Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

RAFAELLA FERREIRA NASCIMENTO

FRACIONAMENTO E TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA PARA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL

RIO DE JANEIRO
2013

RAFAELLA FERREIRA NASCIMENTO

FRACIONAMENTO E TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA PARA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora:
Profª. Suely Pereira Freitas

Rio de Janeiro

2013

Nascimento, Rafaella Ferreira

Fracionamento e transesterificação do óleo de macaúba para produção sustentável de biodiesel/ Rafaella Ferreira Nascimento – Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadora: Suely Pereira Freitas

1. óleo de macaúba. 2. transesterificação. 3. ésteres etílicos. 4. Catálise enzimática. – Dissertação de mestrado. I. Freitas, Suely Pereira (Orient.) II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Fracionamento e transesterificação do óleo de macaúba para produção sustentável de biodiesel.

Rafaella Ferreira Nascimento

FRACIONAMENTO E TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA PARA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de pós graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por

_____

Profª. Suely Pereira Freitas, D.Sc.
Escola de Química/UFRJ – Orientador

_____

Dra. Yordanka Reyes Cruz, D.Sc.
Escola de Química/UFRJ

_____

Profª Maria Antonieta P. Gimenes Couto, D.Sc.
Escola de Química/UFRJ

_____

Profª Marta Antunes Pereira Langone, D.Sc.
PPG-EQ/UERJ

Rio de Janeiro, 26 de junho de 2013

Dedico ao meu marido, minha avó e minha atenciosa Professora Suely Freitas, que acreditaram em mim quando eu não mais conseguia.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiríssimo agradecimento a Deus, por me amar em todas as circunstâncias, por ser o autor da minha fé e me dar coragem para enfrentar tudo que passei.

Ao meu super namorado-noivo-marido Renato por sempre acreditar em mim, por me fazer uma pessoa melhor... obrigada pelas gargalhadas mil, zelo e compreensão. Com certeza não teria conseguido sem você, amor!!! Aos meus avós que amo demais, agradeço a toda preocupação e telefonemas que muitas das vezes me motivaram a não desistir. Aos meus pais e demais familiares pela torcida!

A minha orientadora, sempre carinhosa, presente e mãezona, Suely. Mais uma vez sua atenção transcendeu a relação aluno-professor. Agradeço seus emails, puxões de orelha, e auxílio de todas as formas. Sem dúvida a senhora fez o possível e o impossível para me ajudar. A professora Maria Alice por toda a confiança no meu trabalho. Agradeço aos colegas de laboratório e alunos de IC que me ajudaram nesta longa caminhada: Leonardo, Camila, Luciana, Carol, e finalmente a Mariazinha, sempre atenciosa e com seu sorriso largo...

As minhas super amigas Laisita e Ju, palavras me faltam para expressar tamanha gratidão a vocês. Grande agradecimento por se despencarem até São Gonçalo só para me ajudar! Laís obrigada pela acolhida em seu lar, pelas noites mal dormidas e todas as palavras apropriadas na dissertação. Ju nesta reta final sem sua ajuda seria muito mais difícil!!

Ao coordenador do LACAT/Unirio e a todos meus colegas de trabalho.

Aos amigos da Comunidade Servir pelas orações e carinho, de forma especial o Ministério do qual faço parte. Por fim dedico este trabalho em agradecimento a todas as pessoas que ao longo dos anos me ajudaram na minha formação não só acadêmica bem como também pessoal!!

"Não disse que seria fácil, disse que valeria a pena" – Dom Bosco

RESUMO

NASCIMENTO, Rafaella Ferreira. **Fracionamento e Transesterificação do Óleo Ácido de Macaúba para Produção Sustentável de Biodiesel.** Orientadora: Suely Pereira Freitas. (Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

O uso de lipase como catalisador na produção de biodiesel é uma alternativa para minimizar os impactos ambientais associados aos métodos convencionais. A transesterificação enzimática ocorre em condições brandas de temperatura e reduz, consideravelmente, a formação de subprodutos indesejáveis. O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de biodiesel via catálise enzimática utilizando como matéria prima o etanol e a fração leve do óleo ácido de macaúba, fracionado a seco. Óleos vegetais de diversas oleaginosas têm sido testados com sucesso para produção de biodiesel. A macaúba possui um grande potencial a ser explorado, uma vez que possui um alto teor de óleo na polpa (60 a 70%, em base seca) e na castanha (40 a 50%, em base seca) além de sua elevada produtividade. O óleo, após fracionamento natural, foi caracterizado obtendo-se os valores de 6,7 mg $KOH.g^{-1}$ e 22% para índice de acidez e umidade, respectivamente. Por cromatografia gasosa os ácidos graxos majoritários foram os ácidos oléico (60,81%) e palmítico (18,92%). A escolha das variáveis para compor o planejamento estatístico baseou-se em dados experimentais da autora, reportados na literatura em um estudo prévio. Foram selecionados os seguintes parâmetros: concentração de catalisador, razão etanol:óleo (m/m), temperatura e umidade. A conversão de ácidos graxos livres em ésteres etílicos usando-se uma enzima comercial, Novozymes 435, foi determinada usando um método colorimétrico enzimático. As condições reacionais que alcançaram maior conversão foram: 10% de catalisador, 3:1 razão molar etanol:óleo, 50 $^{\circ}$C e 5% de umidade. A alta conversão obtida com o catalisador enzimático (aproximadamente 96%) indica que o uso do mesmo pode ser tornar muito promissor. O biodiesel foi submetido às análises para avaliação das suas propriedades físico-químicas incluindo índice de acidez, umidade, índice de saponificação, viscosidade cinemática, índice de iodo e glicerol livre de forma a avaliar se o produto obtido atende às especificações estabelecidas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Para efeitos comparativos, tanto o óleo ácido quanto seu respectivo

biodiesel apresentaram características similares às reportadas na literatura. O biodiesel bruto obtido pode ser refinado pelas técnicas usuais para atender os índices estabelecidos pela ANP.

Palavras-chave: óleo de macaúba, transesterificação, ésteres etílicos, catálise enzimática.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Rafaella Ferreira. **Transesterification and Fractionation of Oil Acid Macaúba for Sustainable Production of Biodiesel.** Advisor: Suely Pereira Freitas. (Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013). Dissertation Master of Science (M.Sc.).

The use of lipase as a catalyst in the production of biodiesel is an alternative to minimize the environmental impacts associated with conventional methods. The transesterification occurs under mild conditions of temperature and considerably reduces the formation of undesirable byproducts. The aim of this work was to obtain biodiesel via enzymatic catalysis using ethanol and the light fraction of dry-fractionated macauba acid oil as raw materials. Vegetable oils from other oil crops have been successfully tested for biodiesel production. Macauba fruit has a great potential to be explored, since it has high oil content in the pulp (60-70% dry basis) and in the nut (40-50% dry basis) in addition to its high productivity. Raw oil was characterized and the values of 6.7 mg $KOH.g^{-1}$ and 22% for acid number and humidity, respectively, were reached. The major fatty acids identified by gas chromatography are oleic (60.81%) and palmitic acid (18.92%). A statistic design was proposed and selected parameters were based on literature reported data. The following parameters were selected: catalyst concentration, ethanol/oil ratio (w/w), temperature and humidity. The conversion was determined using an enzymatic colorimetric method. The operational conditions for higher conversion were: 5%, catalyst 3:1, ethanol/oil ratio (w/w) 50°C, and 5% moisture. The high conversion obtained for the enzymatic catalyst (approximately 96%) indicates that its use is very promising. The biodiesel was subjected to analysis for evaluation of their physicochemical properties including acid value, moisture, saponification number, kinematic viscosity, iodine value and free glycerol in order to verify that the product obtained meets specifications established by the Petroleum National Agency, Natural Gas and Biofuels - ANP.

Keywords: macauba oil, transesterification, ethyl esters, enzymatic catalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Emissão de CO_2 no uso da energia no Brasil.. 19
Figura 3.2 Participação de renováveis na Matriz Energética. 20
Figura 3.3 Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país.. 21
Figura 3.4 Aquisições das matérias primas oriundas da agricultura familiar... 22
Figura 3.5 Redução dos principais gases poluentes. 23
Figura 3.6 Palmeira de macaúba com cachos carregados do fruto (a). Fruto de macaúba inteiro (esquerda) e fracionado (direita) (b). 28
Figura 3.7 Mapa de regiões que possuem maior ocorrência no Brasil. 29
Figura 3.8 Diagrama de blocos do processo industrial para produção de óleo de macaúba via prensagem contínua.. 33
Figura 3.9 Espinhos da palmeira de macaúba. 34
Figura 3.10 Armazenamento dos frutos após coleta. na Empresa Paradigma. 34
Figura 3.11 Sementes e mudas do projeto de alteração genética da macaúba. 36
Figura 3.12 Mapeamento do número de artigos científicos e revisão publicados a representação dos 15 países que mais publicaram documentos científicos sobre uso de lipases em óleos e gorduras. O Brasil é classificado como o 12° país nesse conjunto. Os dados foram obtidos pela pesquisa na base de dados Web of Science ®, contemplando artigos e revisões sobre uso de enzimas lipolíticas no período de 1945 a 2012, utilizando os seguintes termos no campo de assunto (*topic*) em inglês: (lipase OR enzymatic-cataliz*) AND (oils OR fat OR lipid), resultando em 14.344 registros. 42
Figura 3.13 Perfil de evolução do número de artigos científicos sobre catálise enzimática de óleos e gorduras. Os dados foram obtidos pela pesquisa na base de dados Web of Science ®, contemplando artigos e revisões sobre uso de enzimas lipolíticas no período de 1945 a 2012, utilizando os seguintes termos no campo de assunto (*topic*) em inglês: (lipase OR enzymatic-cataliz*) AND (oils OR fat OR lipid), resultando em 14.344 registros. 42
Figura 3.14 Etapas do processo de hidroesterificação. (a) Hidrólise dos triacilgliceróis e; (b) esterificação dos ácidos graxos. R representa grupamentos alquila. O etanol foi utilizado como exemplo de agente de esterificação.. 45
Figura 3.15 Esquema da transesterificação de um triglicerídeo genérico com metanol. 46

Figura 3.16 Artigos científicos publicados desde os anos 2000. 49
Figura 3.17 Resultados preliminares em que (a) é Gráfico de Pareto de 3 parâmetros avaliados para obtenção de biodiesel de macaúba e (b) Gráfico da conversão versus tempo.. 50
Figura 4.1 Processo de fracionamento do óleo ácido de macaúba. 53
Figura 4.2 Ilustração do reômetro usado na determinação da viscosidade..... 56
Figura 4.3 Diagrama de blocos do processo de obtenção de biodiesel 58
Figura 4.4 Reator PARR Instruments usado para o processo de hidroesterificação 59
Figura 4.5 Reações enzimáticas para formação de solução cereja 60
Figura 4.6 Diagrama de blocos das etapas para reuso das enzimas..... 63
Figura 5.1 Fases leve e sólida do óleo ácido de macaúba(a) e distribuição percentual da massa do fracionamento(b)..... 66
Figura 5.2 Posições nas cadeias dos ácidos graxos mais suscetíveis à oxidação. 69
Figura 5.3 Etapas da síntese de biodiesel, onde: (a) Sistema reacional no shaker; (b) Enzimas no funil de Buchner após etapa de lavagem e (c) Etapa de separação e purificação do biodiesel..... 69
Figura 5.4 Gráfico de Pareto relativo aos efeitos dos parâmetros independentes bem como a interação entre eles 72
Figura 5.5 : Superfície de resposta da temperatura e teor de água 72
Figura 5.6 : Valores estimados versus valores observados 73
Figura 5.7 Efeito da umidade na conversão do óleo ácido de macaúba em biodiesel..... 74
Figura 5.8 : Efeito da temperatura na conversão do óleo ácido de macaúba em biodiesel. 74
Figura 5.9 : Efeito da razão molar na conversão do óleo ácido de macaúba de biodiesel. 75
Figura 5.10 : Efeito da concentração de na conversão do óleo ácido de macaúba de biodiesel..... 76
Figura 5.11 Aspecto visual do biodiesel obtido via hidroesterificação ácida (a,b) e via transesterificação enzimática (c,d). 78
Figura 5.12 Resultados de conversão após 12 ciclos de reutilização da enzima imobilizada. As barras verticais representam o desvio padrão em cada medida..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Produtividade algumas oleaginosas em L/ha. 30
Tabela 3.2 Composição de ácidos graxos da semente, polpa e amêndoa de macaúba. 31
Tabela 3.3 Comparação das tecnologias enzimática e química (alcalina e ácida) para produção de biodiesel.. 38
Tabela 4.1 Características Fisico-químicas determinadas para fase leve do óleo ácido de macaúba..... 54
Tabela 4.2 Planejamento fatorial, composto central, para otimização do processo de conversão de óleo de macaúba em ésteres etílicos. 61
Tabela 4.3 Matriz de planejamento fatorial 24 para as reações de transesterificação enzimática..... 62
Tabela 5.1 Valores de índice de acidez reportados na literatura para o óleo de macaúba..... 67
Tabela 5.2 Composição em percentual de ácidos graxos majoritários do óleo ácido de macaúba..... 68
Tabela 5.3 Planejamento fatorial 2^4 do biodiesel enzimático da fração leve do óleo ácido de macaúba..... 72
Tabela 5.4 Conversão de biodiesel por hidroesterificação 77
Tabela 5.5 Perfil graxo do biodiesel de macaúba 80
Tabela 5.6 Parâmetros físico-químicos do biodiesel obtido 81
Tabela 5.7 Valores da Viscosidade Cinemática a 20 e 40º C. 82

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	American Oil Chemist's Society
ASTM	American Society for Testing and Materials
CG	Cromatografia gasosa
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MDA	Ministério do Desenvolvimento Agrário
MME	Ministério de Minas e Energia
OCDE	Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico
PEN	Plano Nacional de Energia
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
REN 21	Renewable Energy Policy Network
SCS	Selo de Combustível Social
SEAPA	Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais
TG	Triglicerídeo
UFV	Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1 Introdução 15
2 Objetivos 17
3 Revisão Bibliográfica 18
3.1 Matriz Energética Brasileira 18
3.2 Biodiesel: combustível renovável 21
3.2.1 Biodiesel: Aspecto Ambiental 23
3.3 Glicerol 24
3.4 Matéria prima oleaginosa para produção de biodiesel 25
3.4.1 Macaúba 28
3.4.1.1 Óleo Ácido de Macaúba 30
3.4.2 Fracionamento a seco de óleos vegetais 36
3.5 Catalisadores Químicos 37
3.6 Biocatalisadores 39
3.6.1 Lipases 40
3.7 Processos para obtenção de biodiesel 44
3.7.1 Reação de Esterificação 44
3.7.2 Reação de Hidroesterificação 44
3.7.3 Reação de Transesterificação 45
3.7.3.1 Reação de Transesterificação Enzimática 47
4 Materiais e Métodos 52
4.1 Macaúba 52
4.1.1 Óleo Ácido de Macaúba 52
4.1.2 Enzima 52
4.1.3 Outros Reagentes 52
4.2 Metodologia 53
4.2.1 Fracionamento a seco do óleo 53
4.2.2 Caracterização química e física do óleo de macaúba 53
4.2.2.1 Índice de acidez (I.A.) 54
4.2.2.2 Umidade 556
4.2.2.3 Ponto de fusão 56

4.2.2.4 Viscosidade 56
4.2.2.5 Composição em ácidos graxos do óleo de macaúba 57
4.3 Obtenção do biodiesel 57
4.3.1 Reação de transesterificação enzimática 57
4.3.2 Reação de hidroesterificação 58
4.3.3 Determinação do rendimento da reação 59
4.3.4 Planejamento Estatístico 61
4.3.5 Reação com reciclo da lipase 63
4.4 Caracterização do biodiesel de macaúba 63
4.4.1 Índice de iodo 63
4.4.2 Glicerol Livre 64
4.4.3 Índice de Saponificação 64
5 Resultados e discussão 66
5.1 Fracionamento a seco 66
5.2 Índice de Acidez (I.A.) 66
5.3 Teor de água 67
5.4 Composição em ácidos graxos majoritários do óleo de macaúba 67
5.5 Avaliação da conversão enzimática 69
5.6 Avaliação da hidroesterificação 77
5.7 Estabilidade da enzima Novozymes 435 79
5.8 Caracterização do biodiesel de macaúba 80
6 Conclusões e Sugestões 83
6.1 Considerações Finais 83
6.2 Sugestões 84
Referências Bibliográficas 85
Anexos 93

1 Introdução

O crescimento da produção de biocombustíveis tem sido motivado, principalmente, para ampliar a geração de energia a partir de fontes mais sustentáveis e menos dependentes do petróleo. Neste contexto, desenvolver uma tecnologia para reduzir a produção de compostos indesejáveis e, simultaneamente, o custo de produção do biodiesel é o principal desafio para viabilizar este processo em escala industrial e tornar este biocombustível competitivo e verdadeiramente "limpo".

A contribuição de biocombustíveis, tais como biodiesel e etanol, no consumo mundial de combustíveis tem aumentado a cada ano, com destaque no Brasil para o setor transporte urbano (RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK – REN21, 2011). Na matriz energética brasileira, o setor de transporte representa 30% do consumo final, dentre os quais aproximadamente 50% correspondem ao uso do diesel (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME, 2012). Com o aumento da importação deste combustível, o segmento de combustíveis renováveis ganhou um maior destaque nacional no contexto atual de sustentabilidade. O uso de combustíveis renováveis também se destaca pela redução de gases que geram aquecimento global além da emissão de partículas e de hidrocarbonetos.

Atualmente, existem 65 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para operarem no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de aproximadamente 21000 m^3/dia. Destas 65 plantas, 61 já possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a cerca de 19.000 m^3/dia de capacidade (ANP, 2012). No cenário mundial, a produção de biodiesel atingiu em 2011 cerca de 15 milhões de toneladas em equivalente do diesel.

As rotas convencionais de obtenção do biodiesel ocorrem por meio da transesterificação, onde se faz uso de matéria prima oleaginosa, álcool de cadeia curta e catalisador que pode ser ácido ou básico. A escolha do catalisador depende da qualidade do óleo vegetal utilizado. Por ser de mais baixo custo, o catalisador básico é o mais usado comercialmente. Entretanto, o processo é tecnicamente não recomendado quando se trabalha com óleos vegetais de elevado teor de ácidos graxos livres. Nestes casos, recomenda-se o uso de catalisadores ácidos.

Embora os catalisadores clássicos forneçam uma alta conversão do triglicerídeo em biodiesel, o descarte destes catalisadores para o meio ambiente, no caso dos catalisadores básicos, ou sua reciclagem, no caso dos heterogêneos, ainda são desafios tecnológicos a serem superados. Os catalisadores enzimáticos surgem, portanto, como uma possibilidade de superar os limites tecnológicos de produção sustentável do biodiesel. Os catalisadores enzimáticos mais utilizados são as lipases, pois além de promoverem uma catálise ambientalmente correta, operam em condições brandas, com temperatura abaixo de 55 °C, e minimizam a formação de subprodutos indesejáveis (CRUZ, 2007).

Entretanto, a catálise enzimática ainda requer estudos para torná-la economicamente competitiva. O principal foco de estudos que visam essa competitividade está na aplicação comercial de técnicas de imobilização na tentativa de reutilizar a enzima uma vez que o custo mais elevado do biocatalisador, se comparado com o catalisador químico, é a principal desvantagem do processo enzimático. No Brasil, a maior parte das pesquisas sobre a transesterificação de óleos vegetais, para a obtenção de biodiesel enzimático, utilizam enzimas comerciais importadas. A Escola de Química da UFRJ tem dedicado esforços no estudo e desenvolvimento de suportes de baixo custo para substituir os suportes convencionais que tornam estes catalisadores pouco competitivos, do ponto de vista econômico. A fibra de coco, um resíduo abundante da agroindústria nacional, tem sido explorada com sucesso como suporte de baixo custo para imobilização de lipase (Brígida *et al.*, 2007; Brígida *et al*., 2008).

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma espécie nativa do cerrado com elevado potencial para exploração do óleo contido em sua polpa. O biodiesel produzido a partir deste fruto é uma boa alternativa para produção de biocombustível, uma vez que este fruto não é normalmente usado na produção de alimentos. A palmeira da macaúba produz um fruto com elevado teor de óleo, entre 60 e 70% em base seca, além de sua elevada produtividade se comparado aos óleos comercializados como *commodities*,

Os estudos envolvendo o fracionamento de óleos vegetais a partir do fruto da macaúba são bastante escassos na literatura científica mundial, pois este fruto é oriundo de regiões com diversas restrições tecnológicas. Neste cenário, este trabalho avaliou o uso do óleo de macaúba fracionado a seco, rico em ácidos graxos livres e, portanto, impróprio para consumo humano, como matéria–prima para obtenção de biodiesel pela rota enzimática.

A apresentação desta dissertação está divida em 5 capítulos. Após o presente capítulo inicial de introdução, apresentam-se os objetivos gerais e específicos no capítulo 2, uma fundamentação teórica com a finalidade de informar ao leitor alguns dados gerais sobre a matriz energética brasileira, biodiesel, óleo vegetal (com destaque para o óleo de macaúba) e as principais formas de obtenção de biodiesel no capítulo 3. No capítulo 4, são abordados os materiais e métodos utilizados nos diferentes ensaios experimentais. O capítulo 5 é dedicado à apresentação, discussão e comparação dos resultados obtidos nos experimentos. No capítulo 6, as conclusões e sugestões para trabalhos futuros são destacadas e para finalizar listam-se as referências bibliográficas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi obter biodiesel (ésteres etílicos) via transesterificação enzimática, a partir do óleo ácido de macaúba fracionado a seco, usando-se um catalisador enzimático comercial (NOVOZYMES 435).

2.2 Objetivos específicos

Para este fim, os seguintes tópicos foram abordados:

- Fracionamento a seco do óleo bruto e separação das fases;
- Caracterização física e química da fração leve do óleo de macaúba a ser utilizado (índice de acidez, teor de água, ponto de fusão e viscosidade cinemática);
- Seleção, via análise estatística, das melhores condições reacionais (temperatura, razão molar etanol: óleo, teor de água e concentração enzimática) para obtenção do biodiesel enzimático, utilizando ferramentas estatísticas;
- Obtenção do biodiesel por hidroesterificação utilizando catalisador ácido;
- Caracterização física e química do biodiesel enzimático a partir de parâmetros estabelecidos pela ANP (índice de iodo, índice de saponificação,glicerol livre, índice de acidez viscosidade cinemática.e umidade)

3 Revisão Bibliográfica

Este capítulo trata-se de uma revisão do estado da arte da produção de biodiesel. Inicialmente é apresentado o perfil da matriz energética brasileira e a necessidade de diminuição de emissão de gases do efeito estufa advindos dos meios de transporte de forma a justificar o investimento em combustível de fonte renovável. Em seguida, o tema principal deste trabalho é introduzido no qual se destaca a relevância do biodiesel considerando os diferentes aspectos da produção desse biocombustível no contexto brasileiro. O texto continua descrevendo a matéria lipídica utilizada neste trabalho – óleo de macaúba, os tipos de catalisadores com ênfase no biocatalisador e as diferentes rotas de obtenção do biodiesel finalizando com a transesterificação enzimática utilizada neste trabalho. A junção dessas informações pretende fundamentar o potencial de desenvolvimento da produção desse biocombustível a partir do óleo ácido de macaúba.

3.1 Matriz Energética Brasileira

As fontes de energia podem ser classificadas como renováveis ou não renováveis. As fontes não renováveis originam-se de processos naturais e incluem petróleo, carvão mineral e gás natural. Estas fontes são facilmente encontradas na crosta terrestre e não implicam em vastas áreas de utilização dos solos, além de possuírem uma logística já estabelecida e alta eficiência energética. Entretanto, os efeitos negativos que esta fonte tradicional de energia vem estimulando, há tempos, a busca de fontes alternativas. Dentre as razões para essa busca podem ser mencionadas questões ambientais, sociais e econômicas. A primeira pode ser constatada pelos altos índices de emissão de dióxido de carbono registrados, gás considerado como o principal responsável pelo efeito estufa (SOUZA, 2010; MME, 2013). Estes valores estão ilustrados na Figura 3.1, sendo o setor de transporte o que mais impacta a emissão de dióxido de carbono no Brasil devido a política pública de transporte rodoviário e aumento da aquisição de veículos de passeio. A questão social envolve os impactos na saúde individual e coletiva, pois segundo Gallo e colaboradores (2000) a população de baixa renda é mais suscetível a enfermidades desde intoxicações químicas a doenças imunológicas e respiratórias. Por sua vez a questão econômica envolve a constante oscilação do preço do petróleo, causada principalmente por crises políticas, pois quando se observa o perfil da distribuição mundial do consumo de petróleo, percebe-se uma inversão em relação ao que ocorre na distribuição espacial das reservas. Reservas e produção concentram-se atualmente

em países não desenvolvidos, notadamente Oriente Médio, com as exceções do Canadá, Rússia e Mar do Norte (Reino Unido e Noruega), sendo que os campos nessa região já se encontram em declínio. Já o consumo está concentrado nos países que compõe a OCDE, industrializados e desenvolvidos, embora se observe crescimento significativo, nos últimos anos, do consumo em países da Ásia e do Pacífico. É para essas regiões que se direcionam os fluxos físicos de petróleo.. Dada a importância do petróleo na matriz energética essa situação é potencialmente conflituosa e está na raiz de várias crises, nem sempre resolvidas pelos caminhos do entendimento (MME, 2013).

