

EMIR BOLZANI SAAD

**ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO EMPREGANDO
CATALISADORES ALCALINOS E ENZIMÁTICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Curso de Pós-Graduação em Química – Área de Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger

**CURITIBA
2005**

Aos meus pais, Jorge Cavallari Saad e Arlete Bolzani Saad

À minha irmã Marina Bolzani Saad

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, pela orientação, amizade e dedicação dispensada durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger, pela co-orientação, amizade e indispensável colaboração.

Ao Corn Products do Brasil, pela concessão da bolsa de estudos e matéria-prima para a execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Virgínia, Safi, Nayane, Maria Luiza, Karla, Danyella, Érika, Cecília, Caroline, Alessandra, Thiago, Ricardo, Rafael, Marcelo, Leonardo, Joel, Fernando, Daniel, Claudiney e Anderson, pelo apoio, amizade e companheirismo.

Ao Cerbio (TECPAR), em especial ao Giuliano Fernandes Zagonel, pela realização de algumas análises imprescindíveis à conclusão deste trabalho.

A ALCOPAR, pelo fornecimento do etanol anidro.

Ao The Dallas Group of America Inc. (USA), pelo fornecimento do Magnesol

A todos que contribuíram para este trabalho, direta e indiretamente, incluindo todos os colegas, professores e funcionários técnico-administrativos da UFPR e do Departamento de Química.

E principalmente à minha família, minha mãe, Arlete, meu pai, Jorge e minha irmã Marina, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo amor e compreensão em todos os momentos da minha vida, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS _____	i
LISTA DE TABELAS _____	iv
ABREVIATURAS _____	vi
RESUMO _____	viii
ABSTRACT _____	x
I. INTRODUÇÃO _____	I
I.1. ÓLEOS E GORDURAS _____	3
I.2. BIODIESEL _____	8
I.3. PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL _____	12
I.4. TRANSESTERIFICAÇÃO OU ALCOÓLISE DE ÓLEOS E GORDURAS _____	16
I.5. BIOCATÁLISE _____	20
I.6. LIPASES _____	24
I.6.1. Algumas fontes de lipases _____	26
I.6.1.1. Fontes vegetais: papaína _____	27
I.6.1.2. Fontes bacterianas: <i>Burkholderia cepacia</i> _____	28
I.6.1.3. Fontes fúngicas _____	28
I.6.2. Mecanismo catalítico _____	29
I.6.3. Produção de enzimas por fermentação submersa e no estado sólido _____	30
I.7. BIOCATÁLISE EM AMBIENTES AQUO-RESTRITOS _____	33
I.8. IMOBILIZAÇÃO _____	35
II. OBJETIVO _____	37
II.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	37
III. MATERIAIS E MÉTODOS _____	39
III.1. TRANSESTERIFICAÇÃO ALCALINA _____	39
III.1.1. Síntese dos Ésteres Etílicos Via Catálise Alcalina _____	39
III.1.2. Purificação dos Ésteres Etílicos Produzidos por Catálise Alcalina _____	40
III.1.3. Cálculo do Rendimento da Reação _____	41
III.1.4. Especificação dos Ésteres Etílicos Obtidos por Etanolise Alcalina _____	42
III.2. TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA _____	44
III.2.1. Síntese de Ésteres Etílicos Empregando Lipase de Origem Bacteriana _____	44

III.2.1.1. Manutenção da cepa de <i>B. cepacia</i> _____	46
III.2.1.2. Preparo do substrato para a fermentação _____	46
III.2.1.3. Preparação do inóculo e fermentação _____	46
III.2.1.4. Extração da enzima do sólido fermentado _____	47
III.2.1.5. Preparo da matriz contendo a enzima imobilizada _____	47
III.2.1.6. Síntese dos ésteres etílicos com lipases de <i>B. cepacia</i> _____	48
III.2.2. Síntese de Ésteres Etílicos Empregando Lipases de Origem Vegetal _	49
III.2.2.1. Preparo da matriz contendo a enzima imobilizada _____	49
III.2.2.2. Síntese dos ésteres etílicos empregando papaína bruta _____	49
III.3. MÉTODOS ANALÍTICOS INSTRUMENTAIS _____	50
III.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) _____	51
III.3.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ¹ H) _____	52
III.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO AQUOSO ____	52
III.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS _____	52
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	54
IV.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS ÉSTERES VIA CATÁLISE ALCALINA __	54
IV.1.1. Análise dos Ésteres por Métodos Cromatográficos _____	62
IV.1.2. Análise dos Ésteres por Métodos Espectroscópicos _____	66
IV.2. SÍNTESE DOS ÉSTERES ETÍlicos VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA ____	70
IV.2.1. Biocatálise Empregando Lipases Bacterianas de <i>B. cepacia</i> _____	71
IV.2.1.1. Síntese dos ésteres etílicos com lipases de <i>B. cepacia</i> _____	72
IV.2.1.2. Acompanhamento cinético da síntese dos ésteres etílicos com lipases de <i>B. cepacia</i> _____	76
IV.2.1.3. Reutilização da lipase de <i>B. cepacia</i> na síntese dos ésteres ____	78
IV.2.1.4. Emprego do óleo bruto de milho _____	79
IV.2.1.5. Mudança de solvente orgânico na reação de síntese _____	80
IV.2.2. Biocatálise Empregando Lipases de Origem Vegetal _____	81
IV.2.2.1. Síntese dos ésteres etílicos empregando papaína bruta _____	81
IV.2.2.2. Acompanhamento cinético da síntese dos ésteres etílicos com papaína bruta liofilizada _____	84
V. CONCLUSÕES _____	86
VI. REFERÊNCIAS _____	88

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. EXEMPLOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE OCORRÊNCIA NATURAL __ 4
- FIGURA 2. EXEMPLOS DE UM ÁCIDO FOSFATÍDICO (FOSFATO DE DIACILGLICERINA) (A), E SEUS DERIVADOS LECITINA (B), CEFALINA (C) E SERINA (D) _____ 7
- FIGURA 3. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS COM ÁLCOOL FORMANDO ÉSTERES E GLICEROL (ADAPTADO DE SCHWAB *et al.*, 1987) _____ 17
- FIGURA 4. COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS DO (A) HEXADECANO E DO (B) PALMITATO DE ETILA _____ 17
- FIGURA 5. MECANISMO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DOS TRIACILGLICERÍDEOS _____ 19
- FIGURA 6. MECANISMO DA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÍDEOS _____ 20
- FIGURA 7. MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES (JAEGER *et al.*, 1994) ____ 30
- FIGURA 8. EQUAÇÕES USADAS PARA O CÁLCULO DO RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO (KUCEK, 2004) _____ 42
- FIGURA 9. FLUXOGRAMA DA FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES POR *B. cepacia* _____ 45
- FIGURA 10. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA REAÇÃO DE ETANÓLISE EM MEIO ALCALINO DO ÓLEO DE MILHO. (REAÇÕES REALIZADAS COM RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 12:1 À 40°C) _____ 63

- FIGURA 11. RENDIMENTO MÁSSICO (R_2) (\square) E TEOR DE ÉSTERES (\bullet) DE ACORDO COM A QUANTIDADE DE CATALISADOR (NaOH) UTILIZADA NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE COM RAZÃO MOLAR ETANOL:ÓLEO 12:1 A 40°C _____ 65
- FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN-¹H DO ÓLEO DE MILHO, MOSTRANDO OS SINAIS NA REGIÃO DE 0,50-9,0 ppm [200 MHz, CDCl₃] _____ 67
- FIGURA 13. ESPECTRO DE RMN-¹H DO ÓLEO DE MILHO EVIDENCIANDO O ACOPLAMENTO DOS HIDROGÊNIOS METILÊNICOS DA PARTE GLICERÍDICA [200MHz, CDCl₃] _____ 68
- FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN-¹H DO OLEATO DE ETILA EVIDENCIANDO OS SINAIS DO GRUPO METILÊNICO DA ETOXILA [200MHz, CDCl₃] _ 69
- FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN-¹H DOS ÉSTERES ETÍLICOS EVIDENCIANDO OS SINAIS DO GRUPO METILÊNICO DA ETOXILA [200MHz, CDCl₃, 0,2% DE NaOH] _____ 69
- FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN-¹H DOS ÉSTERES ETÍLICOS EVIDENCIANDO OS SINAIS DO GRUPO METILÊNICO DA ETOXILA [200MHz, CDCl₃, 0,4% DE NaOH] _____ 70
- FIGURA 17. CROMATOGRAMA DA ANÁLISE POR CPG DA REAÇÃO DE ETANÓLISE NAS MELHORES CONDIÇÕES (RM DE 6:1, ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE 67,8U/gS) _____ 74
- FIGURA 18. RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DO RENDIMENTO DA REAÇÃO E A VARIAÇÃO NA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM REAÇÕES UTILIZANDO RM DE 6:1 A 37°C _____ 76
- FIGURA 19. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM LIPASE DE *B. cepacia*, APÓS 12H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCl₃] _____ 77

FIGURA 20. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM LIPASE DE *B. cepacia*, APÓS 24H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCl₃] _____ 78

FIGURA 21. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM A PAPAÍNA BRUTA, APÓS 12H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCl₃] _____ 85

FIGURA 22. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM A PAPAÍNA BRUTA, APÓS 24H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCl₃] _____ 85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS CONHECIDOS NA NATUREZA	5
TABELA 2.	ESPECIFICAÇÕES PRELIMINARES PARA O BIODIESEL NO BRASIL (PORTARIA ANP 42)	9
TABELA 3.	NÚMERO DE IODO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM ÁCIDOS GRAXOS DE ALGUNS DOS PRINCIPAIS ÓLEOS VEGETAIS E GORDURAS ANIMAIS DISPONÍVEIS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL (ALSBERG e TAYLOR, 1928)	13
TABELA 4.	OLEAGINOSAS DISPONÍVEIS NO TERRITÓRIO NACIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL (PARENTE, 2003)	15
TABELA 6.	CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DE ACORDO COM A IUBMB	23
TABELA 5.	VANTAGENS E DESVANTAGENS DO PROCESSO QUÍMICO E ENZIMÁTICO NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	26
TABELA 7.	MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3	40
TABELA 8.	METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA ESPECIFICAÇÃO DO BIODIESEL	43
TABELA 9.	MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2	48
TABELA 10.	MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4	50
TABELA 11.	RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO NaOH	55
TABELA 12.	RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO KOH	56

TABELA 13. TEOR DE SABÃO NOS ÉSTERES ETÍLICOS NÃO LAVADOS E DOS TRATADOS COM MAGNESOL [®] _____	58
TABELA 14. TEOR DE SABÃO NOS ÉSTERES ETÍLICOS LAVADOS COM ÁGUA A 80°C E DOS ÉSTERES LAVADOS E TRATADOS COM MAGNESOL [®] _____	59
TABELA 15. ESPECIFICAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS DO ÓLEO DE MILHO, DE ACORDO COM OS LIMITES ESTABELECIDOS PELA RESOLUÇÃO 42 DA ANP _____	60
TABELA 16. TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS (T_E) E RENDIMENTO REAL (Y_E) DAS REAÇÕES COM NaOH _____	64
TABELA 17. EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH SOBRE O RENDIMENTO DE ETANÓLISE _____	65
TABELA 18. PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 PARA AVALIAR A ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO POR LIPASES DE <i>B. cepacia</i> _____	74
TABELA 19. RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE COM LIPASES DE <i>B. cepacia</i> , UTILIZANDO ÓLEO DE MILHO COMO SUBSTRATO _____	75
TABELA 20. PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4 UTILIZANDO HEXANO E HEPTANO COMO SOLVENTE ORGÂNICO _____	82

ABREVIATURAS

ANP = Agência Nacional do Petróleo

Asp = Aspartato

ASTM = American Society for Testing and Materials

AOCS = American Oil Chemists' Society

A_w = Atividade de Água

B100 = Biodiesel Puro

BHA = 2-t-butil-4-metoxifenol

BHT = 2,6-di-t-butil-4-metilfenol

BSA = Soro-Albumina Bovina

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPG = Cromatografia de Permeação em Gel

DAG = Diacilglicerídeo

d_{FS} = Densidade Da Fração Superior

DIN = Deutsches Institut für Normung

DPR = Desvio Padrão Relativo

EC = *Enzyme Commission*

FC = Fator de Conversão Estequiométrica

FES = Fermentação no Estado Sólido

FS = Fermentação Submersa

Glu = Glutamato

His = Histidina

INCQS = Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IUBMB = União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

LB = Luria-Bertani

MAG = Monoacilglicerídeo

M_{FS} = Massa da Fração Superior

M_{FSL} = Massa da Fração Superior Após Lavagem

M_O = Massa de Óleo

nsf = Não Separou Fases

PC = Ponto Central

pNPP = Palmitato de p-Nitrofenila

R₁ = Rendimento Mássico da Fração Superior Antes da Lavagem

R₂ = Rendimento Mássico da Fração Superior Após a Lavagem

RM = Razão Molar

RMN-¹H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RNA = Ácido Ribonucléico

Ser = Serina

TAG = Triacilglicerídeo

TBHQ = t-butil-hidroxiquinona

T_E = Teor em Ésteres Etilícos

THF = Tetrahidrofurano

TM = Torta de Milho

tr = Tempo de Retenção

V_{FS} = Volume da Fração Superior

VPC = Vidro com Porosidade Controlada

Y_E = Rendimento Real em Ésteres

RESUMO

No Brasil, biodiesel pode ser classificado como qualquer combustível alternativo, de natureza renovável, que possa oferecer vantagens sócio-ambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo. No entanto, o único tipo de biodiesel já regulamentado no território brasileiro corresponde aos ésteres alquílicos derivados de óleos vegetais ou gordura animal, cujos parâmetros de especificação estão previstos na Portaria nº. 42 da ANP. Neste trabalho, foram realizados experimentos utilizando catálise alcalina em meio homogêneo e catálise enzimática em meio heterogêneo para a obtenção de ésteres etílicos a partir do óleo de milho (acidez de 0,1mg KOH/g de óleo). Para a catálise homogênea, foram realizados experimentos utilizando NaOH e KOH como catalisadores de acordo com um planejamento fatorial 2^3 , onde razões molares etanol:óleo (RM) de 6:1 e 12:1, temperaturas de 40 e 70°C e concentrações de 0,3 e 0,5% (m/m) dos catalisadores foram empregados, além do uso de etanol anidro como agente de transesterificação. Os maiores rendimentos primários de fase superior (98,12 e 98,42% para NaOH e KOH, respectivamente) foram alcançados nas condições RM 12:1 (etanol:óleo) e 0,5 % (m/m) de catalisador a 40°C. Após purificação, estes ésteres foram submetidos aos testes exigidos para a certificação da qualidade do produto e se demonstraram compatíveis com a especificação, exceto em relação à estabilidade oxidativa e ao teor de glicerina total. Portanto, para que este produto possa atingir os valores exigidos pela especificação, será necessária a realização de uma segunda etapa de etanólise, a ser provavelmente seguida pelo emprego de agentes anti-oxidantes. É sabido que o processo de etanólise em meio alcalino exige operações unitárias relativamente complexas nas etapas de purificação dos ésteres, gerando uma fração glicerínica impura que muitas vezes não pode ser facilmente aproveitada em processos industriais. Assim, catálise enzimática em meio heterogêneo, utilizando lipases ou glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), seria uma alternativa interessante para solucionar este problema. Com o objetivo de investigar o processo enzimático, estudos foram realizados utilizando enzimas brutas de origem vegetal e bacteriana, eliminando assim as etapas de purificação que são geralmente necessárias para o seu uso. Lipases de *Burkholderia cepacia* foram produzidas por fermentação no estado sólido utilizando torta de milho como substrato, que foi subsequente

liofilizado para aplicação direta na síntese de ésteres etílicos em sistemas aquo-restritos. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento fatorial 2^2 a 37°C por 120h, empregando RM álcool:óleo de 3:1 (210mmol/L:70mmol/L) e 6:1 (420mmol/L:70mmol/L) e atividades lipolíticas de 16,9 e 67,6U em 15mL de n-heptano. Os resultados demonstraram um acréscimo no teor de ésteres etílicos obtidos quando a etanólise foi realizada com 100% de excesso estequiométrico (RM álcool:óleo 6:1), gerando um produto cujo teor de ésteres etílicos correspondeu a 94,73%. Embora o processo utilizando lipases bacterianas tenha se demonstrado tecnicamente viável para a etanólise do óleo de milho, a necessidade da condução de processos fermentativos para a produção do biocatalisador pode se revelar problemático para a viabilidade econômica do processo. Por esta razão, lipases de origem vegetal podem se revelar como uma alternativa interessante para aplicação direta neste bioprocessos. Sendo assim, a papaína bruta foi inicialmente obtida de frutos verdes de *Carica papaya* (mamoeiro), depois liofilizada e então utilizada diretamente para a produção dos ésteres etílicos, de acordo com um planejamento fatorial 2^4 empregando temperaturas de 37 e 55°C , etanol com pureza de 95 e 99,5%, RM etanol:óleo de 3:1 (210mmol/L:70mmol/L) e 6:1 (420mmol/L:70mmol/L), em quantidades de 100 e 200mg do biocatalisador, contendo atividades lipolíticas de 4,3 e 8,6U, respectivamente. As condições que se mostraram mais eficientes para a produção de ésteres etílicos com papaína bruta foram de etanol 95% a uma RM (etanol:óleo) de 3:1, atividade lipolítica de 8,6U em 15mL de n-hexano e temperatura de 37°C . Estas condições permitiram a obtenção de ésteres etílicos com 95,86% de pureza, em rendimentos de etanólise (Y_E) da ordem de 91,52%. Portanto, este trabalho permitiu demonstrar que ambas as matrizes contendo lipases imobilizadas apresentaram uma boa eficiência na etanólise do óleo de milho, restando a necessidade de novos experimentos para que a eventual viabilidade destes processos inovadores seja suficientemente demonstrada.

ABSTRACT

In Brazil, any renewable fuel that may offer social and/or environmental advantages while replacing petrodiesel can be generally classified as biodiesel. However, the only Biodiesel type that has been already implemented in the Brazilian energy matrix are the alkyl monoesters derived from vegetable oils or animal fats, whose specifications are defined in the Resolution #42 of the National Petroleum Agency, ANP. In this work, production biodiesel ethyl esters from winterized corn oil (acid number of 0.1mg KOH/g of oil) has been investigated using both alkaline catalysis in homogeneous media and lipases in heterogeneous media. For experiments in which alkaline catalysts were used, 2³ experimental designs were developed with variables under the following levels: alcohol:oil molar ratios (MR) of 6:1 and 12:1; NaOH and KOH concentrations of 0.3 and 0.5% (m/m); reaction temperatures of 40 and 70°C; and anhydrous ethanol as the transesterifying agent. The highest primary yields of the crude ester phase (98.1 and 98.4% for NaOH and KOH catalysis, respectively) were obtained at ethanol:oil MR of 12:1 and 0.5% (m/m) of the catalyst at 40°C. After purification by water washing, these esters were evaluated by a series of standard methods that are described in the national specification and most of the results were in good agreement with the required technical limits, except for the oxidation stability and the total amount of contaminating glycerin (free and bound). Therefore, to achieve the quality standard required by the national specification, it was clear that a second ethanolysis would be required together with the use of small amounts of synthetic anti-oxidants. It is widely known that the alcoholysis in alkaline media requires complex operations for the suitable purification of the resulting biodiesel, yielding a crude glycerin layer that is often impure enough to compromise its acceptance as a raw material for the chemical industry. To account for this difficulty, many authors have suggested the use of enzymatic catalysis in heterogeneous media, in which lipases or glycerol ester hydrolases (E.C.3.1.1.3) are responsible for the alcoholysis of triacylglycerides. To investigate the suitability of the enzymatic process, studies were carried out using crude enzymes from both bacterial and vegetal origin in order to avoid the need for expensive purification steps that are usually required for their application in industrial processes. Lipases from *Burkholderia cepacia* were produced on corn meal by solid state fermentation and the colonized substrate was freeze-dried for direct application

in the ethanolysis of winterized corn oil. Experiments at 37°C for 120h were carried out according to a 2² factorial design, employing ethanol:oil MR of 3:1 (210mmol/L:70mmol/L) and 6:1 (420mmol/L:70mmol/L) and lipolytic activities of 16.9 and 67.6U in 15mL of n-heptane. The greatest ester yield was obtained when ethanolysis was carried out at an ethanol:oil MR of 6:1, corresponding to an ester product with a total ester content of 94,73%. These results were a good indication that ethanolysis of corn oil with crude freeze-dried bacterial lipases was technically viable, but the need for a 72h long fermentation step to produce the biocatalyst encouraged us to investigate the application of crude papain in this process. Therefore, crude papain was obtained as exudates from direct incisions on the skin of green fruits of *Carica papaya* and the resulting latex was freeze-dried for further use. Ethanolysis was investigated according to a 2⁴ factorial design employing temperatures of 37 and 55°C, two different types of ethanol (anhydrous and 95% proof), ethanol:oil molar ratios (MR) of 3:1 (210mmol/L:70mmol/L) and 6:1 (420mmol/L:70mmol/L) and total lipolytic activities of 4.4 and 8.8U/g of corn oil (100 and 200g of the biocatalyst, respectively). The best conditions for the ethanolysis of corn oil involved the use of n-hexane at 37°C, ethanol 95%, ethanol:oil MR of 3:1 and a lipolytic activity of 8.8U/g. HPLC analysis of the corn oil ethyl esters revealed a total ester content of 95,9% (w/w) for an actual reaction yield of 91,52%, with the amount of unreacted glycerides restricted to approximately 0.8% (w/w). Polar compounds such as glycerol, monoacylglycerides and ethanol were not detectable in the ester product because of their low solubility in n-hexane. Therefore, the suitability of both matrixes containing lipases were demonstrated in this work for the production of ethyl esters from winterized corn oil. However, further studies will be required to optimize these processes up to a level in which they become sufficiently viable for practical applications.

I. INTRODUÇÃO

Apesar do recente destaque que o uso energético de óleos vegetais vem recebendo nas mídias nacional e internacional, esta é uma idéia antiga, que foi inicialmente sugerida no final do século XIX quando Rudolph Diesel, inventor do motor a combustão por compressão interna (motor do ciclo Diesel), utilizou em seus ensaios petróleo, álcool e óleo de amendoim como combustíveis (SHAY, 1993; KNOTHE, 2005). No entanto, devido ao baixo custo e alta disponibilidade do petróleo na época, esta matéria-prima fóssil se consagrou na matriz energética mundial como principal fonte de combustíveis líquidos. Atualmente, a maior parte de toda energia consumida no mundo é proveniente de fontes derivadas de petróleo, sendo o óleo diesel uma de suas principais frações. No entanto, em diversos momentos do século XX, principalmente em crises de abastecimento durante as duas grandes guerras mundiais, óleos vegetais *in natura* foram estrategicamente utilizados como combustíveis líquidos (MA e HANNA, 1999). Finalmente, a crise no mercado mundial de petróleo, ocorrida na década de 70, conduziu a um movimento no sentido da produção de combustíveis líquidos alternativos provenientes de fontes renováveis.

