UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LÍVIA TEREZA DE ANDRADE SOUZA

Síntese Enzimática do Biodiesel de *Jatropha curcas* pela Rota Etílica

Lorena
2010

LÍVIA TEREZA DE ANDRADE SOUZA

Síntese Enzimática do Biodiesel de *Jatropha curcas* pela Rota Etílica

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientadora: Profa. Dra. Heizir F. de Castro

**LORENA
2010**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Souza, Livia Tereza de Andrade

Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica / Livia Tereza de Andrade Souza; orientadora Heizir Ferreira de Castro.—Lorena: 2010.
118 p: ilus.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Lipases 2. Biodiesel 3. Óleo de Pinhão Manso 4. Etanol 5. Micro-ondas. I. Título.

577.152.9 – CDU

Dedicatória

Aos meus amados pais, familiares, amigos e todos aqueles com quem compartilhei os momentos de alegria e dificuldade durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me presentear com momentos e pessoas especiais, por iluminar meu caminho e amparar nos momentos de felicidade e de fracasso. Obrigado Senhor, por ter me concedido fé, força, alegria e capacidade em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais, Iris e Sebastião, que além de educadores são os meus melhores amigos. Obrigada por todo o amor, apoio, incentivo, preocupação, valores e princípios. Agradeço também pela presença cotidiana mesmo com toda a ausência física e por sempre estarem dispostos a me ajudar com palavras sábias ou mesmo por meio de um silêncio necessário.

Ao Gê por ter sido a minha estrela guia durante importantes fases da minha vida. Obrigada por todo carinho, amor, amizade, conselhos, apoio, companheirismo e pela Lignina.

À Prof^a Dra. Heizir Ferreira de Castro, agradeço pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelo aprendizado acadêmico e, principalmente, de vida. Agradeço pela amizade, orientação, dedicação, pelos conselhos e disponibilidade em me ajudar.

Ao grupo de Biocatálise, pela amizade e convivência, pelos momentos de descontração, ajuda, conselhos e união. Obrigada por terem contribuído para uma caminhada mais suave e tão rica em conhecimento.

À Dra. Ana Paula Oliveira Costa, Dr. Júlio César dos Santos e Dr. Pedro Carlos de Oliveira, pela amizade e convivência, por estarem sempre disponíveis em expressar seus conhecimentos, pelas sugestões e contribuições neste trabalho.

Aos meus familiares, pela torcida e por todo o carinho e atenção. A vovó Maria pela oração, preocupação, amor e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos. Ao vovô José pelo exemplo de vida, sabedoria e eterna admiração.

À minha prima Flávia por ter se mantido presente em toda essa caminhada, por me ouvir, aconselhar, incentivar e apoiar em todas as decisões.

Às minhas amigas Ana Karine, Bruna, Gina e Tali por tornarem os meus finais de semana mais divertidos e acima de tudo por amenizarem a saudade que sentia da minha família e dos meus amigos distantes. À Quel, Lê e Tiago pela convivência, amizade, carinho, apoio e ajuda.

Aos amigos distantes pelos anos de amizade e por sempre terem compartilhado minhas alegrias e tristezas.

Ao Prof Dr. Marcos Rogério Totola, obrigada pela base científica que me proporcionou e por acreditar na minha capacidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SOUZA, L. T. A. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica**. 2010, 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)– Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2010.

O esperado crescimento na demanda de biodiesel no mercado mundial tem impulsionado uma evolução constante em seu sistema de produção de forma a torná-lo mais eficiente e ambientalmente favorável. O presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial do óleo de pinhão manso para obtenção de biodiesel pela via enzimática empregando etanol com agente acilante. Para alcançar o objetivo proposto, as atividades experimentais foram iniciadas pela adequação do óleo de pinhão manso bruto para sua utilização como matéria-prima na reação de transesterificação, incluindo as etapas de degomagem, neutralização e secagem. O óleo tratado, após caracterização físico-química, foi utilizado nos testes de triagem do biocatalisador enzimático testando diferentes preparações de lipases (EC 3.1.1.3) tanto na forma livre como imobilizada em SiO₂-PVA, para mediar a síntese de biodiesel em meio isento de solventes. Os testes indicaram que as lipases na forma imobilizada foram mais eficientes e permitiram selecionar os derivados imobilizados das lipases de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* como as preparações mais adequadas para catalisar a síntese de biodiesel a partir do óleo de pinhão, com rendimentos reacionais de 93,18% e 85,67%, respectivamente. Na segunda etapa do trabalho, os derivados imobilizados selecionados foram testados na reação de interesse, mantendo-se fixa as condições reacionais (temperatura 45°C, 1:9 de razão molar óleo/etanol e 500 unidades de atividade lipolítica por grama de óleo), empregando reatores de vidro acoplados com condensador de refluxo, para evitar perda de etanol. O monitoramento da reação foi efetuado pela determinação dos ésteres etílicos formados (Cromatografia de fase gasosa) e viscosidade cinemática em amostras retiradas ao longo da reação. O produto transesterificado (biodiesel) foi purificado e submetido às análises para caracterização de suas propriedades físico-químicas, incluindo estudo reológico, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TG) e ressonância magnética nuclear protônica (¹H-RMN). Os resultados obtidos permitiram confirmar que a lipase de *Burkholderia cepacia* foi a preparação de lipase mais eficiente para mediar a síntese do biodiesel do óleo de pinhão manso, alcançando rendimento de transesterificação superior a 97% (72h). O biodiesel produzido manteve-se estável termicamente até 128°C e não sendo constatada contaminação do produto com glicerol ou água residual, assegurando a eficiência da etapa de purificação do produto transesterificado. Experimentos adicionais foram ainda efetuados sob irradiação de micro-ondas e os resultados obtidos indicaram que o aquecimento por micro-ondas constitui um procedimento potencial para a produção de biodiesel, tendo em vista a considerável redução do tempo global de reação. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi determinada em bateladas consecutivas sob aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de 110 e 26,5h, respectivamente. A real contribuição da aceleração da reação por meio de irradiação de micro-ondas deverá ser reavaliada levando em consideração a acentuada perda da atividade sintética do biocatalisador.

Palavras-chave: Lipases. Biodiesel. Óleo de Pinhão Manso. Transesterificação. Etanol Micro-ondas.

ABSTRACT

SOUZA, L. T. A. **Enzymatic synthesis of *Jatropha curcas* biodiesel by ethylic route.** 2010. 118 f. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

The expected increase in the biodiesel demand worldwide has brought a constant evolution in its production system in order to make it more efficient and environmentally favorable. The objective of present work was to verify the potential of *Jatropha* oil as raw material to produce biodiesel by enzymatic route using ethanol as acilant agent. To attain the proposed objective, the experimental activities were starting by treating the oil to attain suitable properties to be used in the transesterification reaction, including the degumming, neutralization and drying steps. The treated oil, after physico-chemical characterization was used to carry out a screening test to select the most suitable biocatalyst by means of testing different preparations of lipases (EC 3.1.1.3) in free form as well as immobilized in SiO₂-PVA, to mediate the biodiesel synthesis in solvent free system. The assays indicated that the immobilized lipases were more efficient than free ones and allowed selecting the immobilized derivatives from *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* as the most suitable preparations to catalyze biodiesel synthesis from *Jatropha* oil, attaining yields of 93.18% and 85.67%, respectively. In the second step, the selected immobilized derivatives were used to catalyze the reaction of interest maintaining the previous set conditions (temperature 45°C, 1:9 molar ratio oil/ethanol and 500 units of lipolytic activity per gram of oil) using a glass reactor coupled with condenser to avoid ethanol loss. The reaction was monitored by determining the formed ethyl esters by gas chromatography and viscosity in samples taken from the reactor during the reaction. The transesterified product (biodiesel) was purified and submitted to further analyses for physico-chemical properties, including rheological study, FTIR, TG and ¹H NMR. The obtained results confirmed that the lipase from *Burkholderia cepacia* was the most efficient biocatalyst to mediate the biodiesel synthesis from *Jatropha* oil, attaining transesterification yields higher than 97% (72h. The product biodiesel was thermo stable up to 128°C and no residual glycerol or water contaminations were detected, assuring the efficiency of the down stream process. Additional experiments were performed under microwave irradiation and the results suggested that the microwave heating constitutes a potential procedure to enhance the reaction rate by reducing the global reaction time. The operational stability of the immobilized lipase was determined in repeated batch runs under conventional and microwave heating systems, revealing biocatalyst half-life time of 110 and 26.5 h, respectively. Therefore, the real contribution of the microwave irradiations to enhance the reaction should be revalued by taking into account the lost of the biocatalyst activity.

Keywords: Lipases. Biodiesel. *Jatropha* oil. Transesterification. Ethanol. Microwave

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos métodos para imobilização de enzimas	24
Figura 2: Ilustração de métodos de imobilização enzimática por confinamento. (a) Gel; (b) Fibra; (c) Microencapsulação.	25
Figura 3: Ilustração de métodos de imobilização enzimática por ligação. (a) Adsorção; (b) Ligação Iônica; (c) Ligação covalente.	27
Figura 4: Estrutura do suporte SiO ₂ -PVA (“R” representa o grupo alquil).....	28
Figura 5: Representação esquemática para a hidrólise sequencial do grupo acila de triacilgliceróis catalisada por lipases.	29
Figura 6: Exemplos de reações catalisadas por lipases.	31
Figura 7: Mecanismo catalítico das lipases.	32
Figura 8: Foto ilustrativa do fruto, semente, amêndoas e óleo de pinhão manso.	41
Figura 9: Fluxograma do aproveitamento e aplicação da cultura do pinhão manso	43
Figura 10: Equação geral da transesterificação de triacilglicerol com álcool. (R _X , R ₂ e R ₃ representam grupos alquilas)	49
Figura 11: Esquema da reação de transesterificação.....	49
Figura 12: Parâmetros cruciais que afetam a síntese enzimática de biodiesel.....	52
Figura 13: Micro-ondas no espectro eletromagnético.....	57
Figura 14: Mecanismo de transformação de energia denominado de rotação de dipolo	58
Figura 15: Comparação entre o sistema de aquecimento por irradiação de micro-ondas (a) e o aquecimento convencional (b).	59
Figura 16: Diagrama de blocos do procedimento experimental para a purificação do óleo.....	64
Figura 17: Aparelhagem utilizada para síntese de biodiesel empregando as lipases previamente selecionadas.	71
Figura 18: Reator de micro-ondas Discover.	71
Figura 19: Purificação do biodiesel.....	73
Figura 20: Perfil de formação dos ésteres de etila em função do tempo de reação da etanolise do pinhão manso catalisada por diferentes lipases imobilizadas. Todos os ensaios foram realizados em shaker com agitação orbital de 200 rpm a 45°C. Lipase AK (a), Lipase PS (b) e Novozym 435 (c).	84
Figura 21: Rendimento de transesterificação (%) em função do tempo de reação da etanolise do óleo de pinhão manso catalisada pelas lipases PS e AK.	85
Figura 22: Correlação entre viscosidade do produto transesterificado (▼) e rendimento de transesterificação (○) durante o progresso da reação de etanolise do óleo de pinhão manso catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA (razão molar óleo/etanol 1:9 a 45°C).....	86
Figura 23: Ressonância magnética nuclear de prótons das amostras do óleo do pinhão manso e do biodiesel sintetizado pelas lipases AK e PS.	88

Figura 24: Espectro na região do infravermelho das amostras de óleo de pinhão manso e do biodiesel sintetizado pelas lipases PS e AK.....	89
Figura 25: TG do óleo de pinhão manso e dos produtos transesterificados pela atuação das lipases AK e PS (Análise efetuada em atmosfera inerte de nitrogênio).....	92
Figura 26: DTG do óleo de pinhão manso e dos produtos transesterificados pela atuação das lipases AK e PS (Análise efetuada em atmosfera inerte de nitrogênio).....	92
Figura 27: TG/DTG do biodiesel produzido pela lipase PS (Atmosfera oxidativa).	94
Figura 28: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA, em bateladas consecutivas de etanolise do óleo de pinhão manso a 45°C. (○) rendimento de transesterificação e (●) viscosidade do produto transesterificado ao final de cada ciclo...	95
Figura 29: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA na síntese de biodiesel a partir do óleo de pinhão manso. Atividade hidrolítica do biocatalisador (t inicial= 1500 U /g e t final= 166 U/g).	96
Figura 30: Rendimento de transesterificação do óleo de pinhão manso catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA sob irradiação de micro-ondas em função do tempo de reação a 45° C operando nas condições testadas. (○) Condição 1 e (●) Condição 2.	98
Figura 31: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA, em bateladas consecutivas de etanolise do óleo de pinhão manso a 45°C sob irradiação de micro-ondas. (○) rendimento de transesterificação e (●) viscosidade do produto transesterificado ao final de cada ciclo.....	100
Figura 32: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA na síntese de biodiesel a partir do óleo de pinhão manso sob irradiação de micro-ondas. Atividade hidrolítica do biocatalisador (t inicial= 1500 U /g e t final= 308 U/g).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações industriais das lipases.....	35
Tabela 2: Propriedades do óleo de pinhão manso.....	44
Tabela 3: Exemplos de métodos para a produção de biodiesel por transesterificação do óleo de pinhão manso.....	46
Tabela 4: Propriedades físico-químicas do biodiesel obtido do óleo de pinhão manso produzido em planta piloto com capacidade de 30 galões/dia.....	47
Tabela 5: Comparação entre diferentes métodos para a produção de biodiesel	48
Tabela 6: Produção de biodiesel pela via enzimática.....	55
Tabela 7: Exemplos de reações de transesterificação enzimática assistidas por irradiação de micro-ondas	61
Tabela 8: Equipamentos utilizados durante a execução do trabalho.....	63
Tabela 9: Classificação morfológica do suporte SiO ₂ -PVA quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.....	68
Tabela 10: Condições para determinação dos ésteres de etila.	74
Tabela 11: Composição em ácidos graxos das amostras de óleo de pinhão manso.....	76
Tabela 12: Propriedades físico-químicas das amostras do óleo de pinhão manso utilizadas neste trabalho.	78
Tabela 13: Atividade hidrolítica, teor de proteínas e atividade específica das lipases testadas.....	80
Tabela 14: Atividades hidrolítica e a atividade recuperada dos derivados imobilizados em SiO ₂ -PVA.	80
Tabela 15: Desempenho das lipases imobilizadas em SiO ₂ -PVA na etanólise do óleo de pinhão-manso.	82
Tabela 16: Correlação entre rendimento de transesterificação (%) e viscosidade cinemática (cSt).....	87
Tabela 17: Etapas e temperaturas de degradação térmica para as amostras do óleo e biodiesel de pinhão manso sintetizado pela atuação das lipases PS e AK em atmosfera inerte... ..	90
Tabela 18: Etapas e temperaturas de degradação térmica para a amostra de biodiesel de pinhão manso sintetizado pela lipase PS (atmosfera oxidativa).	93
Tabela 19: Comparação dos parâmetros globais de reação de etanólise do óleo de pinhão manso (rendimento e produtividade), para os experimentos realizados sob aquecimento convencional e micro-ondas (6h), utilizando lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	98

ÍNDICE DE SIGLAS

AK – Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

CG – Cromatografia Gasosa

DTG – Termogravimetria diferencial

PEG – Polietilenoglicol

RMN – Ressonância magnética nuclear

PS – Lipase de *Burkholderia cepacia*

SiO₂-PVA – Polissiloxano - álcool polivinil

TEOS – Tetraetilortossilicato

TG – Termogravimetria

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Enzimas como catalisadores	19
2.2. Aplicações das enzimas em meios não convencionais	20
2.3. Imobilização de enzimas.....	22
2.4. Técnicas de imobilização de enzimas.....	24
2.4.1. <i>Imobilização por retenção física</i>	24
2.4.2. <i>Imobilização por ligação química</i>	26
2.5. Lipases	28
2.5.1. <i>Reações catalisadas pelas lipases e mecanismos catalíticos</i>	30
2.5.2. <i>Fontes de lipases</i>	33
2.5.3. <i>Aplicações industriais das lipases</i>	34
2.6. Biodiesel	35
2.6.1. <i>Aspectos gerais</i>	35
2.6.2. <i>Matérias-primas para a síntese de biodiesel</i>	37
2.7. Pinhão Manso	39
2.7.1. <i>Características botânicas do pinhão manso</i>	40
2.7.2. <i>Utilização e aproveitamento industrial do pinhão manso</i>	41
2.7.3. <i>Composição do óleo de pinhão manso</i>	43
2.7.4. <i>O uso do óleo de pinhão manso como combustível</i>	44
2.8. Produção de biodiesel	47
2.8.1. <i>Reação de transesterificação</i>	48
2.8.2. <i>Transesterificação enzimática</i>	50
2.9. Reações enzimáticas assistidas por irradiação de micro-ondas	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1. Lipases	62
3.2. Suporte de imobilização.....	62
3.3. Substratos	62
3.4. Outros materiais e reagentes	62
3.5. Equipamentos.....	63
3.6. Procedimento experimental.....	63
3.6.1. <i>Tratamento e purificação dos óleos brutos de pinhão manso</i>	63
3.6.2. <i>Caracterização físico-química das amostras de óleo de pinhão manso</i>	65
3.6.2.1. <i>Determinação da composição em ácidos graxos do óleo pinhão manso</i>	65
3.6.2.2. <i>Índice de Acidez (I.A.)</i>	65
3.6.2.3. <i>Índice de Peróxido (I.P.)</i>	65
3.6.2.4. <i>Índice de Saponificação (I.S.)</i>	66
3.6.2.5. <i>Índice de Iodo (I.I.)</i>	66
3.6.2.6. <i>Viscosidade</i>	67
3.6.2.7. <i>Densidade</i>	67
3.6.3. <i>Preparação dos derivados imobilizados</i>	67
3.6.3.1. <i>Síntese e ativação do suporte híbrido SiO₂-PVA</i>	67
3.6.3.2. <i>Imobilização de lipases de diferentes fontes em SiO₂-PVA</i>	68
3.6.3.3. <i>Dosagem de atividade hidrolítica das lipases livres e imobilizadas</i>	69
3.6.3.4. <i>Dosagem da umidade dos derivados imobilizados</i>	69

3.6.3.5. <i>Teor de proteína</i>	69
3.6.4. Reações de Síntese do Biodiesel de <i>Jatropha curcas</i>	70
3.6.4.1. <i>Testes de seleção da fonte de lipase</i>	70
3.6.4.2. <i>Etanólise do óleo de pinhão manso com as enzimas previamente selecionadas sob aquecimento convencional</i>	70
3.6.4.3. <i>Etanólise do óleo de pinhão manso empregando-se a enzima selecionada sob irradiação de micro-ondas</i>	71
3.6.5. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA sob aquecimento convencional	72
3.6.6. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA sob aquecimento não convencional	72
3.6.7. <i>Purificação do biodiesel</i>	73
3.6.8. Análises do biodiesel	73
3.6.8.1 <i>Determinação dos ésteres formados na reação de etanólise do pinhão manso</i>	73
3.6.8.2. <i>Cálculo do rendimento de transesterificação</i>	74
3.6.8.3. <i>Análise de viscosidade do biodiesel</i>	74
3.6.8.4. <i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	75
3.6.8.6. <i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1. Caracterização do óleo de pinhão manso	76
4.1.1. <i>Composição química em ácidos graxos</i>	76
4.1.2. <i>Propriedades físico-químicas do óleo de pinhão manso</i>	77
4.2. Imobilização das lipases de diferentes fontes no suporte híbrido SiO ₂ -PVA	79
4.3. <i>Testes de seleção da fonte de lipase: Desempenho das enzimas nas formas livre e imobilizada</i>	81
4.4. Etanólise do óleo de pinhão manso com as lipases previamente selecionadas	85
4.4.1 <i>Estudo reológico das amostras de biodiesel</i>	85
4.4.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio</i>	87
4.4.3. <i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	88
4.4.4. <i>Análises Termogravimétricas: TG e DTG</i>	89
4.4.5. <i>Estabilidade oxidativa da amostra de biodiesel</i>	93
4.5 Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA	94
4.6. Etanólise do óleo de pinhão manso catalisada pela lipase PS sob irradiação de micro-ondas	97
4.6.1 <i>Reciclo da lipase selecionada sob irradiação de micro-ondas</i>	99
6. CONCLUSÃO	103
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

A concepção da possibilidade de utilização de biocombustíveis nos motores do ciclo a diesel foi proposta por Rudolf Diesel, inventor do motor a diesel, na “World Exhibition” realizada na cidade de Paris em 1900. O inventor do motor de combustão interna demonstrou que a máquina podia ser operada utilizando óleo de amendoim como combustível. Entretanto, em razão da abundância do petróleo, as pesquisas de desenvolvimento relativas aos motores movidos a óleos vegetais não foram de grande relevância naquela época (AGARWAL; DAS, 2000). Com o passar do tempo, tanto o motor quanto o combustível foram ajustados, buscando maior eficiência e menor custo, a tal ponto que, atualmente, não mais é possível utilizar petróleo ou óleos vegetais *in natura* diretamente. O uso de óleos vegetais *in natura* é restrito por algumas propriedades físicas não favoráveis, particularmente a viscosidade. Em razão da elevada viscosidade, os óleos vegetais causam redução da atomização, combustão incompleta e deposição de carbono nos injetores e válvulas, resultando em graves problemas no motor (KNOTHE et al., 2006).

Tendo em vista a crescente crise energética e a rígida regulamentação referente à emissão de gases poluentes, existe a necessidade de substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia menos poluidoras. No atual estado da arte, o desenvolvimento da tecnologia de produção do biodiesel como uma fonte de energética renovável e alternativa para o setor da agricultura mecanizada e de transportes tem se tornado crucial para a estratégia política de desenvolvimento e autonomia energética para os países produtores (SAHOO; DAS, 2009). Além disso, o biodiesel tem sido considerado o melhor candidato para substituição do petrodiesel, uma vez que pode ser utilizado em motores de compressão e ignição sem a necessidade de qualquer modificação (KNOTHE et al., 2006).

Quimicamente, o biodiesel pode ser definido como sendo uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais. Esse biocombustível tem elevada eficiência de combustão (com número de cetano semelhante ao do diesel), é biodegradável (mais de 90% do biodiesel pode ser biodegradado dentro de 21 dias), possui menor conteúdo de enxofre e compostos aromáticos que o diesel e, portanto, emite menor quantidade de gases tóxicos (KNOTHE et al., 2006). Sendo assim, o incentivo à produção do biodiesel está sustentada em um tripé: (1) ambiente (melhoria das condições climáticas por redução das emissões e utilização de CO₂ pela matéria-prima); (2) social (desenvolvimento rural associado à produção de

matéria-prima); (3) energia (independência de fornecedores, consumidores produzindo sua própria energia) (QUINTELLA et al., 2009).

Mais de 95% da matéria-prima lipídica empregada para a produção de biodiesel provêm de óleos vegetais comestíveis em razão da grande produção mundial e da composição química destes óleos que proporciona a produção de um biodiesel de alta qualidade (GUI; LEE; BHATIA, 2008). Entretanto, a utilização de óleos comestíveis apresenta algumas limitações, tais como a competição com a cadeia alimentícia, resultando na elevação tanto do preço do biocombustível como do óleo comestível (KANSEDO; LEE; BHATIA, 2009).

Para contornar tais limitações, pesquisas têm sido direcionadas para o uso de óleos não-comestíveis, os quais não são aptos para a alimentação humana em decorrência do elevado teor de ácidos graxos saturados (considerados prejudiciais à saúde) ou da presença de componentes tóxicos, como os contidos nos óleos de mamona e colza (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). As sementes das oleaginosas não-comestíveis, geralmente, podem ser cultivadas em terras pouco férteis, as quais não são adequadas para o crescimento da maioria das oleaginosas e o custo de cultivo é menor, uma vez que as sementes possuem elevados teores em óleo, mesmo sem cuidados intensivos (KUMAR; KUMAR; RAHEMAN, 2007).

No presente trabalho, foi selecionado como matéria-prima lipídica o óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*). O pinhão manso pertence à família das Euforbiáceas e vem sendo considerado uma opção agrícola promissora para a produção mundial de biodiesel dadas as suas características agrônômicas e a qualidade do óleo. O pinhão manso possui grande resistência à seca, é uma cultura perene, produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare e leva de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que pode se estender por 40 anos (DIAS et al., 2007). É uma planta com muitos atributos favoráveis, usos múltiplos e potencial considerável, podendo ser usada para prevenir e controlar a erosão; em reformas de terra; como cerca viva, especialmente na contenção de animais; sua torta tratada pode ser utilizada na alimentação animal; várias partes da planta têm valor medicinal; suas flores atraem abelhas, assim apresentando potencial de produção de mel; além disso, contém óleo que pode ser usado na fabricação de sabão, na indústria de cosméticos e na produção de biodiesel. (OPENSHAW, 2000). No que se refere ao estado da arte, embora os estudos sobre a cultura de pinhão manso estejam avançando rapidamente, são muito recentes e ainda são poucos os trabalhos nacionais publicados sobre a produção e caracterização do biodiesel de pinhão manso obtido por via enzimática.