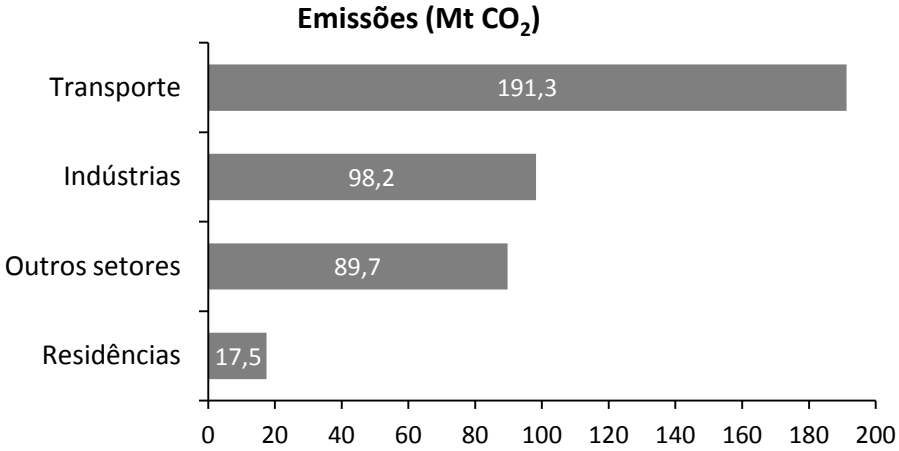


Figura 3.1 Emissão de CO_2 no uso da energia no Brasil. Adaptado de MME (2012).

As fontes de energia renováveis são aquelas que podem ser usadas permanentemente, isto é, são consideradas fontes renováveis se seu uso não causa uma variação significativa nos seus potenciais e se suas reposições em curto prazo são relativamente certas (RUSSOMANO, 1987 apud ABREU, 2012). As vantagens do uso deste tipo de energia são diversas onde cabe ressaltar a redução de impactos sociais, contribuição para melhor qualidade de vida e redução da poluição atmosférica.

O uso de energia renovável não é recente, pois observa-se que nos últimos 30 anos, a oferta primária de energia hidráulica no mundo evoluiu consideravelmente em duas regiões: Ásia, com destaque para a China, e América Latina, com destaque para o Brasil. Com efeito, essas duas regiões respondiam, em 1973, por cerca de 10% da produção mundial de hidroeletricidade. No Brasil, em particular, entre 1974 e 2011, a potência instalada em usinas evoluiu de 13.724 MW para quase 77.303 MW, entre os dois anos indicados. Essa evolução esteve concentrada no início da década de 80, quando o mundo sofria as conseqüências dos choques no preço do petróleo ocorridos na década anterior e se instalavam no país grandes indústrias eletro-intensivas. Em contraposição, nos últimos anos, apesar de nominalmente

elevada, a expansão hidrelétrica foi relativamente pequena, se comparada com a expansão da oferta interna total de energia, Uma consequência da expansão modesta nesses anos foi o racionamento vivenciado em 2001-2002 por grande parte do sistema elétrico interligado (PLANO NACIONAL DE ENERGIA – PEN 2030, MME, 2012).

Em 2011 foi registrada alta porcentagem da participação de recursos renováveis na Matriz Energética Brasileira (44,1%), aparecendo entre as mais elevadas do mundo, principalmente por conta do alto consumo de energia do setor hidroelétrico no país e biomassa para geração de energia (Figura 3.2).

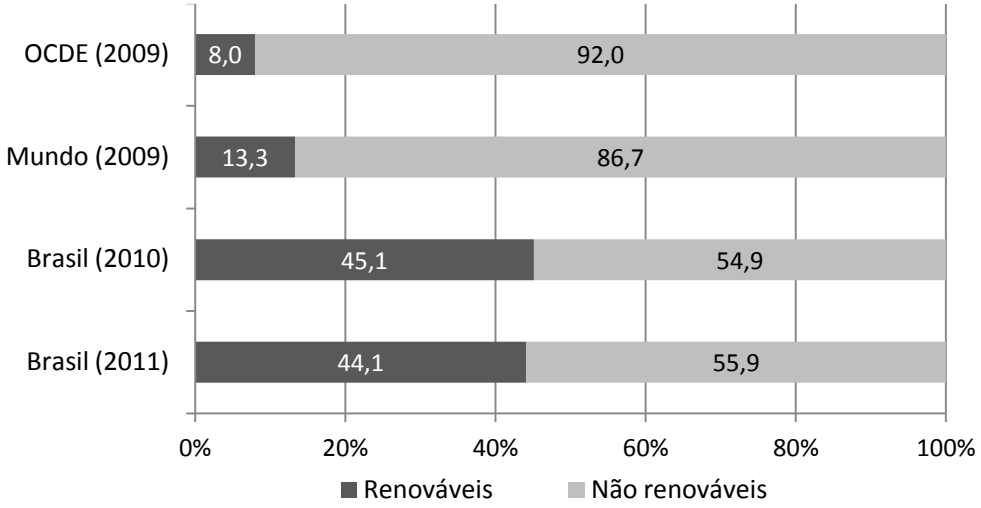


Figura 3.2 Participação de renováveis na Matriz Energética. Adaptado de MME (2012).

Uma característica particular do Brasil é a aplicação das tecnologias de biomassa em grande escala no setor industrial. É possível citar o carvão oriundo de plantações de eucaliptos, e a cogeração de eletricidade do bagaço de cana, onde com a expansão e renovação das unidades de processamento do setor sucroalcooleiro e a valorização dos resíduos agrícolas e industriais do processo, as centrais termoelétricas desenvolveram vias tecnológicas para a geração de energia elétrica a partir da biomassa da cana. Em todas elas há um processo de conversão da biomassa em um produto intermediário que será então utilizado em uma máquina motriz, onde será produzida a energia mecânica que acionará o gerador de energia elétrica (ABREU, 2012).

Outra fonte de consumo de energia que se faz presente no cotidiano do Brasil é registrada no setor de transporte. Neste âmbito, os biocombustíveis são alternativas potenciais ao uso de gasolina e do diesel utilizados em motores automotivos. As tecnologias mais avançadas, em termos de pesquisa e desenvolvimento, para obtenção de biocombustíveis são

o bioetanol e o biodiesel. Por razões políticas, econômicas e ambientais, os biocombustíveis têm se revelado como fontes energéticas promissoras.

3.2 Biodiesel: combustível renovável

Dentre as fontes renováveis, o biodiesel tem sido considerado o melhor candidato para substituição do diesel, uma vez que pode ser utilizado em motores de compressão e ignição sem a necessidade de qualquer modificação (KNOTHE, 2003). A definição química do biodiesel é uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos.

No Brasil o planejamento estratégico do governo é promover a substituição do diesel de forma gradativa. Para este fim desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Atualmente o Brasil é o quarto maior produtor mundial de biodiesel, sendo superado apenas pelos Estados Unidos, Alemanha, e Argentina, respectivamente o primeiro, o segundo e o terceiro colocado (REN21, 2011). A adição compulsória do biodiesel ao diesel promove e estimula o aumento da sua produção e comercialização. A Figura 3.3 ilustra o crescimento da produção e demanda nacional de biodiesel nos últimos anos. Pode-se observar que a produção anual, em 2012, de 2,6 bilhões de litros foi inferior à capacidade instalada, no mesmo ano, cerca de 6,6 bilhões de litros (ANP, 2013).

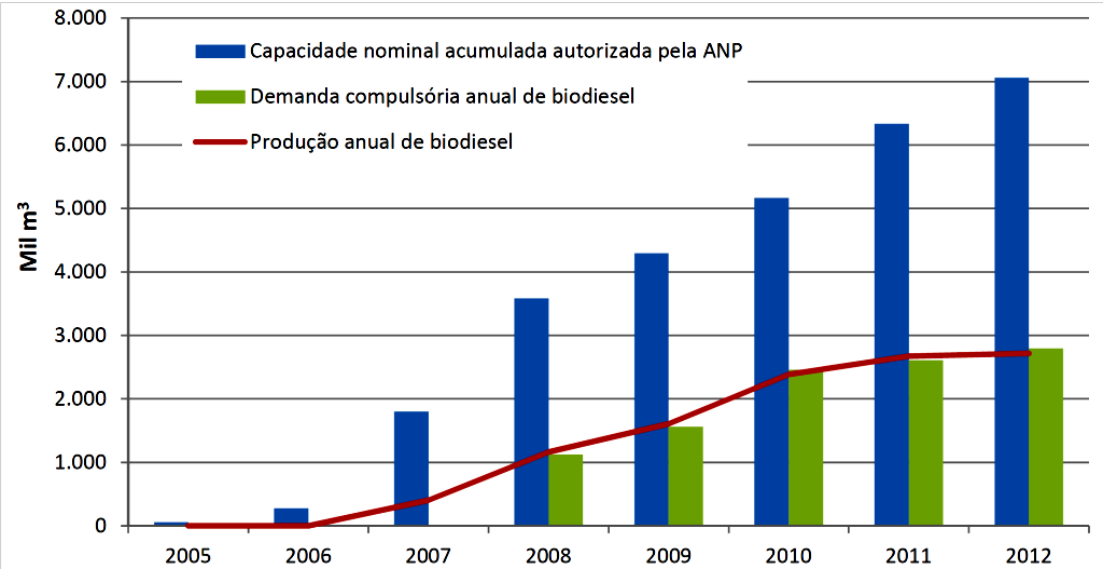


Figura 3.3 Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país. Fonte: ANP (2013).

O principal desafio à produção de biodiesel no Brasil está associado à aquisição das matérias primas a preços competitivos. Para superar esta barreira, o Governo Federal tem

promovido incentivos para incluir a agricultura familiar na cadeia produtiva do biodiesel através do Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel (PNPB). Assim, dentro deste programa, a inclusão social tem como objetivos gerar alternativas de emprego no campo, aumentar a renda familiar e ampliar a oferta de fontes de energia renovável. Neste cenário, o modelo agrícola pode vir a ser mais próspero e sustentável deixando de ser somente uma agricultura de auto-sobrevivência para ser auto-sustentável economicamente, ambientalmente e socialmente (ABREU *et al.*, 2012). A Figura 3.4 ilustra a evolução na quantidade de matéria prima oriunda de agricultura familiar adquirida no período de 2006 a 2010. Nesta figura observa-se que no ano de 2010 foi registrado um aumento de 56% se comparado ao ano anterior.

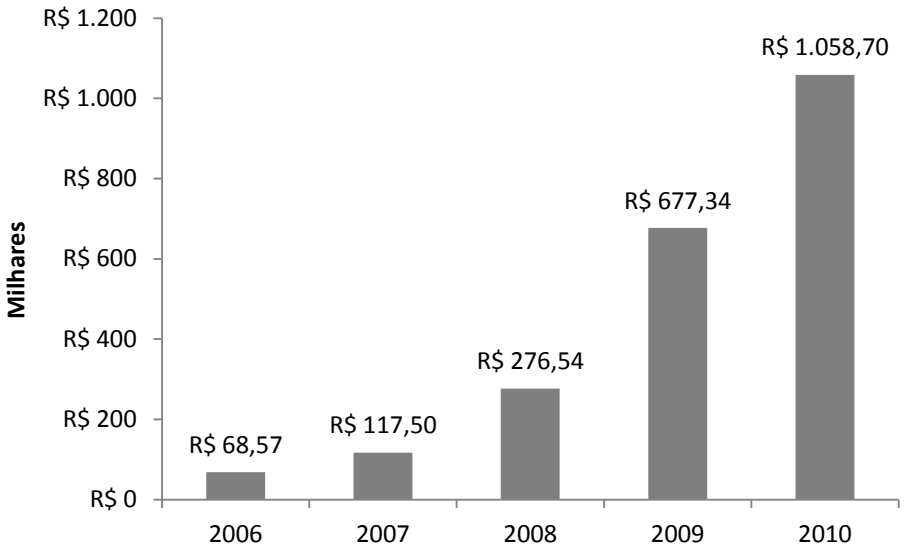


Figura 3.4 Aquisições das matérias primas oriundas da agricultura familiar. (Adaptado de Ministério de Desenvolvimento Agrário, 2010)

Para fortalecer a relação comercial entre os agricultores e os produtores de biodiesel, o Ministério de Desenvolvimento Agrário concede a estes o Selo de Combustível Social (SCS), que oferece diversas vantagens para o produtor de biodiesel como melhores condições de financiamento e participação assegurada de 80% do biodiesel negociado nos leilões públicos da ANP (ABREU *et al.*, 2012 e MDA, 2010). O último leilão (31º), ocorrido no início de junho, arrematou 515 milhões de litros, sendo 99,5% deste volume fornecido por produtores que possuíam o SCS (ANP, 2013).

3.2.1 Biodiesel Aspecto Ambiental

Como abordado na seção anterior, as questões ambientais tem recebido grande destaque na mídia internacional, sendo discutidas constantemente na pauta de reuniões de chefes de Estado. A última reunião relevante, denominada Conferência das Nações Unidas sobre Desenvolvimento Sustentável – Rio +20 foi realizada em 2012 no Brasil. Nesta conferência, dois temas principais orientaram os debates: a economia verde, no contexto do desenvolvimento sustentável e da erradicação da pobreza; e a estrutura institucional para o desenvolvimento sustentável (RIO+20, 2012).

Em termos ambientais, a adoção do biodiesel resulta em redução das emissões de materiais particulados, óxido de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa e chuvas ácidas. A menor emissão de gases poluentes é uma das principais vantagens do uso de biodiesel. Barnwal e Sharma (2005) analisaram a emissão de gases poluentes pelas combustões de biodiesel e de óleo diesel de petróleo, obtendo resultados favoráveis para o uso de biocombustível. Eles concluíram que o SO_2 é totalmente eliminado enquanto a fuligem, o monóxido de carbono, os hidrocarbonetos, os hidrocarbonetos poliaromáticos e os gases aromáticos decrescem em 60%, 50%, 50%, 72% e 15%, respectivamente (Figura 3.5).

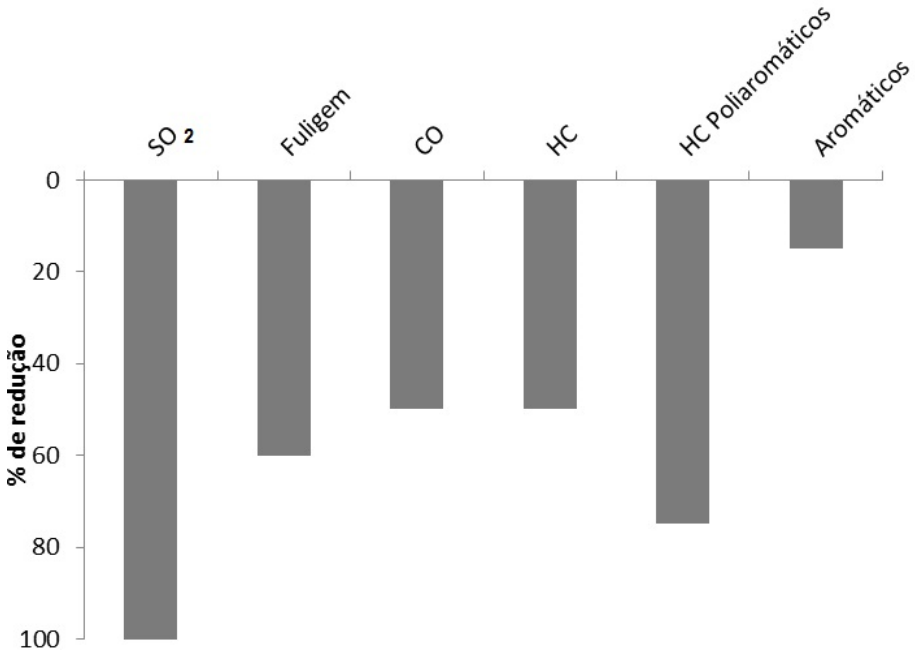


Figura 3.5 Redução dos principais gases poluentes. (Adaptado de BARNWAL e SHARMA, 2005)

O biodiesel tem número de cetano maior que o diesel e o teor médio de oxigênio em torno de 11%. Sendo assim, a adição de biodiesel ao diesel, em termos gerais melhora as

características do combustível fóssil, pois possibilita a redução de emissão de CO_2 e CO pelo aumento do número de cetano (KNOTHE, 2003).

Segundo Souza (2010), pelo fato de o biodiesel possuir ponto de fulgor maior que ao diesel, ele é considerado um combustível não inflamável, o que proporciona uma maior segurança nas condições normais de transporte, manuseio e armazenamento.

Outro tema que permeia a questão ambiental no que diz respeito ao biocombustível, em especial o biodiesel, é a questão da energia. A bioenergia provavelmente tornar-se-á a matéria-prima base de todo um sistema produtivo em função de sua possível sustentabilidade. Nesse contexto o Brasil tem destaque por ser um país tropical que apresenta um elevado potencial para a produção de energia por meio de biomassa (Centro de Gestão e Estudos Estratégios - CGEE, 2010).

Embora haja diversos benefícios, o biodiesel possui menor poder calorífico quando comparado ao diesel convencional, emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NO_x) e possui maior viscosidade que o petrodiesel acarretando problemas no seu uso em regiões de clima frio (BARNWAL e SHARMA, 2005). Além disso, o preço de mercado é relativamente superior ao diesel comercial. No entanto se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for otimizado, a produção de biodiesel poderá ser obtida a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel (SOUZA, 2010).

3.3 Glicerol

A questão do glicerol merece atenção diferenciada já que a fração gerada na conversão dos triglicerídeos nesse subproduto é alta, tornando necessário o desenvolvimento de propostas de utilização do glicerol excedente da produção de biodiesel.

O termo glicerol aplica-se apenas ao composto químico puro 1,2,3-propanodiol. Já o termo glicerina aplica-se aos produtos purificados disponíveis comercialmente. No mercado existe glicerina disponível com várias concentrações de glicerol. A oferta e a demanda do produto apresentavam-se em equilíbrio desde 1998. No entanto, a partir de 2007, essa situação mudou completamente pela maior oferta proveniente das plantas de biodiesel. A queda do preço foi impactante quando os primeiros lotes de glicerina de biodiesel começaram a aparecer, as cotações despencaram de R$ 4 para R$ 0,80 por kg (FIRBANKS, 2009).

A glicerina é utilizada praticamente em toda indústria. As principais áreas de aplicação da glicerina são: a alimentícia, a farmacêutica, a produção de bebidas, a cosmética, a indústria

de tabaco, de tintas dentre outras (TAPANES, 2008). Porém a tendência é diferenciar as glicerinas, com faixas de preços diferentes. Segundo Eduardo Oliva, coordenador da área de óleos vegetais e produtos fracionados da Uniamerica, “A glicerina de biodiesel carrega resíduos de metanol e outros produtos e não deveria ser usada em alimentos, cosméticos e medicamentos”. As aplicações industriais podem aceitar produtos com teores de glicerol mais baixos, entre 90% e 98%, porém a presença de contaminantes pode interferir na coloração (FIRBANKS, 2009).

Diante do aumento de oferta, a glicerina oriunda do biodiesel motivou as Universidades nacionais a desenvolver pesquisas de novas aplicações. A Universidade Federal da Paraíba, por exemplo, estuda a produção de substâncias bioativas, como antibióticos, analgésicos a partir da glicerina. A Universidade Federal do Paraná estuda a obtenção de plastificantes para PVC utilizando o mesmo material. Contudo, a maior possibilidade de consumo de glicerina está na produção de propeno “verde”, para ser polimerizado em polipropileno. Essa resina terá fonte renovável, característica que lhe assegurará um prêmio no preço final de venda (FIRBANKS,2009).

Tanto a transesterificação de triacilgliceróis quanto a esterificação de ácidos graxos, realizadas para a síntese de ésteres metílicos ou etílicos (ambos usados como biodiesel) podem ser obtidas por catálise química ou enzimática. A catálise química, apesar de bons rendimentos (acima de 90%) gera resíduos tóxicos, além de produzir toneladas de glicerina impura e com baixo valor comercial. A catálise enzimática, por outro lado, acontece em condições brandas e a glicerina produzida tem maior pureza, alcançando valores de mercado mais elevados (MESSIAS *et al*., 2010). Estudos recentes mostram que a glicerina obtida a partir da transesterificação enzimática é bastante atrativa quando comparada às outras rotas por ser facilmente recuperada e o processo de purificação dos ésteres etílicos ou metílicos ser mais simples, motivando a pesquisa para viabilizar a produção de biodiesel por esta rota (SILVA *et al.*, 2008).

3.4 Matéria prima oleaginosa para produção de biodiesel

A USDA (2012) lista nove principais oleaginosas que totalizam uma produção anual de, aproximadamente, 200 milhões de toneladas de óleo. A matéria prima para produção de óleo no Brasil está concentrada principalmente na cultura da soja. Outras oleaginosas tradicionais como dendê, algodão, girassol, amendoim e mamona, contribuem com pequenas quantidades de óleo. Com exceção do dendê, cuja produção anual é superior a 3,5 t/ha, as

demais oleaginosas produzem menos de 1,0 t/ha/ano. Essa baixa densidade de produção exigiria uma grande expansão de área, para atender às demanda do mercado nacional para os próximos anos. Das oleaginosas tradicionais somente o dendê apresenta características vantajosas para atendimento do crescente mercado de óleos e gorduras. Entretanto, este fruto está restrito às regiões de clima tipicamente equatorial, na Amazônia e no Recôncavo Baiano. Por outro lado, o Brasil apresenta uma diversidade de oleaginosas nativas, além de algumas espécies promissoras em processo de domesticação, como a macaúba (*Acrocomia aculeata*).

Dentre as possíveis matérias primas para a produção do biodiesel, existe uma gama de estudos que apresentam óleos, gorduras e resíduos oleosos como fonte de ácido graxo. Destas opções, o uso do óleo vegetal vem sendo mais recomendado por conta das suas propriedades físico-químicas. Segundo Souza (2010), mais de 95% da matéria prima lipídica empregada para produção de biodiesel provém de óleos vegetais comestíveis em razão da grande produção mundial desses óleos. Existe no mundo em torno de 4000 espécies vegetais das quais é possível se extrair óleo. Além disso, a composição química da maioria dos vegetais, onde predomina triglicerídeos estáveis, favorece a obtenção de um biodiesel de alta qualidade. De acordo com Silva (2009) existe um grande potencial a ser explorado na área de óleos vegetais no Brasil, tanto em relação ao aproveitamento das culturas temporárias quanto perenes.

Atualmente, três oleaginosas são produzidas em larga escala e tem importância diferenciada no mercado internacional de óleos vegetais, sendo responsáveis por mais de 80% da produção global:

- A palma africana (ou dendezeiro), oleaginosa de onde se extrai dois óleos: óleo de palma ou dendê (da polpa do fruto) e óleo de palmiste (da semente);
- A colza, principal oleaginosa produzida na Europa e insumo mais usado para a produção de biodiesel;
- A soja, historicamente, a oleaginosa mais cultivada no mundo, principalmente para a obtenção de farelo, fonte protéica usada em larga escala na alimentação.

O dendê é uma das oleaginosas de maior produtividade no planeta, com uma área plantada em 2010 de 16 milhões de hectares, sendo que a Malásia e Indonésia concentram 87% desta produção. A produção nacional em 2012 foi de 240 e 23 mil ton. de óleo de palma e palmiste, respectivamente, onde 95% é destinado a área de alimentos. Um dos motivos que levaram esta oleaginosa a uma alta produtividade foram os estudos conduzidos por uma

instituição francesa, no final do século XX, que resultou em um aumento de 300% na produtividade média em óleo (VILLELA, 2009; EMBRAPA, 2013). No Brasil, a Embrapa possui um dos mais completos bancos de germoplasma de palma africana, material genético em avançado estágio de melhoramento, além de fornecer assessoramento para formação de equipe técnica para as pesquisas no Brasil e produzir sementes de alta qualidade tanto para a demanda doméstica quanto a de países vizinhos, em particular a Colômbia, maior produtor de óleo de dendê do continente americano (EMBRAPA, 2013). Uma das desvantagens do uso desta oleaginosa como matéria prima para o biodiesel está nas exigências climáticas desta espécie. Há limitações para sua disseminação no território brasileiro, prevalecendo-se restrita às áreas de produção na Amazônia equatorial e sudeste da Bahia devido ao clima tropical (VILLELA, 2008).

O melhoramento genético ocorrido com a colza (*Brassica napus*) também foi um dos motivos que levaram esta oleaginosa a se tornar a terceira mais produzida no mundo. Esta modificação foi realizada no Canadá, no final do século XX, que designou a nova espécie com o nome de "canola" (abrev. de **Can**adian **O**il **L**ow **A**cid). Com estas modificações genéticas houve redução significativa de ácidos erúcico e glucosinolatos que são substâncias tóxicas se consumido em doses altas. A produção mundial de colza em 2012 foi da ordem de 61 milhões de toneladas e no Brasil 43,8 mil toneladas (Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA, 2013).