Nesta época, foi proposta uma alternativa tecnológica que permitiria reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, aproximando mais suas características às do óleo diesel e facilitando o seu emprego como combustível para motores do ciclo Diesel. Esta reação é conhecida como transesterificação ou alcoólise de óleos vegetais e dá origem, como produto reacional, a uma mistura de alquil monoésteres como os ésteres metílicos ou etílicos. Estas misturas, que ficaram mundialmente conhecidas como "BIODIESEL", foram inicialmente denominadas no Brasil de "PRODIESEL". Os

estudos que levaram ao desenvolvimento do PRODIESEL, a partir de diferentes fontes de óleos vegetais como soja, babaçu, amendoim, algodão e girassol, foram iniciados em meados da década de 70 na Universidade Federal do Ceará (PARENTE, 2003).

Atualmente, é amplamente reconhecido que a disponibilidade do petróleo e seus derivados no mercado mundial é finita e a dependência excessiva em sua oferta traz sérios problemas sócio-econômicos e ambientais. Portanto, a criação e a manutenção de programas voltados à investigação de fontes alternativas de energia renovável, visando à substituição total ou parcial de combustíveis de origem fóssil, tem sido bastante priorizada nestas últimas décadas (MAKAREVICIENE e JANULIS, 2003; GHASSAN, 2003; KNOTHE *et al.*, 2005; RAMOS e WILHELM, 2005), sendo estas iniciativas de vital importância para as economias que se encontram em desenvolvimento.

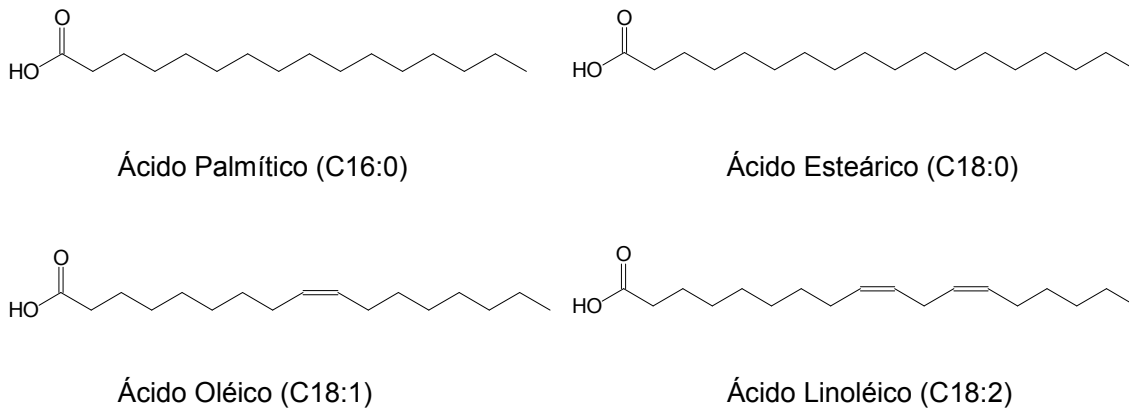
Dentre as fontes de biomassa mais adequadas e disponíveis para a consolidação de programas de energia renovável, os óleos vegetais têm sido investigados não só pelas suas propriedades, mas também por representarem alternativa para a geração descentralizada de energia, atuando como forte apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida (infra-estrutura) em regiões carentes, valorizando potencialidades regionais e oferecendo alternativas a problemas econômicos e sócio-ambientais de difícil solução (RAMOS *et al.*, 2003; RAMOS e WILHELM, 2005).

I.1.ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água) que pertencem à classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. A diferença entre óleos e gorduras reside exclusivamente na sua aparência física. O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 20 °C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo de tal temperatura (MORETTO e FETT, 1989). Esta é a classe de maior abundância na natureza, sendo constituída por uma mistura de diversos compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos graxos livres e seus derivados, como triacilglicerídeos e fosfatídeos.

Os ácidos graxos são ácidos orgânicos lineares que diferem pelo número de carbonos e também pela presença de insaturações (duplas ligações entre os átomos de carbono) em sua cadeia hidrofóbica. Os ácidos graxos sem duplas ligações são conhecidos como saturados e aqueles que as possuem são chamados de insaturados ou poliinsaturados (uma ou mais duplas ligações, respectivamente). Estas duplas ainda podem gerar isômeros *cis* ou *trans*. É interessante destacar que, na natureza, dificilmente são encontrados ácidos graxos ou seus derivados em isomeria *trans*. De fato, estes compostos, largamente reconhecidos como prejudiciais à saúde, são produzidos durante o processamento dos óleos, como na hidrogenação dos mesmos para a fabricação de margarinas. Por outro lado, os ácidos graxos saturados e poliinsaturados podem diferir entre si pela posição da dupla ligação. Existem diversos ácidos graxos de ocorrência natural, sendo alguns exemplificados na Figura 1 e os mais importantes listados na Tabela 1.

FIGURA 1. EXEMPLOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE OCORRÊNCIA NATURAL



Ácidos graxos são encontrados na natureza na forma não associada, sendo assim conhecidos como ácidos graxos livres, ou associados formando outras classes de compostos químicos como fosfatídeos.

Os glicerídeos apresentam uma das principais formas de encontrarmos ésteres de ácidos graxos na natureza, são compostos químicos também conhecidos como triacilglicerídeos, os quais são formados pela condensação entre ácidos graxos e o tri-álcool conhecido “popularmente” por glicerol. Estes compostos são chamados de mono, di ou triacilglicerídeos, dependendo, se uma, duas ou três moléculas de ácido graxo se associa(m) ao glicerol, respectivamente. É importante salientar que os triacilglicerídeos podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si.

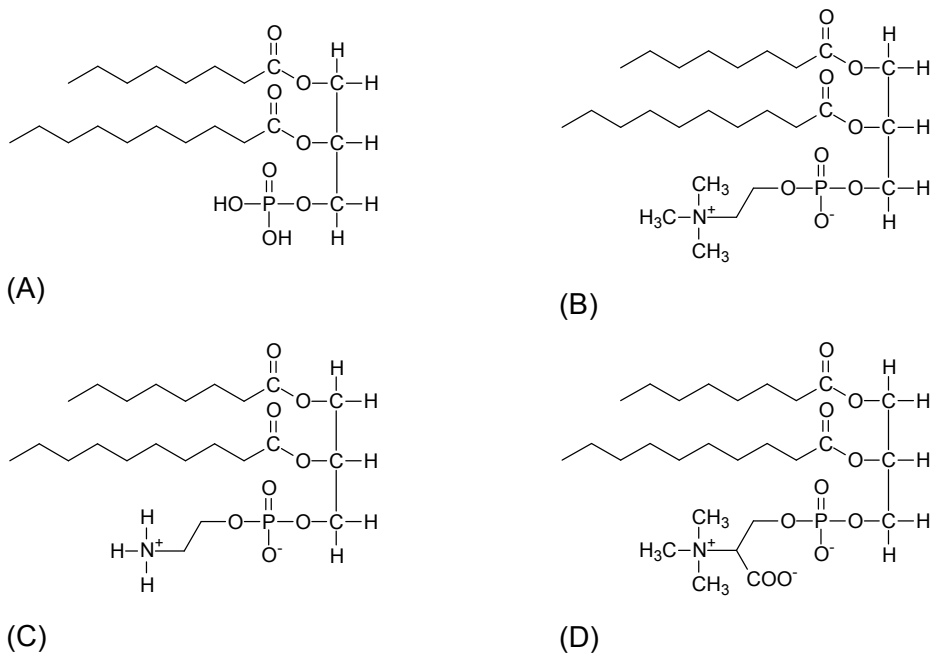
TABELA 1. PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS CONHECIDOS NA NATUREZA

Ácido Graxo	Nome Sistemático	Símbolo	Fórmula
Butírico	Butanóico	C4 ou C4:0	C ₄ H ₈ O ₂
Caprótico	Hexanóico	C6 ou C6:0	C ₆ H ₁₂ O ₂
Caprílico	Octanóico	C8 ou C8:0	C ₈ H ₁₆ O ₂
Cáprico	Decanóico	C10 ou C10:0	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
Otusílico	<i>cis</i> -4-decenóico	C10:1(n4)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
Caproleico	<i>cis</i> -9-decenóico	C10:2(n9)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
Láurico	Dodecanóico	C12 ou C12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Lauroleico	<i>cis</i> -5-lauroleico	C12:1(n5)	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
Lindérico	<i>cis</i> -4-dodecenóico	C12:1(n4)	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
Mirístico	Tetradecanóico	C14 ou C14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Miristoleico	<i>cis</i> -9-tetradecenóico	C14:1(n9)	C ₁₄ H ₂₆ O ₂
Tsuзуico	<i>cis</i> -4-tetradecenóico	C14:1(n4)	C ₁₄ H ₂₆ O ₂
Palmítico	Hexadecanóico	C16 ou C16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecenóico	C16:1(n9)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Esteárico	Octadecanóico	C18 ou C18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Petroselínico	<i>cis</i> -6-octadecenóico	C18:1(n6)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Oleico	<i>cis</i> -9-octadecenóico	C18:1(n9)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Eládico	<i>trans</i> -9-octadecenóico	C18:1(tn9)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Vaccênico	<i>cis</i> -11-octadecenóico	C18:1(n11)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Linoleico	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecadienóico	C18:2(n9,12)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Linolênico	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-Octadecatrienóico	C18:3(n9,12,15)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Ricinoleico	12-hidroxi- <i>cis</i> -9-Octadecenóico	C18:1(n9):OH(n12)	C ₁₈ H ₃₄ O ₃
Araquídico	Eicosanóico	C20 ou C20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Gadoleico	<i>cis</i> -9-eicosenóico	C20:1(n9)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
Gadóico	<i>cis</i> -11-eicosenóico	C20:1(n11)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
Araquidônico	<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15- eicostetraenóico	C20:4(n6,9,12,15)	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Behênico	Docosanóico	C22 ou C22:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Cetoleico	<i>cis</i> -11-docosenóico	C22:1(n11)	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
Erúcico	<i>cis</i> -13-Docosenóico	C22:1(n13)	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
Lignocérico	Tetracosanóico	C24 ou C24:0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Nervônico	<i>cis</i> -15-tetracosenóico	C24:1(n15)	C ₂₄ H ₄₆ O ₂

Já os fosfatídeos são derivados do ácido fosfatídico (ver letra A da Figura 2), que é um composto obtido pela condensação de um poli-álcool, comumente o glicerol, com dois ácidos graxos, que podem ser iguais ou diferentes, e com o ácido fosfórico. A condensação do ácido fosfatídico pode ocorrer com diferentes espécies químicas, dando origem a diversos fosfatídeos, como as lecitinas (derivados da colina, como exemplificado na letra B da Figura 2), as cefalinas (derivados da etanolamina, como exemplificado na letra C da Figura 2) e as serinas (derivados da L-serina, como exemplificado na letra D da Figura 2). Estas moléculas possuem uma região de grande afinidade pela água (hidrofílicas) e outra hidrofóbica, representada pela cadeia hidrocarbonada. Devido à presença das regiões hidrofílica e hidrofóbica, os fosfatídeos, largamente conhecidos como gomas, agem como surfactantes naturais, ou seja, como compatibilizantes entre ambientes orgânicos (apolares) e aquosos (polares). Na indústria de alimentos, esses compostos são largamente utilizados como emulsificantes.

Como já descrito anteriormente, os óleos e gorduras são constituídos por uma mistura de diversos compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos graxos livres e seus derivados triacilglicéridicos e fosfatídicos. Portanto, estas substâncias podem ser divididas em dois grupos: os glicérideos e os componentes não-glicéridicos. A relação entre estas classes de compostos, bem como os tipos de ácidos graxos dos quais são formados, depende essencialmente da matéria-prima (óleo vegetal ou gordura animal) e das condições em que foi produzida e/ou processada. De um modo geral, os óleos brutos contêm menos de 5% de componentes não-glicéridicos, enquanto que os óleos refinados apresentam menos de 2% desses componentes (MORETTO e FETT, 1989).

FIGURA 2. EXEMPLOS DE UM ÁCIDO FOSFATÍDICO (FOSFATO DE DIACILGLICERINA) (A), E SEUS DERIVADOS LECITINA (B), CEFALINA (C) E SERINA (D)



Os óleos e gorduras triacilglicéridicos são constituintes essenciais de todas as formas vivas de plantas e animais e estão largamente distribuídos na natureza. Todas as espécies de plantas ou animais desenvolvem quantidade, ainda que pequena, de óleos ou gorduras durante o seu ciclo de vida. Entretanto, poucas espécies são capazes de produzi-los em quantidade e forma suficientemente disponível para que se tornem artigos de exploração comercial. É importante ressaltar que o grau de insaturação, ou número de ligações duplas entre os carbonos que formam os ácidos graxos, bem como o tamanho da cadeia, estão diretamente relacionados com as propriedades físicas e químicas desses produtos.

Um exemplo de propriedade físico-química que é profundamente alterada com a estrutura da cadeia do ácido graxo é o ponto de fusão, que diminui

drasticamente com o aumento do número de duplas ligações, fazendo com que os triacilglicerídeos saturados (sem duplas) sejam sólidos à temperatura ambiente, como aqueles que compõem o sebo animal, e que os insaturados ou poliinsaturados sejam líquidos à temperatura ambiente, como aqueles que compõem óleos vegetais como o óleo de milho.

I.2. BIODIESEL

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel pode ser classificado como qualquer combustível alternativo, de natureza renovável, que possa oferecer vantagens sócio-ambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel). No entanto, o único tipo de biodiesel já regulamentado no território brasileiro corresponde aos ésteres alquílicos derivados de óleos vegetais ou gordura animal. Como combustível, os ésteres alquílicos necessitam de algumas características técnicas que podem ser consideradas absolutamente imprescindíveis: a reação de transesterificação deve ser completa, acarretando ausência total de ácidos graxos remanescentes e o biocombustível deve ser de alta pureza, não contendo traços de glicerina, compostos não-glicerídicos, catalisador residual ou do álcool excedente da reação. Portanto, é importante frisar que os ésteres alquílicos de óleos e gorduras não podem ser caracterizados como biodiesel se não forem capazes de atender integralmente aos parâmetros fixados pelas especificações, como as normas ASTM D6751 (American Standard Testing Methods, 2003), DIN 14214 (Deutsches Institut für Normung, 2003) ou pela Portaria nº 42 da ANP (Agência Nacional do Petróleo, 2005) que, apesar de provisória, já

estabelece as propriedades que serão exigidas para que esse produto seja aceito no mercado brasileiro (Tabela 2).

TABELA 2. ESPECIFICAÇÕES PRELIMINARES PARA O BIODIESEL NO BRASIL (PORTARIA ANP 42)

Propriedades	Limites	Métodos
Ponto de fulgor (°C)	100 mín.	NBR14598; ISO/CD3679
Água e sedimentos (%)	0,05 máx.	D2709
Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² /s)	Anotar	NBR10441; D445; EN/ISO3104
Cinzas sulfatadas (% m/m)	0,02 máx.	NBR9842; D874; IS3987
Enxofre (% m/m)	Anotar	D5453; EN/ISO14596
Corrosividade ao cobre por 3h a 50°C	No. 1 máx.	NBR14359; D130; EN/ISO2160
Teor de éster (% m/m)	Anotar	Anotar
Número de cetano	Anotar	D613; EN/ISO5165
Ponto de névoa (°C)	7	NBR14747; D6371
Resíduo de carbono (% m/m)	0,1 máx.	D4530; EN/ISO10370
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,80 máx.	NBR14448; D664; prEN14104
Glicerina livre (% m/m)	0,02 máx.	D6854; prEN14105-6
Glicerina total (% m/m)	0,38 máx.	D6854; prEN14105
Curva de destilação 90% (°C)	360 máx.	D1160
Fósforo (mg/kg)	Anotar	D4951; prEN14107
Massa específica a 20°C (kg/m ³)	Anotar	NBR7148/14065; D1298/4052
Álcool (% m/m)	0,50 máx.	prEN14110
Número de yodo	Anotar	prEN14111
Monoglicerídeos (% m/m)	Anotar	D6584; prEN14105
Diglicerídeos (% m/m)	Anotar	D6584; prEN14105
Triglicerídeos (% m/m)	Anotar	D6584; prEN14105
Na + K (mg/kg)	10 máx.	prEN14108-9
Aspecto	LII	----
Estabilidade oxidativa à 110°C (h)	6 mín.	prEN14112

A grande compatibilidade do biodiesel com o diesel convencional o caracteriza como uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos a diesel já existente no mercado, sem qualquer necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento dos motores.

O biodiesel também possui características importantes, como maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional. É praticamente livre de enxofre e compostos aromáticos, possui um teor médio de oxigênio em torno de 11% e produz emissões com menores níveis de CO₂, de material particulado e de monóxido de carbono (MA e HANNA, 1999; VAN GERPEN e KNOTHE, 2005).

O caráter renovável do biodiesel está fundamentado no fato de ser derivado de matéria-prima proveniente de atividades agrícolas, ao contrário dos derivados de petróleo. 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, mas 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 em torno da transesterificação etílica não se encontram tão avançados quanto aqueles associados à rota metílica (RAMOS *et al.*, 2003; RAMOS e WILHELM, 2005).

A implementação do biodiesel de natureza etílica no mercado nacional, por envolver a participação de vários segmentos da sociedade como as cadeias produtivas do etanol e das oleaginosas, abre oportunidades para grandes benefícios sociais decorrentes do alto índice de geração de empregos, culminando com a valorização do campo e a promoção do trabalhador rural. Além disso, fomenta ainda

a demanda por mão-de-obra qualificada para o processamento dos óleos vegetais, permitindo a integração, quando necessária, entre os pequenos produtores e as grandes empresas (CAMPOS, 2003).

Do ponto de vista econômico, a viabilidade do biodiesel está relacionada com o estabelecimento de um equilíbrio favorável na balança comercial brasileira, visto que o diesel é o derivado de petróleo mais consumido no Brasil, e que uma fração crescente desse produto vem sendo importada anualmente (NOGUEIRA e PIKMAN, 2002). Dados atualizados da ANP (2005) indicam que o Brasil importa 9% do total de óleo diesel que consome. No entanto, este percentual sobe para 15% quando as importações de petróleo são levadas em consideração, já que o diesel corresponde a aproximadamente 35% do volume total refinado.

Em termos ambientais, a adoção do biodiesel, mesmo que de forma progressiva, ou seja, a partir de adições de 2 a 5% no diesel de petróleo (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2002), resultará em uma redução significativa no padrão de emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa (MITTELBAACH *et al.*, 1985). Sendo assim, sua difusão, em longo prazo, proporcionará maiores expectativas de vida à população e, como consequência, um declínio nos gastos com saúde pública, possibilitando o direcionamento de verbas para outros setores, como a educação e a previdência social. Cabe aqui ainda ressaltar que, em termos gerais, a adição de biodiesel ao petrodiesel pode melhorar as propriedades do combustível fóssil, permitindo uma redução dos níveis de ruído do motor e melhorando a eficiência da combustão pelo aumento do número de cetano (GALLO, 2003).

Deve-se ainda destacar que a inserção do biodiesel na matriz energética nacional representa um poderoso elemento de sinergia para com o agronegócio da

cana-de-açúcar, cujo efeito será extremamente benéfico para a economia nacional (RAMOS, 1999, 2003). A produção de etanol é expressiva em praticamente todas as regiões do país, e o novo programa somente terá a contribuir para o aumento da competitividade do setor, valendo-se, inclusive, da rede de distribuição já existente e do excelente desempenho das tecnologias desenvolvidas para a cadeia produtiva da cana (CAMPOS, 2003). Nesse contexto, o Brasil se encontra em uma condição que país algum jamais esteve na história do mundo globalizado. Com a evidente decadência das fontes fósseis, nenhuma outra região tropical tem porte e condições tão favoráveis para assumir a posição de um dos principais fornecedores de biocombustíveis e tecnologias limpas para o século XXI (VIDAL, 2000).

I.3. PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Para a fabricação de biocombustíveis a partir de ácidos graxos e seus componentes, seja pela rota de transesterificação ou pelo craqueamento termocatalítico (SUAREZ *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2002), diversas são as matérias-primas disponíveis. Entre elas, podem ser citados os óleos vegetais, as gorduras animais e diversos resíduos industriais ou domésticos.

De uma forma geral, pode-se afirmar que ésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de óleo vegetal (Tabela 3), mas nem todo óleo vegetal pode (ou deve) ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Isso porque alguns óleos vegetais apresentam propriedades não ideais, como alta viscosidade ou alto número de iodo, que são transferidas para o biocombustível e que o tornam inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel.

Dentre as oleaginosas já investigadas para a produção de biodiesel, figuram a soja, o girassol, a mamona, o milho, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim, entre outras (PARENTE, 2003; PIYAPORN *et al.*, 1996; RAMOS *et al.*, 2003). Gorduras animais e óleos usados para cocção de alimentos também são utilizados como matérias-primas alternativas (MA e HANNA, 1999). No entanto, é importante ressaltar que as propriedades químicas e físicas da matéria-prima empregada no processo estão diretamente associadas ao rendimento da transesterificação e, por conseguinte, à qualidade do produto final para fins combustíveis (LANG *et al.*, 2001; BARNWAL e SHARMA, 2004).

TABELA 3. NÚMERO DE IODO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM ÁCIDOS GRAXOS DE ALGUNS DOS PRINCIPAIS ÓLEOS VEGETAIS E GORDURAS ANIMAIS DISPONÍVEIS PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL (ALSBERG e TAYLOR, 1928)

FONTE	Nº DE IODO	PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS						
		Láurico	Mirístico	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico
Sebo bovino	38-46	-	2,0	29,0	24,5	44,5	-	-
Banha suína	46-70	-	-	24,6	15,0	50,4	10,0	-
Côco	8-10	45,0	20,0	5,0	3,0	6,0	-	-
Oliva	79-88	-	-	14,6	-	75,4	10,0	-
Amendoim	83-100	-	-	8,5	6,0	51,6	26,0	-
Algodão	108-110	-	-	23,4	-	31,6	45,0	-
Milho	111-130	-	-	5,5	1,5	44,0	48,0	1,0
Flax	173-201	-	3,0	6,0	-	-	74,0	17,0
Soja	137-143	-	-	11,0	2,0	20,0	64,0	3,0

O Brasil, por ser detentor de uma grande extensão territorial, apresenta uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel (Tabela 4). No entanto, a viabilidade de cada matéria-prima dependerá de suas respectivas competitividades técnica, econômica e sócio-ambiental, passando inclusive por importantes aspectos agronômicos, tais como: (a) o teor em óleos vegetais; (b) a produtividade por unidade de área; (c) o equilíbrio agronômico e demais aspectos relacionados ao ciclo de vida da planta; (d) a atenção a diferentes sistemas produtivos; (e) o ciclo da planta (sazonalidade); (f) sua adaptação territorial, que deve ser tão ampla quanto possível, atendendo a diferentes condições edafoclimáticas; e (g) as vantagens sócio-ambientais que possa oferecer. Avaliações como essas têm sido consideradas absolutamente fundamentais para a compilação da análise do ciclo de vida do biodiesel, fato hoje considerado de fundamental importância para um país que pretende explorar os seus recursos naturais (biomassa), de forma comprovadamente sustentável, para aplicações no setor de energia (RAMOS, 1999, 2003; PERES e FREITAS Jr., 2003).

