H_8 e H_{11} , alílicos); 1,56-1,55 (**m**, 2H, H_{16} , β -carbonílicos e 2H, H_{22} , propoxílicos); 1,26-1,31 (**m**, 20H, H_{12} - H_{15} e H_2 - H_7 , metilênicos); 0,85-0,98 ppm (**m**, 3H, H_1 , metílicos e 3H, H_{23} , propoxílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 173,99 (1C, C_{18} , carbonílico); 129,78 (1C, C_9 , vinílico); 130,00 (1C, C_{10} , vinílicos); 65,83 (1C, C_{21} , propoxílico); 34,40 (1C, C_{17} , α -carbonílico); 22,03-31,96 (13C, C_{11} - C_{16} e C_2 - C_7 , metilênicos e 1C, C_{22} , propoxílico); 14,13 (1C, C_1 , metílico); 10,02 (1C, C_{23} , propoxílico).

7.8. Oleato de butila

(A) RMN 1H – Oleato de butila

(B) RMN ^{13}C – Oleato de butila

Figura 78. Espectros de RMN do oleato de butila padrão: (A) RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$)

Nome: (9Z)-octadecenoato de butoxila, oleato de butila, éster butílico do ácido oléico.

Aspecto físico: Óleo levemente amarelado e pouco viscoso.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,31-5,37 (**m**, 2H, H_9 e H_{10} vinílicos); 4,07 (**q**, 2H, $J=6,68$, H_{21} , butoxílicos) 2,29 (**t**, 2H, H_{17} , $J=7,34$, α -carbonílicos); 2,00-2,02 (**m**, 4H, H_8 e H_{11} , alílicos); 1,54-1,68 (**m**, 2H, H_{16} , β -carbonílico e 2H, H_{22} , butoxílicos); 1,27-1,47 (**m**, 20H, H_{12} - H_{15} e H_2 - H_7 , metilênicos e 2H, H_{23} butoxílicos) e 0,85-0,97 (**m**, 3H, H_1 , metílicos e 3H, H_{24} , butoxílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 173,90 (1C, C_{18} , carbonílico); 129,78 (1C, C_9 , vinílico); 130,00 (1C, C_{10} , vinílico); 54,08 (1C, C_{21} , butoxílico); 34,42 (1C, C_{17} , α -carbonílico); 22,73-31,98 (13C, C_{11} - C_{16} e C_2 - C_8 , metilênicos e 1C, C_{22} butoxílico); 19,20 (1C, C_{23} , butoxílico); 14,13 (1C, C_1 , metílico) e 13,73 (1C, C_{24} , propoxílico).

7.9. Triéster oléico

(A) RMN 1H – Triéster oléico (B) RMN ^{13}C – Triéster oléico

Figura 79. Espectros de RMN do triéster oléico padrão: (A) RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$)

Nome: (9'Z, 9''Z)-propano-1,2,3-trioleato, triéster oléico, trioleato do glicerol.

Aspecto físico: Óleo amarelado e muito viscoso.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 5,29-5,42 ppm (**m**, 6H, H_{24} , H_{25} , H_{40} , H_{41} , H_{56} e H_{57} vinílicos e 1H, H_3 glicerínicos); 4,15-4,39 (**dd**, 2H, $J_1=11,90$, $J_2=4,58$, H_1 , $\text{H}_{1'}$, glicerínicos; **dd**, 2H $J_1=11,90$ e $J_2=4,58$, H_5 e $\text{H}_{5'}$, glicerínicos); 2,36 (**t**, $J=7,02$, 6H, H_{13} , H_{17} e H_{15} , α -carbonílicos); 2,05-2,08 (**m**, 12H, H_{23} , H_{26} , H_{39} , H_{42} , H_{55} e H_{58} , alílicos); 1,63-1,69 (**m**, 6H, H_{18} , H_{34} e H_{50} , β -carbonílicos); 1,31-1,35 (**m**, 30H, H_{19} - H_{22} , H_{27} - H_{32} , H_{35} - H_{38} , H_{43} - H_{48} , H_{51} - H_{54} , H_{59} - H_{64} , metilênicos) e 0,93 (**t**, 9H, $J=6,04$, H_{33} , H_{49} e H_{65} , metílicos).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 173,26 (2C, C_9 e C_{11} carbonílico); 172,85 (1C, C_{10} carbonílico); 129,72 (3C, C_{25} , C_{41} e C_{57} , vinílicos); 130,03 (3C, C_{24} , C_{40} e C_{56} , vinílicos); 68,91 (1C, C_3 , glicerínico); 62,13 (2C, C_1 e C_5 , glicerínicos); 34,22 (1C, C_{15} , α -carbonílico); 34,04 (2C, C_{13} e C_{17} , α -carbonílicos); 22,71-32,62 (39C, C_{18} - C_{23} , C_{26} - C_{32} , C_{34} - C_{39} , C_{42} - C_{48} , C_{50} - C_{55} e C_{58} - C_{64} , metilênicos) e 14,13 (3C, C_{33} , C_{49} e C_{65} , metílicos).