Dentre as matérias-primas tradicionais, a soja contribui com mais de 80% da oferta para a produção de biodiesel, devido à logística instalada no Brasil nestes últimos 30 anos pelo setor agroindustrial. Ela é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. Atualmente, a agroindústria transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo e 23,5 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite (MAPA, 2013). A estimativa da safra de soja em 2013 é de aproximadamente 83 milhões de toneladas com rendimento médio esperado de 3.031 kg/ha (IBGE, 2013). Além disso, a soja e o farelo de soja produzidos no Brasil possuem alto teor de proteína e padrão de qualidade Premium, o que permite sua entrada em mercados extremamente exigentes como os da União Européia e do Japão. De acordo com EMBRAPA (2013), a soja continuará respondendo pela maior participação na oferta de matéria-prima para a produção de biodiesel, nestes próximos cinco anos.

A utilização de óleos comestíveis caracteriza uma produção competitiva com a produção destinada a alimentos, resultando na elevação do preço da matéria prima e, por consequência, dos produtos finais – óleo comestível e biodiesel.

O grupo *United Soybean Board* (2013) desenvolveu estudos sobre o efeito do uso de óleo de soja, como matéria prima para o biodiesel, no preço do óleo comestível. Segundo este estudo, realizado entre os anos de 2006 e 2012, houve, nos Estados Unidos, um aumento de US$ 15 bi, o que ocasionou também um aumento de US$ 0,74 por *alqueire* (equivalente a cerca de 27 kg) de soja em grão. A relação competitiva do setor de energia com o alimentício elevou os preços dos alimentos oriundos da soja. De acordo com Lewis Bainbridge, secretário da *United Soybean Board* (2013) e agricultor de soja nos EUA, na época em que a rotulagem de gordura *trans* passou a ser obrigatória nos produtos, houve redução do uso de óleo de soja nos alimentos e o produto se acumulava. Quando surgiu a demanda por óleo para produção de biodiesel o excesso de soja diminuiu significativamente. Com a porcentagem crescente de biodiesel no diesel, a alta demanda deslocou o preço para cima, que é aplicado também à soja destinada à alimentação. Este exemplo dos EUA se estende aos demais países como o Brasil, que é grande produtor de soja para alimentos e atualmente também para o biodiesel. Para reduzir a competição com o setor alimentício, pesquisas têm sido direcionadas para o uso de óleos não comestíveis (KNOTHE, 2003).

De acordo com estudos divulgados pela National Biodiesel Board (2013), o Brasil teria condições de liderar a produção mundial de biodiesel, promovendo a substituição de 60% da demanda mundial de óleo diesel mineral. Essa produção poderá gerar milhares de empregos no campo e reduzir a importação de diesel de petróleo, que hoje fica próxima de seis bilhões de litros, dos 38 bilhões consumidos anualmente.

3.4.1 Macaúba

A macaúba (Acrocomia aculeata) é uma palmeira nativa das florestas tropicais cujo caule atinge de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. A região dos nós é coberta de espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos (Figura 3.6) amadurecem, principalmente, entre setembro e janeiro e, em condições naturais, as sementes podem levar de um a dois anos para germinar. Pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil de modo a diminuir o tempo de germinação (LORENZI E NEGRELLE 2006, VIEIRA *et al.*, 2012).

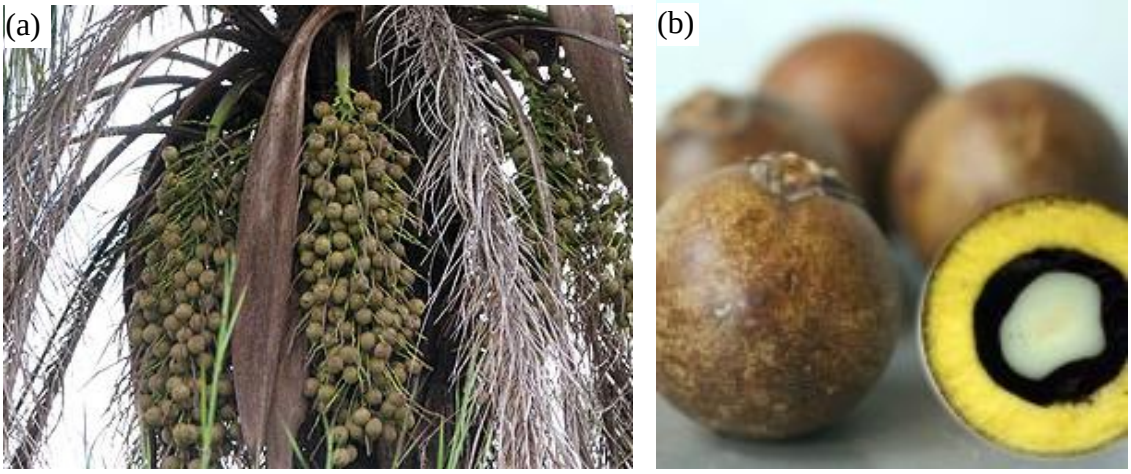


Figura 3.6 Palmeira de macaúba com cachos carregados do fruto (a). Fruto de macaúba inteiro (esquerda) e fracionado (direita) (b). Fonte: Rural Pecuária (2013) e Pólo de florestas (2013), respectivamente.

No Brasil, a macaúba é considerada como a palmeira de maior dispersão, com ocorrência de povoamentos naturais desta espécie em quase todo território. Entretanto, as maiores concentrações estão localizadas em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente espalhada pelas áreas de Cerrado. No passado, ela ocorria em abundância também em São Paulo, mas as populações naturais foram sistematicamente substituídas pelo cultivo do café (HENDERSON *et al.*, 1995). A Figura 3.7 ilustra as regiões de maior predominância de macaúba no território brasileiro.

Figura 3.7 Mapa de regiões que possuem maior ocorrência no Brasil. Fonte: MELO, 2012

Esta palmeira permite a possibilidade de estabelecer cultivos em outras regiões do país, inclusive as regiões mais pobres de Minas Gerais, como Norte e Zona da Mata, devido a sua adaptação a períodos secos definidos. Motta e colaboradores (2001) desenvolveram estudos sobre as condições climáticas e concluíram que a palmeira de macaúba tem preferência por solos férteis, mas sobrevivem em ambientes com excesso de água por possuírem estruturas especializadas que permitem trocas gasosas em áreas inundadas. Tal fato se confirma, pois os agricultores e pesquisadores de Minas historicamente utilizam a macaúba como planta indicadora de solos férteis (HENDERSON *et al.*, 1995).

Outra vantagem da macaúba é que o porte ereto da planta permite a produção integrada com lavouras temporárias nos primeiros anos após o plantio e com pastagens, após o quarto ano. Dessa forma, seria possível aperfeiçoar o aproveitamento da propriedade rural, produzindo óleo e carne (ou leite) no mesmo espaço. Além disso, a macaúba ainda pode ser usada para recompor áreas de reserva legal gerando renda para o produtor, com o manejo sustentável da área (EMBRAPA, 2012).

A palmeira da macaúba, por não ser um insumo tradicional para a produção de alimentos, tem despertado o interesse da sociedade científica, empresarial e governamental para a sua inclusão na cadeia produtiva do biodiesel. A síntese de biodiesel concomitante com a valorização de seus co-produtos, glicerol e carotenóides, a partir do óleo de macaúba

utilizando tecnologia enzimática no seu processamento, insere-se nos princípios da química verde e desenvolvimento sustentável. O uso sustentável da macaúba poderá contribuir para a aumentar a produção de biocombustíveis visando abastecer a crescente demanda que se apresenta como um desafio para o setor energético nacional.

3.4.1.1 Óleo Ácido de Macaúba

De acordo com Melo (2012), palmeiras como a macaúba, o dendê, o pequi e o babaçu apresentam alta produtividade de óleo por hectare e baixos custos de manutenção, pois são plantas perenes, não necessitando de grandes investimentos anuais com o plantio. A tabela 3.1 mostra a produtividade de algumas oleaginosas. A macaúba se destaca, superando a produtividade do dendê.

Tabela 3.1 Produtividade algumas oleaginosas em L/ha. Fonte: Melo, 2012.

Oleaginosas	Rendimento Agrícola (L/ha)
Abacate	2000 a 2500
Algodão	100 a 400
Amendoim	80 a 1200
Babaçu	1500 a 2000
Coco	2000 a 2500
Dendê	3000 a 3500
Girassol	500 a 1100
Macaúba	3500 a 4000
Mamona	400 a 1000
Pequi	2600 a 3200
Soja	400 a 650

A macaúba apresenta ampla utilidade e, mais recentemente, grande interesse sócio - econômico para a produção de óleos vegetais. Em meio as suas várias utilidades são relatados usos medicinais, alimentícios e cosméticos. Entretanto, a qualidade que mais se destaca é a sua capacidade de produção de óleo vegetal, podendo superar quatro mil litros por hectare em plantios racionais e em programas de melhoramento. Esta característica do fruto da macaúba poderá suprir a crescente demanda de óleos graxos com vantagens econômicas e sociais (GONTIJO *et al*., 2008). Além disso, o óleo da polpa de macaúba possui um acentuado grau

de insaturação, cuja composição em ácidos graxos o coloca entre os óleos de alta qualidade para aplicações industriais, principalmente em razão do alto teor de ácido oléico. Semelhante ao dendê, também são extraídos dois tipos de óleo da macaúba. O óleo da macaúba que é extraído da polpa tem características físicas e químicas bem distintas do óleo da amêndoa. O óleo da amêndoa é um óleo altamente saturado no qual predomina o ácido láurico (C12:0) e tem sido empregado, principalmente, na indústria cosmética. Atualmente um mercado potencial para uso de óleos contendo elevado teor de ácido láurico é o de biocombustíveis para aviação. A produtividade desse óleo é menor: cerca de 1.000 kg/ha. O valor de mercado, no entanto, pode chegar a R$ 3.500,00/ton. - mais do que o dobro do preço do óleo da polpa (EMBRAPA, 2012). A Tabela 3.2 apresenta a composição de ácidos graxos tanto do óleo extraído da polpa como da casca e semente.

Tabela 3.2 Composição de ácidos graxos majoritários da semente, polpa e amêndoa de macaúba. Fonte: Silva, 2009.

Ácidos Graxos	**Casca**	**Polpa**	**Amêndoa**
Ácido caprílico			6,2
Ácido cáprico			5,3
Ácido láurico			43,6
Ácido mirístico			8,5
Ácido palmístico	24,6	18,7	5,3
Ácido palmitoléico	6,2	4	
Ácido esteárico	5,1	2,8	2,4
Ácido oléico	51,5	53,4	25,5
Ácido linoléico	11,3	17,7	3,3
Ácido linolênico	1,3	1,5	
Ácidos Saturados	29,7	21,5	71,2
Ácidos Insaturados	70,3	78,5	28,8

Além dos óleos para a produção de biocombustíveis e outros produtos, da macaúba se obtém coprodutos que agregam valor à cadeia produtiva. Entre estes, o endocarpo, parte do fruto que protege a amêndoa (Figura 3.6 (b)), vem ganhando destaque devido ao seu poder calorífico maior do que o do eucalipto e alto teor de lignina, que favorece seu uso como carvão vegetal. Silva e colaboradores (2009) avaliaram o comportamento do endocarpo da macaúba do endocarpo de babaçu e da madeira de eucalipto para produção de carvão vegetal.

O rendimento em carvão foi avaliado em 3 diferentes temperaturas (300, 500 e 700°C) e em todas elas o endocarpo de macaúba foi superior aos demais para usos em metalúrgicas, siderúrgicas e doméstico.

Outro uso para o endocarpo é como matéria prima para carvão ativado. Segundo a pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Daniela Colares, por suas características estruturais o endocarpo de macaúba é um excelente produto para purificação, que pode vir a ser empregado tanto em filtros de água domésticos, quanto em sistemas para refino de petróleo. A pesquisadora relata que, devido ao alto valor de mercado do endocarpo, o plantio da palmeira se tornou mais rentável e vem promovendo o aumento dos plantios comerciais. É possível obter até seis toneladas por hectare cultivado com a planta. O desafio tecnológico neste caso será separá-lo da amêndoa sem nenhuma contaminação (EMBRAPA, 2012).

O processamento da macaúba compreende diversas fases que vão desde a produção e colheita do coco até o beneficiamento final dos produtos derivados (Figura 3.8). A etapa de pós-colheita do fruto é ainda muito pouco estudada e a extração do óleo é feita aplicando-se tecnologias adaptadas de outras oleaginosas. Estes fatores contribuem para a baixa qualidade do óleo comercializado no cerrado brasileiro (MARIANO 2011).

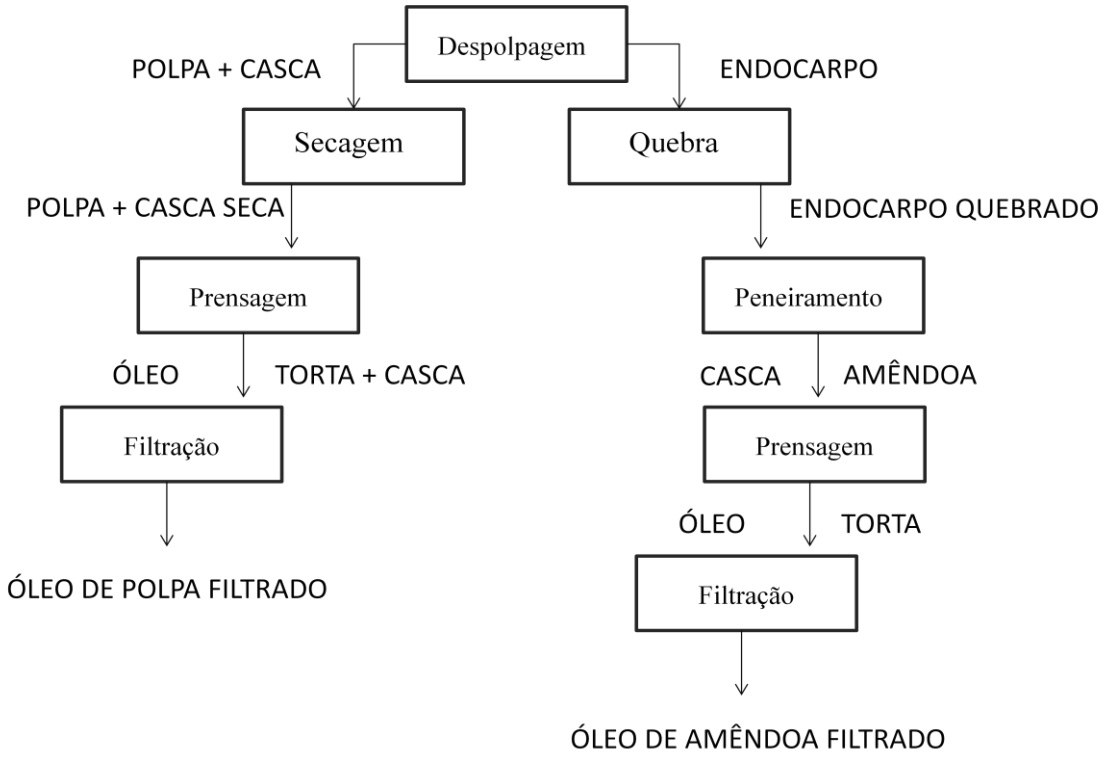


Figura 3.8 Diagrama de blocos do processo industrial para produção de óleo de macaúba via prensagem contínua. Fonte: Adaptado de Ocanha e Ferrari (2011).

Para que a macaúba seja uma alternativa potencial para substituir outras oleaginosas na produção do biodiesel, faz-se necessário o conhecimento de toda a cadeia produtiva e dos principais problemas associados à colheita e pós-colheita deste fruto, de forma a torná-lo competitivo no mercado de biocombustíveis.

Pimentel e colaboradores (2009) fizeram um estudo de pré-viabilidade econômica para estimar os custos de produção de frutos de macaúba para extração de óleo. Eles consideraram fatores como: plantação de 400 mudas por hectare, um horizonte de 30 anos dividido em 4 etapas (1º ano implantação, 2º ao 4º ano formação, 5º ao 10º produção crescente e do 11º ao 30º ano produção estável) e preço de venda de R$ 170,00. Além disso, dividiram os custos em 4 partes, como segue: Operações Mecanizadas, Operações Manuais, Insumos e Custos administrativos. Como resultado eles encontraram um valor de R$ 97,94 para o custo médio de 1 tonelada de coco com casca. Valor inferior ao encontrado para o dendê que é de R$ 126,00 por tonelada. Eles também afirmam que o item de maior impacto na produção da macaúba em casca são os gastos com insumos. Isto se deve principalmente aos gastos com mudas, na implantação da cultura e adubos minerais. O segundo item de maior peso nos custos de produção são as operações manuais. A demanda de mão-de-obra está concentrada na fase de plantio e na fase reprodutiva da cultura (colheita). Segundo esses autores, as operações mecanizadas causaram menor impacto no custo, pois, após maturação completa, o fruto da macaúba desprende-se do cacho a uma altura de até 15 m caindo ao solo, podendo acarretar então a ruptura da casca. Além da altura, os espinhos em média com 15 cm de comprimento são impedimentos à colheita dos cachos (Figura 3.9).

Figura 3.9 Espinhos da palmeira de macaúba. Fonte: Acrotech

No cerrado brasileiro, os frutos da macaúba são, em geral, armazenados ao ar livre ou em galpões pouco ventilados, durante vários meses (Figura 3.10) antes de serem submetidos à extração do óleo por prensagem. A microflora, representada em grande parte por fungos, conforme comprovaram os estudos citados por Silva (2009), contém micro-organismos lipolíticos que hidrolisam os triglicerídeos presentes na polpa. Desta forma, o óleo obtido a partir destes frutos apresenta elevado teor de ácido graxos livres (atingindo valores de até 60%) sendo, por esta razão, destinado principalmente para a indústria de sabões.

Figura 3.10 Armazenamento dos frutos após coleta. na Empresa Paradigma. Fonte: Suely P. Freitas

A utilização da macaúba como fonte produtora de energia renovável ganhou em 2011 novo impulso do Governo de Minas, que regulamentou a Lei nº 19.485/2011 – Pró-Macaúba. A norma instituiu a política estadual de incentivo ao cultivo, a extração, a comercialização, ao consumo e à transformação da macaúba e das demais palmeiras oleaginosas. A regulamentação da referida lei aconteceu em função da demanda crescente por energias renováveis, atendendo às diretrizes de sustentabilidade ambiental, social e econômica definidas no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (Secretária de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais - SEAPA, 2012).

Compete a SEAPA incentivar o plantio, a comercialização e a industrialização da macaúba e das demais palmeiras oleaginosas, estimular o beneficiamento dos produtos, coprodutos e derivados, visando a sua utilização para diversos fins, bem como incentivar a participação dos produtores rurais em projetos integrados com a agroindústria e a indústria. Além disso, a Secretaria deve difundir e transferir tecnologia e desenvolver ações de extensão rural, priorizando os pequenos e médios produtores rurais.

Segundo Motta e colaboradores (2001), os principais gargalos para a implantação de plantios comerciais dessa palmeira seriam a quebra de dormência da semente para produção de mudas e o lento crescimento inicial. No caso da quebra de dormência, já existem técnicas de laboratório capazes de promover a germinação com rapidez e eficiência (MOTOIKE *et al*., 2007). Já o lento crescimento inicial, é comum a quase todas as culturas perenes (PIMENTEL et al., 2007). Por meio de materiais coletados pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Embrapa está sendo criado um banco de germoplasma da macaúba. Os pesquisadores utilizaram a biologia molecular para identificar a diversidade dos materiais genéticos encontrados.

A germinação natural da semente da palmeira é pobre, alcançando no máximo 3%. A técnica desenvolvida na UFV consiste em um conjunto de sete tratamentos e eleva a taxa de germinação para 80%. O produto dessa técnica é a semente pré-germinada (Figura 3.11), que tem potencial de estabelecimento superior a 90% em viveiro. A técnica foi patenteada pela UFV, que assinou convênio de transferência de tecnologia e concedeu licença à Acrotech — empresa nacional de produção de sementes de macaúba — para que pudesse utilizar comercialmente o processo, mediante recolhimento de royalties, o que foi feito com a Entaban Brasil (ACROTECH, 2012).

Figura 3.11 Sementes e mudas do projeto de alteração genética da macaúba. Fonte: Acrotech

A Fertibom, empresa produtora de biodiesel em escala industrial e detentora do SCS, com capacidade de 330 mil L/dia, está localizada em Catanduvas, interior de São Paulo. Esta empresa produz comercialmente biodiesel a partir de óleo de macaúba associado a um projeto com cooperativas do Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Eles assessoram os agricultores fornecendo dados técnicos para tornar o plantio tecnicamente viável. Seu principal objetivo é incrementar o estímulo e beneficiamento do fruto de macaúba de forma a gerar emprego e renda envolvendo centenas de produtores rurais ligados à agricultura familiar (MDA, 2012).

A Petrobras Biocombustíveis comprou 30 mil toneladas de coco macaúba, que foram utilizadas como matéria-prima na fabricação de biodiesel na usina instalada em Montes Claros. O objetivo do acordo firmado entre a Petrobras Biocombustível e o governo de Minas Gerais em janeiro deste ano é ampliar o número de postos na usina e na área de suprimento agrícola, além de contemplar o incremento da participação de agricultores familiares na cadeia do biodiesel. A meta é atingir 4.500 pequenos produtores até 2014 de modo a alcançar uma capacidade total de 765 milhões de litros por ano após a expansão em Montes Claros (http://www.g1com.br. Acesso em: 21/04/2013).

Além disso, já existe uma empresa multinacional instalada em Minas Gerais, Entaban Ecoenergéticas SA®, com sede na Espanha, que possui projetos pilotos baseados na produção de biodiesel a partir de óleo de macaúba. O projeto encontra-se na etapa de crescimento das mudas plantadas em 60.000 hectares (ENTABAN, 2012).

3.4.2 Fracionamento a seco de óleos vegetais

O processo de fracionamento a seco, também conhecido como fracionamento natural, é baseado nas diferenças dos pontos de fusão dos triglicerídeos e seus derivados: diglicerídeos e monoglicerídeos. Trata-se de um processo termomecânico de separação no qual ocorre a cristalização parcial dos triglicerídeos de alto e baixo ponto de fusão, seguido de separação por decantação ou filtração (ZALIHA *et al.*, 2004).

O fracionamento a seco é, portanto, uma técnica que se baseia, principalmente, na propriedade dos óleos e gorduras de formar cristais quando ocorre uma redução na temperatura. Este é o processo mais simples e barato de cristalização fracionada, sendo conhecido como tecnologia “natural”. Ele consiste simplesmente na cristalização controlada da gordura fundida, conduzida de acordo com um resfriamento específico (CHIU *et al.*, 2007).

A fusão fracionada ou fracionamento a seco é aplicado em grande escala, principalmente com óleo de palma, sendo milhões de toneladas deste óleo fracionados todos os anos em estearina de palma e oleína de palma. Também é aplicada com outras gorduras, inclusive sebo de boi, banha e gordura de leite. Alguns dos usos mais freqüentes para a cristalização fracionada em escala comercial são: remoção de componentes com alto ponto de fusão ou de substâncias que podem conferir turbidez ao óleo. O primeiro caso acontece quando o óleo é levemente hidrogenado para ser convertido em um óleo mais estável e no segundo quando se deseja remover ceras presentes em lipídeos, sendo este último tipo de

fracionamento conhecido como winterização (ZALIHA *et al.,* 2004). O fracionamento do óleo de macaúba possibilita concentrar na fase leve (oleína) os componentes com baixo ponto de fusão, dentre eles os ácidos graxos livres (AGL).

3.5 Catalisadores Químicos

O método mais utilizado para transformação de ácidos graxos em biodiesel é a transesterificação que pode ser conduzida utilizando-se diferentes sistemas catalíticos: alcalino, ácido e enzimático. A Tabela 3.3 apresenta um resumo das principais vantagens e desvantagens de cada tipo de catalisador.

A maioria dos processos de produção industrial de biodiesel por transesterificação emprega o metóxido de sódio como catalisador, embora isto exija o uso de óleos com baixo teor de ácidos graxos livres para evitar a geração de produtos não desejáveis como o sabão (VICENTE, MARTÍNEZ e ARACIL, 2004). O sabão consome o catalisador reduzindo a eficiência catalítica e aumentando a viscosidade. As consequências são a formação de gel e a dificuldade de separação do glicerol.

Tabela 3.3 : Comparação das tecnologias enzimática e química (alcalina e ácida) para produção de biodiesel.

Parâmetros	**Processos**		
	Enzimático	**Alcalino**	**Ácido**
Presença de AGL no óleo	Há conversão	Formação de sabão	Há conversão
Rendimento em biodiesel	Alto	Alto	Alto
Taxa de reação	Baixa	Alta	Alta, porém menor que a alcalina
Recuperação glicerol	Fácil	Complexo	Complexo
Reuso catalisador	Fácil	Difícil	Dificil
Custo energético	Baixo, Temperatura 20 – 50^0C	Médio, Temperatura 60 – 80^0C	Alto, Temperatura > 100^0C
Impacto ambiental	Baixo, não necessário tratamento de efluentes	Alto necessário tratamento de efluentes	Alto necessário tratamento de efluentes

- ácidos graxos livres; adaptado de GOT et al., (2012)

Os principais ácidos utilizados para transesterificação incluem os ácidos sulfúrico, fosfórico e ácidos sulfônicos orgânicos. Embora a transesterificação por catálise ácida seja mais lenta que a alcalina, ela é recomendada quando o óleo usado tem alta concentração de ácidos graxos livres (SOUZA, 2008).