O biodiesel comercial tem sido obtido por meio da transesterificação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta. As reações de transesterificação podem ser conduzidas na presença de catalisadores químicos (ácidos e bases minerais, alcóxidos e bases não-iônicas) e enzimáticos (lipases) (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998). Em razão da maior rapidez, simplicidade e eficiência, a catálise homogênea em meio alcalino ainda prevalece como a rota tecnológica mais comumente utilizada para a produção industrial de biodiesel. No entanto, um de seus maiores inconvenientes está relacionado à inevitável produção de sabões, tanto pela neutralização dos ácidos graxos livres quanto pela saponificação dos triacilglicerídeos. Reações secundárias como estas são indesejáveis, pois além de consumirem parte do catalisador, dificultam o processo de separação do glicerol e a purificação do biodiesel, diminuindo o rendimento da reação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

A produção de biodiesel via catálise enzimática tem despertado grande interesse nos setores produtivo e acadêmico. Nessa rota, são utilizadas lipases (glicerol éster hidrolases, EC. 3.1.1.3), que são enzimas cuja função biológica é de catalisar a hidrólise parcial ou completa de gorduras e óleos, desempenhando um papel fundamental no metabolismo dos lipídeos. No entanto, em meios reacionais com restrição de água, estas enzimas podem ainda catalisar outros tipos de reação, a exemplo da alcoólise ou transesterificação. Essas enzimas podem ser extraídas de tecidos vegetais (por exemplo, látex) e animais (lipases pancreáticas, hepáticas e gástricas) ou ser produzidas por cultivo de micro-organismos (fungos e bactérias), sendo a eficiência catalítica dependente das propriedades físico-químicas da enzima, e consequentemente da origem da enzima. Como biocatalisadores, apresentam vantagens importantes sobre os catalisadores químicos, como a especificidade, a regiosseletividade e a enantioseletividade, que permitem a catálise de reações com um número reduzido de co-produtos, menor geração de efluentes e sob condições mais brandas de temperatura e pressão (PAQUES; MACEDO, 2006; LOTTI; ALBERGHINA, 2007).

Embora a rota enzimática não possa competir atualmente com a transesterificação química, poderia gradativamente substituí-la, dado o crescente interesse pela utilização do biodiesel e a necessidade atual de processos industriais menos poluidores. Desta forma, diversos resultados têm sido reportados em forma de artigos e patentes. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições reacionais (solvente, temperatura, pH, fonte de enzima, entre outros), visando estabelecer as características operacionais para futuras aplicações industriais. Por meio da transesterificação enzimática de óleos e

gorduras, é possível a recuperação do catalisador, eliminação dos problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio verificados no processo químico (AKOH et al., 2007; PARAWIRA, 2009; QUINTELLA et al., 2009).

Apesar das vantagens processuais serem muitas e variadas, a rota enzimática é limitada pelo elevado custo das enzimas e pelo longo tempo de reação. O aprimoramento das sínteses enzimáticas por meio da combinação do uso de técnicas de imobilização de enzimas e sistemas de aquecimento não-convencionais (micro-ondas e ultrassom) representa uma alternativa promissora para tornar a rota enzimática economicamente competitiva. Em função dessas considerações, foi proposto no presente trabalho a produção enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica, empregando-se sistema de aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica, será dado um breve enfoque nos principais temas relacionados com o trabalho desenvolvido, iniciando-se com a utilização de enzimas como catalisadores, incluindo a aplicação dos biocatalisadores em meios não-convencionais e a descrição dos métodos de imobilização de enzimas. Em seguida, ênfase será dada à enzima de interesse nesse trabalho, as lipases. Por fim, será focado o processo de obtenção de biodiesel por via enzimática, ressaltando a matéria-prima lipídica selecionada como objeto de estudo deste projeto, óleo de pinhão manso.

2.1 Enzimas como catalisadores

Os termos “biocatálise” ou “biotransformação”, de maneira geral, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. Trata-se de uma ferramenta tecnológica atrativa por priorizar a síntese de compostos de alto valor agregado de maneira ecologicamente limpa, ou seja, com a redução ou eliminação do uso de solventes ou da geração de produtos e sub-produtos que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente (DE CASTRO et al., 2004).

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisar as reações metabólicas, aumentando a velocidade das reações em até 10^{14} vezes. Com exceção de alguns pequenos ácidos nucleicos (RNAs) com função catalítica, os biocatalisadores são moléculas de proteína e seu poder catalítico está associado à conformação nativa, que depende de condições específicas de temperatura, pH e força iônica (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

As enzimas apresentam propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores. Elas são versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas de reação. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar a natureza do meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do valor de pH ou pela adição de algum inibidor. Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Consequentemente, os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar e energeticamente eficientes (PATEL, 2002; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Além disso, as enzimas atendem as

especificações atuais da química verde e são capazes de catalisar um amplo espectro de reações.

De acordo com os relatos da “Business Communications Company”, o valor de venda das enzimas para utilização industrial (alimentos, detergentes e especialidades químicas) foi estimado em 2 bilhões de dólares em 2004. As projeções naquela época previam um aumento na taxa de crescimento do mercado de biocatalisadores de aproximadamente 4-5 % ao ano, em função do aumento do número de empresas que comercializam enzimas com preços mais competitivos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Entretanto, essas expectativas foram superadas e o crescimento da demanda global alcançou valores de 7,6% ao ano com valor de venda estimado em 6 bilhões dólares em 2011. Para os próximos 5 anos, está prevista a manutenção desta taxa de crescimento impulsionada pelo desenvolvimento de novas rotas de processo, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos, ampliando simultaneamente o potencial de aplicação das enzimas em processos industriais (BCC RESEARCH, 2010).

O mercado global de enzimas se divide em três segmentos de aplicação como (i) enzimas técnicas, (ii) enzimas utilizadas por indústrias de alimentos e (iii) para ração animal. O mercado consumidor que mais cresce é aquele destinado ao setor alimentício, em torno de 4% ao ano. As enzimas destinadas aos setores de alimentos são utilizadas na produção de xarope de açúcar invertido e para a produção de compostos aromatizantes. Enzimas técnicas são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos. Este é o principal mercado consumidor e representa aproximadamente 50% do total de enzimas comercializadas no mercado. As enzimas mais utilizadas no setor industrial são as proteases, 40% do mercado de enzimas, seguido de carboidrases e lipases (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

O rápido crescimento da biocatálise está certamente associado às ferramentas de biologia molecular e engenharia de proteínas, que permitem gerar variáveis com propriedades diferentes como estruturas, função, seletividade e, também, tolerância a solventes não-aquosos. Hoje já são conhecidas várias enzimas que são cataliticamente ativas em meios reacionais predominantemente não-aquosos, os quais são também denominados meios não-convencionais (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

2.2 Aplicações das enzimas em meios não-convencionais

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensamente usada em processos catalíticos, tanto na área tecnológica como científica, por vários anos. Porém, seu uso

tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, o que necessitava de grande volume reacional e procedimentos de separação complexos. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou esse problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis. A adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível (AIRES-BARROS, 2002).

Os estudos de enzimas em meio orgânico têm evoluído significativamente nos últimos anos e começaram com a investigação do comportamento das enzimas em sistemas predominantemente aquosos, os quais continham pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água. Posteriormente, desenvolveram-se sistemas enzimáticos para misturas de duas fases aquosa/ orgânica e, em seguida, em meio orgânico contendo uma fase aquosa dispersa (microemulsões). Atualmente, os meios não-convencionais para biocatálise podem ser solventes orgânicos, fluidos supercríticos, sistemas em que não são utilizados solventes orgânicos (fases sólidas, líquidas e gasosas) e, recentemente fluídos iônicos (AIRES-BARROS, 2002).

Uma das principais vantagens da catálise em meio orgânico é a possibilidade de deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, pela extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou pela diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como a esterificação e as interesterificações tornam-se viáveis industrialmente.

Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas permanecem na sua conformação original (RUPLEY; GRATTON; CARERI, 1983). As proteínas, em meio não aquoso, não são capazes de se desdobrar devido, em parte, ao aumento nas interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da molécula em meio orgânico, em razão da baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e também, ao aumento no número de pontes de hidrogênio intramoleculares (KLIBANOV, 2001).

A frequência no uso de um tipo particular de enzima não está uniformemente distribuída entre suas diferentes classes. Esta distribuição segue um perfil definido por suas vantagens técnicas e versatilidade de aplicação. Segundo Faber (1997), a participação das hidrolases (lipases, esterases e proteases) nas reações de biotransformação perfaz um total de 65%. Este fato é uma consequência direta da disponibilidade comercial dessas enzimas, o que permite a seleção da enzima mais adequada para a biotransformação desejada.

Dentre as enzimas hidrolíticas empregadas em síntese orgânica, as lipases pelo fato

de possuírem quimiosseletividade, regioespecificidade e estereosseletividade, serem produzidas por diferentes micro-organismos, não requererem co-fatores e manterem a estabilidade quando em contato com solventes orgânicos, atendem de maneira diferenciada aos pré-requisitos para esse tipo de sistema reacional (JAEGER; EGGERT, 2002).

Apesar da alta atividade catalítica das enzimas e dos benefícios que acrescentam aos processos, a aplicação industrial destas é limitada pelo alto custo e estabilidade nas condições reacionais. A fim de minimizar esses inconvenientes e aumentar a vida útil do biocatalisador, são empregadas algumas técnicas, como a modificação química da enzima, a imobilização enzimática e a engenharia protéica e genética (VILLENUEVE et al., 2000).

2.3 Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio. Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte (CASTRO et al., 2008).

O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. O termo enzima imobilizada inclui: a modificação das enzimas de forma a torná-las insolúveis em água; a utilização de enzimas na forma solúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração, que permitem o escoamento dos produtos da reação e retenção da enzima no interior do reator e a restrição da mobilidade da enzima pela ligação a outra molécula, que torna o sistema insolúvel no meio reacional (ZANIN; MORAES, 2004).

A tecnologia de imobilização enzimática envolve basicamente a escolha do suporte e do método de imobilização nesse suporte. Um bom suporte deve ser resistente à contaminação, ter boa resistência mecânica, ser estável termicamente e estar disponível comercialmente por um custo razoável (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). A imobilização pode ocorrer por adsorção (ligação física) ou ligação química (ligação covalente) da enzima a um material insolúvel, por ligações cruzadas por meio do uso de um reagente multifuncional, pelo confinamento da enzima em matrizes de géis poliméricos ou por encapsulação em uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o seu uso

em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados pode diminuir o custo do processo, caso este possa ser reutilizado, aumentar a velocidade e a repetibilidade do processo, facilitar na recuperação dos produtos, melhorar o controle de operação de processos em reatores e minimizar a produção de efluentes. Além disso, o processo de imobilização pode alterar as propriedades enzimáticas, resultando em biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

No entanto, também são relatadas algumas desvantagens na utilização das enzimas na forma imobilizada, a saber: limitações difusionais, perda de atividade ou inibição enzimática, e, muitas vezes, o alto custo para produção do biocatalisador. Neste caso, o custo da imobilização deve ser compensado pela possibilidade de reutilização do biocatalisador.

Diversos procedimentos para a imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos, objetivando-se a redução da perda de atividade biocatalítica durante o processo de imobilização e, conseqüentemente, a diminuição do custo extra da imobilização, pelo uso mais efetivo da atividade catalítica retida na matriz de imobilização. Para minimizar essas desvantagens, torna-se necessário um conhecimento integrado dos seguintes parâmetros (CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009):

- Propriedades do suporte (porosidade, natureza química, hidrofobicidade ou hidrofiliidade, estabilidade química e mecânica, carga da superfície, tamanho da partícula);
- Natureza da enzima (tamanho da molécula, flexibilidade conformacional necessária à catálise, ponto isoelétrico, glicosilação, presença de regiões hidrofóbicas, presença de regiões hidrofílicas, densidade de carga na superfície, estabilidade nas condições de imobilização);
- Fatores específicos relativos ao sistema (meio reacional, limitações difusionais, inibição enzimática, precipitação de produtos, viscosidade da mistura, termodinâmica reacional).

2.4 Técnicas de imobilização de enzimas

As variações entre as propriedades químicas e estruturas das enzimas, as diferenças entre as características dos substratos e produtos e a aplicação do produto de interesse tornam inviável a generalização de um único método de imobilização. Em função disso, vários métodos para a imobilização enzimática estão sendo desenvolvidos e testados para a imobilização de diferentes biocatalisadores (CASTRO et al., 2008). De modo geral, os processos de imobilização enzimática podem ser classificados em duas grandes categorias: retenção física e ligação química (Figura 1). A principal diferença entre as duas técnicas consiste no fato da retenção física não requerer uma ligação entre o biocatalisador e o suporte, preservando a conformação nativa da enzima (KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990).

Figura 1: Classificação dos métodos para imobilização de enzimas

Fonte: Adaptada de KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990.

2.4.1 Imobilização por retenção física

A técnica de imobilização por retenção física consiste em confinar uma proteína em matrizes formadas por géis poliméricos ou em membranas poliméricas semipermeáveis, contendo poros de tamanho ideal para a retenção de moléculas grandes, tais como as enzimas, enquanto permite a difusão de moléculas pequenas, como substratos e produtos (KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Conforme pode ser verificado na Figura 1, este método pode ser subdividido em:

a) Confinamento em gel: a maior parte das metodologias baseia-se na mistura do biocatalisador com um fluido precursor do gel e a subsequente gelificação por meio de polimerização ou precipitação, o que faz com que a enzima fique distribuída no interior da

matriz. As matrizes preferidas, normalmente são as do tipo hidrogel, e podem ser obtidas nas mais variadas formas (CASTRO et al., 2008) (Figura 2-a).

(b) Confinamento em fibras: a preparação de enzimas imobilizadas no interior de fibras pode ser realizada pela dissolução de um polímero, como o acetato de celulose, em um solvente orgânico imiscível em água seguida da emulsificação desta solução com a solução aquosa contendo a enzima. Em seguida, estuda-se a emulsão em um líquido coagulante (tolueno ou éter de petróleo) que precipita o polímero na forma filamentosa (Figura 2- b). No interior do polímero são retidas as microgotas contendo a enzima (FERNANDES; CABRAL, 2006). Em geral, as fibras são resistentes a alguns solventes orgânicos, a alta força iônica e a ácidos e bases fracos. Entretanto, a escolha do biocatalisador é limitada pelo tamanho da molécula do substrato e a necessidade de agentes de precipitação, os quais podem ocasionar a inativação do biocatalisador (KENNEDY; WHITE; MELO, 1990).

Figura 2: Ilustração de métodos de imobilização enzimática por confinamento. (a) Gel; (b) Fibras; (c) Microencapsulação.

Fonte: Adaptada de KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990.

(c) Microencapsulação: A microencapsulação é um processo muito similar aos descritos anteriormente, com a particularidade da enzima se encontrar totalmente envolvida por uma membrana (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004) (Figura 2-c). As principais vantagens da encapsulação de enzimas incluem a grande área superficial para contato do substrato e da enzima, no interior de um volume relativamente pequeno, e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Entretanto, existe a possibilidade da enzima se incorporar na parede da membrana (KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990).

Como principais desvantagens da imobilização por retenção física, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores somente podem ser aplicados com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização;

a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação ou inclusão; e, os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; CASTRO et al., 2008).

2.4.2 Imobilização por ligação química

A imobilização por ligação química pode ser dividida em:

(a) Ligação por adsorção - este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte sendo essa ligação estabilizada por mudanças entrópicas ou hidrofóbicas, tais como forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo (Figura 3-a). Enzimas que possuem uma extensa superfície hidrofóbica irão interagir melhor com suporte hidrofóbicos, enquanto que enzimas glicosiladas ou com extensa porção hidrofílica interagem melhor com suportes hidrofílicos. A imobilização via efeitos entrópicos ou ligações de hidrogênio não exige que a enzima seja quimicamente modificada ou sofra algum tipo de pré-tratamento, tornando possível a utilização de extratos enzimáticos (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009). Os principais fatores que interferem neste método são o pH do meio, a força iônica, o diâmetro do poro e a presença de íons. O método de adsorção é de baixo custo, não altera as propriedades da enzima e os derivados imobilizados são estáveis em meio com baixo teor de água. Entretanto, os derivados possuem baixa resistência mecânica. Existe ainda a dificuldade em se otimizar as variáveis que controlam a adsorção e a fraca união das enzimas ao suporte (ARROYO, 1998).

(b) Ligação iônica – consiste na fixação da enzima no suporte sólido por meio da interação eletrostática entre as cargas iônicas do suporte e da enzima (Figura 3-b). Os principais fatores que afetam essa técnica são o ponto isoelétrico (pI) da enzima, os resíduos de aminoácidos carregados (tipo e densidade), o pH e a força iônica da solução tampão empregada durante a imobilização. Dependendo do estado de ionização da enzima, o qual é influenciado pelo pH do meio e pela temperatura escolhida para a imobilização, a enantiosseletividade e atividade enzimática podem ser modificadas (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

(c) Ligação covalente - neste caso, como o próprio nome sugere, a enzima é ligada ao suporte mediante ligações químicas covalentes ou por ligações cruzadas, que são normalmente estabelecidas entre os grupos amino dos resíduos de aminoácidos e os grupos reativos do suporte (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004) (Figura 3-c).

Entretanto, outros grupos funcionais na superfície da enzima também podem ser utilizados, incluindo resíduos de açúcar. Esse método proporciona uma forte ligação entre a enzima e o suporte, reduzindo a flexibilidade e vibrações térmicas da molécula (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009). As principais vantagens dessa técnica referem-se à alta estabilidade do derivado imobilizado, não permitindo que a enzima se desprenda do suporte em presença do substrato ou de soluções de altas concentrações (ZANIN; MORAES, 2004). Entretanto, a forte interação entre a enzima e o suporte pode ocasionar perda da atividade enzimática, causada por modificações na estrutura cataliticamente ativa. Somente alguns poucos suportes contêm grupos reativos para interação direta com as enzimas. A maior parte deles possui grupos hidroxil, amino, amido ou carboxil, os quais requerem uma etapa de ativação antecedente à de imobilização (KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990).

Figura 3: Ilustração de métodos de imobilização enzimática por ligação. (a) Adsorção; (b) Ligação Iônica; (c) Ligação covalente.

Fonte: Adaptada de KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990.

Em estudos desenvolvidos no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL-USP), foi testada com sucesso uma matriz híbrida, obtida pela técnica sol-gel, a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA). O suporte resultante, polissiloxano – álcool polivinílico (SiO_2 -PVA), é um composto que combina atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral, bem como a manutenção da elevada atividade e estabilidade (BRUNO et al., 2005). Na Figura 4 é apresentada a estrutura química do SiO_2 -PVA.

Figura 4: Estrutura do suporte SiO_2 -PVA (“R” representa o grupo alquil).
Fonte: BRUNO et al., 2005.

Esta matriz previamente ativada tem sido utilizada na imobilização por ligação covalente de diferentes fontes de lipases, incluindo: pancreática (PAULA; BARBOZA; CASTRO, 2005), *Mucor miehei* (BRUNO et al.; 2005), *Pseudomonas fluorescens* (SANTOS et al., 2008), *Candida rugosa* (PAULA et al., 2008), *Burkholderia cepacia* (FREITAS et al., 2009), *Rhizopus oryzae* (PAULA et al., 2010) e *Penicillium camembertii* (FREITAS et al., 2010).

2.5 Lipases

As lipases [glicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3)] pertencem a um grupo especial de esterases, cuja definição clássica descreve essas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando di- ou monogliceróis, ácidos graxos e glicerol (Figura 5). São constituídas pela tríade catalítica G-X₁-S-X₂-G, em que G=glicina, S=serina, X₁= histidina e X₂=ácido aspártico ou glutâmico (JAEGER; REETZ, 1998). Essas enzimas atuam na interface de lipídeo/água catalisando a hidrólise de substratos pouco solúveis em água, como por exemplo, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 8 átomos de carbono), seus substratos naturais, além de serem capazes de catalisarem reações de síntese, em ambientes aquoso-restritos (FREIRE; CASTILHO, 2008).

As lipases são as únicas enzimas que apresentam a propriedade de ativação interfacial (VERGER; MARIA; DEHAAS, 1973). A atividade lipolítica é baixa em soluções compostas somente de substratos lipídicos, mas é fortemente aumentada quando são formadas interfaces lipídeos/água. Avanços da técnica de difração de raios X proporcionaram uma explicação para o fenômeno de ativação interfacial: o centro ativo

dessas enzimas é recoberto por uma superfície hidrofóbica, denominada de “tampa” (ou “lid”) que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes na classificação das lipases (JAEGER; REETZ, 1998).

Entretanto, para algumas lipases observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a “lid” em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER; REETZ, 1998). As peculiaridades estruturais observadas nas lipases conhecidas podem explicar as diferentes atividades em diferentes substratos (JEGANNATHAN et al., 2008).

Figura 5: Representação esquemática para a hidrólise sequencial do grupo acila de triacilgliceróis catalisada por lipases.

Fonte: DE CASTRO et al., 2004.

A especificidade das lipases é um fator decisivo para a sua aplicação analítica ou industrial. De modo geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidos (LOTTI; ALBERGina, 2007; SONG et al., 2008):

1) Especificidade em relação à classe de lipídeos: a enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo: triglicerídeos, diglicerídeos ou monoglicerídeos, colesterol éster, metil éster, dentre outros.

2) Regioespecificidade: promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. Em geral, as lipases podem ser classificadas em dois grupos: não regioseletivas e regioseletivas (CASTRO; ANDERSON, 1995). As lipases **não regioseletivas** não apresentam especificidade em relação à posição da ligação éster na molécula de glicerol, catalisando a clivagem completa de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos, embora diacilgliceróis e monoacilgliceróis sejam intermediários na reação (CASTRO; ANDERSON, 1995). Nesse grupo estão incluídas lipases produzidas por *Candida* sp. e *Staphylococcus* sp. As lipases **regioseletivas** apresentam especificidade quanto à posição do ácido graxo, por exemplo, do tipo *sn*-1, 3, com a liberação preferencial de ácidos graxos das posições terminais do esqueleto do glicerol, como as lipases pancreáticas e de várias espécies de *Mucor* e *Rhizopus* (MALCATA et al., 1992). Com essas lipases, triacilgliceróis são hidrolisados produzindo ácidos graxos livres, 1,2(2,3)-diacilgliceróis e 2-monoacilgliceróis (CASTRO; ANDERSON, 1995). Porém, como os grupos acilas migram espontaneamente de uma posição a outra na molécula de glicerol, as lipases do tipo *sn*-1,3 também são capazes de catalisar a hidrólise completa com o prolongamento da reação, uma vez, que a taxa de hidrólise de triglicerídeos é normalmente mais rápida que a de diglicerídeos e monoglicerídeos (CASTRO; ANDERSON, 1995).

3) Especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo: a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia e/ou à presença de dupla ligação nesta cadeia.

4) Estereoespecificidade: algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros. Lipases também têm sido empregadas para realizar reações estereoespecíficas, podendo ser usadas para transesterificar seletivamente determinados enantiômeros de ácidos e/ou álcoois quirais e na transformação assimétrica de compostos simétricos para obter seletivamente os isômeros ativos (GANDHI, 1997).

2.5.1 *Reações catalisadas pelas lipases e mecanismos catalíticos*

As lipases verdadeiras (triacilglicerol éster hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar, na interface óleo/água, a hidrólise de ligações éster-carboxílico, produzindo ácidos e álcoois orgânicos (FREIRE; CARTILHO, 2008).

Além da hidrólise, as lipases, em meios reacionais com restrição de água, podem

catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), aminólise (síntese de amida) e lactonização (PAQUES; MACEDO, 2006; FREIRE; CASTILHO, 2008) (Figura 6).

Figura 6: Exemplos de reações catalisadas por lipases.

Fonte: CARVALHO et al., 2003.