O óleo de soja surgiu como um subproduto do processamento do farelo e, atualmente, tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos vegetais. Dada a grandeza do agronegócio da soja no mercado brasileiro, é relativamente fácil reconhecer que essa oleaginosa apresenta o maior potencial para servir de modelo para o desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel.

Além da soja, várias outras oleaginosas, que ainda se encontram em fase de avaliação e desenvolvimento de suas cadeias produtivas, podem ser empregadas para a produção do biodiesel (Tabela 4) (PARENTE, 2003). Várias dessas oleaginosas já tiveram as suas respectivas competitividades técnica e sócio-ambiental demonstradas para a produção de biodiesel, restando apenas, a

implementação de projetos de ampliação de escala e a condução de estudos agronômicos mais aprofundados que venham a garantir a disponibilidade da matéria-prima nos momentos de maior demanda.

TABELA 4. OLEAGINOSAS DISPONÍVEIS NO TERRITÓRIO NACIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL (PARENTE, 2003)

Região	Óleos vegetais disponíveis
Norte	dendê, babaçu e soja
Nordeste	Babaçu, soja, mamona, dendê, algodão e coco
Centro-oeste	soja, mamona, algodão, girassol, dendê e gordura animal
Sudeste	soja, mamona, algodão e girassol
Sul	soja, milho, colza (canola), girassol e algodão

O milho, graças à sua capacidade adaptativa e por apresentar grande importância econômica, é a espécie mais cosmopolita do mundo (PATERNIANI, 1995).

O maior produtor mundial de milho é os Estados Unidos, com uma produção de 253,2 milhões de toneladas em 2000/2001, sendo a China o segundo maior produtor, com 105 milhões de toneladas no mesmo período. O Brasil é o terceiro maior produtor, onde este cereal ocupa uma área cultivada de cerca de 14 milhões de hectares (BRANDALIZZE, 2001).

Além da utilização do seu óleo (4,5% do grão), o milho apresenta uma grande variedade de produtos industrializados, principalmente relacionados à utilização do amido, que corresponde a 71,5% do grão, e das proteínas, que correspondem a 10,3% (PERRY, 1988). Existe grande procura por esse óleo, em função de suas qualidades para o consumo humano. No entanto, o crescente aumento da demanda

por amido de milho nas indústrias alimentícia, química e de cosméticos, gera uma oportunidade para o uso alternativo de seu óleo vegetal, já que o subsequente aumento de sua produção poderá ultrapassar a demanda existente no mercado.

Enfim, dada à multiplicidade de matérias-primas que hoje existem para a produção de biodiesel, é plausível dizer que somente através do conhecimento pleno das propriedades que determinam os padrões de identidade e de qualidade do biodiesel é que será possível estabelecer os parâmetros de controle que garantirão o sucesso de sua incorporação na matriz energética nacional.

I.4. TRANSESTERIFICAÇÃO OU ALCOÓLISE DE ÓLEOS E GORDURAS

A alcoólise de triacilglicerídeos por álcoois mono-hidroxilados é composta por três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários, conforme mostrado na Figura 3 (SCHWAB *et al.*, 1987). Sua estequiometria requer 1 mol de triacilglicerídeo para 3 mols de álcool, mas, devido ao fato desta reação ser reversível, um excesso de álcool se faz necessário para promover um aumento no rendimento da produção dos ésteres alquílicos. Assim, os triésteres de ácidos graxos que compõe os óleos vegetais são transformados em monoésteres (VAN GERPEN e KNOTHE, 2005).

Este processo é utilizado com os objetivos de melhorar a sua qualidade de ignição, reduzir o seu ponto de fluidez e ajustar os seus índices de viscosidade e densidade específica (MITTELBACH *et al.*, 1983; SHAY, 1993; STOURNAS *et al.*, 1995; MA e HANNA, 1999), otimizando, assim, seu uso como combustível em motores do ciclo diesel. A Figura 4 apresenta uma comparação interessante entre as estruturas do palmitato de etila e o hexadecano (cetano) que, em última análise,

representam os componentes de referência para o biodiesel e o diesel de petróleo, respectivamente. Nela, percebe-se facilmente a complementaridade entre o poder calorífico de ambas, com a vantagem de que o éster (biodiesel), por ser um composto oxigenado, apresentará melhor comportamento frente ao processo de combustão.

FIGURA 3. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS COM ÁLCOOL FORMANDO ÉSTERES E GLICEROL (ADAPTADO DE SCHWAB *et al.*, 1987)

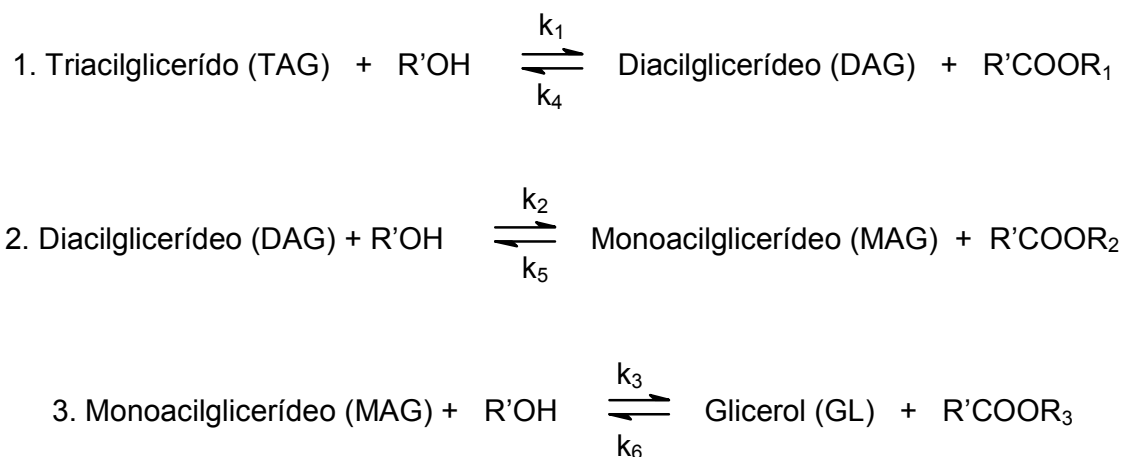
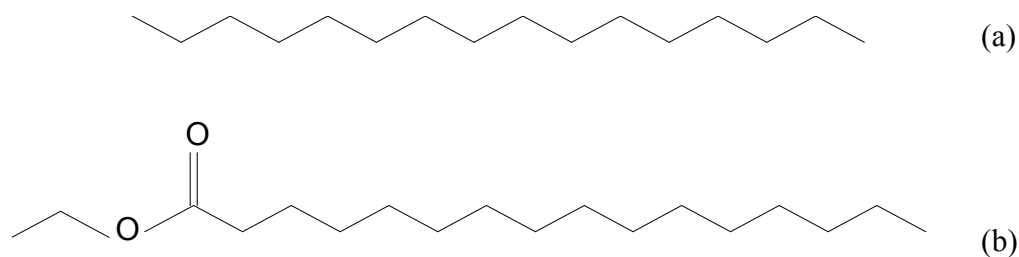


FIGURA 4. COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS DO (A) HEXADECANO E DO (B) PALMITATO DE ETILA



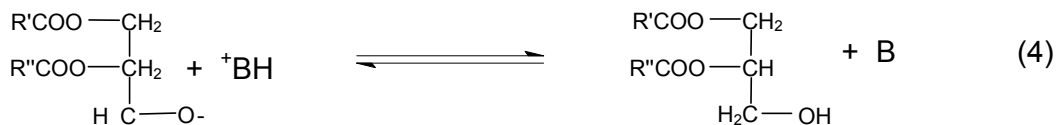
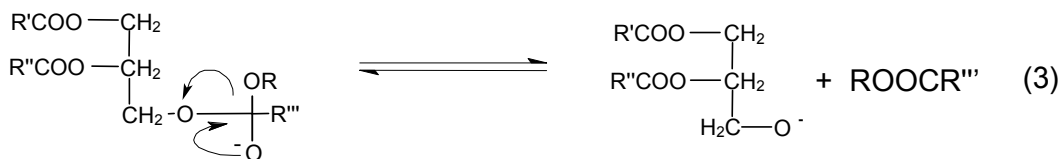
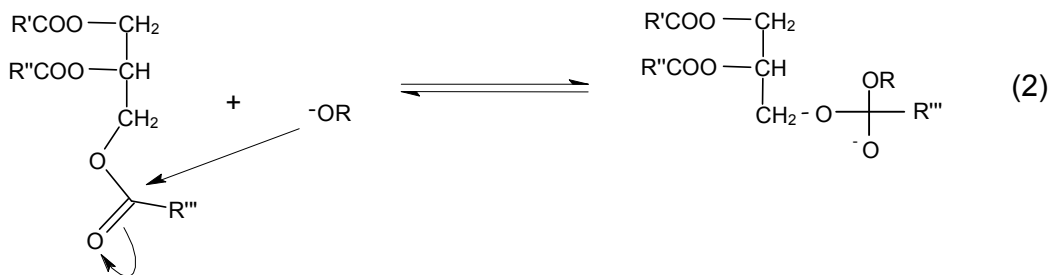
A alcoólise de óleos vegetais ou gordura animal pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados, como bases inorgânicas (hidróxidos de sódio e potássio), ácidos minerais (ácido sulfúrico), resinas de troca iônica (resinas catiônicas fortemente ácidas), argilominerais ativados, hidróxidos duplos lamelares, superácidos, superbases e enzimas lipolíticas (lipases) (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; RAMOS *et al.*, 2003; VAN GERPEN e KNOTHE, 2005).

Ácidos de Brønsted-Lowry podem ser utilizados como catalisadores da alcoólise, preferencialmente os ácidos sulfônico e sulfúrico. Estes catalisadores fornecem alto rendimento em ésteres alquílicos, mas a reação é lenta, requerendo normalmente temperaturas de 100°C e mais de três horas para completa conversão. No entanto, a catálise ácida é eficiente para óleos que possuem índices de acidez superiores a 1%, tais como os óleos utilizados em frituras. Estes óleos possuem grandes quantidades de ácidos livres que não podem ser transformados em biodiesel via catálise alcalina porque, estando livres, reagem rapidamente com o catalisador produzindo sabões que inibem a separação entre o éster e a glicerina nas etapas de lavagem com água. Contaminações com catalisadores ácidos residuais também podem atacar as partes metálicas do motor, causando a corrosão e, por isso, devem ser eliminados completamente do produto final (CANAKCI e GERPEN, 1999).

Por outro lado, as reações catalisadas por álcali são mais rápidas do que as conduzidas em meio ácido (MA e HANNA, 1999; VAN GERPEN e KNOTHE, 2005). Além disto, o catalisador alcalino é menos corrosivo e exige menores razões molares entre o álcool e o óleo vegetal. No entanto, ainda que represente a rota tecnológica mais utilizada para a produção de biodiesel, o emprego de NaOH ou KOH exige que

a matéria-prima presente baixa acidez (menor do que 1mg de KOH/g de amostra) para evitar o consumo improdutivo de álcali e a subsequente formação de sabões. O mecanismo proposto para esta reação (Figura 5) constitui-se de uma seqüência de três reações reversíveis, nas quais diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos são formados como intermediários (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

FIGURA 5. MECANISMO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DOS TRIACILGLICERÍDEOS



A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e de conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool por leveduras é catalisada por “fermentos”. O cientista postulou que esses fermentos, depois nomeados enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que permaneceu como verdadeira por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que as enzimas contidas no extrato de levedo podiam catalisar a fermentação do açúcar até álcool mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Este fato levou muitos cientistas a tentarem o isolamento de numerosas enzimas e a examinarem suas propriedades catalíticas para processos químicos tradicionalmente conduzidos com catalisadores sintéticos (LEHNINGER *et al.*, 2001).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA (ácido ribonucléico) que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Proteínas são macro-moléculas com massas molares que variam de 10 a 1000 kDa e que, de acordo com a composição, classificam-se em proteínas simples e conjugadas. As proteínas simples são compostas por diferentes seqüências dos 20 aminoácidos essenciais e as proteínas conjugadas podem conter, além de aminoácidos, grupos prostéticos que podem corresponder a metais (Fe, Zn, Ca, Mo, Cu), lipídios e açúcares.

Conceitualmente, a estrutura das proteínas pode ser considerada em quatro níveis distintos:

- Estrutura primária: inclui todas as ligações covalentes entre os aminoácidos unidos por ligações peptídicas e pela localização das ligações dissulfeto. No caso das proteínas conjugadas, inclui também as ligações entre os aminoácidos e grupos prostéticos;
- Estrutura secundária: refere-se aos arranjos regulares e recorrentes envolvendo resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica. As estruturas secundárias mais comuns são a α -hélice e a conformação β ;
- Estrutura terciária: refere-se ao relacionamento espacial entre todos os aminoácidos de um polipeptídeo e representa a estrutura tridimensional completa da proteína;
- Estrutura quaternária: consiste na associação de várias cadeias polipeptídicas de estrutura terciária. Somente as proteínas oligoméricas, que são formadas por mais de uma cadeia polipeptídica e apresentam estrutura e função mais complexas, contêm estrutura do tipo quaternária.

Na estrutura primária, a união das cadeias ocorre por ligações covalentes. Para as outras estruturas, a união se faz através de ligações de hidrogênio, pontes de sulfeto, forças de van der Waals e interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Todas as enzimas possuem, pelo menos, estruturas primária, secundária e terciária (LEHNINGER et al., 2001).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) reconhece a existência e/ou descoberta de 3.000 diferentes enzimas. A cristalização de várias enzimas tem sido obtida e suas respectivas seqüências de aminoácidos (estrutura primária) determinadas, bem como a estrutura tridimensional, através de

difratometria de raios-X e ressonância magnética nuclear em duas dimensões (RMN-2D) (VECCHIA *et al.*, 2004).

A IUBMB divide as enzimas em seis grandes classes (Tabela 6), e cada uma em subclasses de acordo com o tipo de reação que as mesmas catalisam. As enzimas hidrolíticas são as mais usadas, por geralmente corresponderem a uma estrutura mais simples e não requererem cofatores.

TABELA 6. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DE ACORDO COM A IUBMB

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidoreduases	Reações de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C e C=C	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
2	Transferases	Transferências de grupos aldeídico, cetônico, acila, fosforila ou metila	Transaldolases, transcetolases, etc.
3	Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases, etc.
4	Liasas	Adição-eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidioliasas, hidroliasas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, etc.
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

A nomenclatura das enzimas é determinada de maneira sistemática. A cada enzima é assinalado um número classificatório de quatro dígitos, que identifica o tipo de reação por ela catalisada (Tabela 6). As enzimas utilizadas neste trabalho são classificadas como E.C.3.1.1.3 (lipases ou glicerol éster hidrolases), onde: a

abreviatura E.C. significa *Enzyme Commission*; o primeiro dígito (3) denota o nome da classe (hidrolases); o segundo dígito (1), a subclasse (atua sobre ligações éster); o terceiro dígito (1), a sub-subclasse (carboxil éster hidrolase); e o quarto dígito (3) é o número de série dentro da sub-subclasse e significa que a enzima atua sobre triacilglicerídeos (Tabela 6) (<http://www.iubmb.unibe.ch/>).

I.6. LIPASES

Devido ao seu alto poder catalítico, as lipases vêm sendo empregadas em uma grande variedade de aplicações industriais nestas últimas décadas (VILLENEUVE *et al.*, 2000; PIMENTEL *et al.*, 1994). Como exemplo, podem ser citados segmentos biotecnológicos das indústrias de alimentos (obtenção de aromas e maturação de queijos), de detergentes, de fármacos (síntese de naxopreno e ibuprofeno), de agroquímica (inseticidas e pesticidas) e de oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) (KRIEGER *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 1999; SAXENA *et al.*, 1999; CABRAL *et al.*, 1998; JAEGER *et al.*, 1994; VULFSON, 1994).

As lipases estão presentes em diversos organismos, incluindo animais evoluídos, plantas, fungos e bactérias, onde desempenham um papel chave na biodegradação de lipídeos. Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C¹⁸. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem,

sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases têm a função biológica de catalisar hidrólise de gorduras e óleos, com a subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e glicerol livre. No entanto, estas enzimas também podem atuar como catalisadores de reações de acidólise, aminólise, esterificação, transesterificação (ou alcoólise) e interesterificação. Como biocatalisadores, apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos, como a especificidade, a regioseletividade e a enantiosseletividade, que permitem a catálise de reações com um número reduzido de subprodutos, baixo custo no tratamento de resíduos e necessitando de condições brandas de temperatura e pressão (FACIOLI *et al.*, 1998; UOSUKAINEN *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2001).

Atualmente, o processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a rota enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica. Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais. Entretanto, dentre algumas desvantagens essencialmente econômicas, o processo enzimático, uma vez otimizado, poderá apresentar vantagens muito interessantes em relação ao processo químico (Tabela 5) (COSTA NETO, 2002).

TABELA 5. VANTAGENS E DESVANTAGENS DO PROCESSO QUÍMICO E ENZIMÁTICO NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade • Alto rendimento • Curto tempo de reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade de separação do catalisador • Impossibilidade de reutilização do catalisador • Dificuldade de utilização de etanol hidratado • Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de separação do catalisador • Obtenção de produtos mais puros • Permite o uso de etanol hidratado na reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de reação • Custo das enzimas

I.6.1. Algumas fontes de lipases

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (lipases pancreáticas, hepáticas e gástricas), vegetais e microbianas (bactérias e fungos). Inicialmente, eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (CASTRO *et al.*, 2004). Em função do alto custo associado ao isolamento e purificação de lipases microbianas e de origem animal a aplicação destas enzimas tem sido limitada em escala industrial.

Para tentar equacionar este problema, vários estudos têm sido orientados ao uso de lipases vegetais em processos industriais (FOGLIA *et al.*, 1997), principalmente porque o seu custo de produção é significativamente menor. Além disso, lipases vegetais também podem apresentar outras vantagens, pois além de

possuírem elevada seletividade e especificidade (em alguns casos, similares às microbianas), não exigem um alto grau de purificação e podem se obtidas com grande facilidade no mercado, na forma de extratos brutos (CARO *et al.*, 2000).

1.6.1.1. Fontes vegetais: papaína

Uma das enzimas de origem vegetal que desempenha importante papel na indústria é a papaína, que vem se transformando em excelente fonte de divisas para os países produtores. A papaína pode ser definida como uma proteína enzimática encontrada no látex do mamoeiro (*e.g.*, *Carica papaya* L.), quer nos frutos verdes, quer em outras partes da planta (tronco e folhas). Em tese, trata-se de uma enzima proteolítica (catalisa a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas) que, de seu uso, resulta, inicialmente, a liberação de uma mistura de peptídeos e, como produto final, uma mistura dos aminoácidos que compunham o substrato protéico. O termo papaína é usado comercialmente para referir-se à papaína crua, que é o látex do mamoeiro desidratado e que, na verdade, trata-se de uma mistura de enzimas proteolíticas que inclui a quimopapaína e a lisozima (MELO *et al.*, 1997). Vários autores também têm constatado a presença de lipases na papaína bruta do mamoeiro e sua presença está certamente relacionada com a hidrólise de metabólitos secundários importantes para o metabolismo da planta (GIORDANI *et al.*, 1991; VILLENEUVE *et al.*, 1995, 1997; FOGLIA e VILLENEUVE, 1997; GANDHI & MUKHERJEE, 2000, 2001a,b). No entanto, essa atividade lipolítica não foi detectada em enzimas comerciais refinadas, do tipo papaína, ω -papaína e quimopapaína (CARO *et al.*, 2000), provavelmente porque as lipases foram eliminadas e/ou desnaturadas durante o processo de purificação.

I.6.1.2. Fontes bacterianas: Burkholderia cepacia

Dentre as bactérias produtoras de lipases, estão disponíveis comercialmente as enzimas de *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia* (anteriormente *Pseudomonas*) *cepacia* para a aplicação em síntese quiral, e as lipases de *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp. para a determinação diagnóstica de triacilglicerídeos. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER *et al.*, 1999).

A *Burkholderia cepacia* produz um extrato lipolítico com altas concentrações de lipase (33000 U/L) por fermentação submersa. No entanto, estudos prévios realizados por fermentação no estado sólido (FES) demonstraram que a bactéria também produz grandes concentrações da enzima quando cultivada com farelo de girassol e farelo de trigo. Além disso, os ensaios preliminares de atividade e estabilidade em solução revelaram que a enzima atua e é estável em uma ampla faixa de pH (3 a 10), mantém atividade em temperaturas relativamente altas (20 a 55°C) e é estável a solventes orgânicos polares e apolares (LIMA *et al.*, 2002, 2004).

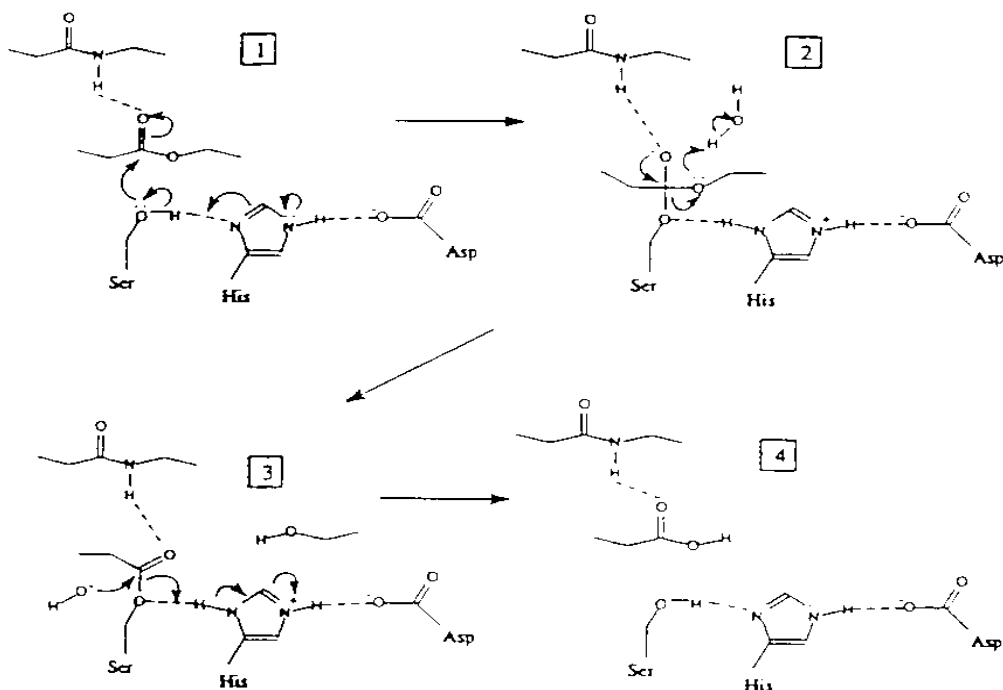
I.6.1.3. Fontes fúngicas

Fungos de diversos gêneros têm sido demonstrados como bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus oryzae* e *A. niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus* e *R. oryzae*, *Penicillium camembertii* e *P. roqueforti*, e da levedura *Candida rugosa*, estão sendo atualmente comercializadas para o processamento de

óleos, gorduras e queijos, principalmente na determinação de triacilglicerídeos, como aditivo em preparação digestiva e para a síntese de compostos quirais (JAEGER *et al.*, 1999).