Os processos podem ser submetidos alternativamente à combinação de catalisadores ácidos e alcalinos, permitindo a transformação completa de triglicérideos (TGs) e ácidos graxos livres (AGLs) nos ésteres desejados (DABDOUB e BRONZEL, 2009). Entretanto, esta alternativa promove um aumento considerável no uso do catalisador e no número de etapas de reação. Há também como desvantagem a necessidade de reatores e equipamentos fabricados com materiais especiais de custo elevado, resistentes ao ataque ácido nas condições termodinâmicas da reação. Adicionalmente, ocorre a geração de grandes quantidades de efluentes. Esses fatos minimizam ou eliminam os ganhos pretendidos com sua aplicação (SAMIOS *et al*, 2009; RAMADHAS *et al*., 2005).

3.6 Biocatalisadores

Enzimas são catalisadores de origem biológica, capazes de acelerar a taxa de reação da mesma forma que os catalisadores químicos e que, graças às suas propriedades, podem favorecer algumas reações. Elas apresentam alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas e atuam sob condições amenas de temperatura e pH (LEHNINGER *et al*.,2002) As transformações proporcionadas por ação de enzimas são conhecidas como biotransformação.

A primeira biotransformação importante para a indústria foi descoberta cem anos depois daquela proposta por Pasteur, para modificações de esteróides por enzimas (GUIMARÃES *et al*., 2010). Hoje, são catalogadas mais de 5000 enzimas pela NC-IUBMB (2013) sendo que cada uma tem afinidade por determinado substrato, que pode ser natural ou sintético, e catalisa uma reação específica que representa, em geral, uma etapa em um caminho metabólico. Aqueles produtos que não sofrem degradação no meio reacional podem ser isolados e utilizados como produto da biotransformação, aumentar a velocidade da reação. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela catalisa. As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (complexo ES).

$$[E] + [S] \leftrightarrow [ES] \rightarrow [E] + [P]$$

Onde:

[E]: Concentração de Enzima

[S]: Concentração substrato

[ES]: Concentração do Complexo enzima-substrato

[P]: Concentração de produto

A função dos catalisadores, químicos ou biológicos, é diminuir a energia de ativação da reação. Uma das vantagens do uso de catalisadores biológicos são as condições brandas de reação, pois a interação entre a enzima e o substrato ocorre com uma energia de ativação significativamente menor que aquela entre um catalisador químico e o reagente, com alta atividade catalítica, mesmo em condições de reação brandas, como temperaturas abaixo de 50°C em pressão atmosférica. Ou seja, as condições termodinâmicas são menos adversas que nos processos químicos, conhecidos pelo alto consumo de energia. Assim, no processo

catalisado com enzimas podem ser geradas, inclusive, moléculas termolábeis que as condições severas das transformações químicas não permitiriam (LEUENBERGER, 1990).

A biotransformação também envolve características menos vantajosas frente à transformação química. Apesar do menor consumo de energia que no processo químico, em geral, as reações biocatalisadas ocorrem em tempo muito longo, devido à menor taxa de conversão do substrato em produto. Além disso, a estabilidade do biocatalisador é, em geral, inferior a do catalisador químico (LEUENBERGER, 1990). Estas característias menos favoráveis são compensadas pelo menor custo de separação e de purificação e maior qualidade dos produtos obtidos (biodiesel e glicerol) que por esta razão podem ser comercializados com um valor mais elevado.

3.6.1 Lipases

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais (com papel fundamental no metabolismo de lipídeos destes seres vivos), tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência. As lipases provenientes de microorganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação tecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades (MESSIAS *et al*., 2011).

As lipases (E.C.3.1.1.3) são definidas como triacilglicerol acil-hidrolases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases (JEAGER e REETZ, 1998; MESSIAS *et al.*, 2010).

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser identificadas. A primeira, é a especificidade em relação à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoglicerídeos, colesterol éster, etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. Elas são divididas em três tipos: sn-1,3-específicas (hidrolisam ligações éster nas posições R1 e R3), sn-2 específico que atuam na posição R2 e as que não distinguem entre as posições de ligações éster a serem clivadas (GOT *et al*., 2012). O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases catalisam

apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros (VAN DER PADT, 1993).

As pesquisas relativas à produção de lipases especificamente em meios líquidos orgânicos não são recentes. Ramakrishina e Banerjee (1951) citam os trabalhos de Camus (1897), Garnier (1903) e Werner (1907) como referências clássicas da produção de lipases por micro-organismos extraídos de sementes e cultivados em meio lipídico. Quanto à aplicação de lipases, Forssell e colaboradores (1992) citam o trabalho de Stevenson, Ludque e Rothbart (1979) como uma contribuição importante para o estudo destas enzimas como agentes de interesterificação.

As biotransformações por lipases podem ser realizadas por meio de síntese de ésteres para a produção de emulsificantes (esterificação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e pela reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do TAG (interesterificação) (HAMMOND E GLATZ, 1988, apud KRÜGER, 2010).

Relacionando as enzimas lipolíticas às vantagens da biotransformação, estas fazem parte de uma categoria particularmente útil, uma vez que elas podem atuar em um amplo espectro de substratos e podem ser estáveis tanto em meio orgânico como em meio aquoso. Algumas das enzimas lipolíticas são termoresistentes e podem ser usadas em condições operacionais consideradas severas para um processo de biotransformação (ZAKS e KLIBANOV, 1984). Khoramnia e colaboradores (2011) isolaram uma lipase termotolerante usando a técnica de fermentação sem-isólida a partir da bactéria *Acinetobacter sp*. Esta lipase é tolerante a temperaturas elevadas (70ºC mantendo 63% da sua atividade), faixa de pH entre 6-11 e alto potencial para tolerância a solventes orgânicos e detergentes. Os estudos mais recentes sobre a biotransformação de óleos e gorduras apresentam uma tendência crescente como ilustrado nas Figuras 3.12 e 3.13. A pesquisa foi restrita ao período entre 1945 (início temporal do registro das publicações científicas pela própria base *Web of Science*) a 2012. Com isso, foram gerados 14.344 registros, armazenados em um banco de artigos e posteriormente separados por ano de publicação (Figura 3.13) e por país (Figura 3.12). Na Figura 3.13 são representados apenas os quinze primeiros países que mais publicaram os artigos científicos do banco de dados gerado na pesquisa, estando o Brasil na 12° posição com 569 publicações. Na Figura 3.12 ilustra-se esta crescente tendência dos esforços científicos para o desenvolvimento das técnicas de catálise enzimática de óleos e gorduras, sendo

identificada uma elevação considerável no número de artigos no início da década de 1990, e outra um pouco menos significativa no final dos anos 2000 até o ano atual.

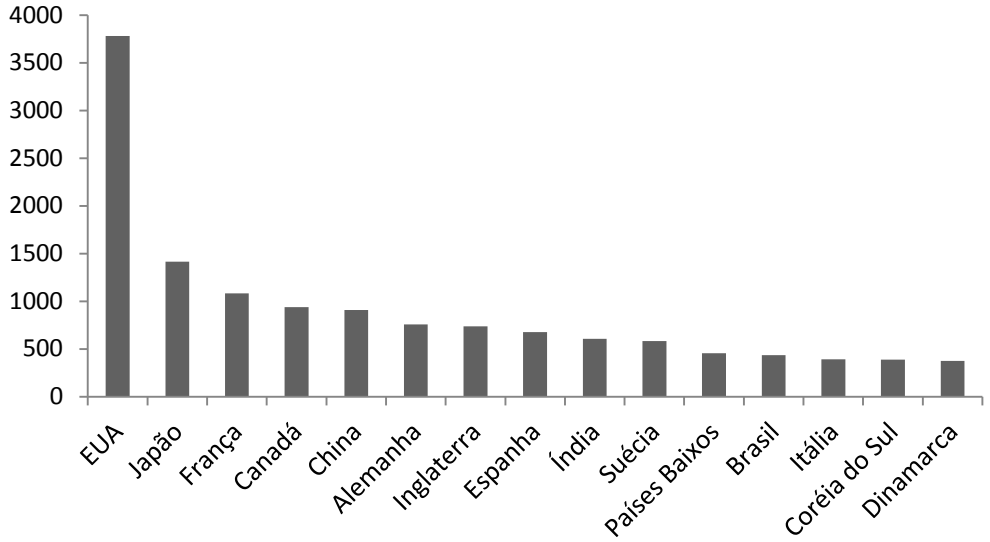


Figura 3.12 Mapeamento do número de artigos científicos e revisão publicados a representação dos 15 países que mais publicaram documentos científicos sobre uso de lipases em óleos e gorduras. O Brasil é classificado como o 12° país nesse conjunto. Os dados foram obtidos pela pesquisa na base de dados Web of Science ®, contemplando artigos e revisões sobre uso de enzimas lipolíticas no período de 1945 a 2012, utilizando os seguintes termos no campo de assunto (*topic*) em inglês: (lipase OR enzymatic-cataliz*) **AND** (oils OR fat OR lipid), resultando em 14.344 registros.

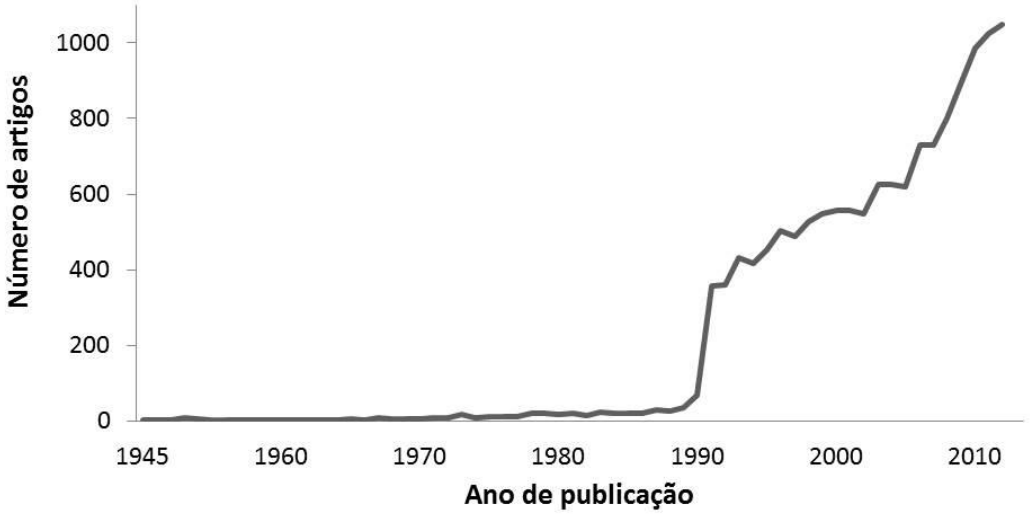


Figura 3.13 Perfil de evolução do número de artigos científicos sobre catálise enzimática de óleos e gorduras. Os dados foram obtidos pela pesquisa na base de dados Web of Science ®, contemplando artigos e revisões sobre uso de enzimas lipolíticas no período de 1945 a 2012, utilizando os seguintes termos no campo de assunto (*topic*) em inglês: (lipase OR enzymatic-cataliz*) AND (oils OR fat OR lipid), resultando em 14.344 registros.

Esta forte tendência identificada na Figura 3.13 pode ser atribuída, principalmente, ao fato de óleos e gorduras serem recursos renováveis e importantes matérias primas para as indústrias química, cosmética, farmacêutica e alimentícia (CASTRO *et al*., 2004). Tais setores industriais fazem uso de diferentes tipos de óleos, com determinada especificação físico-química para que seja possível obter um produto de interesse comercial (MORETTO E FETT, 1998; apud KRÜGER, 2010). Sendo assim, os métodos de biotransformação dos óleos e gorduras são empregados para que a estrutura básica seja modificada, e aquelas moléculas que não são degradadas no meio reacional possam ser, então, separadas, purificadas e aplicadas nas áreas industriais específicas.

A imobilização de enzimas tem um importante papel dentro da biotecnologia aplicada, pois permite recuperar o biocatalisador do produto da reação e reutilizá-lo com o objetivo de aumentar a produtividade. A imobilização, em geral, aumenta a estabilidade do biocatalisador, pois esse é menos afetado durante o processo, se comparado a sua forma livre. Além disso, as alterações estruturais bem como as modificações no sítio ativo podem ser evitadas (CHRISTENSEN *et al.*, 2003; MATEO *et al.*, 2007).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizada em uma determinada região de espaço definida, com a retenção das suas atividades catalíticas, e que possa ser usada repetidamente e continuamente (TAN *et al*., 2010). Diversos procedimentos para imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos, objetivando-se a redução da perda de atividade catalítica durante o processo de imobilização. Diante desta situação alguns parâmetros são importantes, tais como propriedade do suporte (porosidade, natureza química, tamanho da partícula), natureza da enzima (tamanho da molécula, ponto isoelétrico, estabilidade nas condições de imobilização). Seja qual for o método de imobilização, a principal restrição é econômica, pois o custo da enzima por quilograma de produto é em geral muito elevado se comparado com os preços dos catalisadores químicos (SOUZA, 2010, SÉVERAC *et al*,. 2011).

A maioria das reações catalisadas por lipases utilizam biocatalisadores comerciais. Foram catalogadas cerca de 70 lipases já disponíveis no mercado (MESSIAS, 2010). A lipase comercial de *Candida antarctica* (CALB) é produzida por fermentação submersa (FS) de um micro-organismo geneticamente modificado. A CALB apresenta pouca ou nenhuma ativação interfacial, elevada atividade e alta enantiosseletividade para uma grande variedade de alcoóis (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998). Este biocatalisador, desenvolvido pela

Novozymes, Dinamarca, apresenta aplicações numa série de processos industriais, tais como na modificação de óleos e gorduras, na síntese de compostos opticamente ativos, na indústria farmacêutica, na síntese de polímeros, na síntese de ésteres usados na indústria de aromas e mais recentemente, na produção de biodiesel. Inicialmente, esta enzima foi desenvolvida para a síntese de produtos de elevado valor agregado, onde o alto custo do catalisador tem um impacto limitado no custo operacional (SÉVERCAC *et al.*, 2011).

3.7 Processos para obtenção de biodiesel

O processo de obtenção do biodiesel ainda possui limitações, pois geram impacto ambiental devido ao uso em grande escala de substâncias químicas agressivas (bases ou ácidos fortes). Para superar este desafio, deve-se rever o sistema produtivo e aplicar os conceitos atuais de produção integrada, de forma que este processo se torne ambientalmente correto. A sustentabilidade tem sido um elemento decisivo quando se diz respeito ao ramo energético. O Brasil, por possuir elevada participação de energia renovável na matriz energética, precisa estar comprometido com pesquisas cujo foco seja a questão ambiental. A discussão sobre o biodiesel tem, portanto, destacado as oleaginosas que, além de gerar maior número de emprego aos agricultores familiares, são culturas sustentáveis em determinadas regiões (PESSOA *et al.*, 2007).

A produção do biodiesel pode ser feita a partir de rotas distintas. No presente trabalho será dada ênfase às mais conhecidas industrialmente: esterificação, transesterificação hidroesterificação.

3.7.1 Reação de Esterificação

Na produção de biodiesel, a esterificação se dá através da reação de ácidos graxos livres (AGL) com álcoois de cadeia curta. Os AGL são usualmente encontrados em óleos ácidos ou óleos utilizados em frituras. Neste caso os ácidos graxos livres são submetidos à reação direta com um álcool, tendo o éster como produto principal e água como subproduto na presença de catalisadores ácidos (PARENTE, 2003). Geralmente estes catalisadores levam à formação de grande quantidade de efluentes cujo tratamento é oneroso. No caso do ácido sulfúrico, por exemplo, há problemas de toxidade, corrosão, separação e reutilização do catalisador (VIEIRA, 2005).

3.7.2 Reação de Hidroesterificação

Esse processo que também pode fazer uso de óleo ácido, é composto de duas etapas: a primeira etapa do processo é a hidrólise dos triacilgliceróis. Em seguida, o glicerol e a água são separados do meio e os ácidos graxos são submetidos a um processo de esterificação. Estas reações são exibidas na Figura 3.14.

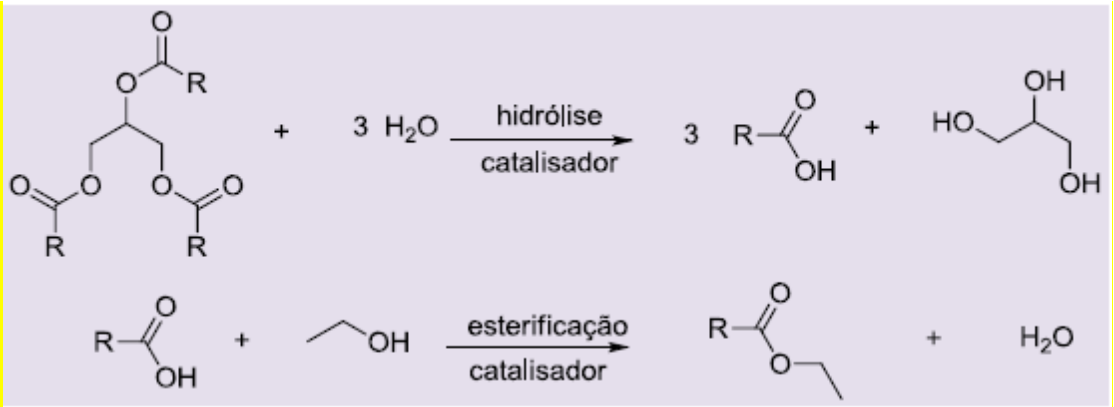


Figura 3.14 Etapas do processo de hidroesterificação. (a) Hidrólise dos triacilgliceróis e; (b) esterificação dos ácidos graxos. R representa grupamentos alquila. O etanol foi utilizado como exemplo de agente de esterificação. Fonte: Ramos *et al.*, 2011.

A hidroesterificação é uma alternativa ao processo convencional de produção de biodiesel, pois favorece a utilização de matérias primas contendo alto teor de ácidos graxos e umidade. Neste caso, os triacilglicerídeos presentes no óleo serão transformados em ácidos graxos por hidrólise (GOMES, 2009). Cavalcanti-Oliveira e colaboradores (2011) produziram um biodiesel a partir do óleo de soja via hidroesterificação no qual a primeira etapa do processo, ou seja a hidrólise dos triacilglicerídeos, foi catalisada pela lipase *Thermomyces lanuginosus* (TL 100L) para gerar os ácidos graxos livres (AGL). Este passo foi seguido por esterificação dos AGL's com álcool, catalisada por ácido nióbio. O melhor resultado para a hidrólise enzimática foi obtido sob condições de reação de 50% (v/v) de óleo de soja e 2,3% (v/v) de lipase (25 U/mL de meio de reação) em água destilada e a 60 ºC, com uma taxa de conversão de 89% para os AGL's após 48 horas de reação.

3.7.3 Reação de Transesterificação

Trata-se de uma reação química, também conhecida como alcoólise entre um éster (RCOOR') e um álcool (R''OH), da qual resulta um novo éster (RCOOR'') e um novo álcool (R'OH). Atualmente este é considerado o processo de melhor relação entre economia e eficiência para a produção de biodiesel em larga escala. A Figura 3.15 mostra um esquema

simplificado de uma reação de transesterificação onde os reagentes são triacilglicerois (óleo) e metanol (citado em TAPANES, 2008).

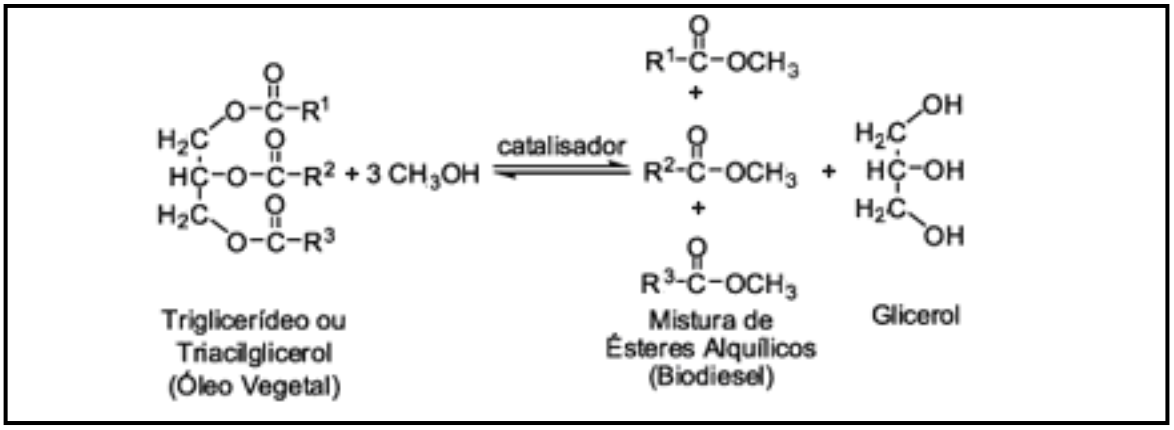


Figura 3.15 Esquema da reação de transesterificação de um triglicerídeo genérico com metanol. Fonte: DABDOUB, 2009.

Óleos e gorduras de diversas matérias-primas oleaginosas podem ser usados como fonte de ácidos graxos para produção de biodiesel de acordo com a disponibilidade de cada região. O álcool por sua vez é adicionado em excesso a fim de permitir a formação de uma fase separada de glicerol e, devido ao caráter reversível da reação, de deslocar o equilíbrio para um maior rendimento de biodiesel (DANTAS, 2010). Finalmente a catálise pode ser ácida, básica ou enzimática (Figura 3.15).

A catálise básica é um processo utilizado quando a quantidade de ácidos graxos livres encontrada no óleo empregado possui baixo teor (menor que 3%). Neste caso, quando se utiliza óleos ácidos ocorrem reações de saponificação, diminuindo a eficiência da conversão. As bases empregadas neste processo podem ser o hidróxido de sódio (NaOH) ou de potássio (KOH), numa razão molar variando de 1:1 a 6:1 em relação ao álcool empregado (MAIOLINI, 2009).

As especificações para que uma melhor conversão seja alcançada neste processo são que a temperatura de operação varie aproximadamente de 60 °C a 70 °C e que a quantidade de catalisador na mistura encontre-se em um limite de 0,5 a 1,0 % g/g. O uso de catalisador em excesso pode gerar uma quantidade indesejada de água, a qual favorece a reação de saponificação, formando sabões que reduzem a eficiência do catalisador e aumentam a viscosidade, dificultando a separação do glicerol.

Quando os ésteres de glicerina possuem alto teor de AGL, o uso de catalisador ácido pode ser utilizado, como é o caso de óleos já utilizados para frituras, sendo o ácido sulfúrico

usualmente empregado para esta conversão. A razão molar da matéria-prima empregada geralmente é de 30:1 em relação ao álcool, estando o limite de temperatura entre 55 a 80 °C e a fração na mistura para reação é de 0,5 a 1mol %.

O uso de catalisadores ácidos apresenta-se muito mais lenta que a via alcalina, possuindo uma conversão de aproximadamente 99% com as dificuldades para separação do glicerol similares à do processo alcalino. No caso da catálise ácida, não há a necessidade de que a matéria-prima passe por um processo de secagem (MAIOLINI, 2009).

3.7.3.1 Reação de Transesterificação Enzimática

A literatura reporta a transesterificação enzimática a partir de diversas fontes de matérias primas. Noureddini e colaboradores (2005) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* para a produção de biodiesel a partir do óleo de soja. Os alcoóis utilizados foram o metanol e etanol. Neste estudo foram investigados os efeitos da concentração de enzima, água e de álcool na reação, bem como da estabilidade térmica e temperatura da reação A condição ótima encontrada pelos autores foram: 35 °C, 0,3 g de água, razão etanol óleo 15:1 e 475 mg da lipase, alcançando-se 67% de ésteres etílicos em 1h.

Royon e colaboradores (2007) utilizaram óleo de semente de algodão para a produção de biodiesel usando a lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Após 24h de reação (50 °C), obteve-se 97% do éster formado, quando a mistura reacional para cada grama do óleo vegetal continha: 32,5% de t-butanol, 13,5% de metanol, 54% do óleo e 0,017 g/mL, de enzima.

Hernández-Martín e Otero (2008) estudaram a síntese enzimática do biodiesel via alcoólise para diferentes óleos vegetais (girassol, oliva, soja e borragem) e utilizaram as lipases comerciais Novozym® 435 (*Candida antarctica*) e Lipozyme® TL IM (*Thermomyces lanuginosus*). Ambas as lipases alcançaram uma conversão de 84% dos triacilgliceróis em éster etílicos após 48h (Novozym® 435) e 96 h (Lipozyme® TL IM). Os autores optaram pela enzima Novozym® 435, uma vez que, após nove ciclos num reator tipo batelada (25 °C), a lipase ainda apresentava 85% da atividade inicial.