Existe, entretanto, uma baixa correlação entre as atividades hidrolíticas e sintéticas, conforme foi demonstrado por Wu, Jaaskelainen e Linko (1996) ao compararem as atividades de hidrólise, esterificação e transesterificação de nove lipases comerciais usando óleo de oliva e de colza como substratos. Assim, de acordo com os resultados obtidos, a atividade hidrolítica da lipase pode ter pouco valor na predição da atividade sintética. Da mesma forma, a lipase pode não exibir atividade sintética, mas pode apresentar alta atividade hidrolítica. Tongboriboon, Cheirsilp e H-Kittikun (2010) também compararam as atividades catalíticas de hidrólise, transesterificação e esterificação das seguintes fontes de lipases: *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK), *Pseudomonas cepacia* (lipase PS), *Candida*

rugosa (lipase AY), *Thermomyces lanuginose* (Lipozyme TL IM) e *Candida antarctica* (Novozym 435). A lipase AY apresentou maior atividade de hidrólise, enquanto as lipases AK e Novozym 435 mostraram maiores atividades de transesterificação e esterificação, respectivamente.

Na Figura 7 está esquematizado o mecanismo catalítico proposto por Reis et al. (2009) para as reações catalisadas por lipases. Na primeira etapa da reação, o resíduo de serina é ativado por desprotonação. Para isso, os resíduos de histidina e do ácido aspártico são requisitados (Figura 7-a). Consequentemente, o caráter nucleofílico do grupo hidroxila do resíduo de serina é aumentado. Esse grupo ataca o grupo carbonil dos substratos formando o intermediário acil-enzima (Figura 7-b). A interação entre o intermediário tetraédrico formado e os resíduos de histidina e ácido aspártico contribui para a estabilização da distribuição das cargas e redução do estado de energia do intermediário formado. No passo seguinte, o complexo acil-enzima é atacado por um nucleófilo (exemplo, H_2O , álcool ou monoglicerídeos). Ocorre, então, a liberação do produto e a regeneração do sítio catalítico da enzima (Figura 7-c).

Figura 7: Mecanismo catalítico das lipases.
Fonte: REIS et al.(2009).

2.5.2 Fontes de lipases

As lipases são produzidas por micro-organismos e eucariotos superiores (plantas e animais), sendo as microbianas as de maior interesse industrial e biotecnológico. As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens quando comparadas às de origem animal e vegetal, a saber, (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000):

- Geralmente são enzimas extracelulares, podendo ser separadas das células microbianas por centrifugação ou filtração;
- Possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substrato em produto;
- Apresentam versatilidade sintética
- Apresentam elevada estabilidade a altas temperaturas e em substratos orgânicos
- São seletivas e específicas.

Além disso, a manipulação de fatores ambientais e a manipulação genética, com vistas à otimização da produção e da atividade, ou ao aumento da estabilidade da enzima, são operações mais simples quando se utilizam células microbianas.

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de isolar micro-organismos produtores destas enzimas, incluindo vários gêneros e espécies de bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos. Micro-organismos com potencial lipolítico têm sido encontrados nos mais diversos habitats, como resíduos industriais, indústrias de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo, sementes de oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem e fontes termais. Os principais gêneros incluem as leveduras *Candida* e *Torulopsis*, fungos filamentosos como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* e bactérias como *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (REETZ, 2002).

Com o objetivo de intensificar a utilização de lipases em escala industrial e piloto, estudos de fontes vegetais, como sementes, látex, folhas e caules, têm aumentado nos últimos anos. Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e sementes oleaginosas, localizadas em diferentes tecidos e normalmente ativadas durante a germinação (PAQUES; MACEDO, 2006).

Embora as lipases extraídas de sementes sejam atrativas, algumas desvantagens são observadas, como complexidade no processo de extração e baixo rendimento, produção limitada ao período de germinação e baixa estabilidade da lipase recuperada (VILLENEUVE, 2000).

2.5.3 Aplicações industriais das lipases

As lipases são biocatalisadores que têm muitas aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais cresce significativamente. Estima-se que, no futuro, elas terão importância industrial comparável à das peptidases, as quais representam 25 a 40% das vendas de enzimas industriais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As propriedades das lipases propiciam a utilização comercial dessas enzimas em diferentes campos, incluindo os setores de óleos e gorduras, alimentos, resolução de misturas racêmicas, detergentes, indústria de papel, entre outros (REETZ, 2002), conforme pode ser observado na Tabela 1.

Atualmente, o maior mercado consumidor da enzima lipase é a indústria de formulação de detergentes, que utiliza lipase geralmente em combinação com outras enzimas (proteases e celulasas) para a remoção de manchas de gordura, tais como batom, fritura, manteiga, azeite, molhos e manchas difíceis em colarinhos e punhos (DE CASTRO et al., 2004).

Uma área que ganhou relevância nos últimos anos é o emprego de lipases na síntese de biodiesel, por transesterificação de triacilglicerídeos com álcoois de cadeia curta. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser empregados como combustível, com a vantagem de não ocorrer à geração de óxidos de enxofre e de particulados.

Tabela 1: Aplicações industriais das lipases

Setor	Aplicação
Óleos e gorduras	Modificação de óleos e gorduras.
Polímeros	Produção de poliésteres biodegradáveis.
Têxtil	Remoção de lubrificantes, resultando em fibras com grande poder de absorção, melhores para o tingimento.
Detergentes	Remoção de manchas de gorduras.
Fármacos, agroquímicos e pesticidas	Resolução de misturas racêmicas.
Processamento de alimentos	Processamento e melhora da qualidade de alimentos e modificação de aromas.
Medicina	Ferramentas de diagnóstico auxiliando a indicação da presença de infecções ou doenças.
Cosméticos	Obtenção de produtos altamente puros que não requerem separação.
Processamento de chás	Melhoramento de aromas.
Couro	Remoção de gorduras do couro.
Tratamento de efluentes	Utilizada em lodo ativado entre outros processos aeróbios para a remoção de camadas de gordura.
Biodegradação de óleos	Tratamento de hidrocarbonetos e polímeros orgânicos.
Polpa e papel	Eliminação de pitch, melhorando do processo de branqueamento.
Combustível	Produção de biodiesel

Fonte: HASAN; SHAH; HAMEED, 2006.

2.6 Biodiesel

2.6.1 Aspectos gerais

O biodiesel é definido como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ciclo diesel (KNOTHE et al., 2006). Apresenta um potencial promissor no mundo inteiro, não só pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, mas também pela geração de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo (PINTO et al., 2005).

Além de renovável, o biodiesel é virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos. Em termos ambientais, a adoção do biodiesel resulta em uma redução significativa das emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que

contribuem para o efeito estufa e chuvas ácidas. A difusão do biocombustível, em longo prazo, proporcionará maiores expectativas de vida à população e, como consequência, um declínio nos gastos com saúde pública, possibilitando o redirecionamento de verbas para outros setores, como educação e previdência (KNOTHE et al., 2006).

Adicionalmente, permite melhorar o fechamento do ciclo do carbono (carbon neutral) e, quando de origem vegetal, intensifica o sequestro de CO₂ da atmosfera, impactando favoravelmente nas mudanças climáticas do planeta, ao retirar CO₂ no crescimento das plantas geradoras de óleo, deste modo compensando a adição de CO₂ à atmosfera durante a sua queima (QUINTELLA et al., 2009).

O biodiesel tem número de cetano maior que o diesel e teor médio de oxigênio em torno de 11%. Sendo assim, a adição de biodiesel ao petrodiesel, em termos gerais, melhora as características do combustível fóssil, pois possibilita a redução de emissão de monóxido e dióxido de carbono e eleva a eficiência da combustão, pelo aumento do número de cetano (KNOTHE et al., 2006).

Cabe ainda ressaltar que o biodiesel é biodegradável e não tóxico, degradando quatro vezes mais rápido que o diesel, cerca de 85-88% em água (MURUGESAN et al., 2009).

Como o biodiesel possui maior ponto de fulgor quando comparado ao diesel convencional, não é inflamável, o que proporciona uma maior segurança nas condições normais de transporte, manuseio e armazenamento (MURUGESAN et al., 2009). Além disso, a cadeia produtiva do biodiesel resulta na diminuição da dependência dos países à importação de combustíveis fósseis e na disponibilização de novos postos de trabalho, principalmente no setor agrícola.

Apesar dos benefícios apontados, o biodiesel possui menor poder calorífico (cerca de 10% para o biodiesel puro), emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NO_x) e possui maior densidade que o petrodiesel em regiões de clima frio (MURUGESAN et al., 2009). Além disso, o preço de mercado é relativamente superior ao do diesel comercial. Entretanto, se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for otimizado, a produção de biodiesel pode ser obtida a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel, ou seja, aquele verificado nas bombas dos postos de abastecimento (SUAREZ et al., 2009).

2.6.2 *Matérias-primas para a síntese de biodiesel*

As matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel podem ser classificadas em: óleos vegetais, gorduras animais, óleos e gorduras residuais e óleos microbianos. Na categoria de óleos vegetais, podem ser transformados em biodiesel os óleos obtidos de semente de soja, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, bagaço de mamona, semente de colza, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (RAMOS et al., 2003).

Aproximadamente 70-95% do custo total do biodiesel é em função das matérias-primas utilizadas na sua produção (ZHANG et al., 2003). Para a escolha da fonte de triacilglicerídeos, devem ser levados em conta fatores como: o valor comercial relativo ao alto valor agregado de alguns tipos de óleo, o percentual de óleo no grão, a produção de grãos por área, a maximização do balanço energético entre a energia consumida no processo de produção e a energia disponibilizada pelo combustível produzido, a vocação agrícola de cada região e a manutenção da produção de alimentos (QUINTELLA et al., 2009).

Os principais óleos e gorduras empregados na produção de biodiesel são os óleos de soja, palma, girassol, colza, sebo animal e óleos residuais (GUI; LEE; BHATIA, 2008).

O Brasil apresenta grandes vantagens para produção de biocombustíveis, pois apresenta geografia favorável, situa-se em uma região tropical, com elevadas luminosidade e temperaturas médias anuais. Esses fatores, associados à disponibilidade hídrica e regularidade de chuvas, tornam o país o de maior potencial para produção de energia renovável.

Diferentemente de outros países, a política brasileira de incentivo à produção de biodiesel é baseada na produção regional, utilizando as técnicas e matérias-primas mais apropriadas em cada região (OLIVEIRA et al., 2009). O Brasil possui grande diversidade de opções para produção de biodiesel, tais como a palma e o babaçu no norte, a soja, o girassol e o amendoim nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, e a mamona e o pinhão manso, que além de ser uma opção do semi-árido nordestino, apresenta-se também como alternativa para as demais regiões do país. Atualmente, a maior parte do biodiesel brasileiro produzido é proveniente do óleo de soja, por ser relativamente barato e já existir uma infra-estrutura de produção bem estabelecida (SUAREZ; MENENGHITTI, 2007).

Estudos divulgados pela “National Biodiesel Board”, dos Estados Unidos, afirmaram que o Brasil tem condições de liderar a produção mundial de biodiesel,

promovendo a substituição de 60% da demanda mundial de óleo diesel mineral (CONCEIÇÃO et al., 2006).

No atual estado da arte, existe uma preocupação mundial da possibilidade de deslocamento das áreas destinadas à produção de alimentos para que se possa produzir biocombustível. Sendo assim, muita ênfase tem sido dada ao estudo de oleaginosas não-comestíveis. Dentre essas, destacam-se as pertencentes ao gênero *Jatropha*, especialmente a espécie *curcas*, conhecido popularmente, no Brasil, como pinhão-manso. Esta planta, assim como outras espécies do gênero *Jatropha* é ainda pouco explorada, mas pelo fato de ser perene e de se adaptar muito bem em regiões semi-áridas tem sido apontada como ideal para a produção de óleos no nordeste brasileiro, utilizando a agricultura familiar (OLIVEIRA et al., 2009).

Com relação à matéria-prima alcoólica, álcoois de cadeia curta, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol têm sido empregados para a produção do biodiesel. O metanol é o álcool mais frequentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade) (PINTO et al., 2005) e também por apresentar um custo mais acessível que os demais álcoois, exceto no Brasil e na Índia (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Embora o metanol tenha uma boa reatividade com os catalisadores químicos convencionais (base e ácidos fortes), apresenta elevada toxicidade à saúde humana, podendo causar cegueira e câncer.

A opção pelo etanol, ao invés do metanol (utilizado na Europa e Estados Unidos) como agente de transesterificação (obtendo-se com isto os ésteres etílicos) torna o biodiesel um produto totalmente renovável. Além disso, o etanol é biodegradável e não tóxico. No entanto, o interesse em torno desta idéia está limitado às regiões em que o seu valor comercial esteja compatível com o valor de mercado do metanol de origem petroquímica. Esta situação é somente encontrada nos países que o produzem em volumes compatíveis com a demanda, como é o caso do Brasil e, por esta razão, estudos relacionados com a transesterificação etílica não se encontram tão avançados quanto aqueles associados à rota metílica (RAMOS et al., 2003).

Cabe ressaltar que a composição final do biodiesel e suas propriedades físico-químicas dependem das matérias-primas empregadas no processo de fabricação. Óleos compostos por ácidos graxos de longa cadeia resultam em biodiesel com maior número de cetano e menores emissões de óxidos de nitrogênio, enquanto que o grau de insaturação dos ácidos graxos afeta a reatividade do produto (SARAF; THOMAS, 2007). Segundo Sharma, Singh e Upadhyay (2008), a maior desvantagem tecnológica do biodiesel é a

relação inversa entre a estabilidade oxidativa (favorecida pela maior concentração de ácidos graxos saturados) e as propriedades a baixa temperatura, como ponto de névoa e ponto de entupimento (favorecidos pela maior concentração de ácidos graxos insaturados). Entretanto, esse impasse tem sido contornado utilizando-se uma mistura de dois ou mais óleos para se atingir uma proporção ideal entre ácidos graxos saturados e insaturados, o que possibilita a obtenção de biodiesel dentro das especificações exigidas em cada país (SARIN et al., 2007).

2.7 Pinhão Manso

O pinhão manso foi nomeado como *Jatropha curcas* por Karl Von Linne em 1753. O nome do gênero *Jatropha* é derivado das palavras gregas "iatros" que significa doutor e "trophe" que significa alimento (BECKER; MAKKAR, 2008).

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) também conhecido popularmente como pinhão Paraguaio, pião, purgueira, pinhão de purga, grão de maluco, pinhão bravo, turba, medicineira, sassi, pinhão do inferno, dentre outros, é provavelmente originário do Brasil, tendo sido introduzido por navegadores portugueses nas Ilhas do Arquipélago Cabo Verde e Guiné, de onde foi disseminado pelo continente Africano (ARRUDA, et al., 2004). Conforme Brasil (1985), sua introdução naquelas Ilhas é atribuída ao interesse dos portugueses em aproveitar as terras inaptas daquele Arquipélago, cujos solos de pouca fertilidade, dificilmente poderiam ser utilizados para culturas menos rústicas. Atualmente, é encontrado em quase todas as regiões intertropicais, ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e temperadas e, em menor extensão, nas regiões frias (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

Embora seja uma planta conhecida e cultivada na América desde tempos remotos e disseminada por todas as áreas tropicais e algumas áreas temperadas, ainda se encontra em processo de domesticação. Somente nas últimas três décadas passou a ser estudada agronomicamente (SATURNINO et al., 2005).

O pinhão manso pertence à família das Euforbiáceas (mesma da mamona, mandioca e seringueira) e sub-família das Platilobeae. O gênero *Jatropha* possui mais de 70 espécies de arbustos, como *Jatropha pohliana*, *Jatropha gossypifolia* e *Jatropha curcas*, as quais produzem sementes contendo óleo de excelente qualidade (SHAH; SHARMA; GUPTA, 2005). De acordo com informações atuais, a planta tem potencial de produzir acima de 4.000 kg/há de grãos (DRUMOND et al., 2009). Com esta produtividade é possível produzir mais de 1.400 kg/ha de óleo. No entanto, com o

melhoramento genético e aprimoramento do sistema de produção, acredita-se que o pinhão-mansão possa produzir acima da produtividade apresentada.

2.7.1 Características botânicas do pinhão manso

O pinhão manso é um arbusto de crescimento rápido, que pode atingir 3 a 5 metros de altura, com diâmetro de tronco de 20 cm. O caule é liso, de lenho mole, e exsuda um látex (leite) cáustico, quando recebe qualquer ferimento. Possui raízes curtas e pouco ramificadas. As folhas do pinhão manso são verdes e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face interior. A planta é monóica com flores masculinas e femininas na mesma inflorescência. Da flor ao fruto maduro são decorridos cerca de 60 dias (OPENSHAW, 2000; ARRUDA et al., 2004; DIAS et al., 2007).

O fruto (Figura 8-a) é capsular ovóide, com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm. É trilocular, formado por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, indeiscente, ou seja, que não se abre quando maduro, via de regra com uma semente por cavidade. A maturação não é uniforme, observando-se, em um mesmo cacho, frutos verdes, amarelos, castanhos e por fim pretos. No geral, 53 a 62% do peso são representados pelas sementes e 38 a 47% pela casca. O peso do fruto varia de 1,5 a 3,0g (OPENSHAW, 2000; ARRUDA et al., 2004; DIAS et al., 2007).

A semente (Figura 8 -b) é relativamente grande. Quando seca mede entre 1,5 e 2,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,3 cm de largura, com peso variando entre 0,5 a 0,8 gramas. Em sua constituição apresenta, de fora para dentro, tegumento rijo e película branca cobrindo a amêndoa. A amêndoa (Figura 8-c) contém o albúmen ou endosperma que é abundante, branco e oleaginoso (38% de óleo) e o embrião, constituído do eixo embrionário e de dois largos cotilédonos achatados e foliáceos (OPENSHAW, 2000; ARRUDA et al., 2004; DIAS et al., 2007).

Observa-se que a planta desenvolve melhor em altitudes de 200 a 800 metros, sob temperatura média de 18 a 28°C e precipitação acima de 800 mm anuais, bem distribuída. A planta deve ser cultivada, preferencialmente, em solos profundos, bem estruturados e não compactados. Devem ser evitados os solos muito argilosos, pouco arejados, de difícil drenagem e com umidade constante. A planta não tolera áreas encharcadas ou alagadiças (DIAS et al., 2007).

Figura 8: Fotos ilustrativas do fruto, semente, amêndoas e óleo de pinhão manso.

2.7.2 Utilização e aproveitamento industrial do pinhão manso

Uma grande vantagem da cultura de pinhão manso é que todas as partes da planta têm utilização econômica, a saber:

Folhas: possuem compostos químicos com potencial de aplicação farmacêutica, médica e biopesticida (exemplo: forbolésteres, os quais têm ação sobre vetores da schistossoma) (BECKER; MAKKAR, 2008). Na Malásia e em algumas regiões da África, as folhas têm sido usadas como purgativo. Em Camarões, as mesmas têm sido empregadas como remédio para reumatismo, e na Nigéria para tratamento de icterícia. Há relatos de que os extratos medicinais contidos nas folhas também tenham efeitos no tratamento contra leucemia (STAUBMANN et al., 1999).

Frutos: são utilizados na medicina popular para o tratamento de doenças como disenteria, hemorróidas, gonorréia, infertilidade, infecções na pele, etc. (AKINTAYO, 2004).

Flores: produzem mel de excelente qualidade podendo ser instalados apiários próximos às plantações. A produção gira em torno de 20 e 40 quilos de mel por hectare, podendo ser aumentada com o consórcio com abelhas, já que a polinização de suas flores é cruzada. O mel produzido de suas flores tem ótimas propriedades medicinais (OPENSHAW, 2000).

Semente: contem elevado teor de óleo e seu extrato tem ação molusquicida, inseticida e nematicida (SATO et al., 2007).

Óleo: a maior parte do óleo destina-se quase à fabricação de sabão, no entanto, também tem sido utilizado na indústria de fiação de lã, de tinta para escrever, tinta de impressão e tintas para pintura, além de ser utilizado como óleo de lustrar e quando cozido, misturado com óxido de ferro, utilizado para envernizar móveis (ARRUDA et al., 2004). Atualmente, a aplicação mais promissora é na indústria de biodiesel.

Torta: pode ser utilizada como adubo orgânico ou ração animal dado o elevado teor de nitrogênio. No entanto, a torta é tóxica devido à presença de altas concentrações de forbolésteres, inibidores de tripsina e lecitina, inviabilizando o uso direto como ração animal. Contudo, estudos visando à desintoxicação estão sendo realizados, como é o caso do trabalho realizado por Makkar e Becker (1999). Após a remoção dos compostos tóxicos, por meio da extração com solventes como metanol 92%, a torta não foi tóxica para ratos.

Madeira: pode ser utilizada como material carburante de fornalhas, assim como as cascas dos frutos (ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et al., 2005).

A planta como um todo ainda pode ser utilizada para outros fins, tais como: substituição parcial do arame em cercas vivas, já que os animais evitam tocá-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas; suporte para plantas trepadeiras como a baunilha (*Vanilla aromática*) e fixador de dunas na orla marítima (OPENSAW, 2000).

Uma aplicação inovadora do pinhão manso foi utilizá-lo para a extração de enzimas conforme proposto por Sousa et al. (2010). Lipases contidas na semente da oleaginosa foram utilizadas para produzir ácidos graxos a partir da hidrólise de matérias graxas (óleos vegetais e rejeitos industriais) que foram subsequentemente esterificados com metanol, por catálise ácida heterogênea. Este processo inédito de obtenção de biodiesel por hidroesterificação mista (enzimático/químico) apresentou inúmeras vantagens quando comparado ao processo convencional, tais como: gastos energéticos muito inferiores; menor geração de subprodutos indesejáveis; geração de glicerol “food grade”; e viabilizou a produção e utilização de um catalisador enzimático vegetal eficiente, inédito e de baixo custo, na produção de um biodiesel de ótima qualidade (dentro das especificações exigidas pela ANP) e que ainda pode ser utilizado em outros processos biotecnológicos. A Figura 9 sumariza o uso industrial e o aproveitamento da cultura do pinhão manso.

Figura 9: Fluxograma do aproveitamento e aplicação da cultura do pinhão manso
 Fonte: Adaptada de BECKER; MAKKAR (2008).

2.7.3 Composição do óleo de pinhão manso

O óleo de pinhão manso é composto por aproximadamente 20% de ácidos graxos saturados e 80% de ácidos insaturados. O ácido oléico é o de maior abundância, seguido pelo ácido linoléico, palmítico e esteárico (SHAH; GUPTA, 2007). Possui aproximadamente 1% de compostos não-saponificáveis (carotenóides, fosfolipídeos, produtos oxidados, tocoferóis ou tocotrienóis) (TAPANES et al., 2008).

Segundo Brasil (1985), as sementes de pinhão manso sofrem o mesmo tratamento industrial que as bagas de mamona, isto é, cozimento prévio e esmagamento subsequente em prensas tipo “expeller” para extração do óleo, que em seguida é filtrado, centrifugado e clarificado, resultando num produto livre de impurezas. A torta contém ainda, aproximadamente, 8% de óleo, o qual é reextraído com solventes orgânicos, geralmente hexano, sendo o farelo residual ensacado para aproveitamento como fertilizante natural.

As características físico-químicas do óleo de pinhão manso têm se mostrado dependente do processo de extração do óleo. Melo et al. (2006) compararam as propriedades de um óleo comercial obtido por prensagem e estocado por várias semanas com outro obtido por extração direta com hexano. Para a extração química do óleo,

amostras de amêndoas secas e trituradas, cerca de 15g, foram acondicionadas no Soxhlet e extraídas com cerca de 80 mL de *n*-hexano por um período de duas horas, numa temperatura de 80 °C. O óleo extraído com o solvente apresentou coloração amarelada e as propriedades físico-químicas obtidas estão sumarizadas na Tabela 2.

O óleo é o produto de maior valor agregado da cultura de pinhão manso e apresenta propriedades como: maior estabilidade oxidativa que o óleo de soja; menor viscosidade quando comparada ao da mamona e melhores propriedades a frio que o óleo de palma (TAPANES et al., 2008).

Tabela 2: Propriedades do óleo de pinhão manso

Características	Método	Unidade	OES*	OIP**
Índice de Acidez	ASTM D 664	Mg KOH/g	3,13	20,11
Acidez (como ácido oléico)	ASTM D 664	% massa	1,57	10,11
Massa específica a 20 °C	ASTM D 4052	Kg/m ³	914,9	914,4
Viscosidade cinemática a 40 °C	ASTM D 445	cSt	32,61	27,37
Composição (ácidos graxos):	CG	%		
Palmítico (C16)			16,4	
Palmítico (C16:1)			0,9	
Esteárico (C18:0)			5,4	
Oléico (C18:1)			40,3	
Linoleico (C18:2)			37,0	
OES* = óleo extraído com solvente				
OIP** = óleo industrial extraído por prensagem e submetido a armazenamento				
Fonte: MELO et al. (2006).				