7.10. Etanolise enzimática do triéster oléico (1h)

(A) RMN ^1H – Etanolise enzimática do triéster oléico (1h)

(B) RMN ^{13}C – Etanolise enzimática do triéster oléico (1h)

Figura 80. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de *C. antarctica* (1h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

Figura 81. Espectros de RMN da etanólise do triéster oléico com lipase de *C. antarctica* (4h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

7.12. Etanólise enzimática do triéster oléico (8h)

(A) RMN ^1H - Etanólise enzimática do triéster oléico (8h)

(B) RMN ^{13}C - Etanólise enzimática do triéster oléico (8h)

Figura 82. Espectros de RMN da etanólise do triéster oléico com lipase de *C. antarctica* (8h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

7.13. Etanolise enzimática do triéster oléico (15h)

(A) RMN ^1H - Etanolise enzimática do triéster oléico (15h)

(B) RMN ^{13}C - Etanolise enzimática do triéster oléico (15h)

Figura 83. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de *C. antarctica* (15h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

7.14. Etanolise enzimática do triéster oléico (24h)

(A) RMN ^1H - Etanolise enzimática do triéster oléico (24h)

(B) RMN ^{13}C - Etanolise enzimática do triéster oléico (24h)

Figura 84. Espectros de RMN da etanolise do triéster oléico com lipase de *C. antarctica* (24h): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

7.15. Etanolise enzimática do óleo de soja com lipase de *C. antarctica* (0,1% de enzima)

(A) RMN ^1H - Etanolise enzimática do óleo de soja (0,1% de enzima)

(B) RMN ^{13}C - Etanolise enzimática do óleo de soja (0,1% de enzima)

Figura 85. Espectros de RMN da etanolise do óleo de soja com lipase de *C. antarctica* (0,1% de enzima): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

7.16. Etanolise enzimática do óleo de soja com lipase de *C. antarctica* (1,0% de enzima)

(A) RMN ^1H - Etanolise enzimática do óleo de soja (1,0% de enzima)

(B) RMN ^{13}C - Etanolise enzimática do óleo de soja (1,0% de enzima)

(A)RMN ^1H - Etanolise enzimática do óleo de soja (5,0% de enzima)

Figura 87. Espectros de RMN da etanolise do óleo de soja com lipase de *C. antarctica* (5,0% de enzima): (A) RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3); (B) RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3)

Cromatogramas obtidos por CG-FID

Figura 88. Cromatograma do ácido oléico comercial: 1. Ácidos graxos; 2. Ácido oléico; 3. Tricaprina

Figura 89. Cromatograma do oleato de metila padrão: 1. Ácidos graxos; 2. Oleato de metila; 3. Tricaprina

Figura 90. Cromatograma do oleato de etila padrão: **1.** Ácidos graxos; **2.** Oleato de etila; **3.** Tricaprina

Figura 91. Cromatograma do oleato de propila padrão: **1.** Ácidos graxos; **2.** Oleato de propila; **3.** Tricaprina

Figura 92. Cromatograma do oleato de butila padrão: 1. Ácidos graxos; 2. Oleato de butila; 3. Tricaprina

Figura 93. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de *C. antarctica* empregando metanol (90,8% de rendimento): 1. ácido oléico; 2. Oleato de metila; 3. tricaprina

Figura 94. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de *C. antarctica* empregando etanol (96,5% de rendimento): **1.** ácido oléico; **2.** Oleato de etila; **3.** tricaprina

Figura 95. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de *C. antarctica* empregando propanol (95,0% de rendimento): **1.** ácido oléico; **2.** Oleato de propila; **3.** tricaprina