De acordo com pesquisa conduzida por Shimada e colaboradores (2002), a lipase CALB imobilizada é inativada irreversivelmente na presença de alcoóis de cadeia curta quando se utiliza acima de 2/3 da quantidade estequiométrica molar. Portanto, o uso de álcool em excesso na reação catalisada com esta lipase requer uma concentração elevada da enzima. Para superar estes desafios, a adição do etanol em etapas, tempo zero e em intervalos pré-

definidos, foi a estratégia proposta por esses autores para manter a estabilidade do catalisador enzimático. Os autores obtiveram uma conversão superior a 95% com apenas 4% (m/m) da enzima em relação ao substrato (óleo).

Dentre as variáveis que afetam a transesterificação enzimática é possível destacar a presença de água, o efeito da razão molar álcool/óleo e temperatura

Efeito da água:

Para a produção de biodiesel via catálise enzimática em meio predominantemente não-aquoso, a água desempenha várias funções e tem uma forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da lipase. Ativação da lipase pela água envolve alterações conformacionais da enzima, que dependem da disponibilidade de uma interface água e óleo. Estudos revelaram que a adição de uma pequena alíquota de água à mistura de reação enzimática catalisada aumentou a taxa de síntese de ésteres de ácidos graxos. O teor de água possui um valor específico para cada lipase e é um fator relevante de acordo com estudos de Nourddine e colaboradores (2005). Segundo este autor, o conteúdo de água mínimo de 0,5% em massa é necessário para promover a ativação das enzimas em função da formação de gotas água-óleo que aumentam a área interfacial disponível. Por isso, alguns trabalhos propõem o uso de meios com baixa umidade, para ativar a enzima. Em contrapartida, o volume mínimo de água para essa ativação equivale a pelo menos dez vezes o teor de água permitido (500 ppm) para o biodiesel nas especificações de qualidade (SHIMADA *et al.*, 2002; HERNANDEZ-MARTINS e OTERO, 2008). É necessário levar em consideração, ainda, que algumas enzimas imobilizadas disponíveis comercialmente possuem uma quantidade significativa de água em seu suporte, proveniente do processo de imobilização (NOURDDINE *et al.*, 2005).

Efeito da razão molar álcool/óleo:

Uma alta razão molar etanol:óleo, na maioria das vezes, favorece o rendimento da conversão em biodiesel, mas por outro lado pode inativar a enzima, em particular quando o álcool é insolúvel na mistura reacional. Neste caso, pode ocorrer a formação de emulsão cuja estabilidade depende da granulometria das gotas e, consequentemente, da intensidade da agitação. No caso da mistura metanol:óleo vegetal, a 40 °C e na proporção molar de, aproximadamente, 1:1 ocorre a solubilização destes. A adição de outro solvente orgânico a esta mistura aumenta a solubilidade do álcool que, neste caso, pode ser utilizado em

concentrações mais elevadas, sem comprometer a atividade das enzimas (CHRISTENSEN *et al.*, 2003). Uma vez que o excesso de álcool é um pré-requisito de elevados rendimentos de transesterificação este substrato é adicionado em várias porções a uma mistura de reação para manter a sua concentração a um nível relativamente baixo. A razão molar ótima dos substratos utilizados para a síntese enzimática de biodiesel tem de ser determinada separadamente para um determinado sistema: álcool: óleo.

Efeito da temperatura:

A temperatura ótima para a transesterificação enzimática depende da termoestabilidade da lipase, que varia na faixa de 30 a 50 °C. Esta estabilidade varia em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.

No que se refere ao estado da arte, embora os estudos sobre a cultura da macaúba estejam avançando, são ainda poucos os trabalhos nacionais publicados sobre a caracterização e a produção de biodiesel de macaúba. A Figura 3.16 ilustra o total de 36 publicações de artigos internacionais entre os anos de 2000 e 2012 sobre o cultivar da macaúba.

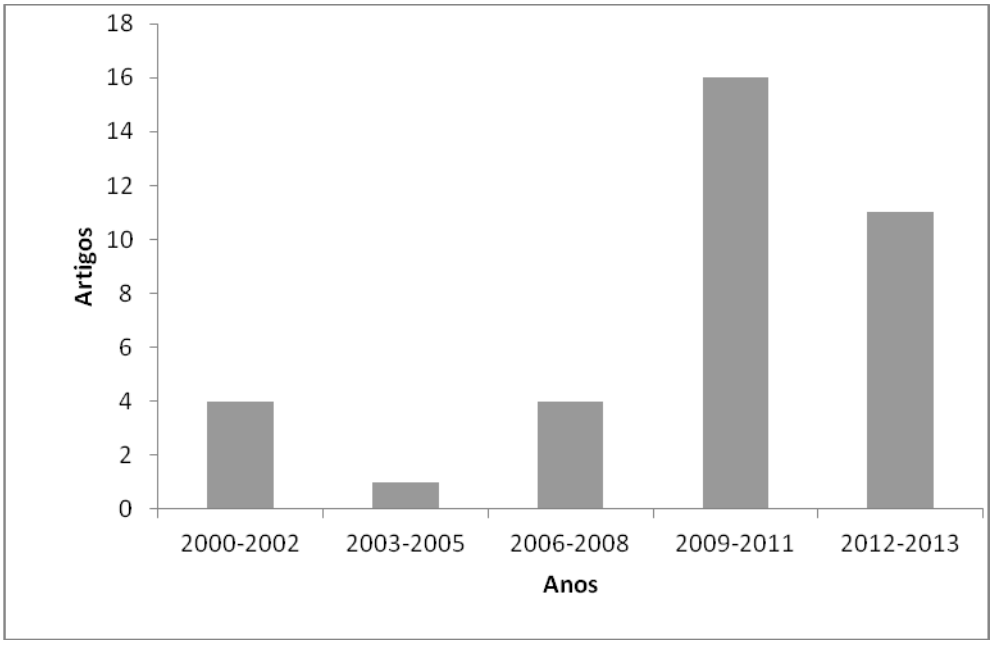
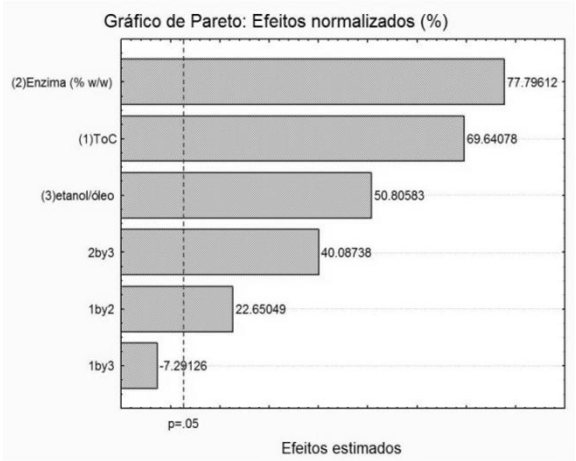


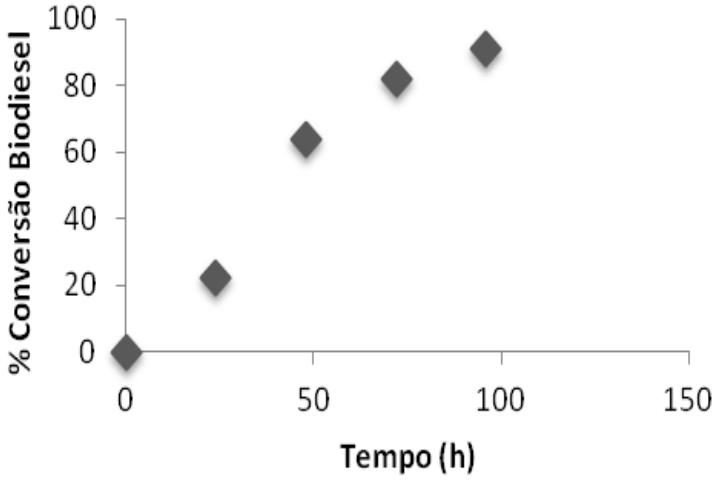
Figura 3.16 Artigos científicos publicados desde os anos 2000. Fonte: web of knowledge, 2013, palavra-chave: macaúba

Nascimento (2010) investigou, no mesmo laboratório da EQ/UFRJ, os melhores parâmetros do processo de obtenção de biodiesel usando óleo ácido de macaúba a partir da variação dos mesmos nas seguintes faixas: temperatura entre 35 a 50 °C, concentração de enzima de 5 a 10% (m/m) e razão óleo:etanol de 3:1 e 6:1. Na Figura 3.17a, estão

apresentados os resultados preliminares para seleção dos parâmetros operacionais de conversão do óleo de macaúba em biodiesel por catálise enzimática. Neste caso, todas as variáveis foram significativas indicando que o processo ainda necessitava ser estudado em uma faixa mais estreita Os parâmetros que apresentaram uma maior conversão foram: temperatura a 35°C, relação etanol óleo 3:1 empregando 10% de enzima CALB imobilizada em fibra de coco verde. A cinética do processo foi avaliada nas condições operacionais previamente otimizadas para seleção do menor tempo associado a uma alta conversão do óleo bruto de macaúba em biodiesel. Este resultado está ilustrado na Figura 3.17(b) onde se observa que o maior rendimento, 86%, foi obtido após 96h.



(a)



(b)

Figura 3.17 Resultados preliminares em que (a) é Gráfico de Pareto de 3 parâmetros avaliados para obtenção de biodiesel de macaúba e (b) Gráfico da conversão versus tempo. Fonte: NASCIMENTO *et al.*, (2010).

Nogueira e colaboradores (2010) também utilizaram o óleo de macaúba e etanol para síntese enzimática de biodiesel com auxílio de microondas. Eles compararam o rendimento do biodiesel obtido a partir da catálise de Novozym 435 e Lipozyme IM variando os parâmetros tempo (5 - 15 minutos), concentração de enzima (2,5 – 7,5% m/m) e temperatura (30 – 40 ºC). Eles concluíram que a maior conversão (45%) foi obtida quando os parâmetros foram no tempo de 5 minutos, 5% m/m da CALB a 30ºC.

4 Materiais e Métodos

As principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel são os triglicerídeos, álcool e um catalisador. No presente capítulo serão abordadas as matérias-primas bem como a metodologia utilizada nos experimentos.

4.1 Macaúba

4.1.1 Óleo Ácido de Macaúba

Os frutos usados para produção do óleo foram cultivados em uma plantação comercial da empresa Paradigma localizada na cidade de Jabuticatubas, Minas Gerais tendo o peso em média de 33 a 50 g. Manualmente os frutos foram coletados sobre o solo, após amadurecimento e queda natural. O óleo utilizado foi obtido a partir da polpa (mesocarpo) por prensagem a quente em uma prensa piloto do tipo parafuso sem fim, com uma capacidade de 100 kg/h. O óleo foi armazenado em tanques isentos de controle de temperatura e umidade.

4.1.2 Enzima

Foi utilizada a enzima comercial imobilizada Novozym 435 (Curitiba-PR). Trata-se de uma lipase de *Candida antarctica* suportada sobre resina acrílica macroporosa em uma concentração 3% (m/m). O produto é comercializado na forma de pellets contendo partículas com diâmetro entre 0,3 e 0,9 mm, com densidade aproximada de 0,43 $g.cm^{-3}$ com umidade entre 1 e 2%. A atividade de síntese do éster pela enzima é de 10000 $PLU.g^{-1}$ (laureato de propila por grama) conforme descrito nas especificações do produto. A escolha desta lipase se deu pelo reconhecimento do seu alto potencial na síntese de ésteres etílicos e metílicos (biodiesel) como reportado por diversas pesquisas (WATANABE, 1999; HERNANDEZ-MARTIN & OTERO, 2008; SOUZA, 2010).

4.1.3 Outros Reagentes

Na síntese do biodiesel, o álcool utilizado foi etanol (99,5%, VETEC Química Fina Ltda) tanto na reação de transesterificação como na hidroesterificação. A catálise ácida da hidroesterificação ocorreu com o Ácido Nióbio (NB-340 CBMM). Para a análise de conversão, fez-se uso de um kit enzimático comercial, fornecido pela Bioclin (Quibasa) cujo método enzimático com detecção colorimétrica será detalhado na seção 4.3.3.

4.2 Metodologia

4.2.1 Fracionamento a seco do óleo

O óleo de macaúba contendo uma elevada acidez foi fracionado por cristalização natural, lenta, em um único estágio entre 10 e 20°C. O tempo de cristalização foi de 24 horas. A figura 4.1 ilustra o processo. Após a cristalização, a separação das fases foi conduzida por decantação. O processo de fracionamento foi feito em triplicata. Para confirmação do fracionamento, avaliou-se o ponto de fusão da fase leve e pesada do óleo de macaúba. A metodologia será descrita na seção 4.2.2.3.

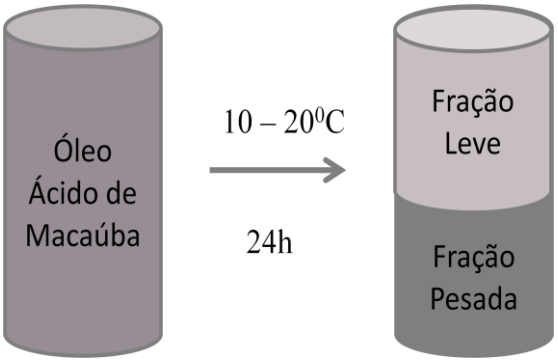


Figura 4.1 Processo de fracionamento do óleo ácido de macaúba.

4.2.2 Caracterização química e física do óleo de macaúba

As determinações das características físico-químicas de um óleo graxo para produção de biodiesel são de grande importância. Segundo Villela (2012), destacam-se os teores de acidez (ácidos graxos livres) e água, uma vez que estes estão intimamente correlacionados com a formação de fases emulsificantes em reações de obtenção de biodiesel via catálise alcalina.

Para avaliação das características físico-químicas da fração leve de macaúba, utilizaram-se procedimentos e métodos analíticos estabelecidos pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2000) exceto a análise do índice de acidez estabelecido de acordo com a metodologia cd 3d-63 da AOCS (American Oil Chemist Societes). As características físico-químicas determinadas para fração leve do óleo de macaúba e seus respectivos métodos estão descritos na Tabela 4.1. Todas as determinações foram feitas em duplicata para fase leve do óleo de macaúba extraído da polpa.

Tabela 4.1 Características Fisico-químicas determinadas para fase leve do óleo ácido de macaúba.

Propriedade Físico-química	Método (AOAC)
Teor de água	968.11
Ponto de fusão	920.156

4.2.2.1 Índice de acidez (I.A.)

Define-se o IA como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos livres presentes em 1g de amostra. A acidez pode ser expressa também em g de ácido oléico por cento m/m. Para esta determinação, dois gramas do óleo foram pesados em erlenmeyer e acrescidos de 25 mL de uma mistura de éter etílico e etanol (2:1). Os ácidos graxos livres foram titulados com solução de hidróxido de potássio 0,01 M, previamente padronizada usando solução de fenolftaleína 1% como indicador.

A determinação do índice de acidez é calculada em função do volume de solução básica gasta na titulação. Os resultados numéricos obtidos foram determinados utilizando-se a fórmula descrita na Equação 4.1.

$$I.A = \frac{V*f*0{,}561}{Ma} \quad \text{Eq. 4.1}$$

onde:

V é o volume de KOH 0,01N consumido na neutralização da amostra

f = fator de correção da solução de KOH

Ma = massa de amostra, em g

4.2.2.2 Umidade

A umidade corresponde a perda em peso da amostra quando aquecida em condições nas quais a água é completamente removida. As amostras, com massas previamente determinadas (5g), foram colocadas em estufa com circulação de ar por 90 minutos a 110^0C.

Logo em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, em dessecador, tendo sua massa novamente determinada. A umidade é obtida pela Equação 4.2.

Cálculo: $$X = \frac{(Mi - Mf)}{Mi} * 100 \quad \text{Eq. 4.2}$$

onde:

X é a umidade, expressa em %

M_i é a massa inicial da amostra, em g

M_f é a massa final da amostra, em g

4.2.2.3 Ponto de fusão

Os triglicerídeos puros apresentam ponto de fusão nitidamente definido. As gorduras naturais, devido à natureza heterogênea de seus triglicerídeos, fundem-se ao longo de uma faixa de temperatura. Desta forma, o ponto de fusão de uma gordura é referido a temperatura na qual o último traço sólido se funde.

Mergulhou-se a extremidade de um tubo capilar no óleo líquido até obtenção de 5cm de coluna. Fechou-se a extremidade oposta e resfriou-se o sistema a 0^0C por um período de 24horas. Prendeu-se o tubo capilar a um termômetro por meio de um anel de borracha de modo que o bulbo do termômetro ficasse junto a substância do capilar. Adicionou-se este sistema a um tubo de ensaio com água e aqueceu-se lentamente o sistema com ajuda de uma placa de aquecimento. O ponto de fusão considerado foi aquele em que o sistema tornou-se totalmente líquido.

4.2.2.4 Viscosidade

A viscosidade é a propriedade dos fluidos que mede a resistência ao transporte microscópico de quantidade de movimento por difusão molecular. Quanto maior a viscosidade menor a velocidade em que o fluido escoa, se mantida a mesma força de cisalhamento. Na indústria, o conhecimento da viscosidade se faz necessário para o projeto e dimensionamento de equipamentos e processos que envolvam transferência de massa e calor (INCROPERA *et al.*, 2006).

Os triglicerídeos se comportam como um fluído Newtoniano para taxas de deformação acima de 10 s^{-1}. Portanto, o principal parâmetro físico que afeta a viscosidade desses fluídos é a temperatura. A viscosidade das amostras (fração leve e biodiesel de macaúba) foi avaliada a

20 e 40°C em reômetro placa e placa (Brookfield Ultra/DVD III) no módulo estacionário (Figura 4.2). A viscosidade do óleo também foi determinada afim de estabelecer uma comparação.

Figura 4.2 Ilustração do reômetro usado na determinação da viscosidade.
Fonte:www.braseq.com.br

4.2.2.5 Composição em ácidos graxos da fase leve do óleo de macaúba

A composição em ácidos graxos do óleo de macaúba foi determinada por cromatografia em gasosa dos ésteres metílicos segundo a metodologia de Hartman e Lago (1973). Inicialmente as amostras de óleo foram pesadas, em alíquotas de 30-100 mg, em tubos de ensaio de 20 mL com tampa rosqueável e submetidos a etapa de saponificação com a adição de 4 mL de solução de hidróxido de sódio em metanol a 0,5 mol/L. Em seguida foi realizado o procedimento de esterificação das amostras com a adição de 5 mL da solução esterificante contendo 10 g de cloreto de amônio dissolvidos lentamente em 300 mL de metanol, adicionado de 15 mL de ácido sulfúrico concentrado em pequenas porções sob agitação. Após a metilação, 5 mL de hexano foram adicionados à amostra e submetidas a agitação por 10 segundos. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 3 mL, que foi concentrada com nitrogênio gasoso, ressuspendida em 100 µL de hexano e, para a injeção, foi tomada uma alíquota de 1 µL.

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo Shimadzu, modelo GC-2010, com injetor split/splitless e com detector de ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi a Carbowax (30m x 0,32 mm x 0,25 µm), marca Quadrex, operada nas seguintes condições: isotérmico a 200 °C, injetor a 250 °C, detector a 250 °C, pressão de gás de arraste de 1,9 mL/min e tempo de análise de 30 minutos.

4.3 Obtenção do biodiesel

4.3.1 Reação de transesterificação enzimática

O meio reacional continha 4 gramas da fase leve do óleo ácido de macaúba e etanol (99,5°GL) que após rápida homogeneização se adicionava a enzima Novozym 435. As reações de síntese do biodiesel foram realizadas em frascos erlenmeyers com capacidade de 100 mL, sob agitação constante de 80 rpm por um período de 48 h em um agitador orbital com controle de temperatura e agitação (Quimis). O tempo selecionado para conversão do óleo fracionado foi de 48h baseado em pesquisas de Shimada e colaboradores (2002) que alcançou com a mesma enzima comercial conversão em torno de 93% tendo como matéria-prima o óleo de soja.

Ao final da reação a mistura foi submetida a consecutivas lavagens com água destilada, utilizando-se um volume equivalente ao meio reacional (10 mL) (FUKUDA *et al.*,

2001). Esta lavagem foi feita num sistema de filtração a vácuo para recuperação da enzima. A glicerina e o biodiesel foram separados por decantação em funil de separação após agitação, adição de pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro para retirada de traços de água do biodiesel e repouso por pelo menos 30 minutos. A fase superior corresponde ao biodiesel de macaúba e a inferior a glicerina, etanol e água residual. A Figura 4.3 ilustra o diagrama das etapas da reação.

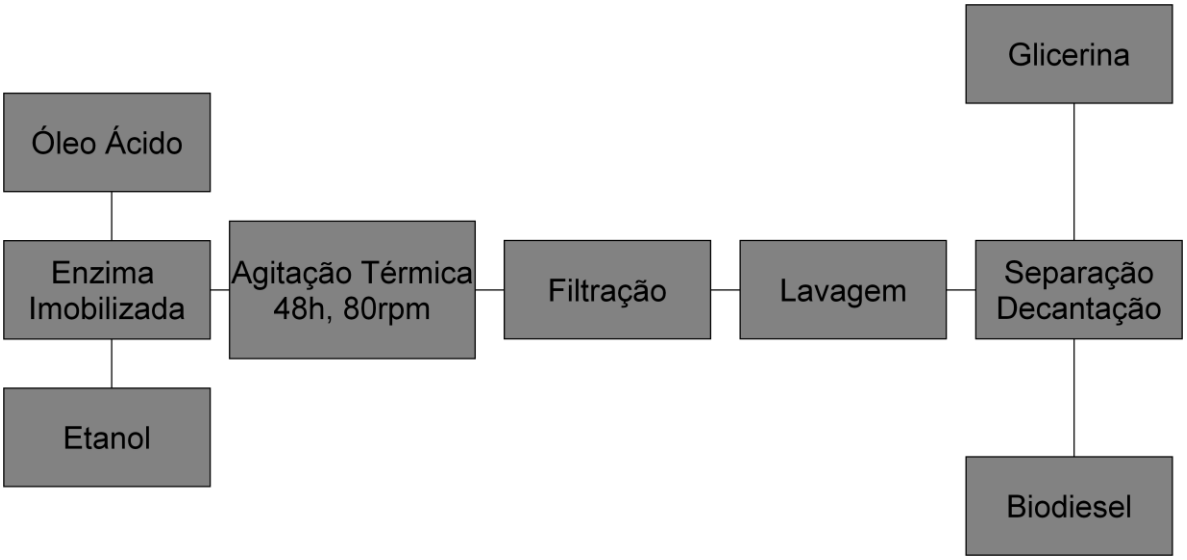


Figura 4.3 Diagrama de blocos do processo de obtenção de biodiesel

4.3.2 Reação de hidroesterificação

Para fins comparativos, a fase leve do óleo de macaúba foi também submetida ao processo de hidroesterificação. Este processo foi realizado no Laboratório de Tecnologias Verdes da Escola de Química – UFRJ e se deu em duas etapas: Na primeira etapa ocorreu uma hidrólise do óleo sem o uso do catalisador a 300 ° C e 1000 psi, onde se adicionou ao copo do reator apenas o óleo ácido. De acordo com Gomes (2009), a água contida em sua composição foi suficiente. A Figura 4.4 ilustra o reator empregado nesta etapa do processo.

Nesta segunda etapa os ácidos graxos livres do óleo de macaúba obtidos nesta primeira etapa foram convertidos em ésteres etílicos via esterificação fazendo uso do catalisador comercial Novozym 435 na proporção de 10% m/m. A duração da reação ocorreu em 72h, seguida de separação do biodiesel. Esta esterificação também foi catalisada por ácido nióbio a uma concentração de 10% m/m, realizada a 190 ° C e 500 psi num tempo de 60

minutos. O biodiesel obtido a partir das duas reações foi armazenado e resfriado a 4°C para posterior avaliação do rendimento.

Figura 4.4 Reator PARR Instruments usado para o processo de hidroesterificação

4.3.3 Determinação do rendimento da reação

Para a quantificação das amostras, primeiramente foi preparada a solução de análise, composta de: 10 µL de amostra, 60 µL de n-Heptano e 5 mL de solução diluente. Essa solução foi cedida pelo Laboratório de Sistemas Particulados, Escola de Química – UFRJ, para melhorar a solubilização e se encontra em fase de obtenção de patente. Dessa solução de análise foi retirada uma alíquota de 100 µL e adicionado a 1 mL de reagente de análise do kit enzimático da Quisaba Química cujo método enzimático colorimétrico, consiste em uma série de reações enzimáticas, levando a formação de um composto de cor cereja (Figura 4.5). A solução foi levada ao banho-maria por 15 minutos a 37 ºC e logo em seguida medida a absorbância utilizando com branco uma solução composta de n-heptano, solução diluente e reagente de análise, na mesma proporção utilizada para preparação da solução de análise.