I.6.2. Mecanismo catalítico

As lipases são hidrolases que atuam em ligações éster presentes em acilglicerídeos para liberar ácidos graxos e glicerol. O sítio ativo consiste na tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu. Devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases, o mecanismo catalítico para lipases segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma serina protease (Figura 7). A hidrólise ocorre em duas etapas: inicialmente, a histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico, quando ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico que é estabilizado pelos resíduos catalíticos de His e Asp. Neste processo, uma molécula de álcool é liberada, formando um complexo acil-enzima que sofre um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila da água, liberando o ácido graxo e regenerando o sítio catalítico da enzima (BORNSCHEUER, 2002; BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 1999; JAEGER *et al.*, 1994).

FIGURA 7. MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES (JAEGER *et al.*, 1994)

I.6.3. Produção de enzimas por fermentação submersa e no estado sólido

A produção de enzimas envolve um processo fermentativo que, conforme a matéria-prima, diferencia-se em fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). No primeiro processo, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos sob um rígido controle da atividade de água (MITCHELL *et al.*, 2004; MITCHELL *et al.*, 2000; LAGEMAAT e PYLE, 2001), enquanto que, no segundo processo, os substratos são dissolvidos em meio líquido.

As enzimas são tradicionalmente obtidas por processos de FS. Entretanto, a FES, onde os teores de água não são superiores a 70%, pode apresentar algumas

vantagens em relação à FS. Os metabólitos são normalmente produzidos em uma forma concentrada, facilitando o seu processo de recuperação do meio de fermentação. Nas últimas décadas, a FES vem sendo utilizada na obtenção de uma variedade de metabólitos primários e secundários de grande interesse econômico (MITCHELL *et al.*, 2002a,b).

A FES também apresenta menor custo porque, além da simplicidade e economicidade do processo, em termos de espaço, meio, equipamentos e consumo de energia (MITCHELL *et al.*, 2003; MAHADIK *et al.*, 2002), pode utilizar como matéria-prima alguns tipos de resíduos agrícolas e agroindustriais geralmente descartados pela indústria. Como, durante a FES, os microrganismos utilizam estes materiais insolúveis para seu crescimento e metabolismo, a difusão de seu uso pode representar uma alternativa para a destinação destas enormes fontes de poluição ambiental. Por outro lado, a FES pode se tornar um processo vantajoso para o Brasil, dada a sua grande base agrícola e florestal, vasta dimensão territorial, excelentes características climáticas e grande capacidade para produzir recursos renováveis (biomassa) em larga escala.

A produção de lipases por FES é relativamente difícil, o que justifica a existência de poucos trabalhos na área relatando bons rendimentos de produção. A co-produção de grandes quantidades de proteases, principalmente no caso de fungos, é parcialmente responsável por estes baixos rendimentos devido à eventual perda de atividade por hidrólise de lipases extracelulares. Assim, o cultivo de bactérias pode ser uma alternativa interessante para a FES. Uma cepa bacteriana de *B. cepacia*, isolada recentemente em nossos laboratórios, produz bons rendimentos de lipases tanto em FS quanto em FES, utilizando como substratos o

farelo de girassol e a casca de trigo e, como indutor, o óleo de oliva (LIMA *et al.*, 2002; MEIRA *et al.*, 2003b). Como mencionado anteriormente, a alta estabilidade desta enzima representa um grande potencial para o seu emprego em sistemas aquo-restritos (LIMA *et al.*, 2002, 2004).

Uma das características imprescindíveis para a utilização de enzimas em meios aquo-restritos é a sua estabilidade e atividade em solventes orgânicos polares e apolares, o que nem sempre é fácil de ser atingido, considerando que este não é o meio natural de ação destas enzimas. Experimentos prévios realizados em laboratório com a lipase de *B. cepacia*, incubando-se a enzima por 1 h em diferentes solventes, demonstraram que, nos solventes polares estudados (etanol, isopropanol e acetona), a enzima apresentou ativação até a proporção de 80% (v/v) de solvente em água, sendo que a maior ativação se deu em etanol (atividade residual de $195 \pm 23\%$). Com 100% de solvente orgânico, a atividade decresceu para todos os solventes, com exceção do isopropanol, que apresentou atividade residual de $97 \pm 18\%$. Em solventes apolares como tolueno, n-hexano, n-heptano e isooctano a 100% (v/v), a enzima apresentou maior ativação em n-heptano (atividade residual de $121\% \pm 6$), sendo que não foi observada ativação somente em isooctano. Esta boa estabilidade em solventes tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos é inédita para uma lipase. Outra característica importante da lipase de *B. cepacia* foi a sua capacidade de conduzir reações de esterificação (LIMA *et al.*, 2002, 2004). Assim, o potencial desta enzima para biocatálise, bem como a perspectiva de sua produção por FES, justificaram o seu emprego no desenvolvimento do presente plano de trabalho.

I.7. BIOCATÁLISE EM AMBIENTES AQUO-RESTRITOS

Nos últimos anos, foram realizados vários estudos sobre reações enzimáticas em meio orgânico. Em sentido restrito, podem ser considerados como ambientes não-aquosos os solventes orgânicos, os fluidos supercríticos, os gases e os substratos líquidos ou misturas eutéticas de substratos livres de solvente. Considerando os sistemas reacionais utilizados na biocatálise, os meios aquo-restritos podem ser classificados em sistemas macro-heterogêneos (enzima liofilizada ou imobilizada), em que se observa separação de fases, e micro-heterogêneos (sistema de micelas reversas), onde a separação de fases não pode ser observada macroscopicamente (GERARD e JULIAN, 1999).

As principais vantagens da catálise enzimática em meios aquo-restritos, relatadas na literatura e de importância para lipases, são: a maior solubilidade dos substratos e produtos hidrofóbicos em solventes orgânicos; a redução de reações hidrolíticas secundárias devido à reduzida quantidade de água no sistema; e o aumento da estabilidade do biocatalisador, pois a enzima fica relativamente inerte nos solventes apolares que, além disso, não são capazes de desorver as águas ligadas à enzima, mantendo intacta a sua conformação cataliticamente ativa (ALVAREZ-MACARIE e BARATI, 2000; CARVALHO *et al.*, 2000; SELLEK e CHAUDHURI, 1999).

As reações onde as enzimas ou o solvente orgânico não são miscíveis em água são chamadas de sistemas macro-heterogêneos. Um dos principais tipos de sistemas macro-heterogêneos, e que será utilizado neste trabalho, é o sistema sólido-líquido. Neste sistema, a enzima está na forma sólida, liofilizada ou imobilizada, em suspensão com a fase orgânica que contém os substratos. Mesmo

quando a enzima está na forma liofilizada, o sistema pode ser considerado como bifásico, pois a maioria das lipases é insolúvel em solventes orgânicos. Neste caso, quando o teor de água presente no sistema é muito baixo (expresso pela atividade de água, a_w) (CHOWDARY e PRAPULLA, 2002), não há a formação de fases distintas, pois a água estará solubilizada no solvente ou incorporada ao biocatalisador. Esta quantidade de água forma uma camada de hidratação ao redor da enzima, protegendo-a da desnaturação pelo solvente.

Há relatos em que as lipases, dentre outras enzimas, permanecem ativas em misturas reacionais contendo altas proporções de solventes orgânicos (PENCREACH *et al.*, 1997). Neste caso, a enzima, na forma sólida e completamente sem a camada de hidratação, pode ter a capacidade de se manter ativa no meio orgânico devido à formação, na superfície da partícula sólida de enzima, de uma camada de proteína desnaturada que protege as camadas interiores do contato com o solvente. Este tipo de sistema tem sido utilizado essencialmente em reações de esterificação e transesterificação, conduzindo normalmente a conversões bastante elevadas, mas com atividades catalíticas baixas devido a problemas difusionais e de transferência de massa entre a enzima e os substratos e produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Em meio orgânico, as enzimas são geralmente insolúveis, o que reduz a necessidade de imobilização. Entretanto, muitos estudos realizados em meio orgânico empregam enzimas imobilizadas como biocatalisador. A principal razão disso é que as enzimas permanecem mais bem distribuídas no suporte do que no precipitado. Conseqüentemente, as limitações difusionais são menores em preparações imobilizadas (PENCREACH *et al.*, 1997).

I.8. IMOBILIZAÇÃO

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (VECCHIA *et al.*, 2004).

Relativamente aos métodos em que a enzima fica retida no interior do suporte, a imobilização pode ocorrer pela formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, a qual fica aprisionada na matriz tridimensional, ou pela introdução da enzima em uma membrana porosa previamente formada. Em ambos os casos, a enzima fica embebida em um “gel” que deverá possuir porosidade adequada, permitindo a difusão dos substratos e produtos enquanto que a enzima permanece retida no interior da matriz. A imobilização na superfície do suporte pode resultar da adsorção da enzima ao suporte sólido, devido a interações do tipo dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações iônicas ou hidrofóbicas, ou ainda da

ligação covalente da enzima ao suporte. Na imobilização por ligação covalente, a enzima fica irreversivelmente ligada ao suporte, obtendo-se com isso um conjugado estável que não se dissocia durante a imobilização. No entanto, as condições necessárias à formação de uma ligação covalente podem levar a alterações na estrutura tridimensional da enzima, conduzindo a preparações com baixas atividades catalíticas (URGEL *et al.*, 2001).

O processo de imobilização por adsorção é mais simples e envolve interações enzima-suporte mais fracas e menos específicas, obtendo-se preparações enzimáticas com atividades catalíticas elevadas e rendimentos de imobilização também elevados. A principal desvantagem da imobilização por adsorção se deve a possíveis perdas de enzima, que poderão ocorrer durante a utilização da preparação enzimática no meio reacional (URGEL *et al.*, 2001).

Os suportes sólidos utilizados para imobilização podem ser constituídos por vários tipos de materiais, que vão desde o vidro com porosidade controlada, óxido de alumínio, sílica (STARK e HOLMBERG, 1989), celite (MARLOT *et al.*, 1985; MUSTRANTA *et al.*, 1993; WISDOM *et al.*, 1990), resinas do tipo Sepharose (SHAW *et al.*, 1990), a polímeros como agarose (GUISAN *et al.*, 1993,1991), poliamida, polipropileno e polietileno (ADLEUCRETZ, 1994; RESLOW *et al.*, 1988). A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende essencialmente de dois fatores: das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada. Dada a variabilidade desses fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte que possa ser considerado de aplicação universal (URGEL *et al.*, 2001).

II. OBJETIVO

Investigar a viabilidade dos processos de transesterificação alcalina e enzimática de óleos vegetais (óleo de milho), utilizando hidróxido de sódio e/ou de potássio e lipases de diferentes origens como catalisadores, com o objetivo de produzir ésteres etílicos com especificação adequada para classificação como biodiesel, de acordo com a Resolução 42 da Agência Nacional do Petróleo (ANP).

II.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo de milho através de análises químicas, físicas e espectroscópicas (RMN-¹H);
- Otimizar a etanólise de óleo de milho em meio alcalino, utilizando planejamentos experimentais que considerem as três principais variáveis de processo em dois níveis: razão molar etanol:óleo (RM), concentração de hidróxidos minerais (NaOH ou KOH) em relação à massa de óleo e temperatura de reação;
- Purificar os ésteres etílicos produzidos mediante a otimização da separação entre as fases que contêm os ésteres e o glicerol;
- Empregar métodos de análise instrumental, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), para a caracterização dos ésteres produzidos por etanólise do óleo de milho em meio alcalino;
- Selecionar o melhor biocatalisador, dentre lipases de origem bacteriana ou vegetal, para conduzir a etanólise do óleo de milho em sistemas heterogêneos;

- Caracterizar a cinética de hidrólise das enzimas imobilizadas, utilizando como substrato cromogênico o palmitato de p-nitrofenila (pNPP)
- Caracterizar a cinética de transesterificação etílica do óleo de milho, utilizando as enzimas imobilizadas.
- Investigar o rendimento da transesterificação enzimática de óleo de milho em relação à quantidade de biocatalisador, tempo de reação para obter máxima conversão do óleo em éster, temperatura e reutilização dos biocatalisadores imobilizados.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

O óleo de milho utilizado neste estudo passou por um processo de resfriamento para a retirada de ceras e outros componentes que cristalizam a temperaturas mais baixas. Este óleo, denominado de óleo “winterizado”, juntamente com uma pequena amostra de óleo bruto e com a torta de milho utilizada como substrato para a produção das lipases, foram fornecidos pela Corn Products Brasil (Balsa Nova, PR). Por outro lado, o etanol anidro que foi empregado na alcoólise dos óleos de milho foi obtido junto à Associação dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado do Paraná (Alcopar, Maringá, PR), enquanto que o adsorvente sintético (Magnesol[®]) foi doado pela empresa The Dallas Group of América (Dallas, USA).

Dentre os solventes e reagentes utilizados neste trabalho, destacam-se: tetraidrofurano, acetonitrila, acetona, etanol (95% e 99,5%), n-heptano, n-hexano, hidróxidos de sódio e de potássio e padrões de ésteres etílicos (estearato, palmitato, linolenato, linoleato e oleato de etila) e de acilglicerídeos (mono, di e triacilglicerídeos), empregados na construção de curvas de calibração para a quantificação dos ésteres produzidos na reação. Todos estes insumos foram adquiridos comercialmente e utilizados como recebidos.

III.1. TRANSESTERIFICAÇÃO ALCALINA

III.1.1. Síntese dos Ésteres Etílicos Via Catálise Alcalina

O procedimento geral da reação de transesterificação etílica foi realizado segundo um planejamento fatorial do tipo 2^3 , tendo-se como níveis mínimos (-) e

máximos (+) as temperaturas de 40 e 70°C, percentuais de catalisador (NaOH e/ou KOH) de 0,3 e 0,5% (m/m) em relação à massa de óleo empregada e razões molares álcool:óleo de 6:1 e 12:1 (Tabela 7). O meio reacional foi agitado por 1h e, ao final deste tempo, o excesso de etanol foi evaporado sob pressão reduzida. A fase orgânica superior, contendo o éster, foi separada da fase glicerínica por decantação e submetida aos procedimentos de purificação descritos abaixo.

TABELA 7. MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2³

Experimento	RM álcool:óleo	NaOH/KOH (%)	Temperatura (°C)
1	6:1 (-)	0,3 (-)	40 (-)
2	12:1 (+)	0,3 (-)	40 (-)
3	6:1 (-)	0,5 (+)	40 (-)
4	12:1 (+)	0,5 (+)	40 (-)
5	6:1 (-)	0,3 (-)	70 (+)
6	12:1 (+)	0,3 (-)	70 (+)
7	6:1 (-)	0,5 (+)	70 (+)
8	12:1 (+)	0,5 (+)	70 (+)
PC*	9:1	0,4	55

PC* = ponto central, realizado em triplicata

III.1.2. Purificação dos Ésteres Etilícos Produzidos por Catálise Alcalina

As fases superiores, que continham os ésteres etílicos produzidos na reação, foram submetidas à lavagem com água quente (80°C), nas proporções de 10 a 20%

(v/v) do volume total de ésteres, para a remoção de glicerina livre, impurezas e álcali residual.

A fim de reduzir o teor de sabões, medidos pelo método AOCS Cc 17-79, e de melhorar a qualidade final do produto, foram testadas adições de 2% (m/m), em relação à massa de óleo, de Magnesol[®] (adsorvente composto por silicato de magnésio amorfo e sulfato de sódio anidro) ao sistema antes ou após a lavagem destes ésteres com água quente. O sistema foi agitado por 30min a 65°C e em seguida o material foi filtrado para a remoção e descarte do Magnesol[®].

III.1.3. Cálculo do Rendimento da Reação

O rendimento R_1 foi definido como o valor que expressa a massa da fração superior (M_{FS}) em relação à massa de óleo empregada (M_O). M_{FS} foi determinada a partir do volume e da densidade da fração superior ($M_{FS} = d_{FS} \cdot V_{FS}$) logo após a separação de fases do meio reacional, cuja indução foi realizada através da evaporação sob pressão reduzida do volume excedente de etanol. R_2 , que corresponde ao rendimento mássico dessa mesma fração superior após o processo de lavagem exaustiva com água, também foi expresso em relação à massa de óleo (M_O) para facilitar a sua comparação direta com os valores de R_1 . Nesse caso, M_{FSL} (massa da fração superior após lavagem) foi determinada da mesma forma que M_{FS} . Finalmente, o rendimento real em ésteres (Y_E) representa a razão entre o rendimento experimental ($M_{FSL} \cdot T_E$) e o rendimento teórico ($M_O \cdot FC$), que foi determinado de acordo com a estequiometria da reação. Portanto, para o cálculo de Y_E , M_{FSL} foi corrigido pelo teor em ésteres etílicos (T_E) que cada amostra apresentou por análise cromatográfica (vide III.3.1.), enquanto que M_O foi ajustado pelo fator de

conversão estequiométrica (FC = 1,053) para representar o rendimento máximo de recuperação dos ésteres etílicos a partir da massa de óleo utilizada na reação. É importante ressaltar que, para o cálculo de FC, as massas molares dos triacilglicerídeos e ésteres formados na reação corresponderam a uma média ponderada baseada na composição química do óleo de milho (MA e HANNA, 1999). As equações usadas para os cálculos dos rendimentos encontram-se na Figura 8.

FIGURA 8. EQUAÇÕES USADAS PARA O CÁLCULO DO RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO (KUCEK, 2004)

$$R_1 = \frac{M_{FS}}{M_O} \cdot 100 \quad R_2 = \frac{M_{FSL}}{M_O} \cdot 100 \quad Y_E = \frac{M_{FSL} \cdot T_E}{M_O \cdot FC} \cdot 100$$

III.1.4. Especificação dos Ésteres Etílicos Obtidos por Etanolise Alcalina

Os ésteres etílicos, obtidos através da etanolise do óleo de milho em meio alcalino, foram submetidos aos métodos padronizados de análise que se encontram descritos na especificação nacional do biodiesel, conforme a Resolução nº 42 da ANP, cujo procedimento emprega as metodologias descritas na Tabela 8.

Dos parâmetros descritos na Tabela 8, foram determinados: ponto de fulgor (°C); água e sedimentos (%), viscosidade cinemática a 40°C (mm²/s), enxofre (% m/m), resíduo de carbono (% m/m), índice de acidez (mg KOH/g), glicerina livre (% m/m), glicerina total (% m/m), massa específica a 20°C (kg/m³), álcool (% m/m), teor de ésteres totais (% m/m), monoacilglicerídeos (% m/m), diacilglicerídeos (% m/m), triacilglicerídeos (% m/m), aspecto e estabilidade oxidativa à 110°C (h). É importante salientar que os teores de ésteres totais e de acilglicerídeos não foram

determinados pelos métodos descritos na norma (vide item III.3.1), e que o teor de glicerina total (% m/m) corresponde ao valor calculado a partir da quantificação dos intermediários da reação.

TABELA 8. METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA ESPECIFICAÇÃO DO BIODIESEL

PROPRIEDADES	MÉTODOS
Aspecto	----
Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² /s)	NBR10441; D445; EN/ISO3104
Água e sedimentos (%)	D2709
Ponto de fulgor (°C)	NBR14598;
Teor de éster (% m/m)	Anotar
Destilação; 90% vol. recuperados, máx.	D1160
Resíduo de carbono (% m/m)	D4530; EN/ISO10370
Cinzas sulfatadas (% m/m)	NBR9842; D874; ISO3987
Enxofre (% m/m)	D5453; EN/ISO14596
Na + K (mg/kg)	prEN14108-9
Fósforo (mg/Kg)	EN 14107
Corrosividade ao cobre por 3h a 50°C	NBR14359; D130; EN/ISO2160
Número de cetano	D613; EN/ISO5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx	NBR14747
Índice de acidez (mg KOH/g)	NBR14448; D664; prEN14104
Glicerina livre (% m/m)	D6854; prEN14105-6
Glicerina total (% m/m)	D6854; prEN14105
Massa específica a 20°C (kg/m ³)	NBR7148/14065; D1298/4052
Número de iodo	prEN14111
Monoglicerídeos (% m/m)	D6584
Diglicerídeos (% m/m)	D6584
Triglicerídeos (% m/m)	D6584
Metanol ou Etanol (% m/m)	EN 14110
Estabilidade à oxidação a 110°C	prEN14112

III.2. TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

III.2.1. Síntese de Ésteres Etílicos Empregando Lipase de Origem Bacteriana

A bactéria utilizada neste trabalho correspondeu a uma cepa de *Burkholderia cepacia* recentemente isolada de uma contaminação em cultura de fungos (LIMA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2004; FERNANDES, 2004). Esta cepa foi caracterizada pelo Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e está depositada como CCOC-P2637 no Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ).

A produção de lipases foi realizada preferencialmente pela técnica de fermentação no estado sólido (FES), por esta ter sido relatada como a mais eficiente para a produção destas enzimas (FERNANDES, 2004). Amostras de torta de milho (TM) foram utilizadas como substrato para a FES, visando minimizar o custo de produção da lipase de *B. cepacia*.