Figura 96. Cromatograma da reação de esterificação do ácido oléico com lipase de *C. antarctica* empregando butanol (91,0% de rendimento): 1. ácido oléico; 2. butil éster; 3. tricaprina

Figura 97. Cromatograma do óleo de soja comercial: 1. ácidos graxos; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

Figura 98. Cromatograma do biodiesel metílico produzido via catálise alcalina: **1.** ésteres metílicos (biodiesel)

Figura 99. Cromatograma de uma amostra comercial padrão contendo: **1.** monooleína; **2.** dioleína e **3.** trioleína

Figura 100. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (0,1% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

Figura 101. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (0,25% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

Figura 102. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (0,5% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

Figura 103. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (1,0% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

Figura 104. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (2,5% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

Figura 105. Cromatograma do biodiesel etílico produzido com lipase de *C. antarctica* (5,0% de enzima): 1. biodiesel; 2. monoglicerídeos; 3. diglicerídeos e 4. triglicerídeos

8. Referências

- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.
- AMBIENTE Brasil. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br>>. Acesso em: 19 nov. 2010.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis-key factors affecting efficiency on the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- ARANDA, D. A. G.; SANTOS, R. T. P.; TAPANES, N. C. O.; RAMOS, A. L. D.; ANTUNES, O. A. C. Acid-catalyzed homogeneous esterification reaction for biodiesel production from palm fatty acids. **Catalysis Letters**, v. 122, n. 1-2, p. 20-25, 2007.
- BASHA, S. A.; GOPAL, K. R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1628-1634, 2009.
- BAUMANN, H.; BÜHLER, M.; FOCHER, H.; ET AL. Natural fats and oils—renewable raw materials for the chemical industry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 27, n. 1, p. 41-62, 1988.
- BÉLAFI-BAKÓ, K.; KOVÁCS, F.; GUBICZA, L.; HANCSÓK, J. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system. **Biocatalysis & Biotransformation**, v. 20, n. 6, p. 437-439, 2002.
- BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; GAZI, G.; GUPTA, V. K. Immobilization of lipase by entrapment in calcium alginate beads. **Journal of Bioactivity Compatible Polymers**, v. 23, p. 552-562, 2008.
- BREIVIK, H.; HARALDSSON, G. G.; KRISTINSSON, B. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Biochemistry**. 5. ed. Harlow: Brooks Cole, 2005. p. 415-418.
- CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/alcool/>>. Acesso em: 25 jan. 2011.
- CHEN, J. W.; WU, W. T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 466-469, 2003.
- COGGON, R.; VASUVEDAN, P. T.; SANCHEZ, F. Enzymatic transesterification of olive oil and its precursors. **Biocatalysis & Biotransformation**, v. 25, p. 135-143, 2007.
- COSTA NETO, P. R.; BALPARDA CARO, M. S.; MAZZUCO, L. M.; NASCIMENTO, M. G. Quantification of soybean oil ethanolysis with ¹H NMR. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 12, p. 1111-1114, 2004.

- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.
- DENG, L.; XU, X.; HARALDSSON, G. G.; TAN, T.; WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, p. 341-347, 2005.
- DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 19 nov. 2010.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. 5. ed. New York: Springer, 2004. p. 212-234.
- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.
- FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil 1. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986.
- FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.
- GARCIA, M. C. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 136f. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- GELBARD, G.; BRES, O.; VARGAS, R. M.; VIELFAURE, F.; SCHUCHARDT, U. F. ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 1239-1241, 1995.
- GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; ET AL. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 103-110, 2010.
- GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.
- GONÇALVES FILHO, L. C.; MICKE, G. A. Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1-2, p. 477-480, 2007.

GUNSTONE, F. D. **An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides**. London: Chapman & Hall, 1967. p. 112-114.

HA, S. H.; LAN, M. N.; LEE, S. H.; HWANG, S. M.; KOO, Y. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 480-483, 2007.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 5. ed. New York: W.H. Freeman & Company, 1998. p. 345-346.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

IZIQUE, C. O Mundo depois de Kyoto. **Revista FAPESP**, v. 12, p. 22, 2005.

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

JEONG, G. T.; PARK, D. H. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 131-139, 2007.