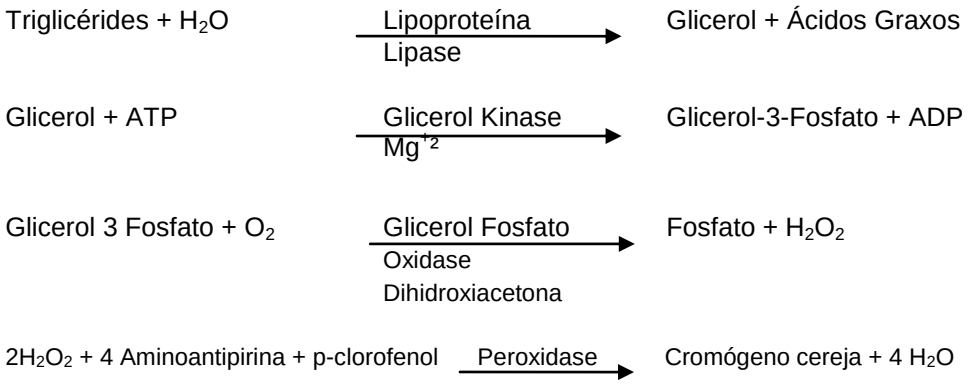


Figura 4.5 Reações enzimáticas para formação de solução cereja. Fonte: Bioclin (2011)

Com o objetivo de criar uma curva padrão, foram preparadas misturas de fase leve do óleo de macaúba com biodiesel de macaúba, simulando conversões de 100%, 80%, 60%, 40%, 20% e 0% de biodiesel. Fazendo uso do procedimento descrito acima. A partir do resultado de absorbância, calculamos a conversão de acordo com a fórmula abaixo uma vez que esse composto tem absorção máxima em torno de 500 nm e pode ser medido fotometricamente, onde a intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de glicerídeos na amostra (Equação 4.3).

$$\text{Conversão (\%)} = [\text{Abs} - B] / A \qquad \text{Eq.4.3}$$

Onde: Abs = Absorbância

B = Coeficiente linear da curva padrão (0,5611)

A = Coeficiente angular da curva padrão (-0,0054)

Segundo VALDEZ e colaboradores (2011) o método enzimático colorimétrico utilizando-se kits comerciais para esta análise é simples, rápido, sensível, com instrumentação simples e baixo custo quando comparado ao método tradicional de cromatografia a gás.

4.3.4 Planejamento Estatístico

O planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que tem por finalidade desenvolver e aperfeiçoar processos, pois determinam quais variáveis exercem maior influência no desempenho desses. Desta forma, com o objetivo de avaliar os parâmetros que maximizem a eficiência da conversão enzimática do óleo de macaúba em ésteres etílicos, foi elaborado um planejamento fatorial completo para avaliar o efeito das seguintes variáveis: temperatura (T), concentração de enzima (C), razão molar etanol:óleo (RM) e umidade (U). para a reação de transesterificação enzimática. Os experimentos foram realizados utilizando-

se dois níveis e um ponto central para cada parâmetro como pode ser observado na tabela 4.2. Este planejamento teve como base dados preliminares, gerados em um planejamento fatorial com 3 parâmetros: temperatura (T), concentração de enzima (C), razão molar etanol:óleo (RM) (NASCIMENTO, 2010). O teor de umidade foi calculado pela relação entre a massa de água contida no meio (óleo e etanol). Os resultados foram utilizados para avaliar a faixa de operação mais apropriada para a conversão do óleo ácido de macaúba em ésteres etílicos via catálise enzimática.

Tabela 4.2 Planejamento fatorial 2^4, composto central, para otimização do processo de conversão de óleo de macaúba em ésteres etílicos.

Variáveis	Nível Inferior (-1)	Ponto Central (0)	Nível Superior (+1)
Temperatura (°C)	35	42,5	50
Concentração enzimática (% m/m)	5	7,5	10
Razão Molar Etanol:óleo	6:1	4,5:1	3:1
Umidade (% m/m)	5	7,5	10

A partir destes limites com auxílio do programa Statistica (versão 8.0), foi possível realizar a montagem da matriz de planejamento, segundo suas variáveis escalonadas na reação de transesterificação (Tabela 4.3). As variáveis foram analisadas na forma codificada (entre -1 e +1) para normalizar a variação de ordem de grandeza dos parâmetros estudados.

Tabela 4.3 : Matriz de planejamento fatorial 24 para as reações de transesterificação enzimática.

Experimentos	U (%)	R M (mol)	E (%)	T ^{o}C
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	-1
5	-1	+!	-1	-1
6	+1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	-1	-1	+1
12	+1	-1	+1	+1
13	-1	+1	-1	+1
14	+1	+1	-1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Os experimentos 17 ao 19 corresponderam às triplicatas do ponto central definido pelo planejamento. Com os resultados obtidos a partir desses experimentos foi possível selecionar as melhores condições operacionais visando a maior conversão.

4.3.5 Reação com reciclo da lipase

Nesta etapa a enzima Novozymes 435 foi reutilizada no processo de transesterificação enzimática da fração leve do óleo ácido de macaúba nas condições experimentais previamente otimizadas e descritas na seção 4.3.1 (Figura 4.6). Foram conduzidos 12 ciclos com a mesma enzima de forma a avaliar a estabilidade da mesma.

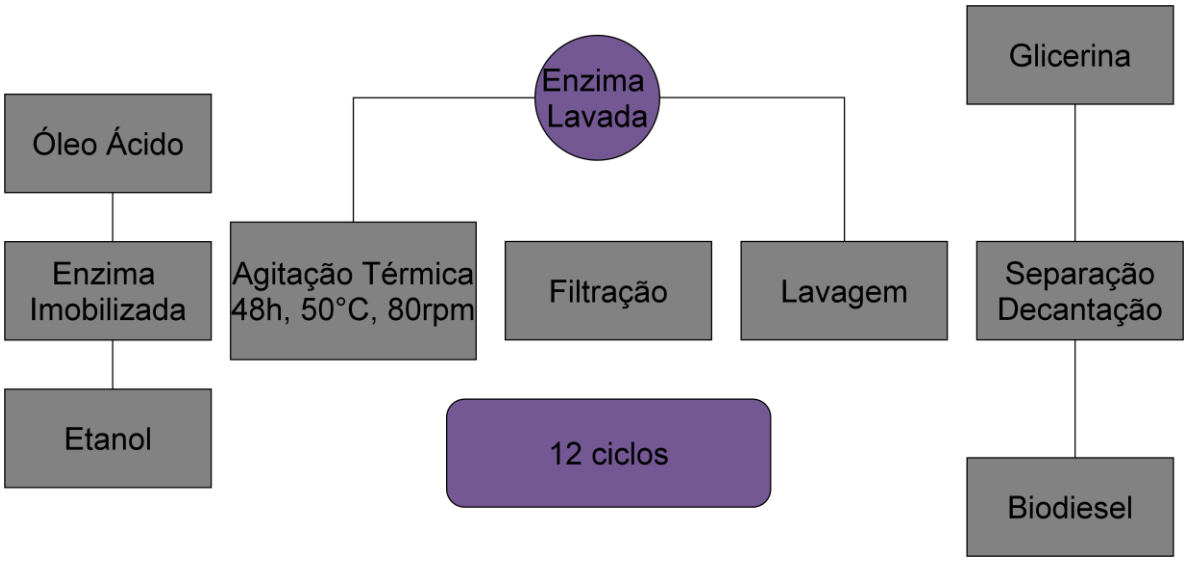


Figura 4.6 Diagrama de blocos das etapas para reuso das enzimas.

4.4 Caracterização do biodiesel de macaúba

Com os parâmetros previamente selecionados, conduziu-se uma nova reação para obtenção e caracterização do produto final. Foram avaliadas as seguintes propriedades do biodiesel: índice de acidez, umidade, índice de saponificação, viscosidade, glicerol livre e índice de iodo. Estas caracterizações são exigidas pela legislação vigente.

O biodiesel também foi caracterizado a partir do perfil graxo utilizando cromatografia em fase gasosa.

4.4.1 Índice de iodo

Este índice é determinado pela quantidade de halogênio que reage com a amostra e é convencionalmente expresso em massa de iodo que reage com 100 g de óleo ou gordura. Neste trabalho foi utilizado o Método de Wijs (AOCS, 2000), onde as amostras de 0,2 g foram adicionadas em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 25 ml de tetracloreto de carbono. Com auxílio de uma bureta adicionou-se 25 mL de solução de Wijs com leve

agitação do erlenmeyer. A mistura de soluções foi deixada em repouso por 30 minutos protegido da luz. Acrescentou-se 20 mL de iodeto de potássio 25% e 100 mL de água. Titulou-se o conteúdo do erlenmeyer com solução de tiossulfato de sódio 0,1N ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) até obtenção de coloração amarelada. Juntou-se a tudo isso 1 mL de solução de amido 0,5% e continuou a titular até o desaparecimento da coloração azul. Paralelamente foi realizado o mesmo procedimento da titulação do branco. As análises foram conduzidas em triplicata e os resultados numéricos foram obtidos a partir da Equação 4.4.

Cálculo:

$$II = \frac{1{,}28 * f * (B - A)}{M} \quad \text{Eq. 4.4}$$

onde,

II = índice de iodo (g/100g)

B = Volume (mL) de solução de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 0,1N gasto na titulação da amostra

A = Volume (mL) de solução de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 0,1N gasto na titulação do branco

f = fator de correção da solução tiossulfato de sódio 0,1N

M = massa da amostra (g)

4.4.2 Glicerol Livre

Dentre todos os procedimentos disponíveis para análise de glicerol livre, o método cromatográfico oferece o melhor desempenho analítico. A cromatografia a gás (CG) é a técnica recomendada pela ANP para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel, pois apresenta boa precisão para a quantificação de componentes minoritários. O método seguido foi ASTM D6584.

4.4.3 Índice de Saponificação

O índice de saponificação é a quantidade de hidróxido de potássio necessária para saponificar 1g de óleo ou gordura. É indicativo do comprimento de cadeia de ácido graxo. O índice de saponificação é inversamente proporcional ao peso molecular médio dos resíduos dos ácidos graxos dos glicerídeos presentes.

O índice de saponificação foi determinado segundo o método descrito pela AOCS (2000) onde 0,5g de amostras foram adicionados a erlenmeyers de 100 mL e em seguida saponificadas com solução alcoólica de KOH 4% m/v e posteriormente titulada com solução de HCl 0,5N. As análises foram em triplicata e os resultados numéricos foram obtidos a partir da Equação 4.5.

Cálculo:

$$IS = \frac{56{,}1 * N * (B - A)}{M} \qquad \text{Eq. 4.5}$$

onde,

IS = índice de saponificação (mg KOH/g amostra)

N = normalidade da solução de HCl devidamente padronizada

B = volume de HCl gasto na titulação do amostra (mL)

A = volume de HCl gasto na titulação da branco (mL)

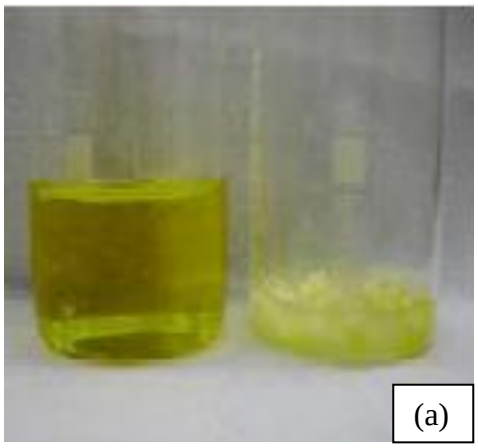
M = peso da amostra (g)

5 Resultados e discussão

5.1 Fracionamento a seco

Após resfriamento por 24 horas, o fracionamento a seco do óleo forneceu frações sólidas e líquidas bem distintas (Figura 5.1(a)), o que facilitou sua decantação e consequentemente a sua separação. A fase sólida com alto ponto de fusão (acima de 35 ± 1 °C) e a fase leve com baixo ponto de fusão (16 ± 1 °C) e na Figura 5.1(b) ilustra-se a distribuição das massas para as frações pesadas e leves obtidas no processo de fracionamento a seco. Estes resultados indicam que a fase leve é composta majoritariamente de ácido oléico (C18:1), cujo ponto de fusão é aproximadamente 16°C. Rodrigues (2007) avaliou em 24 ºC o ponto de fusão do óleo de macaúba extraído da polpa (mesocarpo). A fase leve, obtida neste trabalho, apresenta ponto de fusão mais apropriado para produção de biodiesel destinado aos países de clima frio. Além disso, o fracionamento do óleo ácido da polpa de macaúba deu origem à produtos com diferenças sensoriais (cor e textura) importantes. Essas diferenças podem ser usadas como vantagem para formulações específicas em diferentes setores industriais.

Todos os resultados apresentados se referem à fase leve do óleo de macaúba.



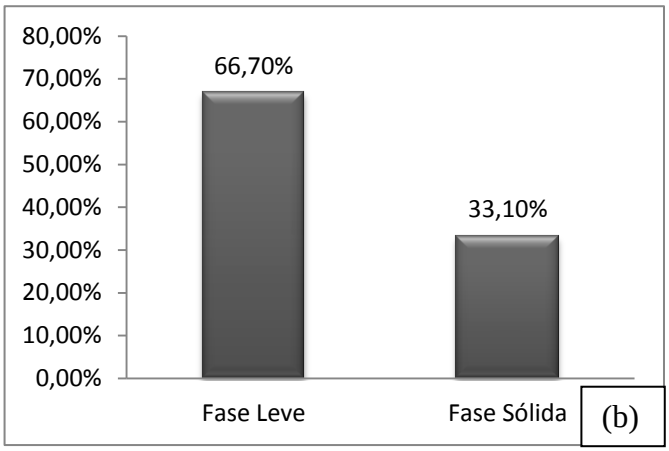


Figura 5.1 Fases líquida e sólida do óleo ácido de macaúba (a) e distribuição percentual da massa após fracionamento (b).

5.2 Índice de Acidez (I.A.)

A fração leve do óleo da polpa de macaúba usado neste trabalho apresentou índice de acidez de 6,7 ± 0,5 mg KOH/g de amostra; valor elevado quando comparado ao valores reportados na literatura. A Tabela 5.1 apresenta alguns valores reportados na literatura. Nota-se que Silva (2009) e Mello (2010) encontraram valores inferior ao deste trabalho, confirmando a rápida degradação do óleo por ação enzimática A Figura 3.10 ilustrou a disposição dos frutos pós coleta em um dos galpões da empresa fornecedora do óleo para o presente trabalho. O condicionamento impróprio dos frutos pode justificar que a alta acidez do óleo está relacionada a fatores como: contato direto com micro-organismos, elevada umidade da polpa e ação das enzimas endógenas durante o armazenamento que promovem e/ou aceleram a hidrólise dos triglicerídeos.

Tabela 5.1 : Valores de índice de acidez reportados na literatura para o óleo de macaúba

IA (mg KOH/g óleo)	Referências
30	Rodrigues (2007)
0,2	Silva (2009)
30	Nascimento (2010)
0,82	Mello (2010)
27,22	Ferrari *et al.*, (2011)

Elaborado pelo autor.

5.3 Teor de água

A umidade do óleo foi de 22 + 0,2 %. Este valor elevado deve-se a grande quantidade de água (cerca de 15 %) que fica retida na polpa após a etapa de secagem, necessária para viabilizar a extração mecânica do óleo. Comparando-se com dados da literatura verificou-se que o valor obtido está de acordo com o encontrado por Silva (2009) que reportou uma variação entre 10 a 25%. No entanto, este é um valor inferior ao encontrado por Silva e colaboradores (2008) (34,3 ± 0,13 %). A presença de água até uma concentração específica no óleo é também fundamental para aumentar a eficiência do transporte de massa e energia e viabilizar a etapa de esterificação enzimática (SHIMADA *et al.*, 2002)

5.4 Composição em ácidos graxos majoritários do óleo de macaúba

Na Tabela 5.2 compara-se a composição em ácidos graxos do óleo da polpa de macaúba utilizado neste trabalho com dados reportados na literatura. Observa-se a

predominância dos ácidos graxos oléico, linoleico e palmítico. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos feitos por MARIANO (2011). As diferenças encontradas se devem à variação natural nas características químicas de produtos de origem vegetal. Adicionalmente, estes resultados indicam uma semelhança química importante entre o óleo da polpa de macaúba e o óleo de palma o que explica a similaridade entre as propriedades físicas e químicas destes dessas duas matérias-primas.

Tabela 5.2 Composição em percentual de ácidos graxos majoritários do óleo ácido de macaúba.

Ácido Graxo	Nomenclatura	Neste trabalho	Mariano, 2011
C12:0	Laurico	*	*
C16:0	Palmítico	18,92	18,7
C18:0	Esteárico	2,55	2,8
Total de saturados		21,47	21,5
C16:1	Palmitoléico	2,12	4,0
C18:1	Oléico	60,81	53,4
C18:2	Linoleico	14,31	17,7
C18:3	Linolênico	0,94	1,5
Total de insaturados		78,18	76,6

*Não identificado

Como observado na Tabela 5.2, o óleo de macaúba possui uma quantidade importante de ácidos graxos poliinsaturados (15,25 %). Este óleo é, portanto, mais propenso aos processos oxidativos (KNOTHE, 2003, MELO 2010). O ácido linoleico e linolênico são 50 e 100 vezes menos estável que o ácido oléico, respectivamente (DANTAS, 2010). Os pontos mais propensos a oxidação nos ácidos graxos insaturados, podem ser visualizados na Figura 5.2.

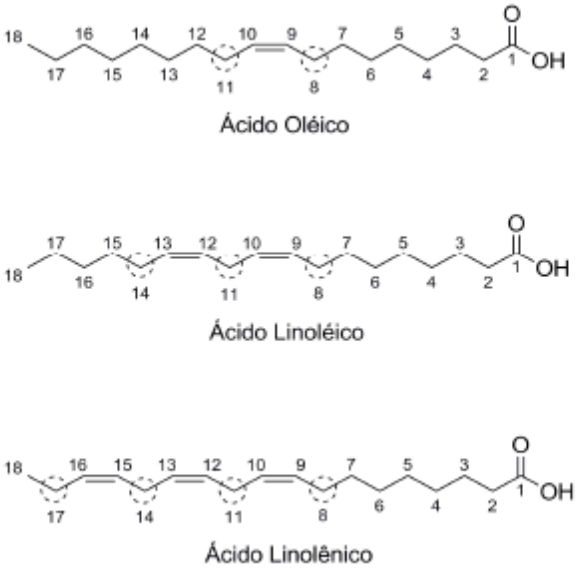


Figura 5.2 Posições nas cadeias dos ácidos graxos mais suscetíveis à oxidação.
Fonte**:** DANTAS, 2010**.**

5.5 Conversão enzimática

As etapas do processo de obtenção de biodiesel via transesterificação enzimática estão ilustradas na Figura 5.3 na qual foi destacada a etapa de reação, filtração e separação. Pode-se observar que a separação de fases é de fácil visualização e que a fase aquosa, contendo a glicerina, tem uma aparência bem mais clara que a dos processos convencionais cuja glicerina apresenta uma cor amarelo forte, indicando uma contaminação com o catalisador.

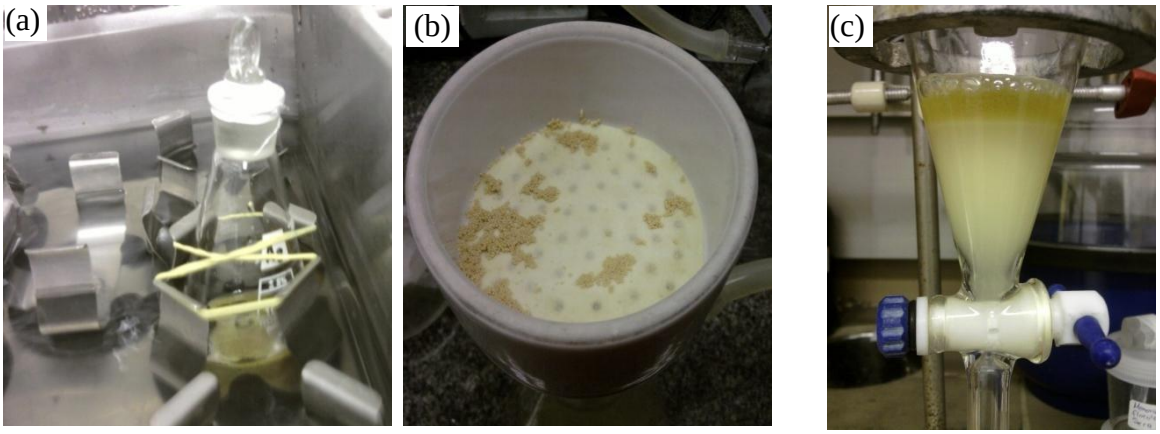


Figura 5.3 Etapas da síntese de biodiesel enzimático, onde: (a) Sistema reacional no shaker; (b) Enzimas no funil de Buchner após etapa de lavagem e (c) Etapa de separação e purificação do biodiesel.

. A seleção dos parâmetros selecionados para avaliar a bioconversão teve como base os trabalhos de Nascimento (2010) e Shimada (2002). Segundo estes autores, a conversão do óleo bruto de macaúba em biodiesel depende significativamente dos parâmetros: temperatura, razão molar etanol:óleo, concentração de enzima e umidade.

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 5.3. Observa-se que a maior conversão alcançada, 96%, ocorreu nas seguintes condições reacionais: temperatura de 50 ^{o}C, umidade a 5%, razão molar etanol:óleo de 6:1 e concentração de enzima de 10% m/m do óleo. Os gráficos ilustrados nas Figuras 5.4 a 5.10 servirão de apoio para discutir os resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 5.3 Planejamento fatorial 2^4 do biodiesel enzimático obtido a partir da fração leve do óleo ácido de macaúba.

T (°C)	U (%)	R M (mol)	E (%)	Conversão Biodiesel (%)	Erro (%)
35	5	6:1	5	75,185	3,727
35	10	6:1	5	77,644	1,394
35	5	6:1	10	86,316	0,155
35	10	6:1	10	85,466	1,600
35	5	3:1	5	73,800	1,350
35	10	3:1	5	79,343	0,155
35	5	3:1	10	57,440	2,293
35	10	3:1	10	88,193	3,029
50	5	6:1	5	91,143	2,877
50	10	6:1	5	73,934	2,636
50	5	6:1	10	96,060	5,170
50	10	6:1	10	75,185	3,712
50	5	3:1	5	92,350	0,279
50	10	3:1	5	42,242	1,229
50	5	3:1	10	92,797	0,967
50	10	3:1	10	66,827	0,739
42,5*	7,5	4,5:1	7,5	56,814	3,976
42,5*	7,5	4,5:1	7,5	56,814	1,478
42,5*	7,5	4,5:1	7,5	56,814	0,937

*Ponto central em triplicata

A partir da análise estatística, pode-se constatar que a eficiência dos processos de esterificação e transesterificação do óleo de macaúba por catálise enzimática depende fortemente da interação entre a temperatura de reação e a quantidade de água no meio reacional. Este fato pode ser observado de forma mais clara na Figura 5.4. Além disso, a concentração de lipase e temperatura não apresentaram efeitos significativos, na faixa analisada. Isto ocorreu provavelmente devido à escolha de uma faixa previamente selecionada para catálise enzimática do óleo de macaúba (NASCIMENTO, 2010).

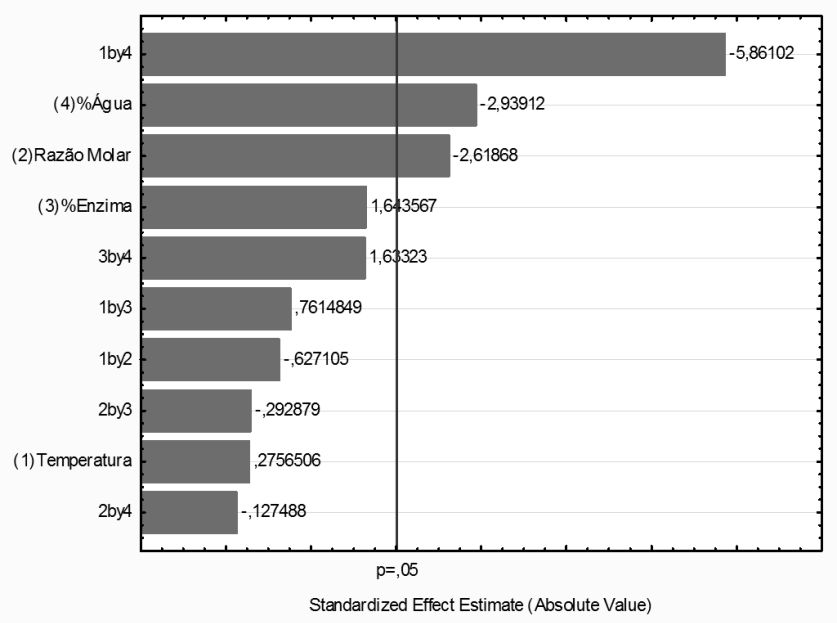


Figura 5.4 Gráfico de Pareto relativo aos efeitos dos parâmetros independentes bem como a interação entre eles

O gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e umidade na conversão estão apresentadas na Figura 5.5, na qual observa-se que a conversão aumentou quando o teor de água no meio reacional decresceu de 10 para 5% e a razão molar etanol:óleo aumentou de 3 para 6.