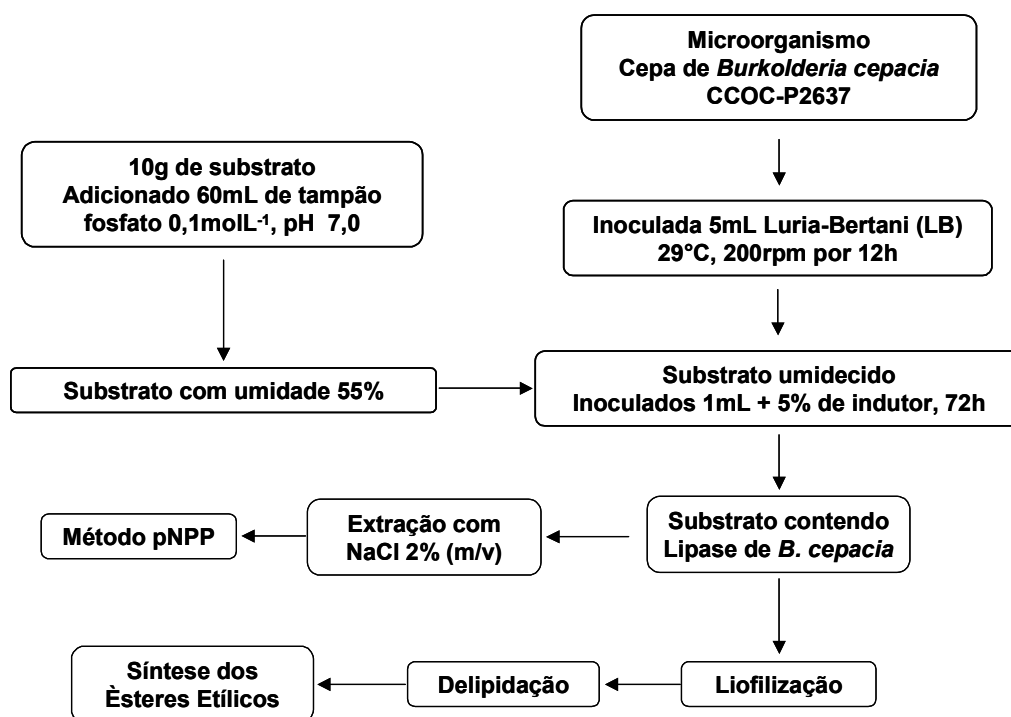
A fermentação no estado sólido foi realizada como mostra a Figura 9. A cepa de *B. cepacia* foi pré-inoculada em meio líquido de Luria-Bertani (LB), que foi utilizado como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento da bactéria. Em seguida, 1mL deste meio contendo a bactéria foi inoculado no substrato (torta de milho) previamente umedecido (55%), com a adição de óleo de milho como indutor para a produção das lipases.

Os experimentos foram realizados em erlemeyers de 500mL, com incubação em estufa. A TM biotransformada, contendo a lipase produzida por *B. cepacia*, foi liofilizada, delipidada (vide item III.2.1.5) e então utilizada nos experimentos de síntese de ésteres etílicos. Para a determinação da atividade lipolítica durante o

processo, o substrato parcialmente fermentado passou por uma extração com solução de NaCl 2% (m/v), para que então pudesse ser determinada a atividade utilizando o método de pNPP, conforme descrito em III.4. Esta atividade foi expressa como unidades por grama de sólido fermentado.

Para garantir condições estéreis de crescimento da bactéria, os meios sólidos de propagação, bem como todos os materiais utilizados, foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15min.

FIGURA 9. FLUXOGRAMA DA FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES POR *B. cepacia*



III.2.1.1. Manutenção da cepa de B. cepacia

Para sua manutenção, realizada mensalmente, a cepa de *B. cepacia* foi inoculada em 5mL do meio líquido Luria-Bertani (LB) e cultivada durante 12h, a 29°C e 200rpm. Após este período, o pré-inóculo foi adicionado a 45mL do meio LB e incubado durante 3h ou pelo tempo necessário para se atingir A_{600} igual a 0,6, valor este equivalente a 10^8 células/mL. Deste meio foi retirado 1mL e adicionado a 1mL de glicerol 40% (v/v), previamente autoclavado. A cepa foi então armazenada em congelador a -18°C.

III.2.1.2. Preparo do substrato para a fermentação

O substrato foi preparado pesando 10g de substrato seco e adicionando 60mL de tampão fosfato $0,1\text{mol.L}^{-1}$, pH 7,0, para uma umidade total de 55% no material hidratado (Fernandes, 2004). A determinação da umidade total do substrato foi realizada em um balança de infravermelho da marca Gehaka.

III.2.1.3. Preparação do inóculo e fermentação

O inóculo para as fermentações foi desenvolvido em meio LB, composto por 1% (m/v) de triptona, 1% (m/v) de NaCl e 0,5% (m/v) de extrato de levedura, a 29°C e 200rpm durante 6h. Os meios sólidos previamente umedecidos e autoclavados foram inoculados com 1mL do inóculo, a não ser nos experimentos onde foi avaliada a influência do volume do inóculo na produção da enzima. As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 250mL contendo 10g de torta de milho, que

foram umedecidos com tampão fosfato 0,1mol/L, pH 7,0, e adicionados de 5% de óleo de milho como indutor. Os frascos foram esterilizados em autoclave, resfriados e inoculados com 1mL do inóculo líquido. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 29°C, sem agitação, de onde foram retirados após 72h para extração da enzima.

III.2.1.4. Extração da enzima do sólido fermentado

A enzima foi extraída do material fermentado com 50mL de solução de NaCl 2% (m/v) para viabilizar a determinação da atividade lipolítica produzida. A mistura de sólido fermentado e a solução extratora foram agitadas em um agitador orbital durante 1h, a 29°C e 200rpm. A mistura foi filtrada em gaze e o sólido prensado manualmente para extração do líquido. O extrato resultante foi centrifugado por 10min a 10.000xg. O sobrenadante assim obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

III.2.1.5. Preparo da matriz contendo a enzima imobilizada

Após 72h de FES, a TM biotransformada contendo a lipase de *B. cepacia* foi liofilizada, a -46°C sob vácuo de 0,07mBar, em liofilizador da marca Jouan LP3®, modelo 60, e o material liofilizado foi armazenado a 4°C. Este processo foi monitorado pela determinação de variações na atividade lipolítica contida no meio, conforme o item III.4.

Para delipidação, o material liofilizado passou por várias etapas de extração em um agitador orbital a 200rpm por 10min, utilizando n-heptano como solvente. O

filtrado foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como padrões a trioleína e o ácido oléico. O eluente utilizado foi uma mistura de hexano:éter:ácido acético (7:3:0,1, v/v/v) e a visualização foi efetuada com vapores de iodo em câmara saturada.

III.2.1.6. Síntese dos ésteres etílicos com lipases de *B. cepacia*

A obtenção dos ésteres etílicos utilizando lipases de *B. cepacia* foi realizada utilizando alguns parâmetros previamente estabelecidos, como a temperatura, o tempo de reação e o tipo de solvente orgânico (FERNANDES, 2004), enquanto que a razão estequiométrica (álcool:óleo) e a quantidade de enzima foram diversificados de acordo com um planejamento experimental 2^2 para se obter a máxima porcentagem de conversão (Tabela 9). O meio reacional foi mantido em agitador orbital a 150rpm e 37°C por 120h. A reação foi monitorada por CCD e os ésteres formados foram caracterizados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H).

TABELA 9. MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2

Experimento	Razão molar (álcool:óleo)	Atividade lipolítica (U/gS)
1	3:1 (-)	16,9 (-)
2	3:1 (-)	67,6 (+)
3	6:1 (+)	16,9 (-)
4	6:1 (+)	67,6 (+)
5	4,5:1	43,9

III.2.2. Síntese de Ésteres Etílicos Empregando Lipases de Origem Vegetal

Neste trabalho, o látex desidratado de *C. papaya* (papaína) foi selecionado como modelo de lipase vegetal por ser de fácil extração e apresentar atividade lipolítica adequada para o desenvolvimento do estudo comparativo.

III.2.2.1. Preparo da matriz contendo a enzima imobilizada

A papaína de *C. papaya* (mamoeiro) foi obtida através de várias incisões longitudinais na casca do fruto verde, seguida de recuperação do exudato na forma de um látex de alta viscosidade. O material extraído foi então liofilizado a -46°C sob vácuo de 0,07mBar, em liofilizador da marca Jouan LP3[®], modelo 60. Em seguida, foi realizada a determinação da atividade lipolítica deste material, conforme o item III.4.

III.2.2.2. Síntese dos ésteres etílicos empregando papaína bruta

A síntese dos ésteres etílicos do óleo de milho, utilizando o látex do mamão liofilizado (papaína bruta), foi realizada a partir de um planejamento fatorial 2^4 , tendo-se como variáveis a temperatura, o grau de hidratação do etanol, a razão molar etanol:óleo e a atividade lipolítica (U/gS), sempre em níveis mínimos (-) e máximos (+) (Tabela 10).

Todas as reações do planejamento fatorial foram realizadas em solvente orgânico (n-heptano e n-hexano) por 120h para que a máxima porcentagem de conversão fosse obtida. O meio reacional foi mantido em agitador orbital a

aproximadamente 150rpm. O monitoramento das reações foi realizado por CCD e os ésteres formados foram caracterizados por CLAE e RMN-¹H.

TABELA 10. MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴

Exp.	RM álcool:óleo	Pureza do etanol (%)	Atividade lipolítica (U/gS)	Temperatura (°C)
1	3:1 (-)	95 (-)	4,3 (-)	37 (-)
2	6:1 (+)	95 (-)	4,3 (-)	37 (-)
3	3:1 (-)	99,5 (+)	4,3 (-)	37 (-)
4	6:1 (+)	99,5 (+)	4,3 (-)	37 (-)
5	3:1 (-)	95 (-)	8,6 (+)	37 (-)
6	6:1 (+)	95 (-)	8,6 (+)	37 (-)
7	3:1 (-)	99,5 (+)	8,6 (+)	37 (-)
8	6:1 (+)	99,5 (+)	8,6 (+)	37 (-)
9	3:1 (-)	95 (-)	4,3 (-)	55 (+)
10	6:1 (+)	95 (-)	4,3 (-)	55 (+)
11	3:1 (-)	99,5 (+)	4,3 (-)	55 (+)
12	6:1 (+)	99,5 (+)	4,3 (-)	55 (+)
13	3:1 (-)	95 (-)	8,6 (+)	55 (+)
14	6:1 (+)	95 (-)	8,6 (+)	55 (+)
15	3:1 (-)	99,5 (+)	8,6 (+)	55 (+)
16	6:1 (+)	99,5 (+)	8,6 (+)	55 (+)

III.3. MÉTODOS ANALÍTICOS INSTRUMENTAIS

As reações de transesterificação via catálise alcalina e enzimática foram acompanhadas por CLAE e por RMN-¹H, permitindo assim a análise qualitativa e quantitativa dos ésteres etílicos produzidos nestas reações.

III.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a determinação da qualidade dos ésteres etílicos produzidos, foram realizadas análises por CLAE. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu modelo LC10AD, provido de sistema de aquecimento de colunas CTO10A, amostrador automático SIL10A e sistema de controle e aquisição de dados CBM10A (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os componentes das amostras foram detectados por refratometria diferencial, com detector Shimadzu RID10A, e os dados cromatográficos foram tratados por software CLASS LC10 da Shimadzu, que também auxiliou no controle do processo de análise. As injeções foram realizadas por amostragem automática e o volume de injeção correspondeu a 20 μ L.

O método da cromatografia líquida de fase reversa quimicamente ligada (C-18) foi realizado em coluna Waters Spherisorb (4,6 x 250mm, 5 μ m), mantida a 35°C e eluída com acetonitrila:acetona, 9:1 (v/v) em eluição isocrática a 0,9mL/min. As respectivas curvas de calibração para análise quantitativa, por padronização externa, foram baseadas em soluções-padrão de ésteres etílicos dos ácidos linolênico, linoléico, oléico, palmítico e esteárico.

No método cromatográfico de CPG, foram utilizadas duas colunas Progel - TSK (2000 e 1000HXL, 30cm x 7,8mm) em série, mantidas a 45°C e eluídas com tetrahydrofurano (THF) a uma vazão de 0,8mL/min. A análise quantitativa por padronização externa foi efetuada com base em soluções-padrão de triacilglicerídeo (trioleína), diacilglicerídeo (dioleína), monoacilglicerídeo (monooleína) e éster etílico do ácido oléico (oleato de etila).

III.3.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-¹H)

A qualidade dos ésteres etílicos produzidos também foi monitorada por RMN-¹H com o objetivo de acompanhar variações no sinal dos hidrogênios do glicerol e dos ésteres etílicos. As análises de RMN-¹H foram realizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) em espectrômetro Bruker de 200MHz.

III.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO AQUOSO

Este método espectrofotométrico, descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Lima (2001), foi utilizado ao longo de todo o trabalho para determinar a atividade das diferentes preparações lipolíticas. O método é baseado na hidrólise enzimática do palmitato de *p*-nitrofenila em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, foi determinada por absorvância a 410nm (uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol/min de *p*NP). As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro de rede de fotodiodos da Hewlett-Packard 8452a, com banho termostatizado a 37°C. A reação foi acompanhada a cada 20s, durante 5min.

III.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas do extrato bruto foi feita de acordo com o método de Bradford (1976). Este método utiliza o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 para a determinação de proteínas totais. O BG-250 interage com proteínas que

contenham aminoácidos com cadeias laterais aromáticas ou básicas. No pH da reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente 595nm. As leituras dos valores de absorbância foram determinadas em espectrofotômetro Varian, modelo Cary 100, e a concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA, Sigma).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS ÉSTERES VIA CATÁLISE ALCALINA

Os ésteres etílicos foram produzidos por etanólise do óleo de milho (acidez de 0,1mg KOH/g de óleo) em meio alcalino, utilizando etanol anidro (0,66% de água) em excesso estequiométrico e empregando os hidróxidos de sódio ou de potássio como catalisadores.

Os planejamentos fatoriais 2^3 empregaram razões molares etanol:óleo (RM) de 6:1 e 12:1, temperaturas de 40 e 70°C e concentrações de 0,3 e 0,5% (m/m) de ambos, NaOH e KOH, sempre em relação à massa de óleo empregada na reação. A escolha destas condições foi baseada em estudos de otimização realizados com outras matérias-primas (ZAGONEL, 2000; ZAGONEL *et al.*, 2003; KUCEK, 2004; DOMINGOS, 2005), com o objetivo de alcançar os melhores rendimentos e as menores dificuldades nas etapas de purificação dos ésteres.

A primeira resposta coletada para indicar o sucesso da transesterificação foi o cálculo do rendimento mássico da fração superior (R_1). Para isso, foi necessário estudar a separação de fases entre os ésteres etílicos (fase superior) e o glicerol (fase inferior). Esta separação foi realizada quando o etanol foi retirado do meio reacional por simples evaporação em evaporador rotativo, diminuindo assim a solubilidade do glicerol nos ésteres e promovendo a separação de fases com rapidez e eficiência. Desta forma, o glicerol pode ser removido do meio de reação por simples decantação e, em seguida, a fração superior pode ser submetida às etapas posteriores de lavagem.

Embora alguns experimentos não tenham resultado em separação de fases (nsf), conforme demonstrado nas Tabelas 11 e 12, isto não significa que os rendimentos de tais reações foram nulos, mas apenas que os seus rendimentos não puderam ser expressos em termos de R_1 e R_2 (rendimento mássico da fase superior após a lavagem com água).

TABELA 11. RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO NaOH

Exp.	RM (álcool:óleo)	NaOH (%)	Temp. (°C)	Rendimento (%)		Sabão (ppm)
				R_1	R_2	
1	6:1	0,3	40	nsf	---	---
2	12:1	0,3	40	95,85	93,88	5156
3	6:1	0,5	40	90,54	86,32	7012
4	12:1	0,5	40	98,12	95,02	6941
5	6:1	0,3	70	nsf	---	---
6	12:1	0,3	70	95,62	93,41	5301
7	6:1	0,5	70	90,21	86,01	7115
8	12:1	0,5	70	98,08	94,97	6981
9 (PC1)	9:1	0,4	55	97,26	94,02	6521
10 (PC2)	9:1	0,4	55	97,34	94,08	6547
11 (PC3)	9:1	0,4	55	97,40	94,12	6539

R_1 = rendimento mássico da fração superior antes da lavagem; nsf = não separou fases.

R_2 = rendimento mássico da fração superior após a lavagem com água.

TABELA 12. RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO KOH

Exp.	RM (álcool:óleo)	KOH (%)	Temp. (°C)	Rendimento (%)		Sabão (ppm)
				R ₁	R ₂	
12	6:1	0,3	40	nsf	---	---
13	12:1	0,3	40	95,12	93,08	4212
14	6:1	0,5	40	91,15	87,42	6230
15	12:1	0,5	40	98,42	95,23	5978
16	6:1	0,3	70	nsf	---	---
17	12:1	0,3	70	95,22	93,11	4231
18	6:1	0,5	70	91,23	86,91	6106
19	12:1	0,5	70	98,39	95,02	5979
20 (PC1)	9:1	0,4	55	97,76	94,82	5539
21 (PC2)	9:1	0,4	55	97,71	94,79	5549
22 (PC3)	9:1	0,4	55	97,68	94,80	5545

R₁ = rendimento mássico da fração superior antes da lavagem; nsf = não separou fases.

R₂ = rendimento mássico da fração superior após a lavagem com água.

Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12, os rendimentos mássicos (R₁) dos ésteres aumentaram com o aumento do excesso de etanol no meio reacional, onde esse deve ser controlado para que o processo não acabe se tornando inviável. Foi ainda observado que o aumento da RM etanol:óleo reduziu a quantidade de catalisador necessária para a obtenção de um bom rendimento de reação, e que a temperatura, a exemplo de outros estudos de etanólise envolvendo matérias-primas diferentes (ZAGONEL, 2000; ZAGONEL *et al.*, 2003; KUCEK, 2004; DOMINGOS, 2005), não apresentou qualquer influência significativa sobre os cálculos de rendimento da reação.

A condução de planejamentos experimentais, cujas variáveis foram a RM etanol:óleo (RM), temperatura do meio reacional e a concentração de KOH ou NaOH empregadas, permitiu a determinação do efeito dos principais parâmetros de processo sobre o rendimento da etanólise. Os maiores rendimentos mássicos ($R_1 = 98,12$ e $98,42\%$) foram alcançados nas condições RM 12:1 (etanol:óleo) e 0,5 % (m/m) de catalisador. Entretanto, concentrações mais baixas de catalisador (0,3%) favoreceram a obtenção de um produto com menor índice de sabão e, conseqüentemente, de mais fácil purificação, evitando, assim, maiores perdas de rendimento (R_2) durante as etapas de lavagem. Embora a formação de sabões nas reações com o KOH tenha sido inferior à observada em experimentos com NaOH, o uso de KOH acarretou maiores dificuldades na separação de fases, como nitidez e tempo de separação. Devido a esses fatores, e pelo fato de ter apresentado rendimentos muito próximos aos do KOH, o NaOH foi selecionado como o catalisador de maior viabilidade para a reação. Sendo assim, os experimentos realizados no sentido de otimizar a purificação dos ésteres etílicos foram conduzidos apenas com produtos derivados da catálise com NaOH.

A fim de melhorar a qualidade dos ésteres, através da remoção de sabões produzidos durante a etanólise por adsorção física, foi testada a adição de Magnesol[®] (The Dallas Group of America), um produto comercial fundamentalmente composto por silicato de magnésio e sulfato de sódio anidro, antes e depois do processo de lavagem aquosa dos ésteres. No entanto, a adição de Magnesol[®] foi restrita apenas a algumas das reações realizadas com NaOH, com o objetivo de demonstrar as vantagens de seu uso no processo de purificação, reduzindo inclusive o gasto de água requerido pelo processo para a produção de ésteres de boa qualidade.

A Tabela 13 compara o teor de sabão nos ésteres etílicos antes de qualquer tipo de purificação, ou seja, o teor de sabões produzido nas reações de etanolise do óleo de milho, com aqueles derivados de um tratamento com 2% (m/m) de Magnesol[®] (quantidade indicada pelo fabricante para o uso em biodiesel). Após o tratamento adsorativo, o teor de sabões dos ésteres foi reduzido consideravelmente, indicando uma boa eficiência do adsorvente, mas não o suficiente para atingir os níveis necessários para garantir a qualidade do produto. Portanto, para resolver este problema, foi avaliado o emprego de uma etapa de lavagem com água quente (80°C) para condicionar os ésteres ao tratamento com Magnesol[®]. Este procedimento foi realizado para favorecer um aumento na eficiência de adsorção de sabões, procurando respeitar os limites de saturação evidenciados nos experimentos anteriores.

TABELA 13. TEOR DE SABÃO NOS ÉSTERES ETÍLICOS NÃO LAVADOS E DOS TRATADOS COM MAGNESOL[®]

Experimento	NaOH (%)	R ₂ (%)	Teor de sabão na fase superior (ppm)	
			não lavada	tratada c/ Magnesol [®]
23	0,2	86,03	5095	2767
2	0,3	93,88	5156	2912
24	0,4	95,98	5782	2974
4	0,5	95,02	6941	3015

* Reações realizadas com razão molar 12:1 a 40°C.

A lavagem aquosa reduziu o teor de sabões dos ésteres em aproximadamente 85% e o tratamento subsequente com Magnesol[®] a 2% (m/m)

contribuiu para a redução dos níveis de contaminação deste sub-produto a menos de 74 ppm (Tabela 14). Também foi constatado que o processo de adsorção reduziu a umidade residual dos ésteres a níveis inferiores a 200 ppm, contribuindo, assim, para uma eventual diminuição do consumo de energia na etapa final de secagem do produto.

TABELA 14. TEOR DE SABÃO NOS ÉSTERES ETÍLICOS LAVADOS COM ÁGUA A 80°C E DOS ÉSTERES LAVADOS E TRATADOS COM MAGNESOL®

Experimento	NaOH (%)	Teor de sabão na fase superior (ppm)		
		não lavada	lavada	lavada e tratada c/ Magnesol®
23	0,2	5095	789	61
2	0,3	5156	822	63
24	0,4	5782	831	72
4	0,5	6941	834	74

* Reações realizadas com razão molar 12:1 a 40°C

Em suma, o Magnesol®, por ser um adsorvente composto por silicato de magnésio amorfo e sulfato de sódio anidro, apresentou uma excelente eficiência na remoção de umidade, sabões residuais e, eventualmente, de outros compostos polares presentes nos ésteres etílicos (KUCEK, 2004; DOMINGOS, 2005). O produto assim obtido foi então submetido a uma seqüência de ensaios, de acordo com a Resolução 42 da Agência Nacional do Petróleo (ANP), para verificar a sua adequação às especificações nacionais do produto. Os únicos parâmetros em desconformidade foram o teor de glicerina total e a estabilidade à oxidação (Tabela 15). Por esta razão, fica evidente a necessidade de uma segunda etapa de

etanólise, sob condições eventualmente análogas às realizadas anteriormente, para que estes atinjam os limites de glicerina total estabelecidos na Resolução 42 da ANP.