2.7.4 O uso do óleo de pinhão manso como combustível

Durante a Segunda Guerra Mundial, na África e na Ásia, o óleo de pinhão manso foi utilizado como substituto do diesel e, devido a esta necessidade, houve um avanço nas pesquisas sobre o uso deste óleo em motores do ciclo diesel. Entretanto, os estudos foram abandonados com a evolução da situação internacional pós-guerra (MARTINS; CRUZ, 1985; ARRUDA et al., 2004).

No atual estado da arte, o pinhão manso tem sido considerado como a matéria-prima graxa mais promissora para aplicação nas indústrias de biodiesel e quanto mais pesquisas são efetuadas sobre a planta, mais ela parece ser a melhor alternativa (DUARTE, 2008). Sendo assim, o plantio da oleaginosa tem sido incentivado pelo governo e, também, pela iniciativa privada em diferentes regiões do mundo. Estima-se que a porcentagem de plantações nos continentes onde a planta é cultivada seja de 85, 13 e 2% para Ásia, África e América Latina, respectivamente (GEXSI, 2008). No Zimbábue, desde 1997, 4 milhões

de sementes já foram plantadas em 2000 hectares. Na Nicarágua, um milhão de sementes foram plantadas em 1000 hectares (MURUGESAN et al., 2009).

No Brasil, a espécie vem sendo adotada em diversas regiões, principalmente Sudeste, Nordeste e Centro-oeste. Estima-se a existência de mais de 15 mil hectares implantados com a cultura, com potencial de produção de mais de 45 mil toneladas de grãos/ano (MEDONÇA, 2010). As expectativas são de ampliação da área de cultivo, valendo destacar o Projeto *Jatropha* lançado em dezembro de 2005, envolvendo inicialmente uma parceria entre a Fusermann Biocombustíveis, a Prefeitura de Viçosa e a Universidade Federal de Viçosa. Atualmente o projeto conta com mais de 16 municípios com participação de prefeituras, associações, sindicatos de produtores e trabalhadores rurais, bem como órgãos de assistência técnica e extensão rural, com uma área plantada com pinhão manso de 1030 hectares. A meta do projeto é atingir 25.000 hectares de área plantada até 2011 (DIAS et al., 2007).

O pinhão manso ganhou popularidade mundial pelo fato de se adaptar bem em regiões de clima e solos não-adaptados ao cultivo da maior parte das oleaginosas, pelo crescimento rápido, pela alta produtividade, pela elevada resistência a pragas e doenças, por não competir com a cadeia de alimentos e, também, por exigir cultivo pouco mecanizado e altamente dependente de mão-de-obra, gerando empregos no campo. Além disso, o óleo de pinhão manso apresenta um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biodiesel, sendo facilmente enquadrado nas especificações internacionais (LU et al., 2009).

Uma outra vantagem desta oleaginosa é que suas sementes, quando armazenadas corretamente, podem ser conservadas por um longo período sem estragar, ao contrário do que é verificado para as sementes do pequi, macaúba e dendê, cujo processamento deve ser realizado em até 24 h (DUARTE, 2008).

Segundo Ackom e Ertel (2005), o óleo de pinhão reduz as emissões de CO₂ e contém enxofre em valores inexpressivos, sendo assim uma alternativa que atende as especificações da atual química verde.

Saturnino et al. (2006) analisaram o poder calorífico do óleo de pinhão e constataram que o óleo possui 83,9% do poder calorífico do óleo diesel. Sendo assim, com a substituição do diesel pelo óleo bruto o consumo poderá ser 16,1% maior. Outro inconveniente em utilizar o óleo bruto é sua elevada viscosidade quando comparada ao diesel, o que pode ocasionar a deposição de carbono na máquina e a queima incompleta do combustível, diminuindo a vida útil do motor. Com base nessa informação, Pramanik

(2003) investigou a proporção da mistura óleo bruto/diesel que evitaria os danos nos motores e concluiu que uma mistura 40-50% pode substituir o diesel convencional sem a necessidade de nenhuma modificação no motor.

A produção de biodiesel pela transesterificação do óleo de pinhão manso tem sido estudada empregando-se diferentes métodos, conforme exemplos ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplos de métodos para a produção de biodiesel por transesterificação do óleo de pinhão manso

Método/ Catalisador	Conversão (%)	Tempo (h)	T (°C)	Razão Molar (álcool: óleo)	Referência
Básico heterogênea	93	2,5	70	metanol: óleo (9:1)	ZHU et al. (2006)
Básico homogêneo (KOH)	100	1	60	metanol: óleo (6:1)	MELO et al. (2006)
Transesterificação não catalítica (super crítico)	95-99	40	200-250	etanol: óleo (50:1)	RHATORES, MADRAS (2007)
Enzimático na presença de CO ₂ supercrítico	60-70	480	45	etanol: óleo (5:1)	
Enzimático	98	8 h	50	etanol: óleo (4:1)	
Transesterificação ácida <i>in situ</i> (H ₂ SO ₄) (durante a etapa de extração do óleo)	99,8	24	60	7,5 mL etanol /g de semente	SHAH; GUPTA (2007). SHUIT et al. (2010)

Fonte: Adaptada de ACHTEN et al., 2008.

A produção de biodiesel de pinhão manso em planta piloto com capacidade de 30 galões/ dia foi investigada com sucesso por Kywe e Oo (2009). O biodiesel foi produzido pelas rotas metílica e etílica utilizando condições operacionais ótimas, previamente estabelecidas em escala de laboratório pelo mesmo grupo de pesquisa e os rendimentos reacionais foram 92 e 90%, respectivamente. O produto final foi posteriormente caracterizado quanto às suas propriedades físico-químicas e, com exceção dos dados referentes ao total de glicerol, os demais parâmetros avaliados encontraram-se dentro da faixa de especificação exigida pela ASTM (American Society for Testing and Materials), conforme apresentada na Tabela 4. A maior porcentagem de glicerol total e combinado verificado nas amostras foi atribuída ao fato da reação não ter apresentado conversão completa (100%).

O potencial energético do óleo de pinhão manso também está sendo considerado promissor para a produção de hidrocarbonetos passíveis de serem usados como querosene de aviação. A companhia aérea TAM divulgou que fará o primeiro voo da América Latina com bioquerosene de aviação, produzido com óleo de pinhão manso até o final do ano. O bioquerosene de pinhão emite entre 65% e 80% menos carbono do que o querosene atualmente usado nas aeronaves, derivado de petróleo (PAMPLONA, 2010).

Tabela 4: Propriedades físico-químicas do biodiesel obtido do óleo de pinhão manso produzido em planta piloto com capacidade de 30 galões/dia.

Propriedades	Biodiesel* Rota Etílica	Biodiesel** Rota Metílica	Especificações da ASTM D 6751
Número de Cetano	49,2	49	48-65
Ponto de Fulgor (°C)	91	98	100-170
Ponto de Névoa (°C)	+3	-1	-15-10
Densidade (15 °C)	0,8746	0,8766	0,88
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² /s)	4,78	5,36	1,9-6,0
Acidez (mgKOH/g)	1,0	1,1	0,8
Corrosão da lâmina de cobre	No.1	No.1	No.3, máximo
Glicerol livre (% massa)	0,05	-	0,24 máximo
Glicerol combinado (% massa)	1,05	1,15	0,22 máximo
Glicerol total (% massa)	1,1	1,15	0,02 máximo
Água e Sedimentos (% massa)	Traços	Traços	0,05 máximo
Temperatura de destilação, pressão atmosférica, 90% recuperados (°C)	333	352	360, máximo

*Razão molar óleo/metanol (1:6), NaOH % (1%), Temperatura: 65°C, Tempo de reação: 1h

**Razão molar óleo/etanol (1:8), KOH % (1%), Temperatura ambiente, Tempo de reação: 5h

2.8 Produção de biodiesel

A redução da viscosidade de óleos e gorduras para utilização como combustível está sendo investigada empregando-se diferentes métodos, tais como: uso direto e/ou misturas de matérias-primas com óleo diesel, micro-emulsão, craqueamento térmico (pirólise) e transesterificação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Na Tabela 5 estão apresentadas as definições, vantagens e desvantagens dos principais métodos de redução da viscosidade dos óleos.

Tabela 5: Comparação entre diferentes métodos de redução da viscosidade dos óleos

Métodos	Definição	Vantagens	Desvantagens
Uso direto e misturas	Direto uso dos óleos como combustível ou como uma mistura com óleo diesel.	-Renovável -Prontamente disponível -Alto conteúdo energético (~ 80% do diesel combustível)	-Alta viscosidade -Baixa volatilidade -Reatividade das cadeias de hidrocarbonetos insaturados
Micro-emulsão	Sistemas termodinamicamente estáveis e isotrópicos, formados pela mistura de dois líquidos imiscíveis.	-Menor viscosidade -Melhores padrões de spray durante a combustão	-Menor número de cetano -Menor conteúdo de energia
Craqueamento térmico (Pirólise)	Consiste na quebra das moléculas de triacilglicerídeos por efeito térmico, formando uma mistura de compostos constituída principalmente de hidrocarbonetos.	-Similaridade química entre os compostos oriundos da reação e os derivados do petróleo (gasolina e óleo diesel)	-Custo e consumo de energia elevado
Transesterificação	Reação entre moléculas de triacilglicerídeos e álcoois de cadeia curta na presença de catalisador, resultando na formação de ésteres alquílicos e glicerol.	-Maior número de cetano -Maior eficiência de combustão; -Menor emissão de gases.	-Formação de subprodutos (glicerol e água residual)

Fonte: Adaptada de LEUNG; WU; LEUNG, 2010.

2.8.1 Reação de transesterificação

A transesterificação é um processo de troca de grupos acila entre moléculas de ésteres e ácidos (acidólise), entre ésteres e outros ésteres (interesterificação) ou entre ésteres e álcoois (alcoólise) (PINTO et al., 2005).

A alcoólise dos triacilglicerídeos é necessária para reduzir a viscosidade do óleo, aumentar a volatilidade e a combustão dos ésteres, o que garante sua utilização em motores de ignição a diesel sem a necessidade de qualquer modificação (FUKUDA et al., 2001).

Na transesterificação de diferentes óleos e gorduras, triacilglicerídeos reagem com moléculas de álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, e produzem ésteres e glicerina (Figura 10). Essa reação pode ser catalisada por diferentes tipos de catalisadores, a saber: catalisadores homogêneos (ácidos ou bases fortes) ou heterogêneos (químicos ou bioquímicos) (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998).

Figura 10: Equação geral da transesterificação de triacilglicerol com álcool. (R_X, R₂ e R₃ representam grupos alquilas).

A reação de transesterificação ocorre numa sequência consecutiva e reversível de três etapas reacionais (Figura 11). A primeira etapa envolve a formação de diacilglicerídeos a partir dos triacilglicerídeos. Na segunda, os diacilglicerídeos são convertidos em monoacilglicerídeos e na última, esses são convertidos em glicerina. Em todas essas etapas são produzidos ésteres de cadeia carbônica longa. Embora a relação estequiométrica da reação seja de 1:3 (óleo e álcool), normalmente é empregado um excesso de álcool para favorecer a formação do produto final e facilitar a recuperação da glicerina (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

Figura 11: Esquema da reação de transesterificação.

Fonte: MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU (2007).

A transesterificação química catalisada por bases ou ácidos fortes destaca-se pelo elevado rendimento reacional, cerca de 99% em curto intervalo de tempo. Os catalisadores químicos, principalmente soda cáustica ou outras bases fortes, tornaram-se dominantes na indústria de biodiesel devido aos seus baixos custos e rapidez do processo. Apesar da excelente produtividade, a produção de biodiesel por essa rota é limitada pela qualidade da matéria prima e pelas etapas de purificação do produto (FUKADA et al., 2001).

O processo de transesterificação alcalina requer matérias-primas de alta qualidade, uma vez que os ácidos graxos livres, fosfatídeos e água reduzem o rendimento da reação e comprometem a purificação do produto (SUAREZ et al., 2009). A presença de água altera o equilíbrio químico reacional, favorecendo reações de hidrólise dos ésteres presentes e

dos glicerídeos, formando ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres e os fosfatídeos reagem rapidamente com catalisadores básicos tradicionais, levando à formação de sabões e ao consumo de parte do catalisador. Sendo assim, somente óleos que contêm no máximo 0,5% de ácidos graxos livres e álcoois anidros podem ser utilizados como matérias-primas na transesterificação alcalina. Esse requerimento limita a utilização de matérias-primas de baixo custo, como os óleos residuais (SUAREZ et al., 2009; LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Além disso, a quantidade de água residual gerada na produção de biodiesel pela rota convencional é da ordem de 0,2 ton/ton de biodiesel produzido (SHUERA et al., 2005) e o tratamento ou reutilização da água residual é problemático do ponto de vista ambiental e energético (FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2008).

Nos processos de catálise ácida, a transesterificação é catalisada por um ácido forte, preferencialmente o ácido sulfônico ou sulfúrico. O rendimento obtido é muito elevado (99%), mas a reação é mais lenta quando comparada à catálise alcalina, sendo necessário o emprego de temperaturas elevadas ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) e tempos reacionais de 3 h para se alcançar o referido rendimento (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

Entre os catalisadores potenciais para a produção de biodiesel, a reação de transesterificação catalisada por biocatalisadores (lipases) tem encontrado interesse atual, por se tratar de uma via eficiente quanto à recuperação do produto, às condições da reação e ao rendimento reacional.

Em função das vantagens oferecidas, a via enzimática tem sido a mais empregada em trabalhos de pesquisa nos últimos anos. Isso é comprovado pelo número de artigos e patentes referentes ao uso de lipase na produção de biodiesel que, de acordo com estimativa recentemente publicada, supera numericamente a soma dos artigos e patentes referentes à obtenção desse combustível por todos os outros processos (QUINTELLA et al., 2009).

2.8.2 *Transesterificação enzimática*

A rota enzimática para a produção de biodiesel é atrativa em função das seguintes características das lipases (SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007; FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2008; PARAWIRA, 2009; ANTCZAK et al., 2009):

- São biodegradáveis e atendem aos apelos atuais da Química Verde.

- Maior compatibilidade com as variações de qualidade das matérias primas, uma vez que toleram maiores teores de ácidos graxos livres e de água presentes no meio reacional.
- Capacidade de produção do biodiesel em menor número de etapas e em condições reacionais brandas, levando à redução do consumo energético e da quantidade de água residual gerada no processo.
- Alta especificidade, conferindo maior facilidade de separação do produto e aumento da qualidade do glicerol.
- Podem ser reutilizadas quando na forma imobilizada.
- Podem ser empregadas na produção de biodiesel por processo contínuo.

A transesterificação enzimática tem sido testada na faixa de temperatura entre 20-60°C e pode ser conduzida na presença ou ausência de solventes orgânicos. Após o término do processo de transesterificação, a fase inferior (glicerol) pode ser facilmente separada na fase superior (biodiesel) sem a necessidade de etapas de neutralização ou desodorização do produto (ANTCZAK et al., 2009).

A produtividade da síntese enzimática de biodiesel é dependente de diversos fatores (Figura 12). Para se assegurar a viabilidade econômica dessa rota, devem ser escolhidas matérias-primas e preparações enzimáticas apropriadas. O biocatalisador pode ser modificado, visando aumentar a sua estabilidade e reatividade. As demais etapas incluem a seleção do solvente (opcional), otimização da razão molar óleo/álcool, temperatura, atividade de água, pH do microambiente da enzima e determinação da concentração máxima de glicerol para se evitar a inibição da enzima (ANTCZAK et al., 2009).

Noureddini, Gao e Philkana (2005) estudaram a transesterificação enzimática do óleo de soja com metanol e etanol. Foram testadas nove fontes de lipases e selecionada a lipase proveniente de *Burkholderia cepacia* (PS), por apresentar o maior rendimento reacional. Posteriormente, foi investigada a imobilização por retenção física dessa enzima em um suporte hidrofóbico obtido pela técnica sol-gel. Empregando-se a enzima PS imobilizada, foram investigados os efeitos da concentração de água, álcool, biocatalisador e temperatura reacional no rendimento da reação, bem como determinada a estabilidade térmica do derivado imobilizado. As condições ótimas para a conversão de 10g óleo de soja foram: 35°C, 1:7,5 de razão molar óleo/ metanol, 0,5g de água e 475mg de lipases para a rota metílica, e 35°C, 1:15,2 razão molar óleo/etanol, 0,3g de água e 475mg lipase para a rota etílica. Foram obtidos 67 e 65 % mol de ésteres metílicos e etílicos

respectivamente, em 1 hora de reação nas condições ótimas. Além disso, foi verificado que o derivado imobilizado manteve-se estável e houve pouca perda de atividade catalítica após doze ciclos da enzima.

Figura 12: Parâmetros cruciais que afetam a síntese enzimática de biodiesel.

Fonte: ANTCHAK et al., 2009.

Em função do reconhecimento da rota enzimática como uma alternativa promissora para a simplificação da cadeia produtiva do biodiesel, diversos estudos têm sido reportados em artigos e patentes cujo aspecto em comum consiste na otimização das condições de reação visando estabelecer as melhores características operacionais do processo para futura aplicação industrial. Entretanto, a produção enzimática de biodiesel é limitada pelo alto custo do biocatalisador e pela baixa velocidade reacional (AKOH et al. 2007; PARAWIRA, 2009). O elevado custo pode ser minimizado pela regeneração da enzima, o uso de células microbianas íntegras imobilizadas, produção em larga escala de lipases recombinantes, avanços na engenharia protéica e melhorias da atividade enzimática por técnicas de imobilização enzimática (AKOH et al., 2007). Enquanto a baixa produtividade pode ser aumentada aplicando-se o aquecimento por irradiação de micro-ondas. No âmbito da química verde, a aplicação de micro-ondas tem sido considerada uma ferramenta atrativa devido à metodologia rápida e segura. Como as reações catalisadas pelas enzimas são geralmente lentas, o sinergismo com as micro-ondas pode ser explorado para aumentar a velocidade reacional (YADAV; LATHI, 2004).

2.8.2.1 Estudos sobre a seleção de fontes de lipases para a produção de biodiesel

Lipases isoladas ou células íntegras de micro-organismos, contendo elevada

atividade sintética, estão sendo testadas com relativo sucesso para a produção de biodiesel, empregando-se diferentes matérias-primas lipídicas. A eficiência da transesterificação tem se mostrado dependente da origem e formulação da enzima, e a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura sugere o emprego das enzimas na forma imobilizada, uma vez que a imobilização aumenta a estabilidade e permite a reutilização das mesmas.

Vários suportes para a imobilização de lipases estão sendo explorados no estudo da produção de biodiesel pela rota enzimática. Uma lista extensiva dos tipos de suportes e das condições de síntese do biodiesel, incluindo matérias-primas, razão molar óleo/álcool e temperatura, pode ser visualizada na Tabela 6.

Dentre todos os métodos de imobilização, o da adsorção física ainda é o mais utilizado, em função da grande porção hidrofóbica das lipases, à facilidade e simplicidade na metodologia, e por ser menos agressivo em relação à atividade enzimática e possuir menor custo. Verifica-se ainda que o processo de imobilização por adsorção e por interação hidrofóbica pode propiciar uma ativação da enzima e um aumento de sua estabilidade frente à temperatura (JEGANNATHAN et al., 2008).

Em geral, as lipases mais eficientes conseguem converter mais de 90% dos triacilglicerídeos em éster alquílicos (biodiesel) atuando numa faixa branda de temperatura (30-50°C) (FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2009). Dentre as lipases purificadas, destacam-se as de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (PS), *Pseudomonas fluorescences* (AK), *Candida antarctica* (CALB) e *Candida* sp. 99-125 (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

As lipases para a produção de biodiesel devem ser capazes de atuar sobre moléculas de tri, di e monoglicerídeos, convertendo-as em seus derivados ésteres. Ao mesmo tempo, devem também ser capazes de catalisar a esterificação de ácidos graxos livres presentes no meio reacional (FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2009). A maior parte das lipases empregadas para a produção de biodiesel apresenta especificidade quanto ao substrato e regioespecificidade, por exemplo, as de *Pseudomonas fluorescences* (AK), *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (PS), *Candida antarctica* (CALB) e *Candida cylindracea*. Entretanto, algumas lipases 1,3-específicas, como as obtidas de *Mucor miehei* e *Rhizopus oryzae*, catalisam eficientemente a transesterificação, com rendimentos satisfatórios. O alto rendimento tem sido explicado pela migração de grupos acila da posição *sn*-2 para posições terminais do glicerol (*sn*-1 e *sn*-3) (ANTCZAK et al., 2009).

A eficiência biocatalítica tem sido avaliada em sistemas compostos por um ou mais tipos de fontes de enzimas. Shah e Gupta (2007) compararam o desempenho de diferentes fontes de lipases na produção de biodiesel a partir da etanolise do óleo de pinhão manso. O rendimento mais elevado (98%) foi obtido com a enzima de *Burkholderia cepacia* imobilizada em Celite, a 50°C, na presença de 4-5% de água em 8 h de reação. Lee et al. (2006) estudaram a produção de biodiesel de soja empregando lipases imobilizadas de *Rhizopus oryzae* (1,3-específica) e *Candida rugosa* (não-específica) isoladamente ou combinadas. Esses autores obtiveram, em 18h, 70% de conversão do óleo de soja em biodiesel com o uso de *Rhizopus oryzae*, e 20% em 30h, com a enzima de *Candida rugosa*. Com a associação das duas enzimas na proporção 1:1 (m/m) foram obtidos 90% de conversão em 21h de reação, sugerindo que duas lipases que diferem quanto à especificidade, por exemplo: lipases 1,3-específicas e não específicas, podem atuar sinergisticamente.

Turkan e Kalay (2006) também sugeriram a aplicação da combinação enzimática à utilização de apenas uma fonte de enzima. Os pesquisadores elucidaram o mecanismo da metanólise do óleo de girassol utilizando três diferentes enzimas na forma imobilizada e observaram que os derivados imobilizados de *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* catalisaram rapidamente a conversão dos triacilglicerídeos em diacilglicerídeos. Entretanto, a lipase de *Candida antarctica* foi mais eficiente na catálise dos diacilglicerídeos em monoglicerídeos e desses em acilésteres.

A especificidade das lipases pelo seu substrato consiste na capacidade da enzima em distinguir características estruturais da cadeia acila, tais como: tamanho da cadeia, número, posição e configuração das duplas ligações, presença de grupos substituintes e natureza da fonte acila (ácidos graxos livres, ésteres alquílicos, glicerol ésteres, etc). Em reações de transesterificação envolvendo triacilglicerídeos e álcoois, as lipases distinguem o tamanho e o tipo de ácido graxo contido no triacilglicerídeo e o tamanho da cadeia carbônica do álcool (metanol e etanol) (ANTCZAK et al., 2009). Por exemplo, a lipase de *R. oryzae* tem a capacidade de distinguir entre os ácidos graxos com diferentes tamanhos. Isoformas A e B da lipase *G. candidum* apresentam diferentes preferências por resíduos de acila (a primeira não tem preferência e a segunda tem preferência pelo ácido graxo cis-9 monoinsaturado). Esses exemplos evidenciam que a seleção das preparações de lipases é de suma importância para produção de biodiesel a partir de matérias-primas renováveis (ANTCZAK et al., 2009).