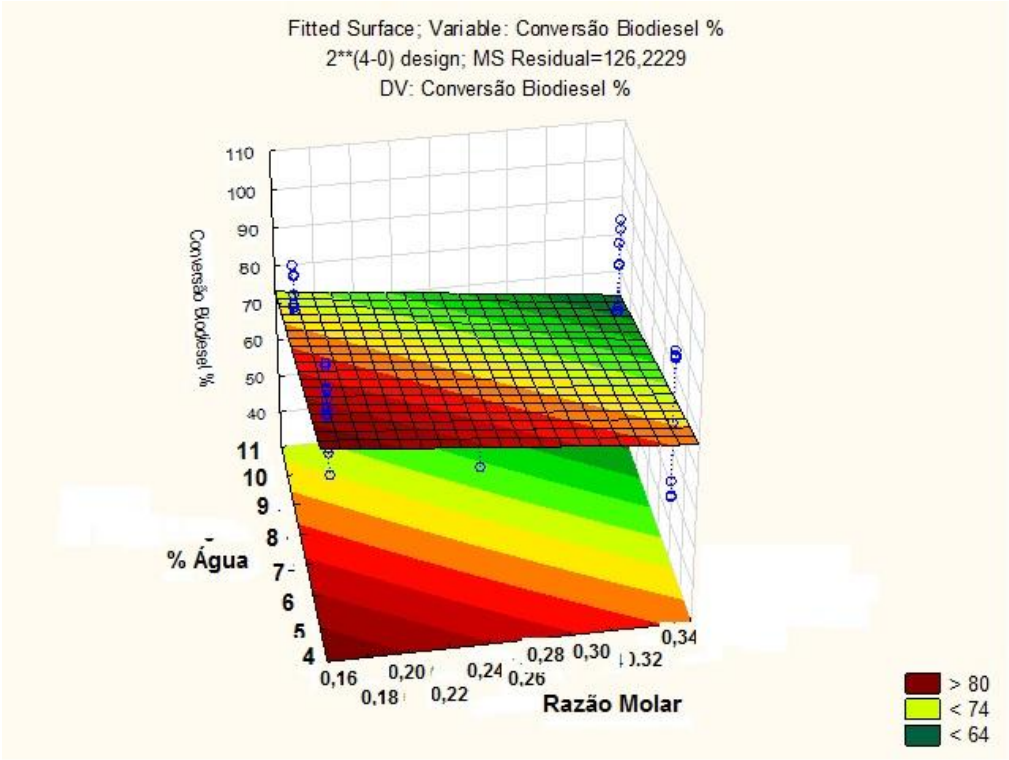


Figura 5.5 : Superfície de resposta da temperatura e teor de água

No gráfico da Figura 5.6 mostra-se que os valores observados estão distribuídos de forma não tendenciosa (sem viés) acima e abaixo da reta de 45º.

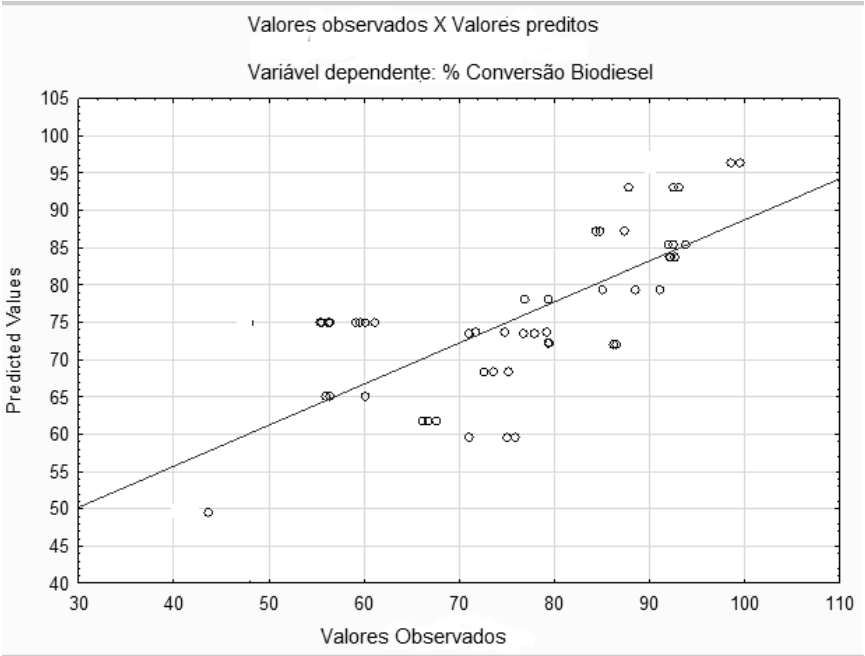


Figura 5.6 : Valores estimados versus valores observados

A influência do teor de água pode ser também observada na Figura 5.7 na qual se pode observar, a partir dos efeitos marginais, um decréscimo na conversão máxima de 83,1% para 74,2% quando o teor de água passou de 5 para 10% confirmando que embora a presença de água no meio favoreça a solubilização da enzima, o seu excesso inibe a etapa de esterificação (obtenção do biodiesel).

As lipases possuem uma característica particular de agir na interface de uma solução aquosa e uma fase orgânica, de modo que a atividade da lipase geralmente depende da área interfacial. A água promove um aumento na área interfacial disponível, mantendo, assim, a atividade da lipase. Contudo, o excesso de água pode favorecer as reações de hidrólise enzimática, sendo estas indesejadas no processo de transesterificação. Por conseguinte, o teor de água ótimo, necessário para maximizar a atividade catalítica, depende da matéria-prima, da lipase, do suporte imobilizado e do solvente orgânico utilizado (TAN *et al*, 2010).

Para a enzima comercial CALB 435, Hernandez-Martins e Otero (2008) sugerem que, para assegurar uma produção elevada de biodiesel, nenhuma água extra deve ser adicionada

ao sistema, confirmando o resultado encontrado neste trabalho, no qual o nível inferior do parâmetro umidade (5%) considerou apenas a água retida no óleo.

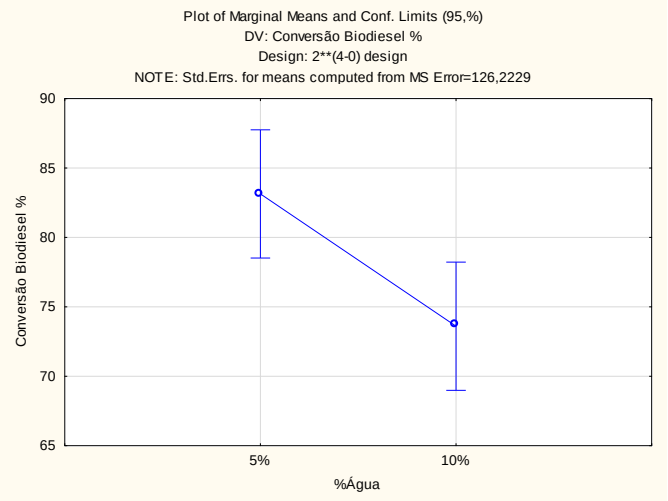


Figura 5.7 Efeito da umidade na conversão do óleo ácido de macaúba em biodiesel

Pode-se ainda observar, na Figura 5.8, que o acréscimo de 15°C na temperatura não apresentou um aumento significativo no rendimento do processo. Resultado reportado por Souza (2010) confirma que a enzima CALB 435 possui atividade ótima entre 40 e 60 ^{o}C. Como a faixa de trabalho selecionada está dentro desta faixa, confirma-se o resultado não significativo no que diz respeito à variação deste parâmetro.

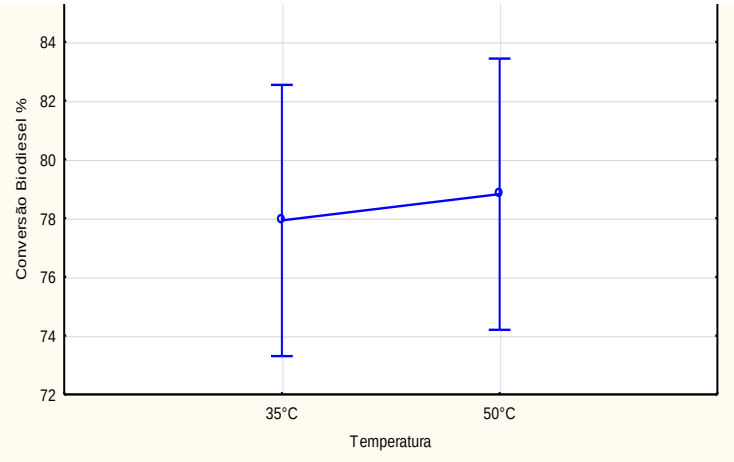


Figura 5.8 : Efeito da temperatura na conversão do óleo ácido de macaúba em biodiesel.

A influência da razão molar é apresentada na Figura 5.9 na qual se pode observar um acréscimo na conversão de 74,79% para 84,26% quando a razão molar passou de 3:1 para 6:1. Este resultado é similar ao reportado por Hernandez-Martins e Otero **(**2008) para a CALB 435. Estes autores observaram que um volume elevado de álcool é necessário para manter a

homogeneidade da suspensão contendo o biocatalisador e indicam que um aumento na razão molar de 0,333 para 2 pode elevar a conversão de 83 para cerca de 100%. Este comportamento pode ser explicado pois a CALB 435 possui alta resistência à desativação. Esta enzima é mais robusta na presença de álcoois de baixo peso molecular, facilitando assim a sua capacidade de catalisar a transesterificação por tempo mais prolongado. Além disso, a presença de um excesso de álcool mantém o glicerol em solução, reduzindo assim a desativação da lipase imobilizada por um sub-produto da reação (SHIMADA *et al.*, 2002).

Shimada e colaboradores (2002) relataram que no que diz respeito ao tipo de álcool, o etanol é mais indicado que o metanol. Além dos motivos ambientais previamente conhecidos, o glicerol gerado na reação se mistura ao metanol para formar uma segunda fase no sistema reacional. Sendo assim com uma concentração reduzida deste álcool no meio há uma consequente redução da conversão alcançada (HERNANDEZ-MARTINS E OTERO**,** 2008**)**. Uma sugestão de Shimada e colaboradores (2002) para uso do metanol é a adição deste reagente em 3 ciclos. Estes autores mostraram que quando o metanol é adicionado no modo batelada alimentada a conversão com a lipase CALB 435 atinge valores acima de 90%.

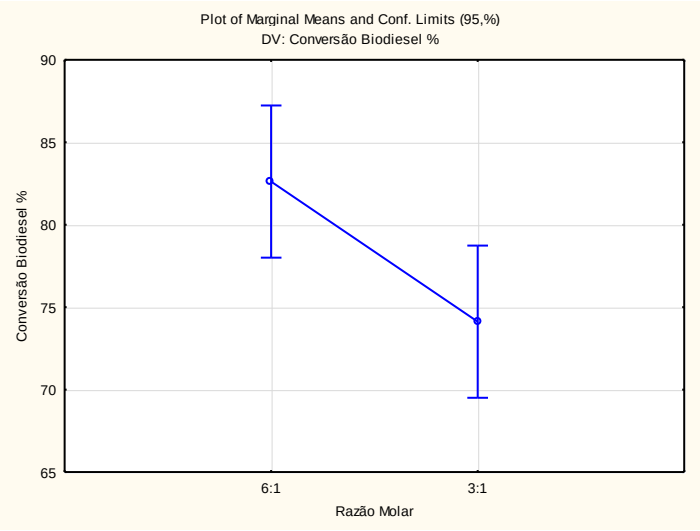


Figura 5.9 : Efeito da razão molar na conversão do óleo ácido de macaúba de biodiesel.

Como esperado, a partir da avaliação do gráfico de pareto, a concentração de enzima foi relevante neste trabalho. Neste caso, quando se variou a concentração de enzima de 10 para 5%, o rendimento diminuiu apenas em 6% (Figura 5.10).

Quando se compara o consumo da enzima por massa de produto, obtido no presente trabalho com o mesmo parâmetro reportado para conversão enzimática do óleo de soja no

estudo de Hernandez-Martins e Otero (2008), observa-se que os valores foram, respectivamente, 0,11 e 0,56 g enzima/g biodiesel. Este resultado indica que o custo da enzima estimado para produção do biodiesel de óleo de soja é cerca de 6 vezes maior que o custo estimado para o biodiesel produzido a partir do óleo ácido de macaúba. Este é um resultado relevante para a viabilização econômica do processo enzimático pois o preço da enzima é um fator limitante para implantação do processo em escala comercial.

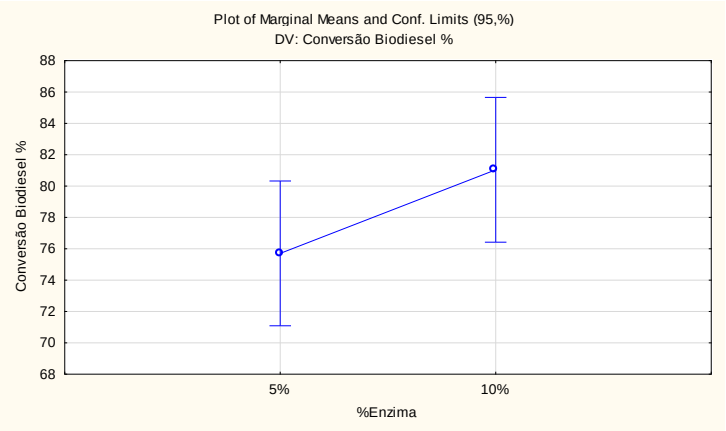


Figura 5.10 : Efeito da concentração de na conversão do óleo ácido de macaúba de biodiesel

5.6 Avaliação da hidroesterificação

Os resultados do processo de hidroesterificação estão apresentados na Tabela 5.4 onde a hidrólise, seguida de esterificação catalisada por ácido apresentou conversão de 78% em um tempo reacional de 60 minutos enquanto que a esterificação não catalisada apresentou conversão de 22%. Usando a mesma matéria–prima (fase leve do óleo de macaúba), a transesterificação via catálise enzimática apresentou uma conversão de 82%. O valor de conversão inferior encontrado é justificado pela alteração do álcool de baixo peso molecular utilizado. Hernandez-Martins e Otero, (2008) compararam o uso do metanol e etanol para obtenção de biodiesel via catálise enzimática e observaram que o metanol tem um efeito mais negativo na atividade do biocatalisador que o etanol. Em se tratando da Novozymes 435, a redução da atividade enzimática pode chegar a 12%, segundo os mesmos autores.

Tabela 5.4 Conversão de biodiesel por hidroesterificação

	Esterificação com cátalise ácida	**Esterificação sem catalisador**
Hidroesterificação	78%	22%

Apesar do tempo da hidroesterificação (72h) ser superior ao da transesterificação (48h), as condições operacionais devem ser levadas em consideração. Reações que exigem pressão e temperaturas elevadas necessitam de equipamentos de custo elevado. Por ser feita em condições mais brandas tanto de temperatura como de pressão, o biodiesel obtido por transesterificação é mais límpido por não possuir compostos de degradação. A Figura 5.11 ilustra tal observação**.**

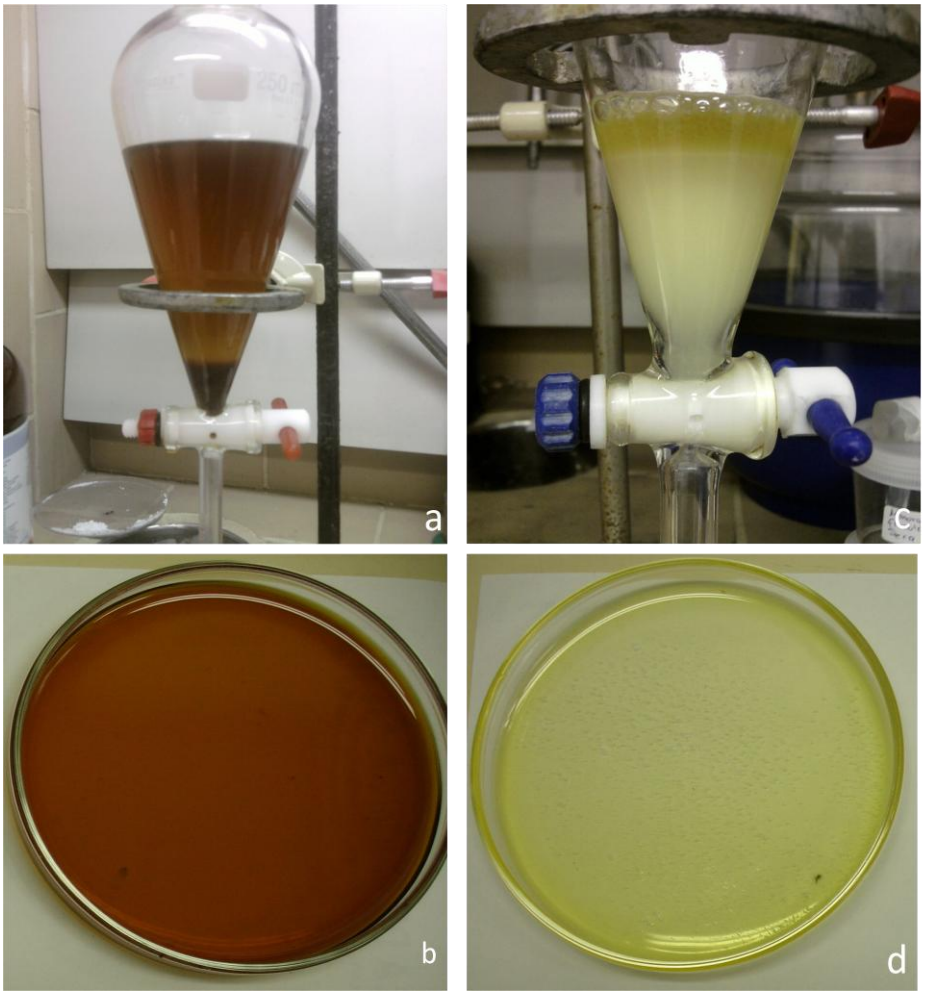


Figura 5.11 Aspecto visual do biodiesel obtido via hidroesterificação ácida (a,b) e via transesterificação enzimática (c,d).

5.7 Estabilidade da enzima Novozymes 435

Na Figura 5.12 estão apresentados os resultados obtidos para conversão da fração leve do óleo de macaúba durante doze ciclos sucessivos usando as condições otimizadas. Não houve uma variação significativa na conversão entre o primeiro e o décimo ciclo de acordo com análise de variância e teste de Fisher ($p<0,05$). Este resultado foi também observado por Hernandez-Martın e Otero (2008). Os autores constataram que a enzima CALB 435 preserva 85% de sua atividade inicial após 9 ciclos de síntese de biodiesel de soja, logo é provável que esta enzima não sofra desativação significativa na presença de etanol. Do ponto de vista econômico a reutilização de catalisadores biológicos reduz os custos e pode tornar viável a inserção da rota enzimática de forma industrial.

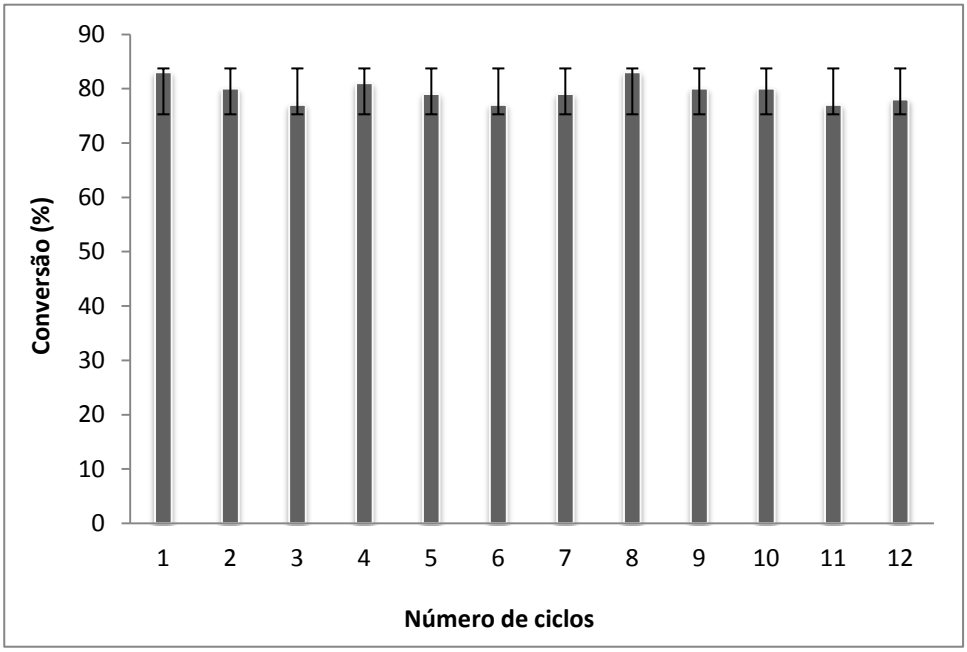


Figura 5.12 Resultados de conversão após 12 ciclos de reutilização da enzima imobilizada. As barras verticais representam o desvio padrão em cada medida

Shimada e colaboradores (2002) e Dhake e colaboradores (2012) estocaram sob refrigeração as lipases reutilizadas (CALB e *Steapsin*) de forma a determinar a vida útil das mesmas. Eles observaram, respectivamente, que após 100 e 90 dias as enzimas mantiveram suas atividades praticamente inalteradas.

5.8 Caracterização do biodiesel de macaúba

Um grande desafio que se enfrenta é a verificação da qualidade do biodiesel, uma vez que o mesmo possui facilidade na produção e ampla variedade de oleaginosas para ser utilizada como matéria prima.

Na Tabela 5.6 encontra-se o perfil graxo do biodiesel e na Tabela 5.7 suas características físico-químicas. A porcentagem de éster originado dos ácidos graxos insaturados se encontra em maior quantidade (78,78%). Nota-se como esperado que o biodiesel possui características similares à matéria prima oleaginosa de origem, ou seja, maior porcentagem de oleato de etila (54,86%). O ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado (Figura 5.2) que se encontra em grande quantidade no óleo de macaúba, conforme perfil graxo apresentado na seção 5.4.

Tabela 5.5 Perfil graxo do biodiesel de macaúba

Éster de Etila	Porcentagem de cada pico
Laurato	1,19
Miristato	0,852
Palmitato	13,2
Estearato	0,950
% Saturados	16,1
Palmitoleato	1,99
Oleato	54,9
Linoleato	20,4
Linoleneato	3,66
% Insaturados	80,9

Tabela 5.6 Parâmetros físico-químicos do biodiesel obtido

Proriedade Físico-química	Unidade	Biodiesel de macaúba	Limite ANP
Índice de Acidez	mg KOH/g	1,8	Máx. 0,8
Umidade	%	19,2	0,035
Índice de Saponificação	g KOH/100 g	206	*
Viscosidade cinemática a 40 ºC	mm^2/s	3,2	03 - 06
Glicerol Livre	% m/m	0,018	Máx. 0,2
Índice de Iodo	g/100g	75	*

* Limite não estabelecido pela ANP.

Os valores encontrados para o IA estão acima do permitido pela legislação. Uma possível solução para superar esta dificuldade é adoção da metodologia proposta por Hernandez e Otero (2008) e Shimada (2002) pode ser adotada. No caso do óleo ácido de macaúba, a reação deve ser conduzida em 3 ciclos de 16 horas, mantendo-se a mesma razão etanol:óleo e mesma concentração de enzima do processo proposto neste trabalho. A adição da enzima e etanol em estágios pode aumentar a taxa de conversão da Novozymes 435.

O teor de umidade foi relativamente alto. Este resultado se deve ao teor de umidade das matérias-primas (22%) e da fração residual da água utilizada na lavagem do catalisador durante a etapa de separação. Uma solução para reduzir a umidade do éster seria uma etapa de aquecimento seguido de filtração do produto através de um adsorvente comercial como, por exemplo, o Magnesol ® (FACCINI, 2008).

O índice de saponificação é um indicativo do comprimento da cadeia de ácido graxo. No caso do biodiesel não existe especificação para esta propriedade. Neste trabalho o valor encontrado foi de 206 mg KOH/g (óleo). Valores similares foram reportados por SILVA (2009) e MELO (2012), 201,13 e 215,13 mg KOH/g(óleo), respectivamente usando o óleo bruto de macaúba como matéria-prima.

Reduzir a viscosidade do óleo vegetal é uma das principais vantagens de produção do biodiesel para uso em motores do ciclo diesel. A elevada viscosidade gera dificuldades operacionais tais como heterogeneidade na combustão e deposição de resíduos dentro do motor (LOBO, 2009). Como esperado, houve uma redução significativa da viscosidade do biodiesel se comparado à do óleo ácido de macaúba (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 Valores da Viscosidade Cinemática a 20 e 40º C.