TABELA 15. ESPECIFICAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS DO ÓLEO DE MILHO, DE ACORDO COM OS LIMITES ESTABELECIDOS PELA RESOLUÇÃO 42 DA ANP

Propriedades	Limites	Ésteres Etílicos
Ponto de fulgor (°C)	100 mín.	186,3
Água e sedimentos (%)	0,05 máx.	<0,005
Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² /s)	Anotar	4,81
Enxofre (% , m/m)	Anotar	<0,0005
Resíduo de carbono (% , m/m)	0,1 máx.	0,025
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,80 máx.	0,34
Glicerina livre (% , m/m)	0,02 máx.	<0,02
Glicerina total (% , m/m)	0,38 máx.	1,07
Massa específica a 20°C (kg/m ³)	Anotar	875,7
Álcool (% , m/m)	0,50 máx.	<0,50
Monoacilglicerídeos (% , m/m)	Anotar	3,30
Diacilglicerídeos (% , m/m)	Anotar	2,23
Triacilglicerídeos (% , m/m)	Anotar	0,14
Aspecto	LII	LII
Estabilidade oxidativa à 110°C (h)	6 mín.	2 – 3

De fato, a hipótese discutida acima já foi comprovada por vários autores para os óleos de soja (KUCEK, 2004), girassol e nabo forrageiro (DOMINGOS, 2005), sendo inclusive possível reduzir consideravelmente o requerimento de NaOH e etanol anidro necessários para atingir este objetivo. Por outro lado, os dados da Tabela 15 demonstraram que o emprego de agentes anti-oxidantes, como aqueles usualmente empregados na indústria de óleos vegetais como o 2-t-butil-4-metoxifenol (BHA), o 2,6-di-t-butil-4-metilfenol (BHT) ou o t-butil-hidroquinona (TBHQ), será necessário para ajustar o período de indução destes ésteres ao estabelecido pela norma vigente.

Domingos (2005) demonstrou que, para a correção do período de indução de ésteres etílicos com estabilidade oxidativa relativamente baixa (3 a 4h de acordo com o método Rancimat), foi necessário o emprego de 1000 a 2000 ppm de anti-oxidantes sintéticos e que, neste sentido, o TBHQ e o BHT apresentam melhor eficiência que o BHA. Como estes estudos foram realizados com óleos triacilglicéricos similares ao óleo de milho (*e.g.*, óleos de soja, girassol e nabo forrageiro), estima-se que a aditivação do éster etílico de óleo de milho com pelo menos 2000 ppm de um destes dois anti-oxidantes seja mais do que suficiente para ajustar a sua estabilidade oxidativa à especificação. No entanto, esta hipótese ainda necessita ser comprovada através de testes específicos que não foram realizados neste estudo. É importante salientar que os limites de tolerância para os teores de mono-, di- e triacilglicédeos ainda não foram especificados pela ANP, apesar do reconhecimento de que estes parâmetros são de extrema importância para o controle de qualidade do biodiesel. Os valores obtidos neste trabalho (Tabela 15) foram condizentes com o teor de glicerina total, reiterando, uma vez mais, que os monoacilglicédeos são os principais intermediários de reação que contaminam o

produto da etanólise de óleos vegetais e gordura animal (ZAGONEL, 2000; ZAGONEL *et al.*, 2003; KUCEK, 2004).

IV.1.1. Análise dos Ésteres por Métodos Cromatográficos

Para a análise dos ésteres etílicos por cromatografia de fase reversa (C18), foi necessária a construção de curvas de calibração para os principais ésteres etílicos obtidos na etanólise do óleo de milho. Os resultados das análises demonstraram que todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, podendo assim, identificar quais ácidos graxos fazem parte da composição do óleo de milho (Figura 10).

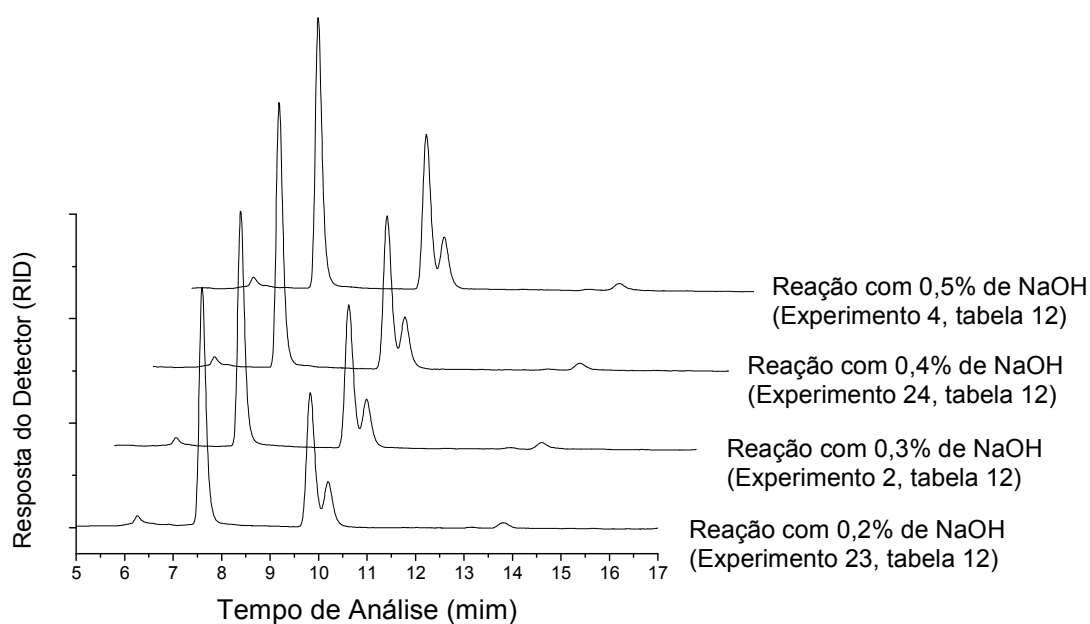
Através destas análises, foram identificados no produto final da etanólise do óleo de milho, os seguintes ésteres etílicos juntamente com seus respectivos tempos de retenção (t_r) como o linolenato de etila ($t_r = 6,3$ min), linoleato de etila ($t_r = 7,5$ min), oleato de etila ($t_r = 9,6$ min), palmitato de etila ($t_r = 10,1$ min) e o estearato de etila ($t_r = 13,7$ min).

No entanto, esta análise não permitiu a determinação de mono, di e triacilglicerídeos, porque estes componentes não se mostraram solúveis na fase móvel empregada na análise cromatográfica e foram segregados durante o procedimento de preparo das amostras.

Sendo assim, para determinar a quantidade destes acilglicerídeos não reagidos (quantificação realizada apenas para os ésteres etílicos submetidos aos testes para a especificação do produto, Tabela 15), juntamente com o teor de ésteres etílicos presentes em cada produto de reação, foi necessária a utilização da técnica de cromatografia de permeação em gel (CPG), cujo princípio fundamenta-se na

separação das diferentes classes de intermediários presentes no meio reacional, como os triacilglicerídeos, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e os ésteres etílicos (ZAGONEL, 2000). Após a quantificação do teor de ésteres etílicos foi possível obter o rendimento real (Y_E) em cada um dos experimentos realizados (Tabela 16).

FIGURA 10. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA REAÇÃO DE ETANÓLISE EM MEIO ALCALINO DO ÓLEO DE MILHO. (REAÇÕES REALIZADAS COM RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 12:1 À 40°C)



Após estas análises, foi possível observar, que os melhores resultados foram obtidos quando o maior excesso estequiométrico de etanol foi empregado (RM de 12:1), independentemente da temperatura da reação. Portanto, novos experimentos foram realizados, variando apenas a quantidade de álcali para que se pudesse

avaliar sua eventual influência no rendimento da reação e na qualidade final do produto.

TABELA 16. TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS (T_E) E RENDIMENTO REAL (Y_E) DAS REAÇÕES COM NaOH

Exp.	RM (álcool:óleo)	NaOH (%)	Temp. (°C)	Rendimento (%)		Sabão (ppm)	T_E (%)	Y_E (%)
				R_1	R_2			
1	6:1	0,3	40	nsf	---	---	---	---
2	12:1	0,3	40	95,85	93,88	5156	96,54	86,32
3	6:1	0,5	40	90,54	86,32	7012	97,82	80,42
4	12:1	0,5	40	98,12	95,02	6941	99,67	90,20
5	6:1	0,3	70	nsf	---	---	---	---
6	12:1	0,3	70	95,62	93,41	5301	96,52	85,87
7	6:1	0,5	70	90,21	86,01	7115	97,79	80,10
8	12:1	0,5	70	98,08	94,97	6981	99,61	90,10
9 (PC1)	9:1	0,4	55	97,26	94,02	6521	97,65	87,44
10 (PC2)	9:1	0,4	55	97,34	94,08	6547	97,59	87,44
11 (PC3)	9:1	0,4	55	97,40	94,12	6539	97,62	87,50

A Tabela 17 demonstra a dependência observada entre o rendimento de etanolise e a concentração de NaOH empregada no sistema. Nestes casos, é importante observar que a RM foi mantida em 12:1 e a temperatura em 40°C, para facilitar a comparação dos resultados.

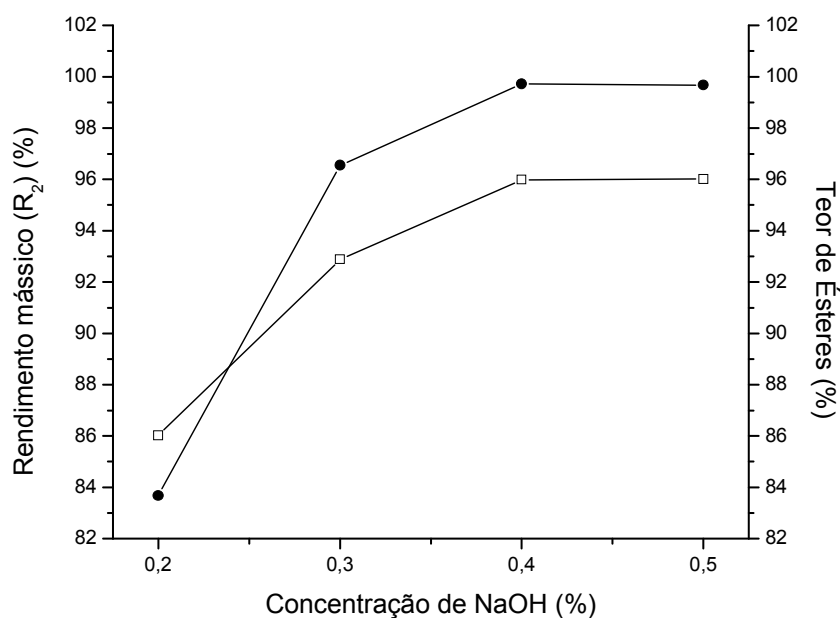
Os dados apresentados demonstraram que o rendimento R_2 variou proporcionalmente ao aumento da concentração de catalisador até o limite de 0,4% (m/m) de NaOH, a partir do que este parâmetro deixou de exercer um efeito positivo sobre rendimento (Tabela 17). Esse efeito pode ser visualizado na Figura 11, onde,

a partir de 0,4% (m/m) de NaOH, nenhuma variação foi observada no rendimento final e na qualidade final do produto da reação.

TABELA 17. EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH SOBRE O RENDIMENTO DE ETANÓLISE

Experimento	NaOH (%)	R ₂ (%)	Teor de Ésteres (%)	Y _E (%)
23	0,2	86,03	83,68	68,56
2	0,3	93,88	96,54	86,32
24	0,4	95,98	99,72	91,15
4	0,5	95,02	99,67	90,20

FIGURA 11. RENDIMENTO MÁSSICO (R₂) (□) E TEOR DE ÉSTERES (●) DE ACORDO COM A QUANTIDADE DE CATALISADOR (NaOH) UTILIZADA NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE COM RAZÃO MOLAR ETANOL:ÓLEO 12:1 A 40°C



IV.1.2. Análise dos Ésteres por Métodos Espectroscópicos

A espectroscopia de RMN-¹H foi utilizada com o propósito de caracterizar os ésteres etílicos obtidos por transesterificação alcalina a partir do óleo de milho. Essa técnica nos permite observar a evolução da reação de etanolise através do desaparecimento de sinais característicos dos triacilglicerídeos ao longo do tempo, uma vez que, no início da reação apenas estes sinais são observados. Portanto, para fins comparativos, foi necessário obter os espectros de RMN-¹H do óleo de milho, de um padrão do éster etílico (neste caso o oleato de etila, um dos ésteres obtidos na transesterificação do óleo de milho) e dos ésteres etílicos obtidos na reação de transesterificação.

Os espectros de RMN-¹H, obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl₃), tiveram o número relativo de hidrogênios calculado em cada grupo baseando-se na integração dos hidrogênios metilênicos entre 4,05 e 4,40ppm.

Segundo Costa Neto (2002), o espectro de RMN-¹H do óleo de soja apresenta oito conjuntos de sinais identificados como: a) hidrogênios olefínicos e um hidrogênio metínico do glicerol (5,1 a 5,5ppm); b) hidrogênios metilênicos do glicerol (4,05 a 4,40ppm); c) hidrogênios dialilmetilênicos (2,6 a 2,9ppm); d) grupos metilênicos α -carboxílicos (2,2 a 2,4ppm); e) grupos metilênicos vizinhos aos carbonos insaturados (1,9 a 2,1ppm); f) grupos metilênicos vizinhos aos átomos de carbonos saturados (1,5 a 1,7ppm); g) grupos metilênicos ligados a dois átomos de carbonos saturados (1,1 a 1,4ppm) e h) grupos metilas terminais (0,7 a 0,9ppm). Este mesmo conjunto de sinais, também foi observado no espectro RMN-¹H do óleo de milho (Figura 12), onde os sinais de maior importância se encontram na região de 4,05 a 4,40ppm (Figura 13), que corresponde à interação dos quatro hidrogênios

Comparando os espectros anteriores com o espectro de RMN-¹H dos ésteres etílicos obtidos no experimento 23 da Tabela 17 (Figura 15), observa-se uma sobreposição de sinais dos hidrogênios do grupo etoxila dos ésteres com os metilênicos do triacilglicerídeo na região de 4,05-4,40ppm, indicando uma conversão apenas parcial dos triacilglicerídeos em ésteres. Por outro lado, na Figura 16 (experimento 24 da Tabela 17), o espectro de RMN-¹H não apresentou esta sobreposição, confirmando a melhor taxa de conversão dos triacilglicerídeos em ésteres, que já havia sido constatado por cromatografia de fase reversa de experimentos conduzidos com razão molar de 12:1.

FIGURA 13. ESPECTRO DE RMN-¹H DO ÓLEO DE MILHO EVIDENCIANDO O ACOPLAMENTO DOS HIDROGÊNIOS METILÊNICOS DA PARTE GLICERÍDICA [200MHz, CDCl₃]

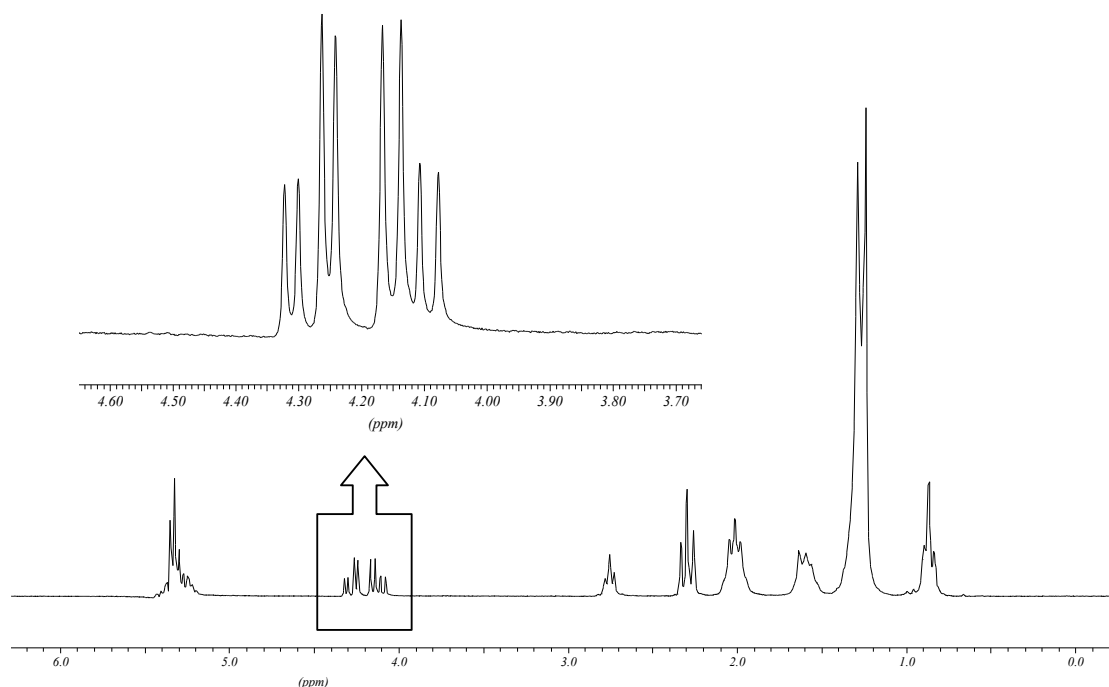


FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN-¹H DO OLEATO DE ETILA EVIDENCIANDO OS SINAIS DO GRUPO METILÊNICO DA ETOXILA [200MHz, CDCl₃]

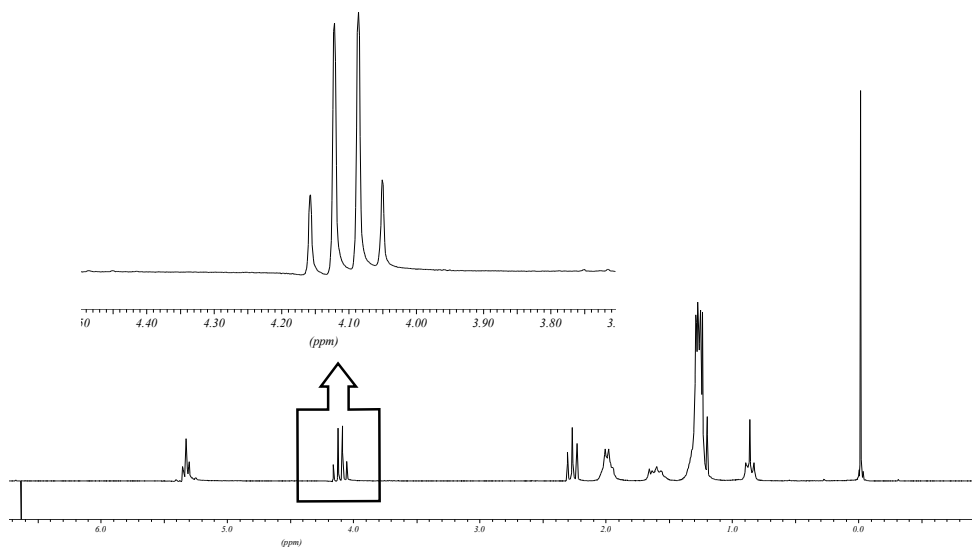


FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN-¹H DOS ÉSTERES ETÍLICOS EVIDENCIANDO OS SINAIS DO GRUPO METILÊNICO DA ETOXILA [200MHz, CDCl₃, 0,2% DE NaOH]

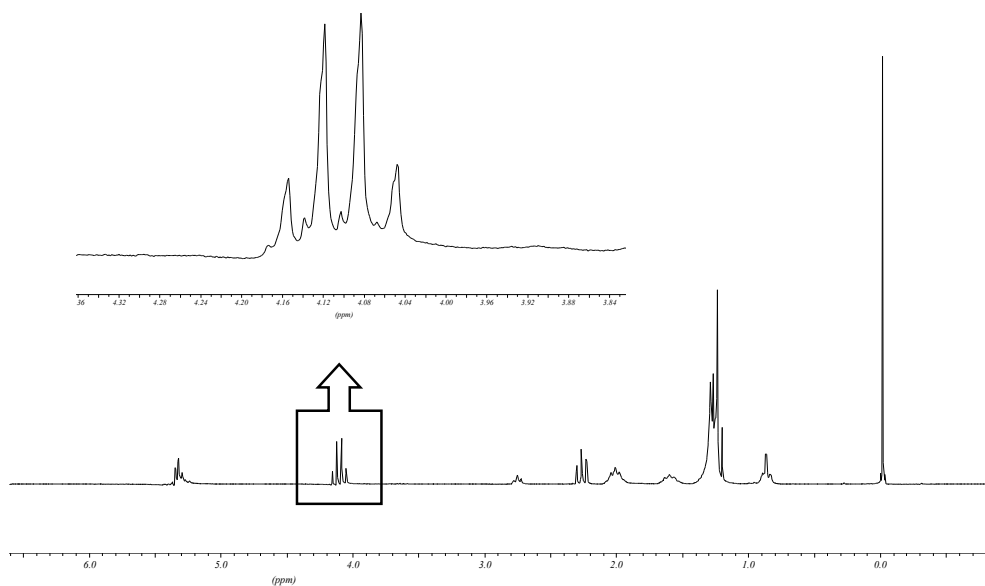
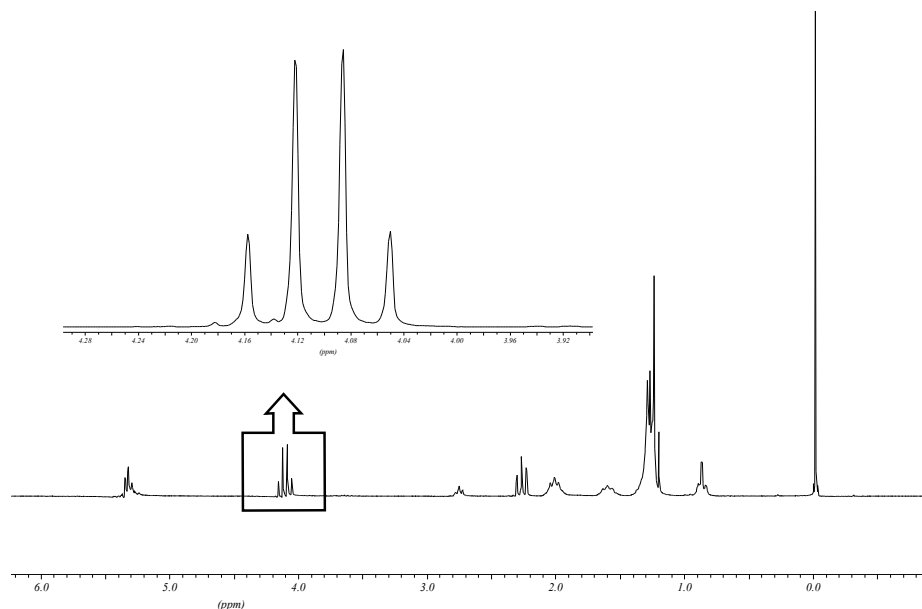


FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN-¹H DOS ÉSTERES ETÍLICOS EVIDENCIANDO OS SINAIS DO GRUPO METILÊNICO DA ETOXILA [200MHz, CDCl₃, 0,4% DE NaOH]



IV.2. SÍNTESE DOS ÉSTERES ETÍLICOS VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

A utilização de lipases como catalisadores industriais apresentam diversas vantagens em relação à catálise química. O uso de lipases permite a síntese de compostos de alta pureza, com procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (WATANABE *et al.*, 2001; DEL RÍO *et al.*, 2000; PAIVA e MALCATA, 1997).