Tabela 6: Produção de biodiesel pela via enzimática

Imobilização	Suporte	Lipase	a	Óleo	Aceptor acila	Solvente	b	c	d	e	f	g	Referência
Adsorção	Celite	<i>Burkholderia cepacia</i>	10	Pinhão manso	Etanol	Ausente	1:4	50	12	98	Aumento	NA	SHAH; GUPTA (2007)
Adsorção	NA	<i>C. antarctica</i>	1,6	Algodão	Metanol	t-butanol	1:4	50	24	95	NA	NA	ROYON et al. (2007)
Adsorção	NA	<i>C. antarctica</i>	3	Colza	Metanol	t-butanol	1:4	35	12	95	Aumento	16	LI et al. (2006)
Adsorção	Resina acrílica	<i>C. antarctica</i>	10	Pinhão manso	Acetato de etila	Ausente	1:11	50	12	91,3	NA	12	MUKESH et al. (2007)
Adsorção	Resina acrílica	<i>C. antarctica</i>	4	Palma	Metanol	THF	1:3	40	40	97	Redução	NA	TALUKDER et al. (2006)
Adsorção	Sílica gel	<i>C. antacrctica</i>	5	Soja	Metanol	t-butanol	1:3,9	40	25	94	NA	NA	WANG et al. (2008)
Adsorção	Resina acrílica	<i>C. antarctica</i>	2	Soja	Metanol	Líquidos iônicos	1:4	50	12	80	NA	NA	SUNG et al. (2007)
Adsorção	Celite-545	<i>Chomobacterium viscosum</i>	10	Pinhão manso	Etanol	Ausente	1:4	40	10	92	Aumento	NA	SHAH et al. (2004)
Adsorção	Polipropileno EP-100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	Girassol	Metanol	Hexano	1:4,5	40	48	91	NA	NA	SOUMANOU; BORNSCHEUE R (2003)
Adsorção	Resina aniônica	<i>Pancreática</i>	10	Girassol	Etanol	Ausente	1:3	45	7	80	NA	NA	YESILOGLU et al. (2004)
Adsorção	Terra diatomácea	<i>Burkholderia cepacia</i>	1,46	Girassol	2-butanol	Ausente	1:3	40	6	100	Aumento	NA	SALIS et al. (2005)

a: Porcentagem de enzima utilizada (g/g de óleo)

b: Razão molar óleo: álcool

c: Temperatura reacional (°C)

d: Tempo Reacional

e: Rendimento Reacional (%)

f: Efeito da água na conversão

g: Número de ciclos da enzima

Tabela 6: Produção de biodiesel pela via enzimática (Continuação)

Imobilização	Suporte	Lipase	a	Óleo	Aceptor acila	Solvente	b	c	d	e	f	g	Referência
Adsorção	Resina acrílica	<i>Candida antarctica</i>	30	Soja	Acetato de metila	Ausente	1:12	40	14	92	NA	100	DU et al.(2004)
Confinamento	Hidrofóbico (sol-gel)	<i>Burkholderia cepacia</i>	5	Soja	Metanol	Ausente	1:7,5	35	30	56	Aumento	4	NOUREDDINE et al.(2005)
Encapsulação	k- carrageenan	<i>Burkholderia cepacia</i>	42	Palma	Metanol	Ausente	1:7	30	72	>99	NA	5	JEGANNATHA N et al.(2009)
Encapsulação	Sílica aerogel	<i>Burkholderia cepacia</i>	2,4	Girassol	Acetato de metila	Isotano	1:3	NA	30	64	NA	NA	ORÇAIRES et al. (2006)
Ligação covalente	Sílica-PVA	<i>Burkholderia cepacia</i>	20	Babaçu	Etanol	Ausente	1:7	39	48	>98	NA	NA	FREITAS et al. (2009)
Ligação covalente	Sílica-PVA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20	Palma	Etanol	Ausente	1:18	40	24	>99	NA	NA	MOREIRA et al. (2007)
Cross-linking	Sílica	<i>Enterobacter aerogenes</i>	*	Pinhão manso	Metanol	t-butanol	1:4	55	48	94	Redução	7	KUMARI et al. (2009)

Fonte: Adaptada de JEGANNATHAN et al., 2008.

a: Porcentagem de enzima utilizada (g/g de óleo)

b: Razão molar óleo: álcool

c: Temperatura reacional (°C)

d: Tempo Reacional

e: Rendimento Reacional (%)

f: Efeito da água na conversão

g: Número de ciclos da enzima

*: 50 unidades de atividade hidrolítica/g de óleo

NA: Não avaliado

THF: Tetrahydrofurano

2.9 Reações enzimáticas assistidas por irradiação de micro-ondas

A irradiação por micro-ondas é uma técnica emergente e uma fonte de energia alternativa para conduzir reações enzimáticas. Em meio aquoso, as propriedades das enzimas irradiadas com micro-ondas são idênticas às obtidas empregando o sistema convencional de aquecimento. Em meio orgânico, onde somente as espécies polares presentes absorvem a energia, a atividade, seletividade e estabilidade das enzimas podem ser aumentadas pelo aquecimento eletromagnético (RÉJASSE et al., 2007).

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes nas bandas de frequência entre 0,3 e 300 GHz e comprimentos de onda variando entre 0,001 e 1 m. A Figura 13 ilustra a faixa das micro-ondas no espectro eletromagnético, incluindo três bandas de frequência típicas: a frequência ultra-alta (UHF – ultra high frequency: 300 MHz a 3 GHz), a frequência super-alta (SHF – super high frequency: 3 a 30 GHz) e a frequência extremamente alta (EHF – extremely high frequency: 30 a 300 GHz). Nos fornos de micro-ondas domésticos e nos reatores de micro-ondas com finalidade de estudo científico, em geral é utilizada a frequência de 2,45 MHz e comprimento de onda de cerca de 12 cm (FORTUNY, et al., 2008).

Figura 13: Micro-ondas no espectro eletromagnético

Fonte: FORTUNY et al. (2008)

O aquecimento por micro-ondas é também chamado de aquecimento dielétrico. Existem dois mecanismos principais para a transformação da energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado de rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento de moléculas (que possuem dipolo permanente ou induzido) com o campo elétrico aplicado (Figura 14). O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado por meio de perdas de fricção, que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético (SANSEVERINO, 2002).

Figura 14: Mecanismo de transformação de energia denominado de rotação de dipolo
 Fonte: SANSEVERINO, 2002.

As principais vantagens da utilização de energia de micro-ondas sobre o aquecimento convencional (manta, bico de bunsen, placa de aquecimento e etc) são: a) as taxas de aquecimento em uma reação onde alguma substância (solvente ou reagente) presente absorva micro-ondas são superiores às obtidas pelo aquecimento convencional; b) o reator ou recipiente da reação pode ser transparente às micro-ondas (como teflon, por exemplo), de modo que a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solventes (ou até seletivamente por apenas um dos constituintes da reação); c) a energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento; d) a possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica (SANSEVERINO, 2002; GRAEBIN; EIFLER-LIMA, 2005). A Figura 15 ilustra o mecanismo de transferência de calor oriundo do aquecimento por irradiação de micro-ondas e convencional.

De acordo com a enzima, uma transferência direta de energia entre as ondas eletromagnéticas e os domínios polares das proteínas pode induzir uma modificação na flexibilidade da enzima e, conseqüentemente, mudanças nas propriedades enzimáticas (LA CARA et al., 1999). As irradiações por micro-ondas influenciam a estabilidade e atividade das enzimas, além de alterar/ aumentar as velocidades reacionais e/ou a enantiosseletividade (LIN; LIN, 1998). O mecanismo de interação das micro-ondas com os sistemas enzimáticos ainda não está claramente definido. Na maior parte das publicações, efeitos denominados não térmicos têm sido sugeridos para explicar as diferenças de velocidade reacional e seletividade observadas comparando-se experimentos numa temperatura controlada por aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas

(RÉJASSE et al., 2007). Dois parâmetros particulares parecem influenciar a atividade enzimática sob irradiação por micro-ondas: o estado de hidratação e a polaridade do meio reacional (RÉJASSE et al., 2007).

Figura 15: Comparação entre o sistema de aquecimento por irradiação de micro-ondas (a) e o aquecimento convencional (b).

Fonte: NEAS; COLLINS, 1988.

A influência do aquecimento por micro-ondas sobre a estabilidade da lipase de *Candida antarctica* lipase-B imobilizada foi estudada por Réjasse et al. (2004). A enzima foi submetida à irradiação por micro-ondas antes (condições de estocagem) e durante a biotransformação (condições reacionais). Em ambos os casos a estabilidade da enzima foi maior sob aquecimento térmico pelas micro-ondas do que pelo sistema convencional. Além disso, a estabilidade enzimática foi maior em solventes polares, os quais interagem fortemente com as micro-ondas. Os pesquisadores relataram que as razões para o aumento da estabilidade da enzima sob irradiação ainda não são elucidadas. No entanto, sugeriram que as micro-ondas alteram a interação entre a enzima e o micro-ambiente, prevenindo a desnaturação térmica.

Uma recente publicação evidenciou que as irradiações por micro-ondas podem induzir mudanças conformacionais na estrutura tridimensional de enzimas hipertermofílicas não justificáveis pelo efeito da temperatura. Essa alteração resultou no aumento da velocidade reacional de hidrólise à medida que a temperatura do meio reacional se tornava mais próxima à da temperatura ótima da enzima (YOUNG et al., 2008). Rufino et al. (2010) também relataram a eficiência da irradiação de micro-ondas investigando a produção de monoésteres de xilitol por meio da esterificação do xilitol com

ácido oléico, catalisada pela lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO₂-PVA. A reação foi conduzida sob aquecimento convencional e não convencionais (micro-ondas e ultrassom), mantendo-se as mesmas condições reacionais. Os resultados de conversão molar (%) em 6 h foram de 60,30 e 63,10 para o teste com ultrassom e micro-ondas, respectivamente, e 39,82 para o aquecimento convencional em 9h de reação, indicando melhores rendimentos e produtividades para ambas as reações conduzidas sob aquecimento não convencional.

Entretanto, a literatura também revela a existência de controvérsias sobre os efeitos do aquecimento por irradiação de micro-ondas na biocatálise. Souza et al. (2009) conduziram uma detalhada investigação sobre a existência de efeitos não térmicos na resolução cinética de álcoois secundários, empregando diferentes lipases imobilizadas. Para todas as lipases estudadas (Novozym 435, Amano PS-C I, Amano AK, Lipozyme RL, Lipozyme TL) e em todas as condições experimentais testadas, não foram constatadas diferenças de seletividade e reatividade entre o aquecimento por micro-ondas e o convencional.

Conforme pode ser visualizado na Tabela 7, similares divergências sobre a potencialidade de aplicação do aquecimento assistido por micro-ondas comparado com o aquecimento convencional também têm sido verificadas para as reações de transesterificação.

A irradiação de micro-ondas tem sido apontada como uma alternativa promissora, segura e fácil para a simplificação das etapas de obtenção e diminuição do tempo de reação da produção do biodiesel por catalisadores químicos e biológicos. Entretanto, poucas pesquisas têm sido encontradas sobre a aplicação desse sistema de aquecimento para a produção enzimática deste biocombustível (YU et al., 2010).

Tabela 7: Exemplos de reações de transesterificação enzimática assistidas por irradiação de micro-ondas

Enzima	Meio Reacional	Temperatura (°C)	Efeito do Micro-ondas X Aquecimento Convencional	Referência
Novozym 435	Acetato de metila e diferentes álcoois	50	A velocidade da reação conduzida no micro-ondas foi 2,2 a 4,6 vezes superior a obtida sob aquecimento convencional.	YADAV; LATHI (2004)
<i>Candida antarctica</i> (livre)	Butanol e butirato de etila	40-110	Não foram verificadas alterações na velocidade e no rendimento. Entretanto, a cinética de inativação pelo butanol mostrou ser influenciada pelo tipo de aquecimento.	RÉJASSE et al. (2004)
<i>Candida antarctica</i>	Acetato de metila e <i>n</i> -propanol	50 e 70	A velocidade reacional e taxa de conversão foram similares para ambos os sistemas de aquecimento.	LEADBEAT; STENCEL; WOOD (2007)
Novozym 435	(R,S)-2-octanol e acetato de vinila	40	Conversão de 50% em 3h e 12h de reação, para o aquecimento com micro-ondas e convencional, constando aumento da atividade e enantiosseletividade da enzima.	YU et al. (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	Óleo de babaçu e etanol	50	A velocidade da reação conduzida no micro-ondas foi 7 vezes superior a obtida sob o aquecimento convencional.	DA RÓS (2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	Óleo de palma e etanol	43	Resultados indicaram um incremento de 13 vezes na velocidade da reação em relação ao aquecimento convencional.	DA RÓS; CASTRO; DE CASTRO (2009)
Novozym 435	Óleo de soja e Metanol	40	Foi obtida uma conversão de 94% em ésteres metílicos, em 12 e 24 h para o aquecimento com micro-ondas e convencional respectivamente.	YU et al. (2010)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Lipases

Neste trabalho foram utilizadas preparações de lipase comerciais das seguintes fontes: *Aspergillus niger* (Lipase A), *Mucor javanicus* (Lipase M), *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) e *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) manufaturadas pela Amano Enzyme Inc (Nagoya, Japão). *Rhizopus oryzae* (Lipase L036P) manufaturada pela Biocatalysts (Cardiff, Inglaterra); *Rhizopus oryzae* (Piccantase R8000®) manufaturada pela DSM Food Specialities (Delft, Holanda) e lipase de pâncreas de porco (Tipo II) adquirida da Sigma Co (St. Louis, MO, EUA). Novozym ® 435 foi também usada como parâmetro de comparação, por ser uma preparação de lipase imobilizada reconhecida pelo potencial de síntese de biodiesel.

3.2. Suporte de imobilização

O suporte foi preparado pela técnica sol-gel (PAULA et al., 2008), empregando como precursor Tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA).

3.3. Substratos

O azeite de oliva comercial (baixa acidez, grau comercial) foi utilizado para dosagem da atividade hidrolítica das lipases e como substratos para a síntese do biodiesel foram utilizados: etanol anidro (98%, Vetec) e amostras do óleo de pinhão manso, obtidas comercialmente da Rural Sementes – Eldorado, MS (Amostra 1) e outra gentilmente doada pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) – Londrina, PR (Amostra 2).

3.4. Outros materiais e reagentes

Outros reagentes utilizados foram: Epícloridrina, hexano p.a. (Reagen Chemical Co, São Paulo, Brasil); acetona p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha); etanol comercial; peneira molecular 0,32cm de diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD adquirida da Sigma-Aldrich Chemical; Goma arábica em pó e polietilenoglicol (PEG-1.500) ambos da marca Synth (adquiridos da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.5. Equipamentos

A Tabela 8 apresenta os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 8: Equipamentos utilizados durante a execução do trabalho

Tipo de análise e/ou Ensaio	Equipamento	Modelo/ fabricante
Medidas de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal (TECNAL, Piracicaba/SP, Brasil)
Dosagem de proteínas	Espectrofotômetro UV-Visível	Modelo Cary 50 Conc., Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA)
Reações de hidrólise	Banho termostatzado com agitação	Modelo 145, Marconi (MARCONI, Piracicaba/SP, Brasil)
Teor de umidade	Balança analítica Com IV	ID 50, Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí / MG, Brasil)
Dosagem de monoésteres	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA)
Reações utilizando campos magnéticos	Reator de micro-ondas Discover	Discover/University-Wave, Cem Corporation modelo PN # CE-925SB235-SPB-PLUG
Análises térmicas	Analizador Termogravimétrico	Modelo Shimadzu TGA 50
Densidade	Densímetro	Modelo DMA 35N EX (Anton Paar)
Refino do óleo bruto	Centrífuga	CR4i, Jouan

3.6. Procedimento experimental

3.6.1. Tratamento e purificação dos óleos brutos de pinhão manso

As amostras de óleo de pinhão manso foram submetidas ao processo de refino, constituído das etapas ilustradas na Figura 16 e a seguir descritas detalhadamente.

Pré-limpeza: O óleo bruto foi centrifugado a 2136g por 10 min para separação dos sólidos em suspensão.

Degomagem: Foi efetuada pela adição de ácido fosfórico concentrado (85% m/m), numa proporção de 1,0% m/m, em relação à massa de óleo a 80°C ($\pm 3,0^\circ\text{C}$). A mistura foi mantida sob agitação mecânica vigorosa durante 1h e em seguida, as gomas foram removidas por centrifugação (2136g/15 min).

Figura 16: Diagrama de blocos do procedimento experimental para a purificação do óleo

Neutralização: O óleo degomado foi neutralizado com solução de NaOH (20% m/m), numa temperatura de 65°C e excesso de solução, com agitação mecânica vigorosa (400 rpm), por 20 min. Em seguida, a agitação foi cessada e a borra foi separada do óleo com o auxílio de uma centrífuga (2136g/15 min).

Lavagem: Ao óleo degomado e neutralizado, foram adicionados 15mL de água destilada para cada 100 g de óleo para remoção da borra saponácea. A água foi adicionada numa temperatura de 90-95°C, com subsequente agitação da mistura. Em seguida, a mistura foi resfriada e submetida à decantação em funil de vidro, até a separação completa das fases aquosa e oleosa. Foram realizadas lavagens sucessivas até o pH da fase aquosa atingir a neutralidade. Após as lavagens, a fase oleosa foi separada e centrifugada (2136g/10 min) para retirada de resíduos aquosos.

Secagem: Para finalizar a etapa de secagem foram adicionados 15 g de sulfato de sódio anidro para cada 100g de óleo. A mistura foi deixada em repouso por 24 h, transcorrido esse tempo foi realizada uma filtração para separação do sal e do óleo. Finalmente, o óleo foi resfriado e devidamente armazenado, e o sal foi lavado com hexano para uso posterior.

3.6.2. Caracterização físico-química das amostras de óleo de pinhão manso

3.6.2.1. Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de pinhão manso

A determinação em ácidos graxos dos óleos de pinhão manso foi realizada em um cromatógrafo de fase gasosa (CG AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM), equipado com coluna capilar do tipo DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme, adotando as seguintes condições de operação: Fluxo coluna = 1,00 mL/min.; Velocidade linear = 24 cm/s; Temperatura do detector: 280°C; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura Forno: 110°C – 5min, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 min; Gás de arraste: Hélio.

3.6.2.2. Índice de Acidez (I.A.).

O índice de acidez da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação, uma massa conhecida das amostras (cerca de 2,0 g da amostra) foi pesada em frascos Erlenmeyeres. Em seguida, foram adicionados 25mL de uma mistura de éter etílico e álcool etílico (95%) preparada na proporção 2:1 em volume. Os ácidos livres foram titulados com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01M previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O índice de acidez foi calculado pela relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, conforme a Equação 1.

$$I.A. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.6.2.3. Índice de Peróxido (I.P.)

O índice de peróxido das amostras de óleo de pinhão manso foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 da AOCS (2004). Para esta determinação, uma massa conhecida (aproximadamente 5g de óleo) foi submetida à reação com solução

saturada de iodeto de potássio por 1 min. O excesso de iodeto de potássio foi então titulado com tiosulfato de sódio 0,01N. O resultado foi calculado pela relação entre a quantidade em miliequivalentes de peróxido por 1000g de amostra. O cálculo do índice de peróxido foi realizado de acordo com a Equação 2:

$$I.P. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times C_{Tiosulfato} \times 1000}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 2}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), $C_{tiosulfato}$ = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.6.2.4. Índice de Saponificação (I.S.)

O índice de saponificação das amostras de pinhão manso foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta medida, uma massa conhecida de amostra (cerca de 2,5 g) foi saponificada com solução alcoólica de hidróxido de potássio (4% m/v) e titulada com ácido clorídrico (0,5 N). O cálculo do índice de saponificação foi realizado de acordo com a Equação 3.

$$I.S. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{KOH} \times C_{HCl}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{HCl} = Concentração molar da solução de HCl (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

3.6.2.5. Índice de Iodo (I.I.)

O índice de iodo das matérias-primas foi determinado pelo Método de Hübl de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação uma massa conhecida das amostras (cerca de 0,25g) foi submetida à reação com solução de iodo por 30 min ao abrigo da luz e posteriormente titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1N. O cálculo do índice de iodo foi realizado de acordo com a Equação 4.

$$I.I. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{I_2} \times C_{Tiosulfato} \times 0,1}{2 \times m_{amostra}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), MM_{I_2} = Massa Molar do I_2 (253,8g/mol), C_{tio} = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

3.6.2.6. Viscosidade

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas a 40 °C, empregando aproximadamente 0,5 mL de amostra.

3.6.2.7. Densidade

Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram feitas a 15 °C, empregando-se 2,0 mL de amostra.

3.6.3. Preparação dos derivados imobilizados

3.6.3.1. Síntese e ativação do suporte híbrido SiO_2 -PVA

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado, conforme metodologia descrita por Paula et al. (2008), pela mistura de 5mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60° C, sob agitação, com adição de 0,2 mL de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25 °C por no mínimo 48 h até a completa solidificação. O composto foi então triturado até que passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler (adquirida da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil) de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH. As principais propriedades morfológicas do suporte obtido estão apresentadas na Tabela 9 (SANTOS et al., 2008). Em seguida, o suporte foi embebido em solução de agente de ativação epiclоридrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,5), na

proporção massa de suporte: volume de solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato de sódio (0,1M e pH=7,5), e em seguida levado à estufa (60 °C) por 24 h.

Tabela 9: Classificação morfológica do suporte SiO₂-PVA quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.

Área superficial específica (m ² /g)	Volume de poros (cm ³ /g)	Tamanho médio dos poros (Å)
461,00	0,275	22,91

Fonte: SANTOS et al., 2008.

3.6.3.2. Imobilização de lipases de diferentes fontes em SiO₂-PVA

As enzimas foram imobilizadas por ligação covalente. Para tanto, o suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 (g/mL) e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, o sólido foi decantado e o excesso de hexano foi removido. Ao suporte foi então adicionado PEG 1500 (1g suporte: 100 µL de PEG) e lipase na proporção de 250 mg de enzima/g suporte, com exceção da lipase pancreática para a qual utilizou-se um carregamento de 500mg/g de suporte, em função da impureza da preparação enzimática. Os derivados imobilizados foram recuperados por filtração a vácuo e, em seguida, transferidos para um dessecador acoplado a uma bomba de alto vácuo a fim de reduzir o teor de umidade. A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999) e a atividade recuperada (η%) foi calculada pela Equação 6.

$$\eta(\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em que: U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização; U_s = unidades de atividade enzimática total presente no derivado imobilizado (atividade hidrolítica do derivado x massa total seca).

3.6.3.3. Dosagem de atividade hidrolítica das lipases livres e imobilizadas

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite: água) e 4 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, à 37 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma solução de concentração 0,5 mg/mL da lipase livre ou massa conhecida do derivado imobilizado (cerca de 0,5 g), mantendo-se o sistema reacional sob agitação a 37 °C, por 5 min. Após o período de incubação, foram adicionados 15 mL de uma mistura de etanol e acetona (1: 1) para interromper a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH previamente padronizada (0,02M) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a Equação 7 e expressas em μmol/g.min (U/g).

$$\text{Atividade hidrolítica} \left(\frac{\mu \text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad \text{Equação 7}$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco, M = molaridade da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa em gramas.

3.6.3.4. Dosagem da umidade dos derivados imobilizados

A determinação do teor de umidade dos derivados imobilizados foi feita medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (cerca de 0,1g) em balança analítica com infravermelho durante 15 min a 100°C.

3.6.3.5. Teor de proteína

O conteúdo de proteína nas preparações de lipase livre foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente brilhante de Comassie Blue e Albumina bovina cristalina (ABS) como padrão.

3.6.4. Reações de Síntese do Biodiesel de *Jatropha curcas*

3.6.4.1. Testes de seleção da fonte de lipase

As reações de síntese do biodiesel foram realizadas em frascos Erlenmeyers com capacidade de 125 mL sob agitação orbital de 200 rpm por um período máximo de 72 h. Todos os experimentos foram realizados com 15 gramas de meio reacional numa temperatura de 45°C. Os meios reacionais continham misturas do óleo de pinhão manso e etanol numa razão molar fixa óleo/etanol de 1:9 e foram incubadas com as diferentes preparações de lipase na forma livre ou imobilizada numa proporção fixa de 500 unidades de atividade por grama de óleo. As reações foram monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional para dosagem dos ésteres etílicos formados por cromatografia de fase gasosa, empregando-se metodologia estabelecida por Urioste et al. (2008). Vale ressaltar que para esta etapa do presente trabalho, foi utilizada a Amostra 1 do óleo de pinhão manso.

3.6.4.2. Etanólise do óleo de pinhão manso com as enzimas previamente selecionadas sob aquecimento convencional

As reações de síntese do biodiesel empregando-se as lipases previamente selecionadas na etapa descrita na seção 3.6.4.1 foram realizadas em reatores de vidro cilíndrico (6 cm de altura e 4 cm de diâmetro interno) encamisados, com capacidade de 50 mL de volume, acoplados a um condensador de refluxo sob agitação magnética a 400 rpm (Figura 17).

As reações foram realizadas com 20 gramas de meio reacional, mantendo-se as mesmas condições reacionais utilizadas na etapa de seleção dos biocatalisadores, ou seja, razão molar fixa óleo/etanol de 1:9, enzima na quantidade de 500 unidades de atividade por grama de óleo e temperatura de 45°C. As reações foram monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional para dosagem dos ésteres etílicos formados por cromatografia de fase gasosa. O produto da reação (biodiesel) foi ainda analisado por técnicas termogravimétricas, espectrofotométricas e reológica.