Viscosidade (mm^2/s)	**20ºC**	**40ºC**
Óleo ácido de macaúba	157,5	29,8
Biodiesel	5,5	3,2

O valor mais baixo encontrado neste trabalho para a viscosidade cinemática do óleo de macaúba a 40 °C (29,8) quando comparado com o reportado por Andrade e colaboradores (2010) (46,4 mm^2/s), pode ser explicado pelo menor teor de ácidos graxos saturados encontrados na fração leve do óleo usado neste trabalho.

A viscosidade do biodiesel é proporcional ao comprimento da cadeia e ao grau de saturação. Os valores obtidos no presente trabalho estão dentro dos limites estabelecidos pela ANP (CARVALHO JR., 2010).

O glicerol livre (subproduto da reação) depende da eficiência do processo de separação dos ésteres. Um alto conteúdo de glicerol pode causar problemas que vão desde a formação de cristais, crostas no interior do tanque de armazenamento do combustível, contribuindo para a formação ou depósitos de resíduos nos pistões, injetores, válvulas, anéis, filtros e entupimentos nos bicos injetores diminuindo a vida útil do motor (MELLO, 2012). A quantidade encontrada de glicerol foi de 0,018%, inferior ao valor limite permitido pela legislação (0,02%).

Valores elevados para o índice de iodo (II) podem indicar maior probabilidade de ocorrência dos processos oxidativos na molécula do ácido graxo insaturado. Os ácidos graxos contendo ligações duplas carbono-carbono reagem com iodo, de modo que, quanto maior o número de insaturações maior é o índice de iodo (MELO, 2010).

O valor encontrado para o II, no presente trabalho, foi de 75 g/100g, próximo aos valores reportados para o biodiesel de palma e soja, respectivamente, 61,97 e 135,4 g/100g. A determinação do índice de iodo apesar de ainda não possuir limites estabelecidos, é uma importante análise no controle de qualidade do biodiesel, pois está relacionada com a estabilidade oxidativa (LEAL, 2008; KAZITORIS *et al.*, 2011).

6 Conclusões e Sugestões

6.1 Considerações Finais

Para alcançar os objetivos deste trabalho utilizou-se o óleo vegetal de macaúba de baixa qualidade de forma a viabilizar um processo sustentável, para obtenção de biodiesel. Para este fim, foram utilizadas a fase leve do óleo ácido de macaúba, fracionado a seco, e uma enzima comercial Novozymes 435 (Novozyme®).

Nas condições selecionadas para os parâmetros da reação, obteve-se uma conversão de 96% na formação do éster etílico (biodiesel). Este resultado é superior aos resultados reportados para obtenção de biodiesel pelo processo de hidroesterificação, usando o mesmo óleo como fonte de ácidos graxos. As variáveis mais relevantes da reação foram a combinação de temperatura e umidade, seguida da razão molar etanol:óleo

A produção do biodiesel de macaúba usando a fase leve do óleo, fracionado a seco, alcançou maior taxa de conversão se comparado aos dados reportados na literatura para o óleo bruto de macaúba. Este resultado confirma a hipótese que esta fração leve favorece a formação do éster devido maior concentração de AGL no meio.

A qualidade e conversão final do óleo ácido de macaúba por catálise enzimática (82%) foi ligeiramente superior à obtida por hidroesterificação (78%).

Para efeitos comparativos, tanto o óleo ácido quanto seu respectivo biodiesel apresentaram características similares às encontradas na literatura. O biodiesel obtido, se refinado para reduzir umidade e índice de acidez, poderá atender as especificações da ANP.

Embora a rota enzimática não possa competir economicamente com a transesterificação química, a tecnologia desenvolvida no presente trabalho pode gradativamente substituir a rota convencional dado o crescente interesse pela utilização do biodiesel e a exigência, dos órgãos de proteção ambiental, na implementação de processos industriais menos poluidores.

6.2 Sugestões

Usar a técnica de reação em estágios de forma a minimizar o tempo de reação e possibilitar o uso do processo em escala comercial.

Usar o processo de catálise enzimática combinada com a hidrólise prévia do óleo.

Determinar a estabilidade da lipase a partir de um estudo com maior número de ciclos possíveis.

Refino do biodiesel bruto e análise dos índices da ANP.

Avaliar a pureza do glicerol obtido de forma a caracterizá-lo como grau farmacêutico.

Referências Bibliográficas

ABREU, Y. V., OLIVEIRA, H. R., LEAL, J. E. C. *Biodiesel no Brasil em três hiatos: Selo Combustível Social, Empresas e Leilões 2005 a 2012*. Editora Eumed, 2012

ABREU, Y. V., OLIVEIRA, M. A. G, GUERRA, S. M. G. *Energia, Sociedade e Meio Ambiente. Editora Eumed*, 2010

ACROTECH, História e Biodiesel . Disponível em:<http//:www.acrotech.com.br>Acesso em: 14/11/2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Boletim Mensal de Biodiesel, dezembro 2012. Disponível em:<http//:www.anp.gov.br>Acesso em: 14/01/2013.

AOCS - American Oil Chemists Society; Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 5th ed.,Champaign: AOCS, 2000.

ARISTONE, F.; *Exploração auto-sustentável da Bocaiúva no Pantanal Sul Mato Grossense: Geração de renda e equilíbrio do meio ambiente*. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.

BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v9, n4, p 368-378, 2005.

BRÍGIDA, A.I.S., PINHEIRO, A.D.T., FERREIRA, A.L.O., Pinto, G.A.S., Gonçalves, L.R.B Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137, 2007.

BRÍGIDA, A. I. S. *Imobilização de Lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais*. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

CARVALHO JR, R. M. *Determinação da eficiência energética do processo de obtenção de biodiesel proveniente de microalga por metanólise in situ*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2010.

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

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGIOS – CGEE. Química Verde no Brasil 2010 – 2030,Disponível em: :<http//:www.cgee.org.br>Acesso em: 28/11/2012.

CHANG, C.C.; WAN, S. W. China's motor fuels from tung oil. *Ind. Eng. Chem*, vol. 39, p. 1543-1548, 1947

CHIU, S.Y.; KAO,; C.Y.; CHEN, C.H.; KUAN, T.C.; ONG, S.C. LIN C.S. Reduction of CO_2 by a high-density culture of Chlorella sp. in a semicontinuous photobioreactor Bioresour. *Technol.*, 99 (2008), pp. 3389‑3396

CHRISTENSEN M. W.; ANDERSEN, L.; HUSUM, T. L.; KIRK, O. Industrial Lipase immobilization. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p 6. 2003;

CRUZ, A. *Imobilização de lipase de Candida Antarctica B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

D'SOUZA, A. C; *Produção, purificação e imobilização de* lipases. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

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

DANTAS, M. B., *Blends de Biodiesel: Propriedades de Fluxo, Estabilidade Termo-oxidativa e Monitoramento durante armazenamento*. Tese (Doutorado), Universidade Federal da Paraíba, 2010.

DARBDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L. Biodiesel: Visão Crítica do status atual e perspectivas na Academia e na Indústria. *Química Nova*, vol. 32, n° 3, p. 776-792, 2009.

DHAKE, K. P., BHATTE, K. D., WAGH,Y. S., SINGHAL, R. S., BHANAGE, B. M. Immobilization of Steapsin Lipase on Macroporous Immobead-350 for Biodiesel Production in Solvent Free System. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **vol.** 17, p. 959-965, 2012

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/janeiro/4a-semana/macauba-epequi-para-producao-de-agroenergia/>. Acesso em: 20/01/2013.

ENTABAN. Ecoenergéticas do Brasil Ltda. Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br/>. Acesso em: 02/01/2013.

FACCINI, C.S. *Uso de adsorventes na purificação de biodiesel de óleo de soja*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rio Grande do Sul, 2008.

FERRARI, R.A., OCANHA, A. C. Obtenção de óleo de Macaúba por prensagem contínua 2011 disponível em: <http://ongtremmacaubeiros.blog.terra.com.br/2012/08/02/extracao-continua-de-oleo-de-macauba/>. Acesso em: 12/08/2012.

FIRBANKS, M. Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações. *Revista Química e Derivados*, edição n° 487. 2009.

FORSSELL, P., *et al.* Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rapeseed oil (LEAR) mixture. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69.2 , 126-129, 1992.

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

GALLO, P. R.; AMIGO, H. , LEONE, C. Fatores de risco ao retardo de crescimento estrutural em crianças de baixo nível econômico e social de São Paulo, Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición,* 50: 121 – 125, 2000.

GOMES, M. *Parâmetros produtivos e reprodutivos de ovinos suplementados com glicerina da produção de biodiesel*. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Maringá, 2009.

GONTIJO, V. S.; ARANTES, A. C. C.; NETO, P. C.; FRAGA, A.C. Avaliação da qualidade dos óleos de macaúba . *In: 5° Congresso Nacional de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Lavras, UFLA-MG*, v. 1. p. 1-10. 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Química Nova*, vol. 33, no. 3, pp. 667-679, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Lipids. *Laboratory Practice*, vol. 22, p. 475-477, 1973.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Field Guide to the Palms of the Americas New Jersey: *Princepton University*, p.166-167, 1995.

HERNANDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Diferent enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL- IM. *Bioresource Technology*, p. 99 277–286, 2008.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. *Energy Policy*, vol.37, p. 2450–2456, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Estatistica da produção agrícola, janeiro 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica /indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201301comentarios.pdf>Acesso em: 08/03/2013.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto. php?codTexto=9167>. Acessado em: 15/08/2012.

INCROPERA, F. P.; DeWITT, D. P.; BERGMAN, T. L.; LAVINE, A. S. *Fundamentos de Transferência de Calor e Massa*. 5ª edição, Editora Ltc, 2006

JANUZZI, G. M. SWISHER, J. N. *Planejamento integrado de Recursos Energéticos*. Editora Autores Associados, 1997.

JEAGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, vol 16, n° 9, p. 396-403, 1998.

KAZITORIS, B.; ARICETTI, J. A.; TUBINO, M. Controle de qualidade do biodiesel: determinação do índice de iodo e a sua relação com o grau de insaturação. XVIII Congresso de Química, Instituto de Química, UNICAMP, 2011.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with lipases, In: *Multi-volume comprehensive treatise in biotechnology*, 1998.

KNOTHE, G.; DUNN R. O.; Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 80 n° 10, p. 1021-1026, 2003.

KHORAMNIA, A. *et al*. Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated Acinetobacter sp. in submerged and solid-state fermentations.*Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

KRÜGER, R. L. *Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva.* Tese (Doutorado), Universidade Federal Santa Catarina, 2012.

LEAL, R. V. P. *Avaliação metrológica de métodos para determinação do índice de iodo em biodiesel B100*. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

LEHNINGER, A., NELSON, D.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. Ed. Sarvier, 3a. ed., 975p, 2002.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S.; Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, vol. 32, 2009.

LORENZI, G.M.A.C. *Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável*. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, 2006.

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

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. *Biotectonologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 32, p. 38-46, 2004.

MAIOLINI, R. S. S. *Aplicações das enzimas em diagnóstico molecular: desenvolvimento de um Reagente Enzimático para determinação de Lactato em fluidos biológicos*. Monografia, Universidade Federal de Lavras, 2009.

MARIANO, R. G. B. *Biotransformação de óleos obtidos a partir de frutos do cerado: Macaúba (Acrocomia aculeata) e Pequi (C. brasiliense Camb).* Exame de Qualificação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 40, p.1451-1463. 2006.

MELO, M. A. M. F. *Avaliação das propriedades de óleos vegetais visando a produção de biodiesel.* Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, 2010.

MELLO, P. G. *Produção e Caracterização de Biodiesel a partir da Oleaginosa Macaúba (Acrocomia aculeata).* Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. *Seminário : Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO – MAPA. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>Acesso em: 05/02/2013.

MINISTÉRIO DE DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO – MDA. Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel.- Inclusão Social e desenvolvimento territorial. Disponível em:<http//:www.mda.gov.br>Acesso em: 14/01/2013.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. Balanço Energético Nacional. Síntese do relatório final – ano base 2011. Disponível em:<http//:www.mme.gov.br>Acesso em: 11/01/2013.

MOTOIKE, S. Y.; LOPES, F. A.; OLIVEIRA, R. M. A.; CARVALHO, M. *Processo de germinação de e produção de sementes pré-germinadas de palmeiras do gênero Acrocomia*. 2007 .

MONTEIRO, R. T. T. *Análise de Ciclo de Vida do Biodiesel – Aplicação à realidade Nacional.* Dissertação (Mestrado). Universidade de Aveiro, Portugal, 2009.

MOTTA, P. E. F., CURI, N., FILHO, A. T. O., GOMES, J. B. V. Ocorrência da Macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Embrapa* (2001)

NASCIMENTO, R.F. *Síntese de Biodiesel via Catálise Enzimática: CAL B imobilizada em fibra de coco e nanopartículas*. Projeto Final de Curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

NASCIMENTO, R.F., MARIANO R.G.B., BRÍGIDA A.I.S., ROCHA-LEÃO M.H., FREITAS S.P. Produção de biodiesel a partir do óleo ácido de macaúba usando lipase imobilizada em fibra de coco. *Revista de Química Industrial*, vol. 18, SBQ-Rio de Janeiro, 2010.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/extpages/search-results?q=brazil>. Acesso em: 09/01/2013.

NC-IUBMB - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Em consulta com o IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Enzyme Nomenclature. Disponível em http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/. Acesso em 06 de junho de 2013.

NOGUEIRA, B. M., *et al*. Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67.1 (2010): 117-121.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications,* p 769-777, 2005.

OCANHA, A. C. S., FERRARI, R. A. Tecnologia para Extração de óleo e produção de biodiesel de macaúba. *V Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica*, Campinas - SP 2011.

PARENTE, E. J. S. *Uma aventura tecnológica num país engraçado*. Editora Tecbio, Ceará, 2003.

PESSOA, V. M. N.; SOUZA, F. C. S.; REBOUÇAS, I. G. O biodiesel como elemento de desenvolvimento sustentável no semi-árido potiguar, *Holos*, a. 23, v. 3, 2007.

PIMENTEL, L. D.; MOTOIKE, S. Y.; COSTA, E. W. A.; MANFIO, C. E.; BRUCKNER, C. H. *Estimativa de custo de produção e viabilidade econômica do cultivo da palmeira macaúba (Acrocomia aculeata) para produção de óleo vegetal*. Disponível em http://www.entabanbrasil.com.br/downloads/Estudo-de-Viabilidade-Economica-Macauba-Leonardo-Pimentel.pdf. Acesso em 12/11/2012.....

RAMADHAS, A.S., JAYARAJ. S., MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel*, vol. 84, p.335-340, 2005.

RAMAKRISHNA, G. Notes on the Indian species of the genus Argulus Muller (Crustacea; Copepoda) parasitic on fishes. *Rec. Indian Mus* 49.2: 207-216, 1951.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim*. 3 (5), 385-405, 2011.

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

RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK – REN21. Renewables 2012 – Global Status Report. Disponível em: <http://www.ren21.net/REN21Activities/GlobalStatusReport.aspx> , Acesso em 19/03/2013.

RIO+20. Relatório de sustentabilidade da Organização da Conferência das Nações Unidas sobre desenvolvimento sustentável. Disponível em: <http://www.rio+20.gov.br> Acesso em 23/01/2013.

RODRIGUES, P. M. S. Fenologia Vegetativa e Reprodutiva de Acrocomia Aculeata (jacq.) lodd. ex mart.–arecaceae- no Norte de Minas, 2007.

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

SAMIOS, D., PEDROTTI, F., NICOLAU, A., REIZNAUTT, Q. B., MARTINI, D. D., DALCIN, F. M. A. Transesterification double step process - TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. Fuel Process. Technol., 90, 599-605, 2009.

SAMUKAWA, T., KAIEDA, M., MATSUMOTO, T., BAN, K., KONDO, A.,SHIMADA, Y., NODA, H., FUKUDA, H.,. Pretreatment of immobilized Candida antarctica lipase for biodiesel production from plant oil. J. Biosci. Bioeng. 90, 180–183, 2000.

SECRETARIA DA AGRICULTURA DE MINAS GERAIS- SEAPA, disponível em <http://www.agricultura.mg.gov.br>. Acesso em: 20/03/2013.

SÉVERAC, E., GALY, O., TURON, F. PANTEL, C. A., CONDORET, J. S., MONSAN, P. MARTY, A.. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme and Microbial Technology* vol. 48, p. 61–70, 2011.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A., TOMINAGA,Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 17, p. 133–142, 2002.

SIGMA ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso em 22/02/2013.

SILVA, I. C. C. *Uso de processos combinados para aumento do rendimento da extração e da qualidade do óleo de macaúba*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S.; ARAUJO, A. G. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. *Ciência Rural* v. 58, n. 5, p. 845-851, 2008.

SOARES, L. H. B.; ARAÚJO, E. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; *Eficiência Energética comparada das culturas do girassol e soja, com aptidão para produção de biodiesel no Brasil*. Circular Técnica, Rio de Janeiro, 2008.

SOUZA, L. T. A. *Síntese Enzimática do Biodisel de Jarropha curcas pela Rota Etílica.* Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 2010.

SRIVASTAVA, A. PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 4, p.111-133, 2000.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. Transformação de Triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e Insumos Químicos: Algumas Aplicações da catálise na oleoquímica. *Química Nova*, vol. 30, n.° 3; p 667-676, 2007.

TAN, T., JIKE, L., KAILI, N., LI, D., FANG, W. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, vol. 28, p. 628–634, 2010.

TAPANES, N. C. O. Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de pinhão manso (Jatropha curcas lin): Estudo teórico e Experimental. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

TELES, H., PIRES, L. L. Ambientes de ocorrência natural de macaúba, Goiás, p. 595-602, 2011.

VALDEZ, H. C.; AMADO, R. S.; SOUZA, F. C.; D'ELLA, E. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. *Química nova*, vol. 35, n° 3, 601-607, 2011.

USDA, *Foreign Agricultural Service***,** Oilseeds: World Markets and Trade. In: http://www.fas.usda.gov/oilseeds/Current/. Consultado em junho de 2013.

VAN DER PADT, A.;. SEWALT, J. J. W.; VAN'T RIET, K. On-line water removal during enzymatic triacylglycerol synthesis by means of pervaporation. *Journal of membrane science* 80.1,199-208, 1993.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, 8, 29-35. 2004.

VIEIRA, A. P. *Síntese de ésteres monoalquílicos de ácido palmítico utilizando zeólitas e lipase imobilizada*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

VIEIRA, S. S., MAGRIOTIS, M. Z., SANTOS, N. A. V., CARDOSO, M. G,. SACZK, A. A. Macauba palm (Acrocomia aculeata) cake from biodiesel processing: An efficient and low cost substrate for the adsorption of dyes. *Chemical Engineering Journal* 183, 152– 161, 2012.

VILLELA, A. A. *O dendê como alternativa energética sustentável em áreas degradadas da Amazônia*. 175 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ. 2009.

WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized Candida antarctica lipase. *J.Biosci. Bioeng*. 88, 622–626, 1999.

WENDER, P. A.; HANDY, S. T.; WRIGHT, D. L. Towards the ideal synthesis. *Chemistry & Industry*, p. 765-769, 1997.

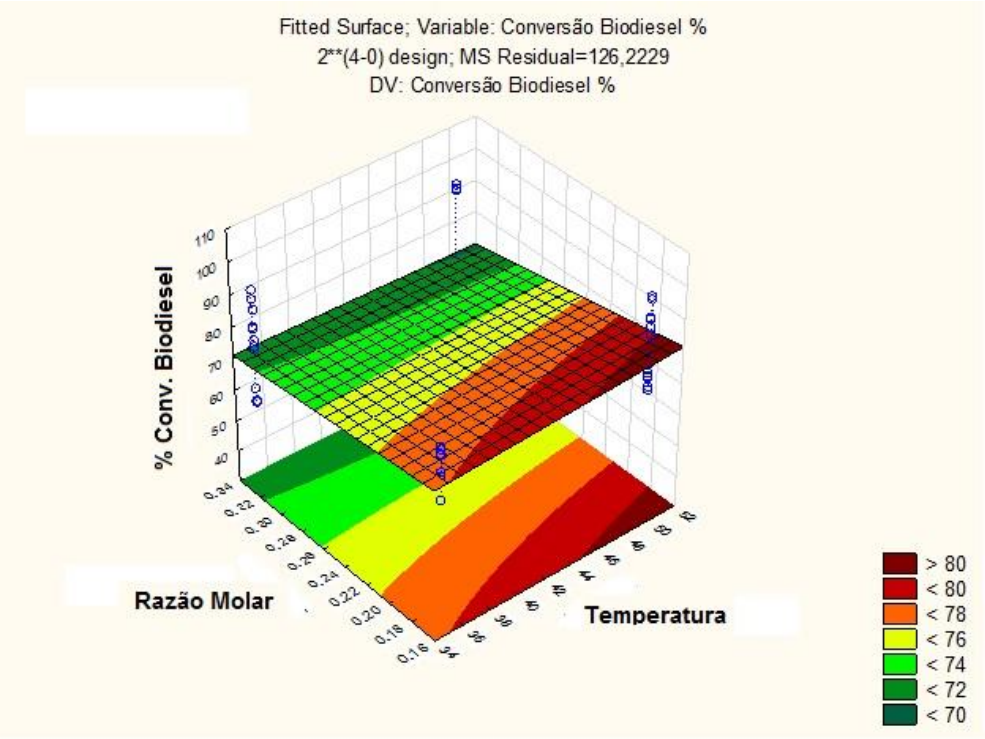
WU, J. C.; LOW, H. R.; LENG, Y.; CHOW, Y.; LI, R.; TALUKDER, M. M. R.; CHOI, W. J. Ketoprofen resolution by enzymatic esterification and hydrolisis of esters product. *Biotechnology and bioprocess engineering*, vol. 11, p. 211-214, 2006.

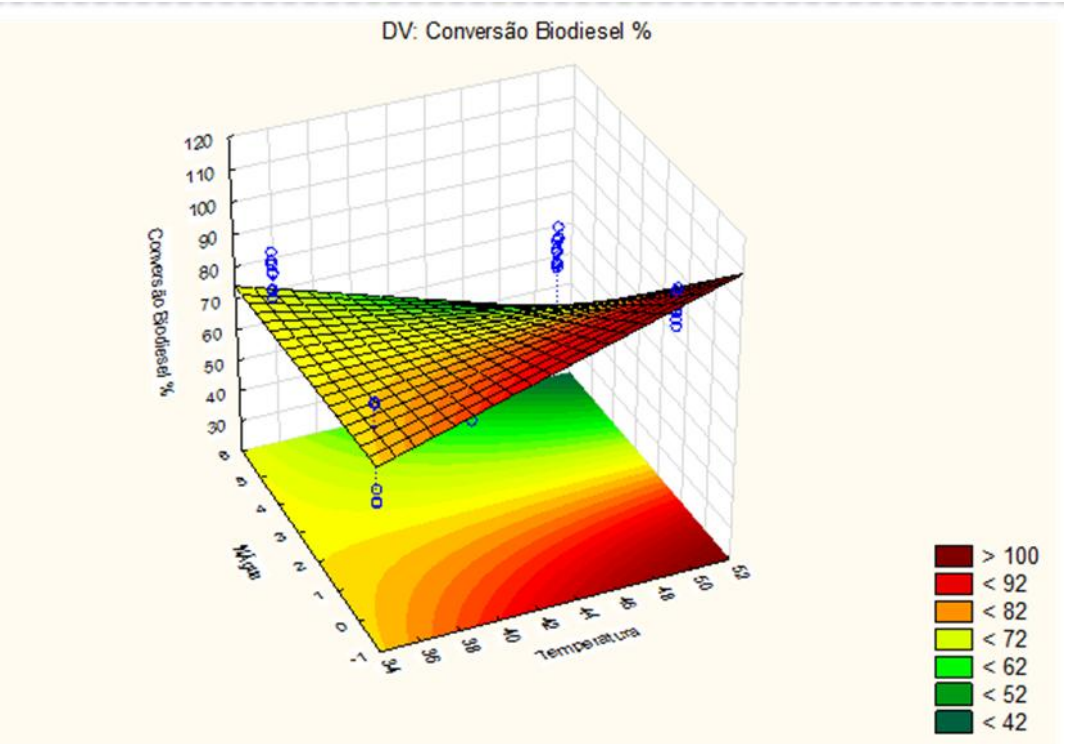
XIANG LI, TAO LIU, LI XU, XIAOHUA GUI, FENG SU, YUNJUN YAN. Resolution of Racemic Ketoprofen in Organic Solvents by Lipase from Burkholderia cepacia G63. Biotechnology and Bioprocess Engineering, vol. 17, p. 1147-1155, 2012.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100°C. *Science*, vol. .22, p. 1249-1251, 1984.

ZALIHA, O; CHONG, C. L.; CHEOW, C. S.; NORIZZAH, A. R.; KELLENS, M. J.; Crystallization properties of palm oil by dry fractionation, *Food Chemistry*, v. 86, p. 245–250, 2004.

Anexos


Fitted Surface; Variable: Conversão Biodiesel %
2**(4-0) design; MS Residual=126,2229
DV: Conversão Biodiesel %
% Conv. Biodiesel
Razão Molar
Temperatura
> 80
< 80
< 78
< 76
< 74
< 72
< 70


DV: Conversão Biodiesel %
Conversão Biodiesel %
Razão
Temperatura
> 100
< 92
< 82
< 72
< 62
< 52
< 42