Apesar de todas as vantagens, as enzimas ainda apresentam importantes limitações tecnológicas, como o elevado custo do processo, a disponibilidade de mercado ainda restrita e a exigência de tempos de reação considerados proibitivos para um processo industrial. No entanto, recentes evoluções na área da tecnologia

enzimática tendem a minimizar estes problemas, fazendo com que a tecnologia enzimática possa vir a ser considerada uma alternativa viável a transesterificação. Como o objetivo de minimizar os custos do processo enzimáticos, foram realizados estudos utilizando com enzimas brutas de origem vegetal e bacteriana eliminando assim etapas de purificação destas enzimas diminuindo o custo do processo.

IV.2.1. Biocatálise Empregando Lipases Bacterianas de *B. cepacia*

A fermentação no estado sólido (FES) apresenta vantagens em relação à fermentação submersa (FS), como a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como substratos, material este abundante no Brasil e que normalmente oferece um potencial poluente devido a problemas inerentes ao seu descarte.

Neste estudo, o processo de fermentação no estado sólido foi realizado utilizando a torta de milho como substrato para a produção de lipases de *B. cepacia*. Este substrato foi preparado de acordo com os estudos de fermentação realizados por Fernandes (2004), onde se fez necessária a adição de um indutor (óleo de milho a 5%) para que houvesse uma elevada produção de lipase no processo.

Segundo Mitchell *et al.* (2000), teores reduzidos de umidade nos substratos desfavorecem o desenvolvimento bacteriano em FES. Estudos realizados por Fernandes (2004) demonstraram que cultivos realizados em baixa concentração de água no meio (35%) não apresentaram atividade lipolítica significativa, enquanto que, ao elevar os teores de água para valores mais elevados (55%), esta atividade apresentou seu máximo em 72h de fermentação (FERNANDES, 2004).

Este procedimento foi então empregado neste estudo para a obtenção de lipases bacterianas, que seriam subseqüentemente utilizadas para a produção de ésteres etílicos em sistemas aquo-restritos. O biocatalisador empregado foi produzido por liofilização da torta de milho biotransformada por 72h, buscando a imobilização das lipases de *B. cepacia* em uma matriz que introduzisse o mínimo de água no meio reacional, pois a água poderia deslocar o equilíbrio da reação no sentido das reações de hidrólise. Neste sentido, foi constatado que, após a etapa de liofilização, o substrato contendo as lipases apresentou uma umidade de 2,5%.

Após o processo de FES para a produção de lipases por *B. cepacia*, foi necessária a eliminação dos lipídeos do material fermentado para que estes não viessem a interferir nas reações de síntese, ao atuarem como substratos naturais para a enzima. Assim, foram realizados experimentos de delipidação por extrações sucessivas com solvente, até que, por cromatografia em camada delgada (CCD), não fosse mais possível verificar a presença destes componentes no biocatalisador liofilizado. Nove extrações consecutivas foram realizadas até que lipídeos não foram mais observados por CCD e, neste caso, verificou-se também que a enzima não perdeu atividade (33,8 U/g de substrato seco) durante os tratamentos de liofilização e de delipidação, permanecendo estável até mesmo por vários meses de armazenamento a 4°C.

IV.2.1.1. Síntese dos ésteres etílicos com lipases de B. cepacia

Os ésteres etílicos do óleo de milho (acidez de 0,1mg KOH/g de óleo) foram obtidos através da reação de transesterificação enzimática em solvente orgânico (n-

heptano), utilizando etanol 99,5% e torta de milho liofilizada contendo a lipase de *B. cepacia* com atividade lipolítica total de 33,8 U/g de substrato seco (U/gSS).

Inicialmente, os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento fatorial 2^2 a 37°C por 120h (Tabela 18), empregando razões molares álcool:óleo de 3:1 (210mmol/L:70mmol/L) e 6:1 (420mmol/L:70mmol/L) e atividades lipolíticas de 16,9 e 67,6U/g de substrato (óleo de milho) em 15mL de n-heptano. Estes experimentos foram monitorados a cada 24h por CCD, e através deste monitoramento, foi possível acompanhar ao menos qualitativamente o andamento da reação. Uma vez transcorridas por 120h, os meios de reação foram filtrados, evaporados, reconstituídos em solvente apropriado e analisados por cromatografia de permeação em gel (CPG) para quantificação dos ésteres e demais intermediários da reação (Figura 17). Esta análise teve como princípio a separação das diferentes classes de intermediários presentes no meio reacional, como os triacilglicerídeos, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e os ésteres etílicos propriamente ditos (ZAGONEL, 2000).

A quantificação foi realizada através do método de padronização externa, cujas curvas de calibração foram construídas com padrões de oleato de etila (representando os ésteres etílicos derivados dos ácidos graxos presentes no óleo de milho) e dos mono, di e triacilglicerídeos derivados do ácido oléico (monooleína, dioleína e trioleína).

Os experimentos utilizando lipases de *B. cepacia* (Tabela 18) demonstraram um acréscimo, embora que pequeno, no teor de ésteres etílicos obtidos quando a etanolise foi realizada com 100% de excesso estequiométrico (RM álcool:óleo 6:1). No entanto, o efeito principal mais significativo esteve claramente associado ao

aumento da atividade lipolítica que, no experimento 4, levou a um produto cujo teor de ésteres etílicos correspondeu a 94,73%.

FIGURA 17. CROMATOGRAMA DA ANÁLISE POR CPG DA REAÇÃO DE ETANÓLISE NAS MELHORES CONDIÇÕES (RM DE 6:1, ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE 67,8U/gS)

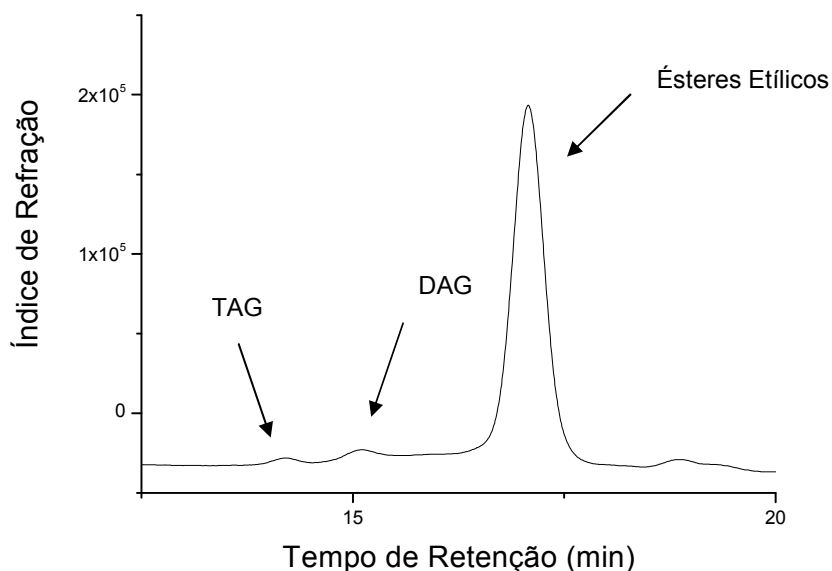


TABELA 18. PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 PARA AVALIAR A ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO POR LIPASES DE *B. cepacia*

Experimento	Razão molar (álcool:óleo)	Atividade lipolítica (U/gS)	Teor de ésteres (%)
1	3:1	16,9	82,47
2	3:1	67,6	94,15
3	6:1	16,9	85,42
4	6:1	67,6	94,73
5*	4,5:1	43,9	93,12 +/- 0,11

* Triplicata realizada no ponto central do planejamento fatorial 2^2 .

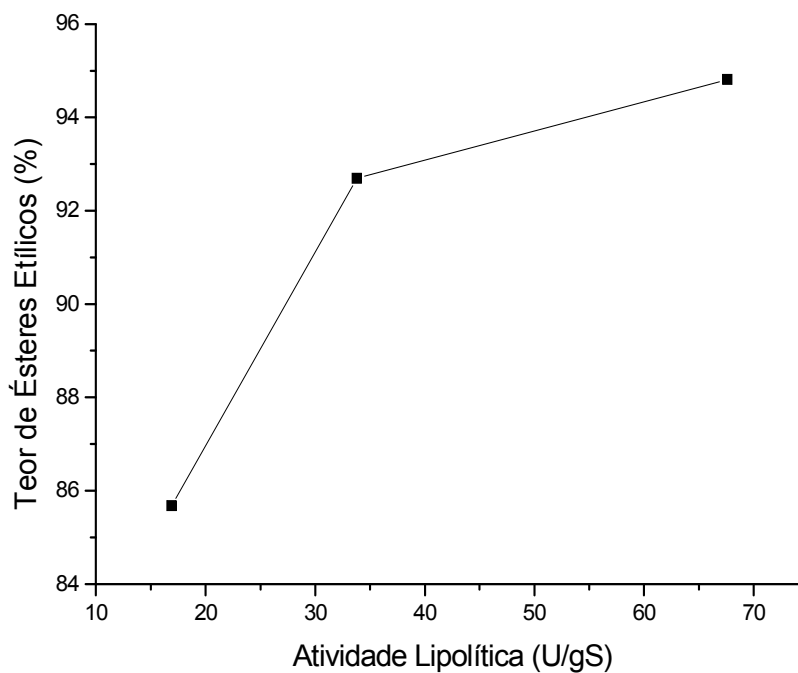
É também importante ressaltar que os resultados deste planejamento foram bastante significativos, como pode ser observado pelo desvio padrão relativo (DPR) obtido a partir da triplicata realizada em seu ponto central (0,12%). Portanto, pode-se concluir que os dados apresentados neste experimento foram bastante confiáveis, assim como quaisquer outros resultados cujo DPR tenha sido tão baixo.

Para confirmar o efeito do aumento da massa enzimática sobre a conversão dos triacilglicerídeos em ésteres etílicos, foram realizados novos experimentos a uma mesma RM (etanol:óleo de 6:1) empregando diferentes atividades lipolíticas (U/gS), mantendo constante as demais condições de reação (15mL de n-heptano, 37°C) (Tabela 19). Os resultados demonstraram que o aumento da atividade é acompanhado por um aumento substancial no teor de ésteres do produto, mas esta tendência apresentou um comportamento logarítmico, demonstrando que, a partir de um certo ponto, o aumento da atividade já não mais favorece uma melhora na formação do produto final (Figura 18). Assim, a melhor condição para a etanólise do óleo de milho que foi aquela em que 67,8U/gS de atividade lipolítica foi empregada a uma RM etanol:óleo de 6:1 na temperatura de 37°C, sendo que esta mesma condição foi utilizada para uma avaliação preliminar da cinética da reação.

TABELA 19. RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE COM LIPASES DE *B. cepacia*, UTILIZANDO ÓLEO DE MILHO COMO SUBSTRATO

Experimento	Razão molar (álcool:óleo)	Atividade lipolítica (U/gS)	Teor de ésteres (%)
6	6:1	16,9	85,68
7	6:1	33,8	92,69
8	6:1	67,8	94,81

FIGURA 18. RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DO RENDIMENTO DA REAÇÃO E A VARIAÇÃO NA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM REAÇÕES UTILIZANDO RM DE 6:1 A 37°C



IV.2.1.2. Acompanhamento cinético da síntese dos ésteres etílicos com lipases de *B. cepacia*

Para o acompanhamento cinético da reação, experimentos realizados isoladamente por 6, 12, 24, 48, 72 e 120h de reação foram interrompidos e alíquotas foram coletadas para que o grau de conversão fosse determinado por RMN-¹H.

As reações de etanólise realizadas conforme o experimento 8 da Tabela 19, foram caracterizadas através da análise dos sinais sobrepostos na região de 4,05 a 4,40ppm do espectro de RMN-¹H. Esta região compreende os sinais referentes aos acoplamentos dos hidrogênios metilênicos do glicerol e hidrogênios metilênicos da

etoxila do éster etílico. Sendo assim, após 12h, esta sobreposição foi observada com grande intensidade (Figura 19), indicando uma baixa conversão dos ésteres neste período.

À medida que aumenta o teor de ésteres nas reações de etanólise do óleo de milho esta sobreposição dos sinais diminuiu, fato este, observado após 24h de reação (Figura 20). Este comportamento observado nas reações de etanólise utilizando lipases de *B. cepacia* permite com que as reações anteriormente conduzidas por até 120h possam ser interrompidas após 24h e em seguida outra reação de etanólise possa ser realizada utilizando biocatalisadores reciclados.

FIGURA 19. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM LIPASE DE *B. cepacia*, APÓS 12H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCl₃]

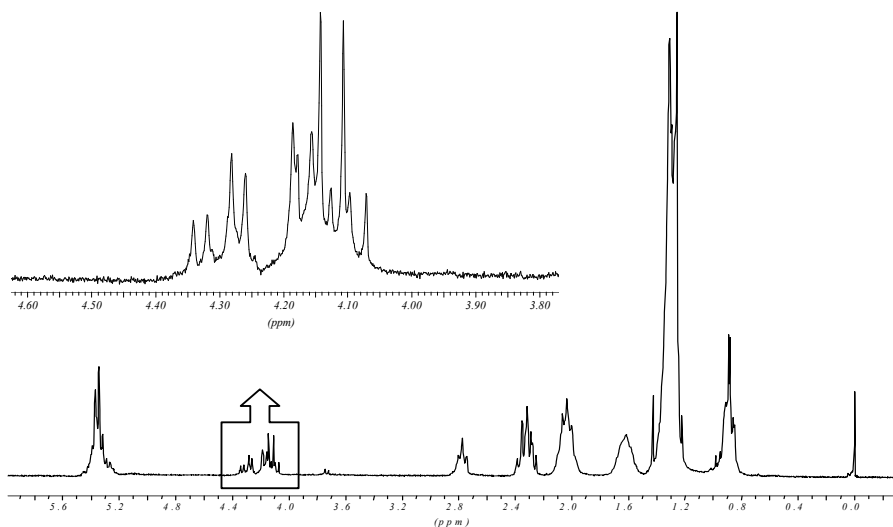
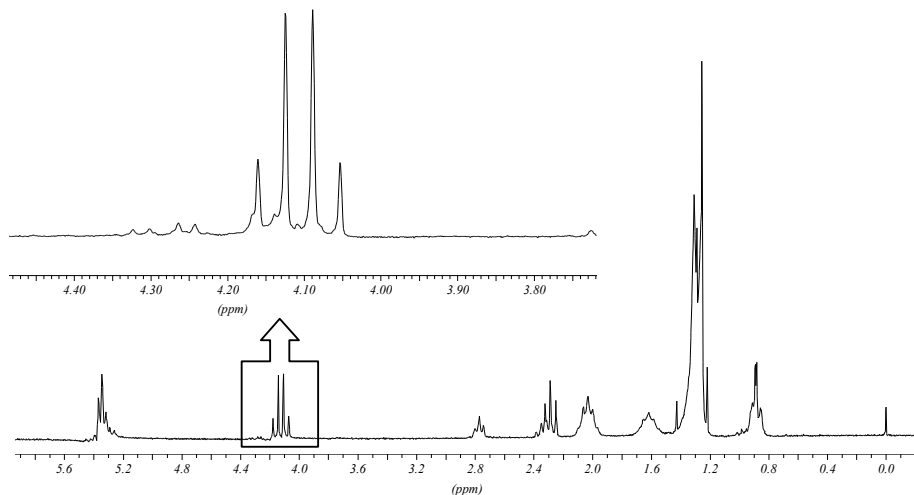


FIGURA 20. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM LIPASE DE *B. cepacia*, APÓS 24H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCl₃]



IV.2.1.3. Reutilização da lipase de *B. cepacia* na síntese dos ésteres

Após o biocatalisador contendo as lipases de *B. cepacia* ter sido utilizado para a etanólise do óleo de milho, de acordo com as condições descritas no experimento 7 da Tabela 19, um experimento adicional foi conduzido para avaliar a susceptibilidade deste produto à reutilização. Para tanto, a massa do biocatalisador foi centrifugada por 10min a 10.000xg e lavada subsequentemente com n-heptano para eliminar todo o meio reacional. O biocatalisador reciclado foi então reutilizado para a transesterificação de uma nova partida de óleo de milho, em condições idênticas às anteriores (RM etanol:óleo de 3:1 com atividade lipolítica de 33,8U/gS em 15mL de n-heptano à 37°C por 120h). Como resultado, houve uma redução de aproximadamente 10% no índice de conversão de triacilglicerídeos em ésteres etílicos, proporcionando um rendimento de 82,06% na reação. Embora as razões

que motivaram esta perda de atividade ainda não tenham sido esclarecidas, este experimento demonstrou que o biocatalisador em estudo apresenta um bom potencial para operação em reatores contínuos ou de batelada alimentada. No entanto, esta alternativa ainda deverá ser motivo de investigações futuras, para que o processo venha a ser minimamente otimizado.

IV.2.1.4. Emprego do óleo bruto de milho

A “winterização” é um processo relativamente caro que exige a instalação de operações unitárias bastante complexas. Por esta razão, o óleo bruto de milho foi tentativamente empregado como substrato para a etanólise catalisada por lipases de *B. cepacia* visando averiguar se algum de seus constituintes químicos poderia comprometer a eficiência do processo de transformação.

A reação em que o óleo bruto foi empregado obteve-se 88,80% de conversão. Isto representa uma redução de apenas 4,2% em relação à taxa de conversão obtida anteriormente com o óleo de milho “winterizado” (Tabela 19) em experimento realizado nas mesmas condições experimentais (RM etanol:óleo de 3:1 com atividade lipolítica de 33,8U/gS em 15mL de n-heptano à 37°C por 120h). Embora não tenham sido realizados novos ensaios para otimizar a taxa de conversão do óleo bruto, a perda de rendimento de 4,2% pode representar nada mais do que a diferença que existe entre o seu teor de triacilglicerídeos e aquele observado no óleo de milho “winterizado”, cujo processo de produção elimina importantes componentes não glicéricos do óleo, como ceras, pigmentos e outros componentes minoritários. Portanto, este resultado foi considerado bastante animador, pois demonstra que a biocatálise é mais tolerante a desconformidades na composição química da matéria-

prima e isso poderá representar ganhos importantes no balanço energético e na economia do processo. No entanto, ésteres produzidos a partir do óleo bruto ainda deverão ser submetidos às normas de especificação para avaliar o seu enquadramento nos critérios de qualidade por ela exigidos.

IV.2.1.5. Mudança de solvente orgânico na reação de síntese

A reação de etanolise do óleo de milho “winterizado” (acidez de 0,1mg KOH/g de óleo) com lípases de *B. cepacia* também foi realizada substituindo o solvente orgânico apolar (n-heptano) por um solvente polar, neste caso, o próprio agente de transesterificação (etanol 99,5%) na mesma proporção volumétrica (15mL) e nas mesmas condições experimentais empregadas anteriormente (torta de milho liofilizada contendo atividade lipolítica de 33,8 U/gS, à 37°C por 120h).

A conversão da reação utilizando etanol 99,5% como solvente foi de 51,54%. Portanto, com esta mudança no solvente orgânico, a atividade lipolítica apresentou um decréscimo de 44,4% na conversão dos éteres, em comparação aos resultados obtidos no experimento 7 da Tabela 19. Provavelmente, o etanol anidro causou a desidratação do substrato liofilizado onde a enzima se encontrava imobilizada. Desta forma, parte da atividade lipolítica pode ter sido perdida por desnaturação, levando ao decréscimo observado no rendimento final. Novos experimentos deverão ser conduzidos para avaliar se o emprego de etanol hidratado (95%) poderá melhorar o rendimento da reação, em uma tentativa de eliminar o solvente orgânico (n-heptano) do processo.

IV.2.2. Biocatálise Empregando Lipases de Origem Vegetal

Embora lipases bacterianas tenham se demonstrado tecnicamente viáveis para a etanólise de óleos vegetais, a necessidade da condução de processos fermentativos para a produção do biocatalisador pode se revelar problemático para a viabilidade econômica do processo. Por esta razão, lipases de origem vegetal, como aquelas produzidas por espécies dos gêneros *Carica* sp. e *Ficus* sp., poderão se revelar como alternativas interessantes para aplicação direta neste bioprocessos. Esta hipótese foi investigada neste estudo através do emprego de papaína bruta, um látex multienzimático isolado dos frutos verdes de *Carica papaya* (mamoero). Nestes experimentos, ésteres etílicos foram obtidos do óleo de milho (acidez de 0,1mg KOH/g de óleo) através da etanólise em solvente orgânico empregando uma amostra de papaína bruta liofilizada, cuja atividade lipolítica total correspondeu a 43U/g de material liofilizado.

IV.2.2.1. Síntese dos ésteres etílicos empregando papaína bruta

Inicialmente, uma série de experimentos foram realizados por 120h em 15mL de n-heptano ou n-hexano de acordo com um planejamento fatorial 2^4 (Tabela 20), empregando temperaturas de 37 e 55°C, etanol com pureza de 95 e 99,5%, RM etanol:óleo de 3:1 (210 mmol.L⁻¹:70 mmol.L⁻¹) e 6:1 (420 mmol.L⁻¹:70 mmol.L⁻¹) e quantidades de látex liofilizado (papaína) de 100 e 200mg (atividade lipolítica de 4,3 e 8,6U/gS, respectivamente). Estes experimentos foram monitorados a cada 24h por CCD e, após 120h, os meios de reação foram analisados e quantificados por CPG.

A catálise enzimática com papaína bruta demonstrou ser dependente da atividade de água, pois os resultados derivados do emprego de etanol hidratado foram superiores aos obtidos com etanol anidro (vide experimentos 5 e 7 na Tabela 20). Portanto, sua atividade em reações de transesterificação está diretamente relacionada ao nível de hidratação da enzima, sendo que para valores elevados, se inicia uma perda de rendimento na conversão dos ésteres, com o aumento da atividade de hidrólise que, obviamente, é uma reação inversa à síntese.