Figura 17: Aparelhagem utilizada para síntese de biodiesel empregando as lipases previamente selecionadas.

3.6.4.3. Etanólise do óleo de pinhão manso empregando-se a enzima selecionada sob irradiação de micro-ondas

As sínteses foram realizadas em um reator de micro-ondas Discover (Figura 18), utilizando um reator de vidro esférico (50 mL) acoplado com condensador de refluxo. O meio reacional contendo óleo de pinhão e etanol na razão molar fixa de 1:9 e 1:6 (óleo/álcool) foi irradiado com 5 W de potência de micro-ondas para manter a temperatura da reação constante e igual a 45 °C. Como biocatalisador, foi empregada a lipase mais promissora para a etanólise do óleo de pinhão manso na proporção de 500 U/g de óleo. As reações foram conduzidas por um período máximo de 8 h, com agitação magnética no nível alto para todos os experimentos. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação dos ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa.

Figura 18: Reator de micro-ondas Discover

3.6.5. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA sob aquecimento convencional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado. As reações de transesterificação foram realizadas utilizando-se 500 unidades de atividade hidrolítica/ g de óleo e 20 g de substrato, na razão molar 1:9 óleo/etanol, em bateladas consecutivas (24 h/ 45°C). A temperatura reacional foi mantida constante pela imersão do sistema reacional em banho de glicerina previamente estabilizado. As reações foram conduzidas em reator de vidro esférico (25 mL) acoplado com condensador de refluxo. A enzima foi confinada em uma membrana de nylon evitando assim a perda de massa enzimática nas etapas de lavagem. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas após 6 e 24h reacionais, para quantificação da formação dos ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa. Entre as bateladas, a membrana contendo a enzima foi removida e lavada sucessivamente com álcool tert-butanol (total de 10 mL) e, em seguida com hexano (total de 20 mL). A membrana foi deixada à temperatura ambiente overnight para secagem e reutilizada em uma outra reação com um novo substrato na mesma concentração do utilizado na reação anterior. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado pela equação 8.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{kd}$$

Equação 8

Em que kd = constante de desativação.

3.6.6. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA sob aquecimento não convencional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada em reações de transesterificação do óleo de pinhão manso com etanol em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, segundo condição otimizada descrita por Da Rós (2009).

As reações de transesterificação foram realizadas utilizando-se 12 g de substrato, na razão molar 1:6 óleo/etanol, em bateladas consecutivas (6h/ 45°C), 10% de lipase imobilizada em relação a massa total de substrato. A enzima foi adicionada diretamente no meio reacional, uma vez que testes preliminares mostraram ineficiência da membrana de nylon no sistema de reação. As reações foram conduzidas por 6 h e alíquotas foram retiradas ao longo do tempo para quantificação da formação dos ésteres de etila por

cromatografia de fase gasosa. Ao final de cada batelada, a enzima foi lavada no próprio reator conforme descrito da seção 3.6.6. e o tempo de meia vida determinado conforme equação 8.

3.6.7. Purificação do Biodiesel

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a lavagens sucessivas com água destilada. Em cada lavagem, foi utilizado aproximadamente o mesmo volume de água em relação ao volume do meio reacional. A mistura foi transferida para um funil de decantação (Figura 19), agitada e deixada em repouso por pelo menos 30 min para a separação das fases.

Figura 19: Purificação do biodiesel

A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à centrifugação (1569g /15 min) e posteriormente a evaporação em rota-evaporador (70°C/15 min) para a retirada de traços de etanol e água remanescentes. Para finalizar a etapa de secagem, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro e o biodiesel foi armazenado em frascos de vidro para as análises posteriores.

3.6.8. Análises do biodiesel

3.6.8.1 Determinação dos ésteres formados na reação de etanólise do pinhão manso

As concentrações dos ésteres formados na reação de etanólise do óleo de pinhão manso foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando nas condições definidas na

Tabela 10, conforme estabelecido por Urioste et al. (2008). As amostras foram previamente diluídas com hexano numa proporção de 1:3.

Tabela 10: Condições para determinação dos ésteres de etila.

Padrão interno	Hexanol (18,0 g/L)	
Programa de temperaturas	90°C (3min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min)	
Taxa de variação	25 °C/ min	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Atenuação do cromatógrafo	A, B e C = 16	
Preparo da amostra	0,1 g da amostra em 0,3 g de hexano	
Amostra para injeção	1:1 (amostra: padrão interno)	
	Padrão Interno (P.I.)	Minutos (min)
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila	C14 EtOH	12,06
	C16 EtOH	13,96
	C18 EtOH	17,10
	C18:1 EtOH	17,81
	C18:2 EtOH	19,26

3.6.8.2. Cálculo do rendimento de transesterificação

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de pinhão manso (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 9 (a), em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) Equação 9 (b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (M_t) pela massa teórica de ésteres de etila (M_e), conforme mostrado na Equação 9 (c).

$$M_e = \frac{(M_0 \cdot MM_e)}{MM_a} \quad (a) \quad M_0 = C_a \cdot M_i \quad (b) \quad R = \frac{M_t}{M_e} \times 100 \quad (c) \quad \text{Equação 9}$$

3.6.8.3. Análise de viscosidade do biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos conforme descrito da seção 3.6.2.6. As análises do produto transesterificado foram efetuadas após a etapa de purificação, conforme descrita no item 3.6.7.

3.6.8.4. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

As análises de ressonância magnética nuclear protônica (RMN ^1H) das amostras dos óleos de pinhão manso e biodiesel foram realizadas em um espectrofotômetro Varian modelo Mercury 300MHz. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3) utilizando-se como referência o tetrametilsilano.

3.6.8.5. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Amostras de óleos de pinhão manso e biodiesel foram submetidas à análise de espectroscopia na região do Infravermelho na faixa de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , por meio de um espectrômetro modelo Spectrum GX, Perkin Elmer.

3.6.8.6. Análise termogravimétrica (TG)

Um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA 50 foi utilizado para efetuar as análises de termogravimetria TG das amostras de pinhão manso e dos produtos transesterificados obtidos nas reações catalisadas pelas lipases AK e PS, adotando as seguintes condições de análise: fluxo de 50mL/ min de atmosfera de nitrogênio e ar sintético, razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na faixa de aquecimento de 25 a 1000 $^{\circ}\text{C}$ e 25 a 600 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do óleo de pinhão manso

4.1.1. Composição química em ácidos graxos

Os óleos e gorduras possuem como componentes mais expressivos os triglicerídeos, que são ésteres resultantes da ligação do glicerol com ácidos graxos. Suas propriedades químicas e físicas dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos (AG) uma vez que estes representam em média 95% da massa molecular dos triacilgliceróis (TAG) (MORETTO; FETT, 1998). A composição em ácidos graxos de uma determinada matéria-prima lipídica é dependente do tipo de espécie oleaginosa e influenciada por fatores climáticos e regionais.

As composições químicas em ácidos graxos das amostras de óleo de pinhão manso em estudo estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11: Composição em ácidos graxos das amostras de óleo de pinhão manso

Ácidos Graxos		Amostra 1	Amostra 2
C12: 0	Láurico	0,06	0,02
C14: 0	Mirístico	0,08	0,07
C15: 0	Pentadecanóico	0,02	0,03
C16:0	Palmítico	11,33	12,90
C16:1	Palmitoléico	0,78	0,87
C17:0	Margárico	0,12	0,12
C17:1	Margaroléico	0,05	0,05
C18:0	Esteárico	5,30	5,63
C18:1	Oléico	38,23	39,73
C18:2	Linoléico	33,66	40,00
C18:3	Linolênico	1,22	0,22
C20:0	Araquídico	0,34	0,18
C20:1	Gadoléico	0,85	0,07
C22:0	Behênico	0,33	0,05
C22:1	Erúcico	7,24	0,0
C24:0	Lignocérico	0,16	0,06
Saturados (%)		17,74	19,06
Insaturados (%)		82,26	80,94

Verifica-se pela comparação dos dados dispostos na Tabela 11 que existe uma variação considerável no perfil de ácidos graxos nas duas amostras. A amostra 1, adquirida comercialmente da empresa Rural Sementes – Eldorado, MS, apresentou em sua composição um elevado teor do ácido graxo erúcico (C22: 1). De acordo com os dados da literatura, esse ácido graxo não integra o perfil de ácidos graxos do óleo de pinhão manso. Segundo informações posteriores obtidas do fornecedor, essa amostra de óleo foi extraída por meio de prensa mecânica e no local, anteriormente, tinha ocorrido a extração do óleo de crambe. Sendo assim, a presença do ácido graxo erúcico (C22:1) pode ser justificada pela possível contaminação da amostra com o óleo de crambe, uma vez que esse óleo é composto por aproximadamente 57 % deste ácido graxo.

Mesmo com essa pequena contaminação advinda da etapa de extração do óleo, os testes referentes à triagem de lipases para síntese enzimática de biodiesel foram realizados com essa amostra, tendo em vista que na época era a única amostra de óleo de pinhão manso disponível no laboratório. Além disso, deve ser destacado que nesse grupo de experimentos o objetivo era comparar o desempenho de diversas preparações de lipases na formação de ésteres de etila de tamanho de cadeia inferior a C20. Portanto, a presença desse ácido graxo no meio reacional não interferiu negativamente na atuação das diferentes fontes de lipase. A segunda amostra do óleo de pinhão manso doada posteriormente pelo Instituto de Pesquisas do Paraná (IAPAR – Paraná-PR) foi utilizada nos ensaios de síntese e caracterização do biodiesel pelas preparações de lipases mais eficientes selecionadas no teste de triagem.

4.1.2. Propriedades físico-químicas do óleo de pinhão manso

Além da composição, algumas propriedades físico-químicas das amostras do óleo de pinhão manso foram determinadas incluindo: os índices de acidez, iodo, peróxido e saponificação. Essas análises são importantes para determinar a qualidade do óleo para síntese do biocombustível. Independentemente do tipo de catalisador selecionado, a qualidade do óleo utilizado na reação de transesterificação é de fundamental importância, tendo em vista que inibidores catalíticos podem reduzir o rendimento da reação (SUAREZ et al., 2009). Em princípio, todas as fontes de triacilglicerídeos podem ser empregadas como substrato para as lipases, mas algumas substâncias como fosfolipídeos, mesmo presentes em pequenas quantidades, podem ter um efeito negativo na atividade da enzima (SALIS et al., 2007). Os dados referentes à caracterização físico-química das amostras de óleo do pinhão manso estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Propriedades físico-químicas das amostras do óleo de pinhão manso utilizadas neste trabalho.

Atributos	Amostra 1	Amostra 2
Índice de Acidez (mg KOH/g óleo)	0,08	3,15
Índice de Peróxido (mEq/kg óleo)	4,83	1,81
Índice de Saponificação (mgKOH/ g óleo)	189	144
Índice de Iodo (g I ₂ /100g óleo)	96	101
Viscosidade cinemática (cSt)	36,30	34,53
Densidade a 27°C (g/cm ³)	0,9112	0,9135

O índice de acidez indica o estado de conservação do óleo. Foi constatado que o índice de acidez da amostra 2 (3,15 mg KOH/g óleo) foi superior ao da amostra 1 (0,08 mg KOH/g óleo), sugerindo que essa amostra possui maior grau de deterioração em termos de rancidez hidrolítica. Esse parâmetro influencia diretamente na síntese de biodiesel por transesterificação química, sendo considerada como matéria-prima ideal óleos e gorduras com índice de acidez inferior a 2 mg KOH/g óleo (SUAREZ et al., 2009). Sendo assim, a amostra 02 não seria adequada para síntese de biodiesel por essa rota. Entretanto, as lipases possuem a capacidade de esterificar os ácidos graxos livres do meio e convertê-los em seus ésteres alquílicos correspondentes. Essa versatilidade sintética das lipases torna a rota enzimática para obtenção de biodiesel ainda mais vantajosa.

O índice de peróxido da amostra 1 (4,43 mEq/kg óleo) foi maior do que aquele para a amostra 2 (1,81mEq/kg óleo), indicando que a amostra 1 apresentou maior grau de deterioração em termos de rancidez oxidativa. O processo de rancidez oxidativa nos lipídeos é acelerado por vários fatores, dentre os quais destaca-se a presença na composição do óleo de elevada proporção dos ácidos graxos insaturados (ZAGONEL, 2005). Aceitam-se como limite máximo, o valor de 10 mEq/kg de óleo, já que valores maiores significam início do processo de rancidez oxidativa (ANVISA, 1999).

O índice de iodo para as amostras 1 e 2 foram 96 e 101 I₂/100g, respectivamente, indicando uma variação no grau de instauração das mesmas. Esse teste representa a quantidade de iodo necessária para reagir com as instaurações dos ácidos graxos presentes nos ácidos graxos constituintes das amostras estudadas.

Houve variação entre o índice de saponificação para as amostras 1 (189 mgKOH/g) e 2 (144 mgKOH/ g) confirmando a diferença no perfil de ácidos graxos das amostras do óleo de pinhão manso. O índice de saponificação identifica a presença de óleos e gorduras

que contenham um elevado teor de ácidos graxos de baixa massa molecular, assim, quanto menor a massa molecular do ácido graxo, maior será o índice de saponificação.

Em geral, a viscosidade cinemática dos óleos vegetais varia na faixa de 30-40 cSt a 40°C. Os valores de viscosidade das amostras de óleos de pinhão manso em estudo 36,30 e 34,53 cSt (amostra 1 e 2, respectivamente) estão dentro da faixa esperada.

Como as amostras de óleo sofreram o mesmo tratamento de refino, as diferenças observadas de qualidade e composição dos óleos podem ser atribuídas a fatores como condições de cultivo da oleaginosa, tipo de extração do óleo, condições de armazenamento das sementes e do óleo cru, bem como a variabilidade genética da planta. Vale ressaltar que as amostras, após a etapa de refino, apresentaram características desejáveis para serem utilizadas na reação de transesterificação.

4.2. Imobilização das lipases de diferentes fontes no suporte híbrido SiO₂-PVA

Sete preparações de lipases comercializadas por diferentes fornecedores foram utilizadas na execução do presente trabalho. A caracterização dessas preparações foi uma etapa preliminar necessária, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos fabricantes são determinados na maioria dos casos por métodos diversos. Desta forma, na Tabela 13 são apresentados os valores das atividades hidrolíticas dessas preparações empregando a hidrólise do azeite de oliva como método de análise (pH 7,0 e 37°C), conforme procedimento descrito na seção 3.6.3.3. A Tabela 13 também inclui a regiosseletividade, os teores de proteína, as atividades específicas de cada preparação e condições ótimas de pH e temperatura de cada preparação.

As atividades hidrolíticas das lipases testadas apresentaram uma ampla faixa de variação entre 13848 a 70423 U/g. Esse parâmetro é interessante por permitir uma comparação eficiente e real na atividade catalítica da enzima sobre um determinado substrato (SALIS et al., 2007). A preparação lipase PS (*Burkholderia cepacia*) foi a que apresentou a atividade específica mais elevada (cerca de 5417U/mg de proteína), o que indica que se trata de uma preparação com alto teor de pureza entre as proteínas presentes, além de apresentar atividade de hidrólise de azeite de oliva bastante elevada.

Adotando o procedimento descrito no item 3.6.3.2, o suporte SiO₂-PVA, previamente ativado com epícloridrina, foi utilizado para imobilizar as diferentes preparações de lipases. A Tabela 14 apresenta os dados referentes aos teores de umidade, atividades hidrolíticas e a atividade recuperada para cada preparação de lipase.

Tabela 13: Atividade hidrolítica, teor de proteínas e atividade específica das lipases testadas.

Fonte de Lipase	Nome Comercial	Regio-seletividade	Proteína (mg/g)	Atividade hidrolítica (U/g)	Atividade específica (U/mg proteína)	Condições ótimas	
						pH	T (°C)
<i>A. niger</i>	Lipase A	1,3 >> 2	96	23751	247	6,5	45
<i>M. javanicus</i>	Lipase M	1,3 > 2	121	40875	338	7-8	35-40
<i>R. oryzae</i>	Lipase L036P	1,3 >>> 2	93	45112	484	7,0	40
<i>R. oryzae</i>	Piccantase R 8000®	1,3 >>> 2	134	13848	104	7,0	37-60
<i>B. cepacia</i>	Lipase PS	Não específica	13	70423	5417	7,5	55-70
<i>P. fluorescens</i>	Lipase AK	Não específica	14	29878	2134	8,0	60
Pâncreas de porco	Pancreática	1,3 específica	122	19802	162	8,0	45

Especial atenção foi dada ao procedimento experimental de imobilização para se obter derivados imobilizados com teores de umidade entre 10-20%, tendo em vista que elevados teores de água podem favorecer a reação de hidrólise, reduzindo conseqüente o rendimento da reação de transesterificação.

A atividade hidrolítica do derivado imobilizado é de crucial importância, pois além de fornecer dados referentes à recuperação de atividade catalítica no suporte (rendimento de imobilização), foi utilizada no cálculo da massa do biocatalisador para mediar a reação de transesterificação. Conforme determinado em trabalhos anteriores (DA RÓS, 2009), uma quantidade mínima de 400 unidades de atividade hidrolítica por grama de óleo é necessária para se alcançar um bom rendimento de transesterificação.

Tabela 14: Atividades hidrolítica e recuperada dos derivados imobilizados em SiO₂-PVA.

Lipase	Umidade (%)	Atividade hidrolítica (U/g)	Atividade recuperada (%)
Lipase A	12,00	757	15,53
Lipase M	13,00	1286	13,28
Lipase L036P	10,00	2925	30,62
Piccantase R8000®	7,25	749	23,04
Lipase PS	11,00	1980	17,41
Lipase AK	16,83	1860	33,28
Lipase Pancreática	12,88	1059	20,50

Os valores de atividade recuperada variaram entre 13,28 e 33,28%. Com exceção das lipases de *R. oryzae* (Lipase L036P) e (Lipase AK), todas as lipases resultaram em rendimentos de imobilização inferiores a 30%. O maior rendimento de imobilização foi obtido pela lipase AK, significando que esta preparação apresentou a maior afinidade pelo suporte.

Os distintos valores de rendimentos obtidos podem estar relacionados com as diferentes fontes de lipases avaliadas. Neste caso, as diferenças estruturais entre as moléculas protéicas de cada enzima resultaram em diferentes interações enzima-suporte.

4.3. Testes de seleção da fonte de lipase: Desempenho das enzimas nas formas livre e imobilizada

Os ensaios de transesterificação foram efetuados de acordo com as condições descritas no item 3.6.4.1, empregando-se as preparações de lipases nas formas livre e imobilizada e o rendimento da reação de transesterificação foi monitorado por cromatografia de fase gasosa. A viscosidade do produto transesterificado foi também determinada nas amostras após a etapa de purificação.

As lipases na forma livre não foram eficientes na transesterificação do óleo de pinhão manso. Além da perda de atividade catalítica, foi verificado que as enzimas livres em meio orgânico tenderam a aglomerar nas paredes do Erlenmeyer, dificultando a homogeneização do sistema e reutilização do catalisador, além de contribuir com o aumento da perda de atividade catalítica pela diminuição do contato do substrato com o sítio ativo da enzima. Dentre as fontes de lipases testadas, somente foi verificada atividade de transesterificação para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK) com a qual se obteve rendimento de 18,00% (dado não tabulado). Resultados similares foram obtidos por Moreira et al. (2007) no estudo da etanolise do óleo de palma catalisada pela enzima AK na forma livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído. Com a lipase na forma livre foi obtido um rendimento de 38,4% bem inferior ao obtido para a enzima na forma imobilizada (>90%).

Por outro lado, verifica-se na Tabela 15 que todas as lipases imobilizadas testadas foram capazes de transesterificar o óleo de pinhão manso. Entretanto, o rendimento reacional foi dependente das fontes de lipases testadas. Os valores obtidos em concentração mássica de ésteres de etila variaram entre 0,22 a 67,28 % m/m correspondendo, respectivamente, a rendimentos de 0,31 a 96,87% (Tabela 15).

As lipases PS e AK mostraram-se as mais eficientes para a transesterificação do óleo de pinhão manso alcançando rendimentos de 93,18% e 85,67%, respectivamente, valores próximos ao encontrado para a enzima controle Novozym 435 (96,23%). Baixos rendimentos reacionais (<10%) foram obtidos para a lipase A, lipase M, lipase L036P e Piccantase R8000. Verifica-se ainda a relação inversa entre o rendimento reacional e a viscosidade, ou seja, quanto maior o rendimento de transesterificação, menor o valor da viscosidade, confirmando que as lipases PS e AK foram as mais efetivas na produção de ésteres etílicos.

Tabela 15: Desempenho das lipases imobilizadas em SiO₂-PVA na etanólise do óleo de pinhão-manso.

Lipases	Ésteres etílicos (% m/m)						Rendimento (%)	Viscosidade (cP)
	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	Total		
Lipase A	0,05	0,08	0,01	0,04	0,04	0,21	0,31	33,00
Lipase M	0,44	0,19	0,03	0,16	0,15	0,97	1,48	27,25
Lipase L036P	0,12	0,51	0,42	2,38	2,31	5,74	8,72	25,91
Piccantase R8000®	0,6	0,96	0,08	0,48	0,46	2,59	3,93	31,56
Lipase PS	0,95	7,23	4,42	24,66	23,97	61,24	93,18	6,00
Lipase AK	0,72	9,56	4,11	22,75	22,10	59,10	85,67	6,72
Lipase Pancreática	0	2,10	0	2,36	2,10	6,56	8,99	27,48
Novozym 435	0,17	9,07	4,80	27,00	26,24	67,28	96,23	5,41

A seleção de lipases para a produção de biodiesel também foi estudada por Salis et al. (2008). Oito fontes de lipases imobilizadas em polipropileno macroporoso foram testadas para a síntese de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol na razão molar de 1:8 (óleo/álcool). Seis das fontes de lipases estudadas (*M. javanicus*, *P. camembertii*, *R. oryzae*, *C. rugosa*, *P. roquefortii* e *A. niger*) não mostraram nenhuma atividade de transesterificação. Somente as lipases de *P. fluorescens* (Lipase AK) e de *B. cepacia* (Lipase PS) foram capazes de formar ésteres metílicos alcançando rendimentos reacionais máximos da ordem de 58% (em 22h) e 37% (em 51,5 h), respectivamente.

Na Figura 20 está esquematizado o perfil de formação dos ésteres de etila em função do tempo de reação da transesterificação do óleo de pinhão manso catalisada pelas lipases AK, PS e Novozym 435.

Entre as lipases eficazes para transesterificação do óleo de pinhão manso, verifica-se um desempenho bastante similar tanto em termos de rendimento de transesterificação quanto em termos de seletividade para os ácidos graxos presentes em maior concentração no óleo de pinhão manso (ácidos palmítico, oléico e linoléico).

A pequena diferença de velocidade de reação constatada para as reações catalisadas por essas lipases (Figura 20) pode ser creditada as condições reacionais adotadas (temperatura e razão molar), que podem não ter sido totalmente adequadas para essas três lipases. Como constatado na literatura pertinente, apesar de lipases de fontes distintas serem capazes de catalisar a mesma reação, os desempenhos de cada uma delas, sob as mesmas condições de reação, pode ser bastante diferente (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Com base nos resultados obtidos, as lipases imobilizadas oriundas de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* foram pré-selecionadas como as mais eficientes para a síntese do biodiesel de óleo de pinhão. Essas preparações de enzimas foram empregadas para catalisar a etanolise do óleo de pinhão manso em reatores de vidros acoplados com condensador de refluxo (conforme descrito na seção 3.6.4.2), adotando-se as mesmas condições reacionais, mas aumentando-se o volume reacional visando obter um maior volume do produto transesterificado que permita efetuar análises complementares que auxiliem na seleção da preparação enzimática mais efetiva para a transesterificação do óleo de pinhão manso.

(a)

(b)

(c)

Figura 20: Perfil de formação dos ésteres de etila em função do tempo de reação da etanolise do pinhão manso catalisada por diferentes lipases imobilizadas. Todos os ensaios foram realizados em shaker com agitação orbital de 200 rpm a 45°C. Lipase AK (a), Lipase PS (b) e Novozym 435 (c).

4.4. Etanólise do óleo de pinhão manso com as lipases previamente selecionadas

Os rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo de reação da etanólise do óleo de pinhão manso catalisada pelas enzimas AK e PS, empregando-se o sistema reacional acoplado ao condensador de refluxo, são apresentados na Figura 21.