JIN, F.; KAWASAKI, K.; KISHIDA, H. NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil. **Fuel**, v. 86, n. 7-8, p. 1201-1207, 2007.

JIN, G.; BIERMA, T. J.; HAMAKER, C. G.; MUCHA, R.; SCHOLA, V.; STEWART, J.; WADE, C. Use of a whole-cell biocatalyst to produce biodiesel in a water-containing system. **Journal Of Environmental Science And Health Part A**, v. 44, p. 21-28, 2009.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12-15, 2001.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 446-451, 2002.

KNOTHE, G. Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel. **Transactions of the ASAE**, v. 44, p. 193, 2001.

KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 10, p. 823-833, 2006.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V. **The biodiesel handbook**. Illinois: AOCS Publishing, 2005. p. 25-89.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzymatic transesterification of Jatropha oil. **Biotechnology Biofuels**, v. 2, p. 1-7, 2009.

- LEE, K. T.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 2, p. 191-195, 2002.
- LEISTEN, J. A. Homogeneous catalysis: a reexamination of definitions. **Journal of Chemical Education**, v. 41, n. 1, p. 23, 1964.
- LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 58-62, 2006.
- LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1481-1485, 2007.
- LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; WU, X.; ET AL. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41-50, 1998.
- LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp.* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 122-125, 2009.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.
- MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Comparison of different heterogeneous catalysts and different alcohols for the esterification reaction of oleic acid. **Fuel**, v. 87, p. 3477-3480, 2008.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007.
- MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel's quantitative chemical analysis**. 6. ed. New York. Prentice Hall, 2000, p. 1-906.
- MIRASGEDIS, S.; SARAFIDIS, Y.; GEORGOPOULOU, E.; LALAS, D. P. The role of renewable energy sources within the framework of the Kyoto Protocol: the case of Greece. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 6, n. 3, p. 247-269, 2002.
- MITTELBAACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 3, p. 168-170, 1990.
- MIYAKE, Y.; YOKOMIZO, K.; MATSUZAKI, N. Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 9, p. 1091-1094, 1998.
- MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1260-1264, 2007.

- MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 593-605, 2008.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina do biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- NELSON, D. L.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 9, p. 1191-1195, 1996.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 367.
- NONHEBEL, S. Renewable energy and food supply: will there be enough land? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, n. 2, p. 191-201, 2005.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.
- OKKERSE, C.; VAN BEKKUM, H. From fossil to green. **Green Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 107-114, 1999.
- PALMER, T. **Understanding enzymes**. 4. ed. Oxford: Prentice Hall, 1995, p. 1-411.
- PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281-288, 2007.
- PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; ET AL. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1313-1330, 2005.
- PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1-2, p. 461-468, 1995.
- PORTAL do Biodiesel. Disponível em: < <http://www.biodiesel.gov.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.
- RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. **JAOCs: Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 10, p. 925-930, 2008.

- ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ^1H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, p. 136-142, 2011.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MODUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.
- SAMUKAWA, T.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; ET AL. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 2, p. 180-183, 2000.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.
- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.
- SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. **Fuel**, v. 66, n. 10, p. 1372-1378, 1987.
- SCHWAB, A. W.; DYKSTRA, G. J.; SELKE, E.; SORENSON, S. C.; PRYDE, E. H. Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 11, p. 1781-1786, 1988.
- SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 1993.
- SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.
- SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.
- SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, p. 111-133, 2000.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

TASHTOUSH, G.; AL-WIDYAN, M. I.; AL-SHYOUKH, A. O. Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Applied Thermal Engineering**, v. 23, n. 3, p. 285-293, 2003.

TILMAN, D.; HILL, J.; LEHMAN, C. Carbon-Negative Biofuels from Low-Input High-Diversity Grassland Biomass. **Science**, v. 314, n. 5805, p. 1598-1600, 2006.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz energética brasileira: uma perspectiva. **Novos Estudos - CEBRAP**, , n. 79, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-33002007000300003&script=sci_arttext>. Acesso em: 9 nov. 2010.

VIANNI, R.; BHATTACHARYA, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 400-407, 1995.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. New York: Wiley, 1995, p. 94.

WARABI, Y.; KUSDIANA, D.; SAKA, S. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 283-287, 2004.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 7, p. 703-707, 2001.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 151-155, 2002.

ZHANG, Y.; DUBE, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1-16, 2003.