TABELA 20. PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴ UTILIZANDO HEXANO E HEPTANO COMO SOLVENTE ORGÂNICO

Exp.	RM (álcool:óleo)	Pureza do etanol (%)	Atividade lipolítica (U/gS)	Temp. (°C)	Teor de éster (%) no produto	
					n-hexano	n-heptano
1	3:1	95	4,3	37	87,65	85,77
2	6:1	95	4,3	37	19,21	17,84
3	3:1	99,5	4,3	37	80,68	74,40
4	6:1	99,5	4,3	37	48,25	39,49
5	3:1	95	8,6	37	95,86	93,16
6	6:1	95	8,6	37	68,31	30,23
7	3:1	99,5	8,6	37	93,12	91,23
8	6:1	99,5	8,6	37	69,87	43,20
9	3:1	95	4,3	55	60,32	50,12
10	6:1	95	4,3	55	13,61	11,46
11	3:1	99,5	4,3	55	57,39	45,42
12	6:1	99,5	4,3	55	44,20	31,76
13	3:1	95	8,6	55	93,42	90,60
14	6:1	95	8,6	55	67,39	11,81
15	3:1	99,5	8,6	55	92,87	89,56
16	6:1	99,5	8,6	55	69,02	40,24

Neste sentido, é importante discutir que o processo de liofilização mantém cerca de 10% (m/m) de umidade na papaína bruta, e que o emprego de etanol anidro provavelmente desloca esta umidade para o solvente, causando efeitos negativos sobre o modo de ação catalítica das enzimas.

Também é preciso reconhecer que a papaína bruta contém outras enzimas que não exclusivamente associadas as lipases vegetais, e que principalmente as proteases poderão apresentar algum efeito positivo sobre o resultado da etanólise. Novos experimentos deverão ser conduzidos para avaliar a extensão e a veracidade desta hipótese.

As condições que se mostraram mais eficientes para a produção de ésteres etílicos com papaína bruta foram de etanol 95% a uma RM (etanol:óleo) de 3:1, atividade lipolítica de 8,6U/gS em 15mL de n-hexano e temperatura de 37°C (experimento 5 da Tabela 20). Estas condições permitiram a obtenção de ésteres etílicos com 95,86% de pureza, em rendimentos de etanólise (Y_E) da ordem de 91,52%. É importante ressaltar que a atividade lipolítica da papaína bruta mostrou-se um pouco superior nas reações em que o n-hexano foi utilizado como solvente orgânico. Embora este aumento não tenha sido muito expressivo, o n-hexano foi selecionado para o subsequente acompanhamento cinético das reações de etanólise do óleo de milho.

IV.2.1.2. Acompanhamento da síntese dos ésteres etílicos com a papaína bruta liofilizada

Experimentos isolados, realizados pelos tempos de 6, 12, 24, 48, 72 e 120h nas condições estabelecidas no experimento 5 da Tabela 20, foram interrompidos e suas respectivas alíquotas de reação foram imediatamente analisadas por RMN-¹H. Através deste método, foi possível observar a presença de uma quantidade considerável de material não reagido, representado pela sobreposição dos sinais dos hidrogênios metilênicos do glicerol (região de 4,05 a 4,40ppm), quando a reação de etanólise foi conduzida por 12h (Figura 20). No entanto, após 24h de etanólise (Figura 21), esta sobreposição não foi observada em grande intensidade, comportamento este que permaneceu relativamente constante até 120h de reação.

Através da interpretação dos espectros das Figuras 21 e 22, foi possível observar que a etanólise do óleo de milho com papaína bruta atinge excelentes níveis de conversão em 24h de reação, não havendo a necessidade de que esta permaneça em andamento pelas 120h inicialmente propostas para o experimento. Este resultado, ainda que preliminar, também sugere que uma segunda etapa, provavelmente empregando biocatalisadores reciclados, poderá ser realizada após 24h de etanólise, e que este procedimento poderá reduzir os teores de material não reagido ao mínimo, garantindo a qualidade exigida pela especificação nacional para o produto. No entanto, experimentos de reciclagem de papaína bruta liofilizada e de etanólise em duas etapas seqüenciais ainda não foram realizados. Vale lembrar que os experimentos conduzidos neste trabalho foram realizados em frascos agitados, e que resultados ainda mais positivos poderão advir da simulação de processos contínuos e/ou de batelada alimentada.

FIGURA 21. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM A PAPAÍNA BRUTA, APÓS 12H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCI₃]

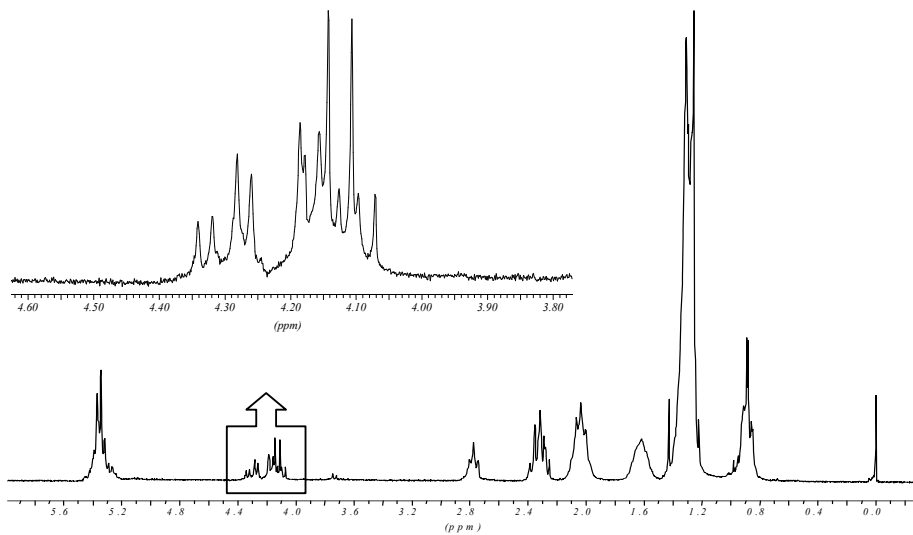
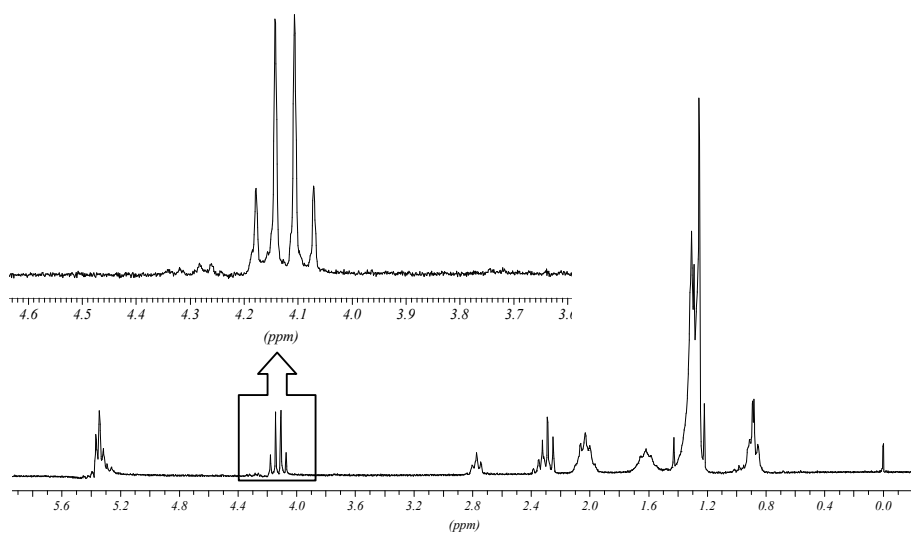


FIGURA 22. ESPECTRO DE RMN-¹H DA ETANÓLISE COM A PAPAÍNA BRUTA, APÓS 24H EVIDENCIANDO A REGIÃO DE 4,05-4,40ppm [200MHz, CDCI₃]



V. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi demonstrado que o óleo de milho é uma excelente matéria-prima para a produção de ésteres etílicos; no entanto, a remoção de ceras por filtração a frio é muito importante para facilitar o processo de purificação dos ésteres. Por outro lado, a etanólise foi um processo perfeitamente viável em uma única etapa reacional, mas a condução de uma segunda etapa de reação será necessária para atingir a qualidade exigida pela especificação nacional do produto.

Na etapa de purificação dos ésteres, o tratamento dos ésteres etílicos com Magnesol[®] facilitou as etapas subseqüentes de purificação, reduzindo a quantidade de água necessária para lavagem dos ésteres da primeira etapa e removendo importantes contaminantes polares da reação, como a umidade, sabões, glicerina livre e acilglicerídeos não reagidos.

O emprego de torta de milho contendo 5% de óleo vegetal foi bem sucedido para a produção de lipases de *Burkholderia cepacia* por fermentação em estado sólido e a simples liofilização da torta de milho biotransformada permitiu que a lípase já imobilizada não tivesse perda aparente de atividade lipolítica. O emprego destas matrizes como biocatalisadores em sistemas aquo-restritos foi bastante interessante e vantajosa, pois não envolve dispendiosas etapas de purificação da enzima, facilita a purificação dos ésteres por eliminar intermediários e sub-produtos polares da reação e permite o emprego de óleos vegetais brutos. A reutilização destes biocatalisadores para a síntese de uma nova partida de ésteres etílicos também se mostrou relativamente promissora, mas novos experimentos deverão ser conduzidos para avaliar a real viabilidade deste procedimento.

A utilização de papaína bruta liofilizada como biocatalisador para a etanólise de óleo de milho também apresentou resultados muito interessantes. A simples liofilização do látex obtido de frutos de mamão verde (*Carica papaya*) permitiu a eficiente imobilização das enzimas sem qualquer perda aparente de atividade lipolítica e o uso deste biocatalisador em sistemas aquo-restritos, além das vantagens já inerentes ao processo, permitiu o emprego de etanol hidratado na reação. Esta é, indiscutivelmente, uma medida de grande importância, pois elimina a necessidade de quaisquer operações unitárias para a desidratação do etanol a ser reciclado no processo. Por outro lado, embora a etanólise do óleo de milho utilizando a papaína bruta tenha fornecido uma excelente taxa de conversão em 24 horas, foi evidenciado que uma segunda etapa de reação será necessária para que o produto atinja a qualidade exigida pelos parâmetros da especificação nacional.

Este trabalho permitiu demonstrar que ambas as matrizes contendo lipases imobilizadas apresentaram boa eficiência na etanólise do óleo de milho, muitas vezes comparáveis ao emprego de lipases fúngicas imobilizadas de origem comercial. No entanto, várias questões ainda deverão ser avaliadas para que a eventual viabilidade técnica e econômica destes processos inovadores seja suficientemente demonstrada.

VI. REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P., Enzyme-catalysed lipid modification. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.12, p.231-254,1994.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP. Resolução nº 42. Disponível em: <<http://www.anp.org.br>>. Consultado em outubro de 2005.
- ALSBERG, C. L.; TAYLOR, A. E. The fats and oils, a general review. California: Food Research Institute, Stanford University, 1928.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 377- 383, 2000.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING METHODS - ASTM. D6751. USA, 2003.
- BARNWAL, B.K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2004.
- BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations. Wiley: Weinheim, 1999.
- BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Review*, v. 733, p. 1-9, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDALIZZE, W. Nova realidade do mercado. In: FRANCELLI, A.L.; DOURADONETO, D. (eds.) *Milho: Tecnologia e Produtividade*. Piracicaba: ESALQ. p.1-9, 2001.

- CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; PINHEIRO, H.; PRAZERES, D. M. F.,
Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. *Journal of Biotechnology*, v. 59, p.133-143, 1998.
- CAMPOS, I. Biodiesel e Biomassa: duas fontes para o Brasil. *Revista de Ecologia do Século 21*, Rio de Janeiro, v.80, 2003.
- CARO, Y.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J. Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v.77, n. 8, p.89-901, 2000.
- CARO, Y.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J., Lipase activity and fatty acid typoselectivity of plants extracts in hydrolysis and interesterification. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 77, n. 4, p. 349-354, 2000.
- CARVALHO, C.M.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Kinetic of cutinase catalyzed transesterification in AOT reversed micelles: modelling of a batch stirred tank reactor. *Journal of Biotechnology*, v. 81, p. 1-13, 2000.
- 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, 2004.
- CHOWDARY, G.V.; PRAPULLA S.G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 393-397, 2002.
- COSTA NETO, P.R. Obtenção de ésteres etílicos (Biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. Tese de doutorado em química – Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- DEL RÍO, J.L.; CAMINAL, G.; FITÉ, M.; FAUS, I.; BLADÉ, J.; SOLÁ, C. Lipase-catalysed synthesis of natural ethanol esters: effect of water removal on

- enzyme reutilisation. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 75, p. 991-996, 2000.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V. – DIN, EN14214. Alemanha, 2003.
- DOMINGOS, A.K. Otimização da etanolise de óleo de *Raphanus sativus* L. e avaliação de sua estabilidade à oxidação. Dissertação de mestrado em química – Universidade Federal do Paraná, 2005.
- FACIOLI, N.L.; GONÇALVES, L.A.G., Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui. *Química Nova*, v. 21, p.16-19,1998.
- FERNANDES, M.L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A.O; ZAMORA, P.P.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isocetane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 43-49, 2004.
- FOGLIA, T.A.; VILLENEUVE, P. *Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 74, n. 11, p. 1447-1450, 1997.
- GANDHI, N. N.; MUKHERJEE, K. D. Specificity of papaya lipase in Esterification with respect to the chemical structure of substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 566-570, 2000.
- GANDHI, N.N.; MUKHERJEE, K.D. Specificity of papaya lipase in esterification of aliphatic alcohols - a comparison with microbial lipases. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v.78, p.161-165, 2001.
- GANDHI, N.N.; MUKHERJEE, K.D. Synthesis of designer lipids using papaya (*Carica papaya*) latex lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p.271-277, 2001.

- GERARD, A.S.; JULIAN, B.C. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 471-482, 1999.
- GHASSAN, T.A.; MOHAMAD, I.; AL-WIDYAN, B.; ALI O, A. Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. *Applied Thermal Engineering*, v. 23, p. 285-293, 2003.
- GIORDANI, R.; MOULIN, A.; VERGER, R. Tributyrorylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices. *Phytochemistry*, v. 30, n. 4, p. 1069-1072, 1991.
- GUISÁN, J.M, BASTIDA, A CUESTA, C, FERNANDEZ- LAFUENTE, R. E ROSELL, C. M, Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 1144-1152, 1991.
- GUISÁN, J.M, ALVARO, G, LAFUENTE, R.F, ROSEL, C.M., GARCIA, J.L E TAGLIANI, A., Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, p. 455-464, 1993.
- JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Reviews*, v. 15, p.29-63, 1994.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; EETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications as lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 53, p. 315-351, 1999.
- KNOTHE, G. The history of vegetable oil-based diesel fuels. In: KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. (eds.) *The Biodiesel Handbook*. Illinois: AOCS Press. pp. 4-16, 2005.

- KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. *The Biodiesel Handbook*. Illinois: AOCS Press, 2005
- KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of the lipase from *Penicillium citrinum* by chromatographic process. *Bioprocess Engineering*, v. 20, p.59-65, 1999.
- KUCEK, K. T. Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Federal do Paraná, pp. 95, 2004.
- LAGEMAAT, J.V.; PYLE, D.L. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chemical Engineering Journal*, v. 84, p.15-123, 2001.
- LANG, X.; DALAI, A. K.; BAKHSHI, N. N.; REANEY, M. J.; HERTZ, P.B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 53-62, 2001.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2001.
- LIMA, V.M.; KRIEGER, N; MITCHELL, D.A; FONTANA, J.D. lipase de uma cepa selvagem de *Bacillus* sp e a sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. In: VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2002. Maringá. *Anais*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D., Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 31, p. 53-61, 2004.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresorce Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.

- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V.
Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.
Process Biochemistry, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester.
Renewable Energy, v. 28, p. 2395-2403, 2003.
- MARLOT, C.; LAUGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BRATTI, J. Ester synthesis in
organic solvent catalized by lipases immobilized on hydrophilic supports.
Biotechnology Letters, v. 7, p. 647-650, 1985.
- MEIRA, J.A.; SANTOS, M.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.
Produção de lipases por *Burkholderia cepacia* em fermentação no estado
sólido. In: Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, 2003b. *Anais*.
Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina
- MELO, W. J.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P., Papaína. Uma opção para o produtor
de mamão. Jaboticabal: FUNEP, p. 76, 1997.
- MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY. New developments in
solid-state fermentation: II – Rational approaches to the design, operation and
scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state
bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, v. 8, p. 183-225, 2002a.
- MITCHELL, D.A.; TONGTA, A.; STUART, D.M.; KRIEGER, N. The potential for
establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in
rotating drum bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, p. 114-
122, 2002b.

- MITCHELL, D.A.; VON MEIEN O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 137-147, 2003.
- MITCHELL, D.A.; VON MEIEN O.F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, p.15-26, 2004.
- MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 67, p. 168-170, 1990.
- MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. Rio de Janeiro: Varela, 1989.
- MUSTRANTA, A, FORSSELL, P. E POUTANEN, K, Applications of immobilized lipases to transterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 133-139, 1993.
- NAG, A.; BHATTACHARYA, S.; DE, K. B. New utilization of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 72, p. 1591-1593, 1995.
- OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F., Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, p. 63-71, 1999.
- OLIVEIRA, A.C. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid –a kinetc study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 4-6; v. 22, p. 999-1005, 2001.
- PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Integration of reaction and separation with lipases: an overview. *Journal Molecular Catalalysis B: Enzymatic*, v. 3, p. 99-109, 1997.

- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, p.119-131, 1999.
- PARENTE, E.J.S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Unigráfica, 2003.
- PATERNIANI, E. Importância do milho na agroindústria. In: OSUNA, J.A.; MORO, J.R. (eds.). *Produção e melhoramento do milho*. FUNEP, Jaboticabal-SP. pp.1-12, 1995.
- PENCREACH, G.; LEULLIER, M.; BARATTI, J., Proprieties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56, p. 181-189, 1997.
- PERES, J. R. R.; JUNIOR, E. F. Insumos oleaginosos para o biodiesel: um diferencial entre a soja e o girassol. In: Seminário Paranaense de Biodiesel, Londrina, 2003.
- PERRY, T.W. Corn as a livestock feed. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (eds.). *Corn and corn improvement*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp. 941-963.
- PIMENTEL, M. C. B.; KRIEGER, N.; COELHO, L. C. C. B.; FONTANA, J. D.; MELO, E. H. M.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA-FILHO, J. L; Lipase from a brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 49, p.59-69, 1994.
- PIYAPORN, K., JEYASHOKE, N.; KANIT, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 73, p. 471-474, 1996.
- RAMOS, L. P. Conversão de óleos vegetais em biocombustível alternativo ao diesel convencional. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, 1999. *Anais*. Londrina: Embrapa-Soja, pp. 233-236, 1999.

- 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.
- RAMOS, L.P.; WILHELM, H.M. Current status of biodiesel development in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 807-820, 2005.
- RESLOW, M., ADLERCREUTZ, P. E MATTIASSON, B., Selection of Solvents for Bioorganic Synthesis. *Ann. of the New York Academy of Science*, v. 9, p. 250-254, 1988.
- SAXENA RK; GHOSH PK; GUPTA R; DAVIDSON WS; BRADDOO S; GULATI R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, v. 77, p. 101-115, 1999.
- SCHUCHART, U.; SERCHELI, R.; VARGAS R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, p. 199-210, 1998.
- SCHWAB, A.W.; BAGBY, M.O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel*, v. 66, p. 1372-1378, 1987.
- SELLEK, G.A.; CHAUDHURI, J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles: review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 471-482, 1999.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE U.C., Production, purification, characterization, and applications of lipases: review. *Biotechnology Advances*, v.19, p.627-662, 2001.
- SHAW, J.F,CHANG, R.C,WANG, F.F E WANG, Y.J, Lipolytic Activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 132-137,1990.

- SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. *Biomass and Bioenergy*, v. 4, p. 227-242, 1993.
- SOARES, V. C. D.; LIMA, D. G. DE; RIBEIRO, E. B; CARVALHO, D. A.; CARDOSO, É. C. V.; RASSI, F. C.; MUNDIM, K. C.; RUBIM, J. C.; SUAREZ, P. A. Z. Diesel-like fuel obtained by pyrolysis of vegetable oils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 71, n. 2, p. 987-996, 2004.
- STARK, M.B E HOLMBERG, K, COVALENT, Immobilization of lipase in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 942-950, 1989.
- STOURNAS, S.; LOIS, E.; SERDARI, A. Effects of fatty acid derivatives on the ignition quality and cold flow of diesel fuel. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 72, p. 436-437, 1995.
- SUAREZ, P.A.Z.; RUBIM, J.C.; MUNDIM, K.C. Sistema de Conversão de Óleos Vegetais, Óleos Usados e Gorduras Animais em Óleos Combustíveis. PI BR 0204019-0, 2002.
- UNIÃO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – IUBMB
Disponível em <<http://www.iubmb.unibe.ch/>>. Consultado em outubro de 2005.
- UOSUKAINEN, E.; LINKO, Y.; LAMSA, M. et al., Transesterification of trimethylolpropane and rapessed oil methyl ester to environmentally acceptable lubricants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 75, p. 1557-1563, 1998.
- URGEL, A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., *Biotechnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos*, vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher. p.p.391-403, 2001.

- VAN GERPEN, J.; KNOTHE, G. Basics of the transesterification reaction. In: KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. (eds.) *The Biodiesel Handbook*. Illinois: AOCS Press. p. 26-41, 2005.
- VECCHIA, R.D.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V., Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, p.623-630, 2004.
- VIDAL, B.J.W. Brasil, civilização suicida. Brasília: Star Print, 1^a edição, 2000.
- VILLENEUVE, P.; PINA, M.; MONET, D.; GRAILLE, J. *Carica papaya* latex lipase: *sn*-3 stereoselectivity or short-chain selectivity? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 72, p. 753-755, 1995.
- VILLENEUVE, P.; SKARBEEK, P. A.; PINA, M.; GRAILLE, J.; FOGLIA, T. A. Catalytic Behavior of *Carica papaya* latex transesterification reactions. *Biotechnology Techniques*, v. 11, p. 637-639, 1997.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VULFSON, E. Industrial applications of lipases. In: WOOLEY, P; PETERSEN, S. B. *Lipases: their structure, biochemistry and applications*. Cambridge University Press, p.271-288, 1994.
- WATANABE, Y.; MIYAWAKI, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Equilibrium constant for lipase-catalyzed condensation of mannose and lauric acid in water-miscible organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 494-498, 2001.

- WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 3, p. 663-670, 1979.
- WISDOM, R.A.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. Enzymic Interesterification of fats: Laboratory and Pilot- Scales Studies with Immobilized Lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, p. 1063-1069, 1990.
- ZAGONEL, G. F. Obtenção e caracterização de biocombustíveis a partir da Transesterificação etílica em meio alcalino. Curitiba, 2000. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica - Universidade Federal do Paraná.
- ZAGONEL, G. F.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Estudo de otimização da reação de transesterificação etílica do óleo de soja degomado. *Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 35-41, 2003.