As concentrações totais em ésteres etílicos obtidas ao final da reação foram 57,54 e 63,86 m/m%, correspondendo a rendimentos de transesterificação de 87,85 e 97,5% para a lipase AK e PS, respectivamente. Verifica-se ainda que rendimentos reacionais similares foram obtidos em relação aos dados descritos anteriormente, sugerindo que na temperatura utilizada não ocorreu evaporação significativa do álcool durante a reação, independente do aparato experimental utilizado.

Os produtos transesterificados foram purificados (separação do glicerol formado e extração de álcool residual no aparelho de rota-evaporador) e posteriormente submetidos à análise de reologia, ressonância magnética de prótons, espectrometria no infra-vermelho e termogravimetria.

Figura 21: Rendimento de transesterificação (%) em função do tempo de reação da etanólise do óleo de pinhão manso catalisada pelas lipases PS e AK.

4.4.1 Estudo reológico das amostras de biodiesel

A viscosidade, que é uma medida da resistência da vazão de um líquido associada à fricção ou atrito interno de uma parte do fluido que escoar sobre a outra, é um importante parâmetro utilizado para caracterizar as matérias-primas oleaginosas e o biodiesel. A

viscosidade cinemática dos óleos varia na faixa de 30-40 cSt a 40°C. A elevada viscosidade dos óleos vegetais (cerca de 10 a 15 vezes o valor do diesel) é a principal propriedade combustível que justifica o abandono generalizado do emprego dos óleos vegetais *in natura* como combustíveis (SINGH; SINGH, 2009).

A viscosidade aumenta com o tamanho da cadeia do ácido graxo (número de átomos de carbono) e com o grau de saturação. Esta regra também é válida para o álcool empregado na reação, pois a viscosidade dos ésteres etílicos é ligeiramente superior àquela dos ésteres metílicos (KNOTHE et al., 2006).

A determinação da viscosidade pode ser também usada como um parâmetro de controle da síntese de biodiesel, indicando a conversão dos triglicerídeos em ésteres pela gradual redução da viscosidade do produto transesterificado. Conforme pode ser observado na Figura 22, há uma relação inversamente proporcional entre conversão e viscosidade, ou seja, quanto maior a conversão do triglicerídeo, menor a viscosidade do produto transesterificado.

Figura 22: Correlação entre viscosidade do produto transesterificado (▼) e rendimento de transesterificação (○) durante o progresso da reação de etanólise do óleo de pinhão manso catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA (razão molar óleo/etanol 1:9 a 45°C).

Na Tabela 16 estão apresentados os rendimentos de transesterificação e os valores de viscosidade cinemática dos produtos transesterificados obtidos pela atuação das lipases AK e PS.

Tabela 16: Correlação entre rendimento de transesterificação (%) e viscosidade cinemática (cSt).

Enzimas	Rendimento de Transesterificação (%)	Viscosidade Cinemática (cSt)
Lipase AK	87,85 ± 3,04	6,66
Lipase PS	97,50 ± 3,53	5,81

De acordo com a norma ASTM 6751-02 (KNOTHE et al., 2006), a viscosidade cinemática do biodiesel (B100) deve se enquadrar na faixa entre 1,9-6,0 (cSt). Comparando-se a viscosidade das amostras de biodiesel obtidas pela atuação das lipases AK e PS, verifica-se que a viscosidade do biodiesel obtido pela atuação da lipase PS enquadrou-se no limite permitido e foi inferior ao obtido pela AK em função da menor concentração residual de mono-, di-, triacilglicerídeos remanescentes.

4.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

A técnica analítica Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) possibilita monitorar variações no sinal dos hidrogênios da glicerina, sendo empregada para se confirmar a reação de transesterificação dos triacilglicerídeos, levando a sua conversão em ésteres de ácidos graxos alquílicos.

Verifica-se nos espectros (Figura 23 a, b,c), a ausência dos sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio do grupo CH₂ da glicerina, nos intervalos = 4 a 4,5 ppm, existente no espectro do óleo de pinhão manso (Figura 23-a), na forma de um multiplete (duplo duplete). Isso indica a transformação, em ambas as sínteses, do triacilglicerídeo em ésteres de etila. Pelos espectros das amostras de biodiesel obtido com as enzimas AK e PS (Figuras 23-b,c), foi confirmada a formação do éster etílico caracterizado pelo aparecimento de um quarteto em 4,1 ppm, referente aos átomos de hidrogênio do grupo metileno da porção alcoólica do éster [CH₃-CH₂-OC(=O)-R].

Figura 23: Ressonância magnética nuclear de prótons das amostras de óleo do pinhão manso e do biodiesel sintetizado pelas lipases AK e PS.

4.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Outra técnica normalmente usada no monitoramento da transesterificação de óleos e gorduras é a espectroscopia na região do infravermelho. A vantagem dessa metodologia inclui a possibilidade de diferenciar a quantidade de óleo, éster e glicerol (MONTEIRO et al., 2008).

Os espectros apresentados na Figura 24 mostram regiões de absorção de carbonila de éster (1740 e $1163\text{-}1172\text{ cm}^{-1}$), ligação C-H de alcano (2925 e 2855 cm^{-1}) e ligação C-H₂ de alcano (720 cm^{-1}). Como se trata de um triéster (óleo vegetal) e após a reação é formada uma mistura de ésteres (biodiesel) era de se esperar que as curvas estivessem no mesmo comprimento de onda.

A análise dos dados obtidos permite verificar que tanto o óleo de pinhão manso como as amostras de biodiesel produzidos não apresentaram a banda larga entre 3100 e 3500 cm^{-1} , a qual caracteriza a deformação axial de grupos hidroxila (O-H) em ligações de

hidrogênio, sugerindo isenção de contaminação das amostras com glicerol ou água. Essa informação demonstra também que a etapa de purificação do biodiesel descrita na seção 3.6.7. foi eficiente.

Figura 24: Espectro na região do infravermelho das amostras de óleo de pinhão manso e do biodiesel sintetizado pelas lipases PS e AK.

4.4.4. Análises Termogravimétricas: TG e DTG

As análises termogravimétricas podem ser usadas como um método de fácil execução e baixo custo para se avaliar a conversão da reação de transesterificação, bem como para se determinar a estabilidade térmica do biodiesel. Essa técnica não requer a utilização de solventes ou reagentes. No entanto, não possibilita a diferenciação da quantidade de cada um dos ésteres alquílicos produzidos pela reação (CHAND et al., 2009).

A Termogravimetria (TG) é o resultado de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura (COSTA NETO, 2002). A Termogravimetria Derivada (DTG) é a derivada primeira da curva termogravimétrica, ou seja, a derivada da variação de massa em relação ao tempo ou temperatura. A curva DTG apresenta as informações de uma

forma mais visualmente acessível, mostrando com mais clareza os pontos inicial e final do processo, sendo a área diretamente proporcional à variação de massa, levando à pronta determinação da temperatura do pico e indicando as temperaturas inicial e final do processo (FERNANDES, 2005).

Tais técnicas termoanalíticas geram como resultado uma curva de decomposição térmica que informa as etapas de degradação das amostras em função da temperatura. Por meio da análise desses dados, é possível estabelecer parâmetros de estabilidade térmica do óleo *in-natura* e do biodiesel obtido. O biodiesel, como é uma mistura de ésteres de metílicos ou etílicos, possui propriedades físicas análogas às aquelas obtidas dos ésteres puros (LIMA et al., 2007).

A Tabela 17 reúne as informações obtidas nas etapas e temperaturas de degradação térmica para as amostras de óleo de pinhão manso e dos produtos transesterificados pela atuação das lipases PS e AK.

O óleo de pinhão manso se mostrou estável termicamente até a temperatura de 321°C, demonstrando dois estágios de degradação térmica entre 321-442°C e 442-450°C com perda de massa de 81,64 e 18,36%, respectivamente, atribuídas à volatilização e/ou decomposição térmica dos ácidos graxos que compõem o triacilglicerídeo. A maior velocidade de decomposição (dm) ocorreu a 404°C (Figura 26). Para amostras de óleo de pinhão manso de diferentes safras também foi verificada estabilidade térmica superior a 300° C (FREIRE et al., 2009).

Tabela 17: Etapas e temperaturas de degradação térmica para as amostras do óleo e biodiesel de pinhão manso sintetizado pela atuação das lipases PS e AK em atmosfera inerte.

Amostra	Etapas	T _{inicial} (°C)	T _{final} (°C)	Δ _{massa} (%)
Óleo de Pinhão Manso	1	321	442	81,64
	2	442	450	18,36
Biodiesel (Lipase PS)	1	128	290	98,00
Biodiesel (Lipase AK)	1	136	364	84,60
	2	364	444	8,20
	3	444	518	7,20

As curvas TG/DTG ilustradas nas Figuras 25 e 26, respectivamente, revelaram que a temperatura inicial de decomposição dos ésteres etílicos foi menor que do óleo de pinhão manso. A maior volatilidade do biodiesel, indicada pela menor estabilidade térmica, certifica a qualidade da mistura dos ésteres como biocombustível e ratifica a quebra das moléculas de triacilglicerídeos do óleo durante a reação de transesterificação.

A amostra de biodiesel proveniente da catálise da lipase PS apresentou apenas uma etapa de degradação térmica na faixa de temperatura de 128–290°C, com maior velocidade de decomposição a 258°C. A perda de massa foi de aproximadamente 98,0% referente à volatilização dos ésteres etílicos, principalmente oleato e linoleato de etila, por serem os mais abundantes na mistura de ésteres (biodiesel). Esse perfil de decomposição térmica do biodiesel de pinhão manso está em concordância com outros verificados na literatura (FREIRE et al. 2009; DANTAS et al. 2007).

A curva de TG (Figura 25) permitiu também a verificação de um dos parâmetros da resolução n°42 de 2004 da ANP, referente ao parâmetro de destilação. Observa-se que o biodiesel de pinhão manso, até 290 °C, perdeu 94% de massa, enquadrando-se no parâmetro de destilação, que estabelece uma temperatura máxima de 360 °C para uma recuperação de 90% da massa destilada de biodiesel.

A amostra de biodiesel obtida na reação catalisada pela lipase AK apresentou três etapas de degradação térmica. A primeira etapa na faixa de temperatura de 136–364 °C, com perda de massa de aproximadamente 84,6% referente à decomposição/volatilização dos ésteres etílicos. A segunda na faixa de temperatura de 364-444 °C e a terceira na faixa entre 444-518 °C, com perda de massa de 8,2 e 7,2 %, respectivamente, possivelmente referentes à decomposição de mono, di e triglicerídeos não convertidos em ésteres.

Os resultados em percentuais de ésteres obtidos pelo TG/DTA corroboraram com os dados obtidos pela cromatografia de fase gasosa, indicando que a lipase PS foi mais eficiente na síntese do biodiesel nas condições experimentais avaliadas.

Com base nesses dados, foi possível concluir que o biodiesel obtido pela atuação da lipase PS apresentou um melhor conjunto das propriedades quando comparadas com o biodiesel obtido com a lipase AK. Esse resultado é bastante similar ao obtido por Silva (2009), que também demonstrou que a lipase de *Burkholderia cepacia* foi a lipase mais eficiente na transesterificação de sebo bovino com etanol, alcançando uma conversão da ordem de 95% em 24h. Em outro trabalho e mesmo adotando diferentes condições reacionais (utilizando hexano como solvente), esta preparação de lipase foi também

reportada como a mais efetiva para catalisar a conversão de sebo bovino em ésteres metílicos (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996).

Figura 25: TG do óleo de pinhão manso e dos produtos transesterificados pela atuação das lipases AK e PS (Análise efetuada em atmosfera inerte de nitrogênio).

Figura 26: DTG do óleo de pinhão manso e dos produtos transesterificados pela atuação das lipases AK e PS (Análise efetuada em atmosfera inerte de nitrogênio).

4.4.5. Estabilidade oxidativa da amostra de biodiesel

A degradação oxidativa pode afetar algumas propriedades do biodiesel como a viscosidade cinemática, número de cetano e acidez do combustível (KNOTHE et al., 2006). Para avaliar a estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de pinhão manso foi realizada a termogravimetria do biodiesel obtido pela enzima PS em atmosfera de ar sintético. Os dados derivados da Figura 27 estão esquematizados na Tabela 18.

Tabela 18: Etapas e temperaturas de degradação térmica para a amostra de biodiesel de pinhão manso sintetizado pela lipase PS (atmosfera oxidativa).

Amostra	Etapa	T _{inicial} (°C)	T _{final} (°C)	Δ _{massa} (%)
Biodiesel (Lipase PS)	1	140	291	95

O biodiesel de pinhão manso em atmosfera oxidativa mostrou-se estável até a temperatura de 140°C e apresentou apenas uma etapa de decomposição no intervalo de 140-291°C com perda de massa de 95%, atribuída à combustão dos ésteres etílicos. Não foram, portanto, verificadas alterações no perfil de degradação da amostra em função da atmosfera empregada durante a análise.

O biodiesel de pinhão manso apresentou menor estabilidade oxidativa do que as amostras de biodiesel de sebo bovino (T_{inicial} =187°C), babaçu (T_{inicial} =154°C) e palma (T_{inicial} =144°C), conforme dados relatados por Oliveira (2010). Esse resultado era esperado, em razão da maior porcentagem de ácidos graxos insaturados contidos no óleo de pinhão manso.

A estabilidade oxidativa do biodiesel depende das proporções entre a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados presentes na matéria prima lipídica adotada. Ácidos graxos saturados são mais estáveis que os insaturados, uma vez que a presença de insaturações favorece a ocorrência de processos oxidativos (KNOTHE et al., 2006).

O biodiesel de pinhão manso apresenta baixa estabilidade oxidativa quando comparado com as amostras obtidas a partir da transesterificação de outras oleaginosas ou gorduras animais, mas possui propriedades adequadas a baixas temperaturas. Esses dois fatores são cruciais para certificar a qualidade do biodiesel.

Figura 27: TG/DTG do biodiesel produzido pela lipase PS (Atmosfera oxidativa).

Alguns estudos sugerem que a mistura do biodiesel de pinhão manso com o de palma, o qual apresenta comportamento contrário ao do pinhão manso com relação aos fatores citados anteriormente (estabilidade oxidativa e propriedades a baixas temperaturas), possibilita a obtenção de amostra de biodiesel que apresenta melhor estabilidade oxidativa e boas características a baixas temperaturas (SARIN et al., 2007).

4.5 Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

A estabilidade operacional é um parâmetro de fundamental importância quando se pretende utilizar industrialmente uma enzima imobilizada. Um dos objetivos principais de se imobilizar uma enzima é aumentar seu tempo de utilização em relação à enzima livre, mantendo-a estável num maior número possível de reações consecutivas. Os processos com enzimas imobilizadas somente podem se tornar menos dispendiosos e mais vantajosos desde que se consiga um tempo de meia-vida suficientemente elevado para a enzima imobilizada (ZANIN; MORAES, 2004).

O estudo da estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA na síntese de biodiesel a partir do óleo de pinhão manso foi realizado em regime de bateladas consecutivas (24h/45°C), adotando metodologia descrita em 3.6.5. Os rendimentos de transesterificação, bem como os valores de viscosidade, obtidos ao final de cada ciclo são mostrados na Figura 28.

Ao final do primeiro ciclo, a concentração mássica dos ésteres no meio reacional foi da ordem de 41,73%, o que correspondeu a um rendimento de transesterificação de 57,10%. Nas três bateladas seguintes houve uma redução gradativa da formação de ésteres,

atingindo ao final do quarto reciclo (96h) uma concentração mássica de 29,77% (rendimento= 40,74%). Após o quarto reciclo verifica-se uma drástica redução do rendimento de transesterificação atingindo valores da ordem de 6,12% no sétimo reciclo (168h), correspondendo a uma redução global de 90%.

Com relação à viscosidade do produto transesterificado obtido ao final de cada ciclo, verifica-se um aumento gradativo em função da redução do rendimento reacional. À medida que o rendimento de transesterificação foi sendo reduzido verifica-se um aumento gradativo da viscosidade do produto, atingindo uma viscosidade de 27,1 cp ao final do sétimo reciclo (rendimento= 6,12%).

Considerando que existe uma correlação inversa entre rendimento de transesterificação e viscosidade, os dados mostrados na Figura 28 confirmam experimentalmente esta correlação.

Figura 28: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, em bateladas consecutivas de etanólise do óleo de pinhão manso a 45°C. (○) rendimento de transesterificação e (●) viscosidade do produto transesterificado ao final de cada ciclo.

A partir da linearização exponencial dos rendimentos de transesterificação plotados na Figura 28, foram calculados a constante de desativação e o tempo de meia-vida para o biocatalisador nas condições de síntese (Figura 29), revelando um tempo de meia-vida da lipase PS de 110h. Isto confere ao sistema imobilizado a possibilidade de ser utilizado em 4 bateladas consecutivas de 24h. Esses resultados são similares aos obtidos para outras fontes de lipases imobilizadas nesse tipo de suporte e indicam a viabilidade do

biocatalisador para a síntese proposta (MOREIRA et al., 2008; DA RÓS, 2009).

A reutilização da lipase de *Burkolderia cepacia* na transesterificação do óleo de palma com metanol foi estudada por Jegannathan e colaboradores (2009). A enzima encapsulada em k-carrageenan por técnica de coextrusão foi reutilizada cinco vezes perfazendo um total de 360 h de reação, e a atividade de transesterificação iniciada em 99% de conversão decaiu suavemente com o número de ciclos. Ao final do quinto ciclo foi observada uma conversão de ésteres metílicos de 81% e não foram verificadas deformações físicas na estrutura do derivado imobilizado.

Figura 29: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA na síntese de biodiesel a partir do óleo de pinhão manso. Atividade hidrolítica do biocatalisador (t inicial= 1500 U /g e t final= 166 U/g).

A lipase *Burkolderia cepacia* foi imobilizada em Celite e testada para catalisar a produção de biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica empregando-se as seguintes condições reacionais: razão molar óleo/ álcool de 1:4 (mol.mol⁻¹), 50 °C na presença de 4-5% (g/g) de água em 8h de reação. O rendimento de transesterificação 100% foi mantido durante quatro ciclos da enzima. No quinto ciclo foi observado um rápido declínio da atividade de transesterificação (SHAH; GUPTA, 2007).

A redução da conversão reacional após sucessivos ciclos de síntese de biodiesel tem sido explicada pela diminuição da transferência de massa entre o meio reacional e o interior do suporte, ou seja, no decorrer das reações o glicerol formado como sub-produto pode bloquear os poros do suporte (WATANABLE et al., 2000). Outra explicação

sugerida é o desprendimento da enzima do suporte de imobilização (YADAV; JADHAV, 2005).

4.6. Etanólise do óleo de pinhão manso catalisada pela lipase PS sob irradiação de micro-ondas

Para complementar esse estudo foi ainda investigado a possibilidade conduzir a reação de síntese do biodiesel a partir do pinhão manso sob irradiação de micro-ondas. Nesse conjunto de experimentos foram testadas duas condições reacionais:

Condição 1: Adotando os parâmetros estabelecidos anteriormente para as reações conduzidas sob aquecimento convencional (Razão molar óleo/etanol= 1/9; temperatura de 45°C; carregamento de lipase = 500 unidades de atividade hidrolítica/ grama de óleo)

Condição 2: Adotando os parâmetros previamente otimizados por Da Rós (2009) para reações de etanólise do óleo de palma conduzidas sob irradiação de micro-ondas (Razão molar óleo/etanol= 1/6; temperatura de 45°C; carregamento de lipase= 10% de enzima/ grama de meio).

Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 30 que correlaciona os rendimentos de transesterificação para cada condição testada em função do tempo. A observação da Figura 30 indica que adotando a Condição 1 ao final de 6 h de reação a concentração mássica dos ésteres no meio reacional foi da ordem de 37,28 % m/m o que correspondeu a um rendimento de transesterificação de 56,92%. Valores de rendimentos similares (57,10%) somente foram alcançados em 24 h de reação para as reações conduzidas sob aquecimento convencional. Esses resultados podem ser considerados satisfatórios quando são comparados os parâmetros globais de reação de etanólise do óleo de pinhão manso (rendimento e produtividade), conforme ilustrado na Tabela 19.

Figura 30: Rendimento de transesterificação do óleo de pinhão manso catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA sob irradiação de micro-ondas em função do tempo de reação a 45°C operando nas condições testadas. (○) Condição 1 e (●) Condição 2.

Tabela 19: Comparação dos parâmetros globais de reação de etanolise do óleo de pinhão manso (rendimento e produtividade), para os experimentos realizados sob aquecimento convencional e micro-ondas (6h), utilizando lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA.

Tipo de sistema de aquecimento	Rendimento de transesterificação (%)	Produtividade (mg ésteres/g.h)
Irradiação de micro-ondas	56,92	22,37
Convencional	41,18	16,84

Esses resultados também confirmam que o aquecimento por irradiação de micro-ondas pode diminuir o tempo de reação quando comparado com o aquecimento convencional, conforme já constatado para outras reações de sínteses enzimáticas visando à obtenção de ésteres etílicos ou ésteres de xilitol (DA RÓS, 2009; RUFINO et al., 2010). Entretanto, as condições que maximizem essa reação devem ser posteriormente otimizadas, tendo em vista que para cada sistema reacional um estudo detalhado deve ser conduzido. Por exemplo, adotando-se os parâmetros estabelecidos para o óleo de palma (Condição 2), a concentração mássica dos ésteres no meio reacional foi da ordem de 24,84% o que correspondeu a um rendimento de transesterificação de 30,31% em 6 h de reação.

Um dado experimental importante que deve ser aqui relatado é referente à agitação do meio reacional quando se utilizou uma maior proporção de biocatalisador (Condição 1).

Nessa condição foi verificado que a agitação do meio reacional ficou prejudicada, dificultando a homogeneização do sistema, que é fundamental para se obter um rendimento de transesterificação satisfatório.

Conforme relatado anteriormente, o aquecimento por micro-ondas envolve uma transferência direta de energia sobre moléculas que possuem momento de dipolo permanente/ induzido ou condutividade iônica. Os dipolos das moléculas de etanol podem rapidamente se reorientar sob a radiação de micro-ondas e, dessa forma, destruir a interface entre o óleo e o álcool, aumentando a reatividade dos grupos funcionais (ZHANG; HAYWARD, 2006).

A irradiação de micro-ondas também tem efeito sobre a velocidade de emulsificação da mistura óleo/álcool, favorecendo o contato entre a enzima e o substrato e, conseqüentemente, o aumento da velocidade da reação. Além disso, é possível que a enzima sofra alguma mudança conformacional e isso facilite a aproximação do substrato ao seu sítio ativo, efeito não verificado sob aquecimento convencional. Entretanto, somente efeitos irreversíveis podem ser analisados por meio da comparação das propriedades da enzima antes e depois da irradiação de micro-ondas, uma vez que a detecção em tempo real dos efeitos das micro-ondas sobre as proteínas não podem ser facilmente verificados, em razão de limitações técnicas (YU et al., 2010).

A maior produtividade na síntese enzimática de biodiesel sob aquecimento por irradiação de micro-ondas também foi demonstrada por Yu e colaboradores (2010). A produção de ésteres metílicos, oriundos de óleo de soja e metanol, foi de 94% em 12 h de reação sob irradiação de micro-ondas comparado a 24h sob aquecimento convencional empregando-se a enzima Novozym 435 como biocatalisador.

4.6.1 Estabilidade da lipase PS sob irradiação de micro-ondas

O estudo da estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, sob efeito da irradiação de micro-ondas, foi também realizado em regime de bateladas consecutivas (6h/45°C) adotando-se os parâmetros estabelecidos na Condição 2. Os rendimentos de transesterificação, bem como os valores de viscosidade, obtidos ao final de cada ciclo são mostrados na Figura 31.

Figura 31: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, em bateladas consecutivas de etanolise do óleo de pinhão manso a 45°C sob irradiação de micro-ondas. (○) rendimento de transesterificação e (●) viscosidade do produto transesterificado ao final de cada ciclo.

Os resultados obtidos indicam um comportamento bastante similar ao verificado nos testes de estabilidade operacional do derivado imobilizado, conduzidos sob aquecimento convencional (seção 4.5.). Ao final do primeiro ciclo, a concentração mássica dos ésteres no meio reacional foi da ordem de 26,5% m/m o que correspondeu a um rendimento de transesterificação de 40,45%.

Com relação à viscosidade do produto transesterificado obtido ao final de cada ciclo verifica-se um aumento gradativo em função da redução do rendimento reacional. À medida que o rendimento de transesterificação foi sendo reduzido verifica-se um aumento gradativo da viscosidade do produto, atingindo uma viscosidade de 30,27 cp ao final do sétimo ciclo (rendimento= 2,49%).

A partir da linearização exponencial dos rendimentos de transesterificação plotados na Figura 31, foram calculados a constante de desativação e o tempo de meia-vida para o biocatalisador nas condições de síntese sob irradiação de micro-ondas (Figura 32), revelando um tempo de meia-vida da lipase PS de 26,5 h.

Figura 32: Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA na síntese de biodiesel a partir do óleo de pinhão manso sob irradiação de micro-ondas. Atividade hidrolítica do biocatalisador ($t_{\text{inicial}} = 1500 \text{ U/g}$ e $t_{\text{final}} = 308 \text{ U/g}$).

Estudos referentes a estabilidade operacional de enzimas quando submetidas a aquecimento sob irradiação de micro-ondas são ainda escassos na literatura. Entretanto, o tempo de meia-vida determinado para a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, da ordem de 26,5 h, se compara favoravelmente aos dados descritos para a lipase Novozym 435 na síntese de β -ceto ésteres, sendo relatado um decréscimo da atividade após três reciclos, perfazendo um total de 4 h de exposição da enzima à irradiação de micro-ondas (YADAV; LATHI, 2004). A perda de atividade sintética foi creditada à baixa resistência mecânica da enzima, e não a desativação ou desnaturação da mesma pelas ondas eletromagnéticas.

A estabilidade térmica das enzimas lipase AK e lipase PS imobilizadas em SiO₂-PVA sob irradiação de micro-ondas foi estudada por Da Rós (2009). Os testes foram realizados incubando-se as lipases de *Burkholderia cepacia* (PS) e *Pseudomonas fluorescens* (AK) imobilizadas em SiO₂-PVA em meio orgânico (heptano) a 60 °C sob irradiação de micro-ondas, durante um período máximo de 3h, que subestimava aproximadamente 100 W para o meio estabelecido. A atividade enzimática foi dosada por hidrólise do óleo de oliva, sendo obtido um $kd = 0,123$ ($R^2 = 0,9436$) para a lipase de *Burkholderia cepacia*, o que correspondeu a um tempo de meia-vida da ordem de 5,65 h. Para a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, obteve-se um menor valor de $kd = 0,084$ (R^2

=0,9782), correspondendo a um tempo de meia-vida da ordem de 8,22 h, o que conferiu a este sistema imobilizado maior estabilidade térmica.

Resultados promissores sobre a potencialidade de aplicação das micro-ondas em rota enzimática de produção de biodiesel foram obtidos por Yu e colaboradores (2010) ao estudarem a estabilidade operacional da enzima Novozym 435 sob condições de aquecimento convencional e não convencional durante a síntese do biodiesel de soja pela rota metílica. A enzima não foi desnaturada ou desativada pela irradiação de micro-ondas, sendo somente verificado um decréscimo de 4% da atividade da enzima após cinco ciclos. Entretanto, 10% de atividade de transesterificação foram perdidas após cinco ciclos sob aquecimento convencional. A maior estabilidade das enzimas sobre irradiação de micro-ondas foi atribuída a melhores interações entre a enzima e seu micro-ambiente devido a ação das micro-ondas.

Estudos adicionais para se determinar a estabilidade operacional de derivados imobilizados de lipase sob diferentes condições operacionais devem ser efetuados visando verificar a real contribuição do aceleração das micro-ondas nas reações, sem o comprometimento da estabilidade operacional do derivado imobilizado. Conforme dados obtidos neste trabalho, a irradiação de micro-ondas reduziu em 4 vezes a estabilidade do derivado imobilizado, ou seja, a estabilidade operacional estimada sob aquecimento convencional de 110 h foi reduzida para 26,5 h.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi avaliada a potencialidade do óleo de pinhão manso (*Jaropha curcas*) como fonte de matéria-prima lipídica para a síntese enzimática do biodiesel, empregando-se etanol como agente acilante. Os resultados obtidos foram satisfatórios, e nesse conjunto de dados pode-se concluir que:

- A caracterização do óleo de pinhão manso mostrou as similaridades e diferenças entre as propriedades físico-químicas das duas amostras de óleo disponíveis para a execução do trabalho e revelou a adequação das mesmas como fonte de matéria-prima lipídica para a síntese do biodiesel.
- Os testes de triagem efetuados para selecionar a preparação de lipase mais adequada revelaram que as lipases na forma livre não foram efetivas para a transesterificação do óleo de pinhão manso, com exceção da preparação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), que forneceu um rendimento de transesterificação de 18,00%.
- Dentre as sete preparações de lipases testadas na reação de interesse deste projeto, as lipases de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) e *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), ambas imobilizadas em SiO₂-PVA ativado com epicloridrina, foram as que apresentaram velocidades de reação mais elevadas, revelando rendimentos elevados, respectivamente, da ordem de 93,17 e 85,67% em 72h, respectivamente.
- Os produtos obtidos da transesterificação pela atuação dessas lipases (PS e AK) foram submetidos às análises de viscosidade, termogravimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e RMN ¹H. Com base nos resultados dessas análises, foi possível inferir que o biodiesel obtido pela atuação da lipase PS apresentou um melhor conjunto de propriedades quando comparado com o biodiesel obtido com a lipase AK.
- Levando-se em conta a pureza do produto obtido, foi selecionada a preparação de Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA como derivado mais efetivo para mediar a reação de síntese de biodiesel a partir do pinhão manso.

- O uso da técnica de Termogravimetria permitiu verificar que o perfil de decomposição térmica do biodiesel de pinhão manso obtido pela atuação da lipase PS em atmosfera de nitrogênio apresenta menor estabilidade térmica comparado ao óleo, comprovando a maior volatilização da mistura de ésteres. Além disso, foi possível inferir a adequação do biodiesel de pinhão manso à resolução n° 42 de 2004 da Agência Nacional de Petróleo, referente ao parâmetro de destilação. Observou-se que o biodiesel de pinhão manso, até 290 °C perdeu 98% de massa, enquadrando-se no parâmetro de destilação, que estabelece uma temperatura máxima de 360 °C para uma recuperação de 90% da massa destilada de biodiesel.
- O perfil de decomposição térmica do biodiesel de pinhão manso obtido pela lipase PS em atmosfera de oxigênio revelou que a mistura de ésteres manteve-se estável até 140 °C. A estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de pinhão manso foi menor quando comparado a amostras obtidas a partir de outras matérias-primas lipídicas em função do alto teor de ácidos graxos insaturados característico deste óleo.
- A transesterificação enzimática do óleo sob aquecimento não convencional revelou que a irradiação de micro-ondas teve efeito benéfico sobre a velocidade da reação. Após 6 h de reação, foi obtido um rendimento de transesterificação de 56,92%. Sob aquecimento convencional, valores de conversão similares, somente foram alcançados em 24 h.
- A lipase de *Burkholderia cepacia* apresentou maior estabilidade operacional sob aquecimento convencional comparada à irradiação de micro-ondas, com tempo de meia-vida de 110 e 26,5 h, respectivamente. Isto conferiu ao sistema imobilizado a possibilidade de ser utilizado em 4 bateladas consecutivas de 6 e 24h para o aquecimento por micro-ondas e convencional, respectivamente.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as condições reacionais para a síntese do biodiesel sob irradiação de micro-ondas, tendo em vista que a aplicação desta técnica para síntese enzimática apesar de promissora ainda necessita de estudos detalhados.
- Testar a eficiência de outros tipos de aquecimento não convencional, tais como o ultrassom, para o processo enzimático de produção de biodiesel.
- Verificar a possibilidade de ocorrência de sinergismo entre a atuação mista das enzimas mais promissoras para a catálise.
- Estruturar um sistema de reatores que permitam aumentar a produtividade e estabilidade operacional do biocatalisador.

REFERÊNCIAS

ACHTEN, W.M.J.; VERCHOT, L.; FRANKEEN, Y.J.; MATHIJS, E.; SINGH, V.P.; AERTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1063-1084, 2008.

ACKOM, E.K; ERTEL, J. An alternative energy approach to combating desertification and promotion of sustainable development in drought regions. **In: FORUM DER FORSCHUNG**, p.74-78, 2005.

AGARWAL, A.K.; DAS, L.M. Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines. **ASME, Gas Turbines**, v. 123, p. 440-447, 2000.

AIRES-BARROS, M.R. In: CORRELA, I.S., MENEZES, J.C. **Boletim de Biotecnologia**. Portugal: Proense Ltda, 2002. Cap. 1, p. 2-12.

AKINTAYO, E. T. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 307-310, 2004.

AKOH, C.C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995–9005, 2007.

ANP- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução no 42, de 24 de novembro de 2004. Regulamento Técnico, no 04/2004. Brasília: Diário Oficial da União.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. **AOCS Press**, 5th ed., 2004.

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

ANVISA. Resolução no 482, de 23 de setembro de 1999, Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 82-87, 1999.

ARROYO, M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. **Ars Pharmaceutica**, v. 29, n. 2, p. 23-39, 1998.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, p. 789-799, 2004.

BCC RESEARCH. Disponível em<<http://www.bccresearch.com/report/BIO030E.html>> Acesso em 25 fev. 2010.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel, **Lipidic Techonology**, v. 20 n. 5, p. 104-107, 2008.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/CIT, 1985. 364 p. (Documentos, 16).

BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.

CARVALHO, P. D.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M., Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos Poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p. 544-554, 1995.

CASTRO, H.F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F.F.; PEREIRA, P.S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E.P.S; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123-147.

CHAND, P.; REDDY, V.; VERKADE, J.G.; WANG, T.; GREWELL, D. Thermogravimetric quantification of biodiesel produced via alkali catalyzed transesterification of soybean oil. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 989–992, 2009.

CONCEIÇÃO, M.M.; CANDEIA, R.A.; SILVA, F.C.; BEZERRA, A.L.; ERNANDES, V.T.; SOUZA, A.G. Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 964-975, 2006.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 213p.

COSTA NETO, P.R. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir de óleo de soja**. 2002. 133p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2002.

DA RÓS, P. C. M., **Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. 2009. 131p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), Lorena, 2009.

DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, M, A. B.; CASTRO, H. F. Otimização da etanólise do óleo de babaçu por via enzimática conduzida no reator de micro-ondas Discover empregando a técnica do planejamento experimental. In: **XVII SINAFERM/Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2009, NATAL/RN. XVII SINAFERM/Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of lipases immobilized on polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M. M.; FERNANDES JR, V. J.; SANTOS N. A.; ROSENHAIM, R.; MARQUES, A. L. B.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA A. G. Thermal and kinetic study of corn biodiesel obtained by the methanol and ethanol routes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.87, n.3, p.835-839, 2007.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; PRETTI, L. A. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. In: **II SEMINÁRIO DE BIODIESEL E PINHÃO MANSO**, Viçosa, MG, impresso, 40 p, 2007.

DRUMOND, M.A.; SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; ANJOS, J.B.; EVANGELISTA, M. R. V. Desempenho agrônomo de genótipos de pinhão manso irrigado no semiárido pernambucano aos 12 e 24 meses de idade. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO**, 2009. Brasília, DF. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009.

DU, W.; XU, Y.Y.; LIU, D.H.; 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.

DUARTE, A. Esperança Nacional. **Biodieselbr**, v. 5, p. 24-34, 2008.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook**, 3rd Edition, Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 1997.

FERNANDES, P.; CABRAL, J.M.S. Biotransformation. In: RATLEGE, C.; KRISTIANSEN, B. Cambridge University Press, 2006. **Basic Biotechnology**, p. 577-626.

FERNANDES, V.J. **Curso de análise térmica (TG, DSC, DTA e TMA)**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p.1298-1315, 2008.

FREIRE, L.M.S.; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 16, p. 369-380.

FREIRE, L.M.S.; BICUDO, T.C.; ROSENHAIM, R.; SONFRÔNIO, F.S.M.; BOTELHO, J.R.; CARVALHO FILHO, J.R.; SANTOS, I.M.G.; FERNANDES JR, V.J.; FILHO, N.R.A.; SOUZA, A.G. Thermal investigation of oil and biodiesel from *Jatropha curcas* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, p. 1029-1033, 2009.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F.. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, p. 78-90, 2010.

FREITAS, S. P.; SILVA F.C.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.127-130, 1998.

FORTUNY, M.; RAMOS, A.L.D.; DARIVA, C.; EGUES, S.M.S.; SANTOS, A.F. Principais aplicações das microondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, v.31, n.6, p. 1553-1561, 2008.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils- Review. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

FUREBY, A.M.; LI, T.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 198-206, 1997.

GANDHI N.N. Applications of lipase. Journal of American Oils Chemists's Society, v. 74, n.6, p. 621-634, 1997.

GEXSI. Global Market Study on Jatropha. London/Berlin, 42 p, 2008.

GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. O uso do forno de micro-ondas na síntese orgânica em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, p.73-76, 2005.

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

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

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^a ed. São Paulo, 1985, v. 1. p.533.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JEGANNATHAN, K.R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E.S.C.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase – A critical review. **Critical Reviews in Biotechnonology**, v. 28, p. 253-264, 2008.

JEGANNATHAN, K.R.; JUN-YEE, L.; CHAN, E.; RAVINDRA, P. Design an immobilized lipase enzyme for biodiesel production. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 1, n.6, p., 2009.

KANSEDO, J.L.; LEE, K.T.; BHATIA, S. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Fuel**, v. 88, p. 1148-1150, 2009.

KENNEDY, J. F.; MELO E. H.M.; JUMEL, K. Immobilized enzymes end cells. **Chemical Engenieering Program**. v. 86, p. 81–89, 1990.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v.409, p.241– 246, 2001.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel** 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KUMAR, T.; KUMAR, A.; RAHEMAN, H. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process. **Biomass Bioenergy**, v. 31, p. 569-575, 2007.

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

KYWE, T.T.; OO, M.M. Production of biodiesel from Jatropha oil (*Jatropha curcas*) in pilot plant. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 50, p. 477-483, 2009.

LA CARA, F.; D'AURIA, S.; SCARFI, M.R.; ZENI, O; MASSA, R.; D'AMBRIOSIO, G.; FRANCESCHETTI, G.; DE ROSA, M.; ROSSI, M. Microwave exposure effect on a thermophilic alcohol deshydrogenase. **Protein Peptide Letter**, v.6, p. 155-162, 1999.

LEADBEATER, N. E.; STENCEL, L. M.; WOOD, E. C. Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterification reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p.1052-1055, 2007

LEE D.H.; KIM, J.M.; SHIN, H.Y.; KANG, S.W.; KIM, S.W. Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Biotechnology Bioprocess**, v. 11, n.6, p. 522-525, 2006.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083-1095, 2010.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapessed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 58-62, 2006.

LIMA, J.R.O.; SILVA, R.B.; SILVA, C.C.M.; SANTOS, L.S.S.; Jr. J.R.S.; MOURA, E.M.; MOURA, C.V.R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via enzimática. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LIN, G.; LIN, W.-Y. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron Letters**, v.39, p. 4333-4336, 1998.

LOTTI, M. ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J.; MACCABE, A.P. **Industrial Enzymes: structure, function and application**. Valencia: Springer, 2007. Cap. 16, p. 263-281.

LU, H.; YINGYING, L.; ZHOU, H.; YANG, Y.; CHEN, M.; LIANG, B. Production of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil. **Computers and Chemical Engineering**, v. 33, p. 1091-1096, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2000.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 53, p. 183-192, 1999.

MALCATA, F. X.; GARCIA, H. S.; HILL, C.G., Jr.; AMUNDSON, C. H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: part I. Lipase adsorption studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 6, p. 647-57, 1992.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARTINS, E.R.F.; CRUZ, N.D. Pesquisas em desenvolvimento com pinhão-paraguaio no Instituto Agrônômico. **O Agrônômico**, v. 37, n. 2, p. 109-113, 1985.

MELO, J.C.; BRANDER, J.; WALTER, C.; RONALDO, J.A.; PACHECO, J.G.A.; SCHULER, R.P.; STRAGEVITCH, L. Avaliação preliminar do potencial do pinhão manso para a produção de biodiesel. In: **CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL**, 1, 2006, Brasília-DF. Brasília: MCT/ABIPTI, 2006, v. 2, p.198-203.

MEDONÇA, S. Toxidez do pinhão-manso. **Biodieselbr**, v. 17, p. 59-61, 2010.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZINI, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v.77, p.593-605, 2008.

MOREIRA, A. B. R., PEREZ, V.H., ZANIN, G.M., CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

MUKESH, K. M.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 637–640, 2007.

MURUGESAN, A.; UMARANI, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 653-662, 2009.

NEAS, E.D.; COLLINS, M.J. Microwave heating: Theoretical concepts and equipments design. In: KINGSTON, H.M.; JASSIE, J.B. **Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice**. Washington: ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, 1988. Cap. 1, p. 7-32.

NELSON, L. L.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal American Oil Chemists Society**, v.73, p.1191-1195, 1996.

NIELSEN, P.M; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.692-700, 2008.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PILKANA, R.S. Immobilised *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

OLIVEIRA, J.S.; LEITE, P.M.; SOUZA, L.B.; MELLO, V.M.; SILVA, E.C.; RUBIM, J.C.; MENEGHETTI, S.M.P.; SUAREZ, P.A.Z. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 449-453, 2009.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OLIVEIRA, L.E. **Análise térmica de biodieseis obtidos por rota enzimática e suas respectivas matérias-primas**. 2010. 152p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), Lorena, 2010.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: An oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 1-15, 2000.

ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A.C. Application on silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 3-4, p. 106-113, 2006.

PAMPLONA, N. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/tam-voo-biocombustivel-setembro-250510.htm>> Acesso em 20 jul. 2010.

PAQUES, F.W., MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, p. 93-99, 2006.

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, p. 82-93, 2009.

PATEL, R.N. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 804-826, 2002.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.792-796, 2005.

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 and Biotechnology**, v. 82, n.3, 281-288, 2007.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; De CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SILVA J.L; CASTRO, H.F.; SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n.4, p. 1146-1156, 2010.

PEIXOTO, A.R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284p.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p.1313-1330, 2005.

PRAMANIK, K. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. **Renewable Energy**, v.28, p.239-248, 2003.

QUINTELLA, C.M.; TEIXEIRA, L.S.G.; KORN, M.G.A; COSTA NETO, P.R.; TORRES, E.A.; CASTRO, M.P.; JESUS, C.A. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

RATHORES, V.; MADRAS, G. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical carbon dioxide. **Fuel**, v. 86, p. 2650-2659, 2007.

REETZ, T. M. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p.145-150, 2002.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

RÉJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D.; BESSON, T. Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p.1086-1089, 2004.

RÉJASSE, B.; LAMARES, S.; LEGOY, M.D.; BESSON, T. Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 518-526, 2007.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cottonseed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H. F. . Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 5-9, 2010.

RUPLEY, J. A.; GRATTON, E.; CARERI, G. Water and globular proteins. **Trends in Biological Sciences**, v.8, p. 18-22, 1983.

SAHOO, P.K.; DAS, L.M. Process optimization for biodiesel production from *Jatropha*, *Karanja* and *Polanga* oils. **Fuel**, v. 88, p. 1588-1594, 2009.

SALIS A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Use of lipases for the production of biodiesel. In: POLAINA, J.; MACCABE, A.P. **Industrial Enzymes: structure, function and application**. Valencia: Springer, 2007. Cap. 19, p. 317-339.

SALIS A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporus polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19-26, 2008.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n.4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, J. C; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008.

SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 85, p. 360-364, 2007.

SARIN, R.; SHARMA, M.; SINHARAY, S.; MALHOTRA, R.K. *Jatropha*–Palm biodiesel blends: An optimum mix for Asia. **Fuel**, v.86, p. 1365-1371, 2007.

SATO, M.; BUENO, O.C.; ESPERANCINI, M.S.T.; FRIGO, E.P. A cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L): uso para fins combustíveis e descrição agrônômica. **Varia Scientia**, v. 7, n. 13, p. 47-62, 2007.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Cultura do Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. **Implantação de unidades de validação de tecnologia pinhão-manso**. Nova Porteirinha, 2006. 5 p. Projeto de Pesquisa, Centro Tecnológico do Norte de Minas Gerais, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Nova Porteirinha.

SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. **Energy & Fuels**, v. 18, p. 154-159, 2004.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. **Industrial Crops and Production**, v. 20, p. 275-279, 2005.

SHAH, S.; GUPTA, M.N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 409-414, 2007.

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S.N. Advancement in development and characterization of biodiesel. **Fuel**, v. 87, p. 2355-2373, 2008.

SHUERA, K.; KAWAMOTO, Y.; FUJII, KOHDA, J.; NAKANO, Y. YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n.4, p.437-442, 2005.

SHUIT, S.H.; LEE, K.T.; HAMARUDDIN, A.H.; YUSUO, S. Reactive extraction and in situ esterification of *Jatropha curcas* L. seeds for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 89, p. 527-530, 2010.

SILVA, G. A. M. **Síntese Enzimática, Caracterização Físico-Química e Térmica de Biodiesel de Sebo Bovino por Rota Etilica**. 2009. 97 f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena – EEL-USP, Lorena, 2009.

SINGH S.P; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200-216, 2009.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.79, p. 745-757, 1999.

SONG, X.; QI, X.; HAO, B.; QU, Y. Studies of substrate specificities of lipases from different sources. **European Journal Lipid Science Technology**, v. 110, p. 1095-1101, 2008.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U.T. Improvement in lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 97-103, 2003.

SOUSA, J.S.; OLIVEIRA, E.A.C.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, p. 133-137, 2010.

SOUZA, R.O.M.A.; ANTUNES, O.A.C.; KROUTIL, W.; KAPPE, C.O. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. **Journal of American Oils Chemists' Society**, v. 74, p. 6157-6162, 2009.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GUBITZ, G.M.; STEINER, W.; READ, J.S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.

SUAREZ, P.A.Z.; MENENGHITTI, S.M.P. 70º Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, 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, p. 768-775, 2009.

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

TALUKDER, M. M. R.; PUAH, S. M.; WU, J. C.; WON, C. J.; CHOW, Y. Lipase-catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.24, p. 257-262, 2006.

TAPANES, N. C. O.; DONATO, A.G.A.; CARNEIRO, J.W.M.; ANTUNES, O.A.C. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, v. 87, p. 2286-2295, 2008.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, A.; KITTIKUN, H. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, doi:10.1016/j.molcatb.2010.07.005, 2010.

TURKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: elucidation of the mechanism of lipases. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 34-44, 2006.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v.31, n.2, p.407-412, 2008.

VERGER, R.; MARIA, C.E.; DEHAAS, G.H. Action of phospholipase A at interfaces. **Journal Biological Chemistry**, v. 218, p. 4028-4034, 1973.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.M.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

YADAV, G.D.; LATHI, P.S. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 2223, p. 51-56, 2004.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. 2005. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.86, p. 215–222, 2005.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. **Journal of American Oils Chemists' Society**, v.81, p. 157–160, 2004.

YOUNG, D.D.; NICHOLS, J.; KELLY, R.M.; DEITERS, A. Microwave activation of enzymatic catalysis. **Journal American Chemical Society**, v. 130, p. 10048-10049, 2008.

YU, D.; WANG, Z.; CHEN, P.; JIN, L.; CHENG, Y.; ZHOU, J.; CAO, SHUGUI. Microwave-assisted resolution of (R, S)-2-octanol by enzymatic transesterification. **Journal of Molecular Catalysis**, v.48, p.51-57, 2007.

YU, D.; TIAN, L.; MA, D.; WU, H.; WANG, Z.; WANG, L.; FANG, X. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. **Green Chemistry**, v.12, p.844–850, 2010.

WANG, F.; GAO, Y.; TAN, T.W.; NIE, K.L. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 114-118, 2008.

WATANABLE, Y.; SHIMADAS, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal American Chemical Society**, v.77, p.355–360, 2000.

WU, X.Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y. Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 226-231, 1996.

ZAGONEL, G.F. **Obtenção e caracterização de biocombustíveis a partir da transesterificação etílica em meio alcalino**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p. 35-85.

ZHANG Y., DUBE, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil. **Bioresource Tecnology**, v. 89, n.1, p. 1-16, 2003.

ZHANG, X.; HAYWARD, D. O. Applications of microwave dielectric heating in environment-related heterogeneous gas-phase catalytic systems. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 3421-3433, 2006.

ZHU, H. P.; WU, Z. B; ZHANG, P.; DUAN, S. J.; LIU, X.H. Preparation of biodiesel catalyzed by solid super base of calcium oxide and its refining process. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 27, p. 391-396, 2006.