



UNILAB

UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
CURSO DE ENGENHARIAS DE ENERGIAS

ELLEFSON EMMANUEL SOUZA DE OLIVEIRA

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE
COCO RESIDUAL**

ACARAPE
2019

ELLEFSON EMMAUEL SOUZA DE OLIVEIRA

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE
COCO RESIDUAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energias.

Orientadora: Prof.^a Maria Cristiane Martins de Souza, Dr.^a

Coorientadora: Prof.^a Ada Amelia Sanders Lopes, Dr.^a

ACARAPE
2019

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Oliveira, Ellefson Emmanuel Souza de.

O45h

Hidroesterificação enzimática dos ácidos graxos do óleo de côco residual / Ellefson Emmanuel Souza de Oliveira. - Redenção, 2019. 74f: il.

Monografia - Curso de Engenharia de Energias, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2019.

Orientador: Profa. Maria Cristiane Martins de Souza.

1. Biodiesel. 2. Óleo de coco. 3. Lipase. 4. Hidroesterificação. I. Título

CE/UF/BSP

CDD 662.6

ELLEFSON EMMANUEL SOUZA DE OLIVEIRA

HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE COCO RESIDUAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energias.

Orientadora: Prof.^a Maria Cristiane Martins de Souza, Dr.^a

Coorientadora: Prof.^a Ada Amelia Sanders Lopes, Dr.^a

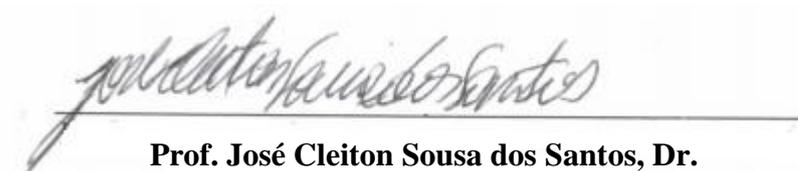
Aprovado em: 04/04/2019

BANCA EXAMINADORA



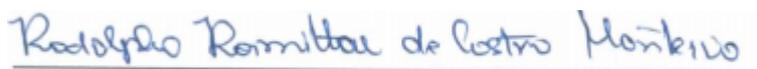
Prof.^a Maria Cristiane Martins de Souza, Dr.^a

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)



Prof. José Cleiton Sousa dos Santos, Dr.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)



Rodolpho Ramilton de Castro Monteiro, Eng. de Energias

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho à minha Mãe, Francisca Maria, por seu apoio incondicional; à minha irmã, Ellen, por sua preocupação, cuidado e companheirismo; à minha querida avó Alzenir e à minha amada tia Antônia por toda ajuda que me têm dado ao longo da jornada.

Aos meus pais pelo investimento e suporte na minha criação e educação ao longo dos últimos 25 anos, em especial à minha mãe, a quem muito amo, por sua sabedoria e força, que me inspiram a nunca temer os desafios da vida, sempre ao meu lado, me confortando nos momentos de angústias e incertezas e vibrando por minhas conquistas e superações, por me ensinar a ter gosto pelo estudo e procurar fazer sempre o melhor quando algo me for proposto, por sua classe e perfeccionismo, me mostrando que sempre podemos lapidar nossa melhor versão para oferecê-la ao mundo, obrigado por tudo, obrigado por ser minha mãe.

À minha princesa, e também irmã, Ellen Mariane, por seu companheirismo e preocupação comigo, por sua maturidade fundida em sua tão pouca idade, sempre torcerei por ti, você terá conquistas grandiosas.

À minha querida tia Antônia, ou como chamo carinhosamente, tia T., a quem muito amo, por seu tão grande amor e cuidado comigo desde meus primeiros dias de vida até hoje, contigo sempre posso contar, sempre posso recorrer ao seu cuidado quando as coisas não estão da maneira que eu queria, já passastes por tantas coisas, mas nunca perdeu seu jeito alegre!! Minha gratidão e amor por ti não tem tamanho.

Ao meu terapeuta e grande amigo Dr. Nilson Frazão, o senhor ajudou a me encontrar na imensidão nos meus próprios pensamentos, quando eu mesmo já havia perdido a esperança em mim o senhor me fez renascer para uma nova vida, minha gratidão por ti é imensurável. Muito obrigado por tudo, sua amizade vale ouro!

À Dr.^a e também Vereadora de Mulungu, Lyziane Cristina Malta Bitar Farias Lima, suas contribuições foram decisivas no meu tratamento e recuperação, me possibilitando retornar às minhas atividades acadêmicas, seus empenhos na melhoria da saúde são memoráveis. À querida Prof.^a Dr.^a Ada Amelia Sanders Lopes pela confiança que depositou no meu potencial como bolsista, no projeto Análise exergética do processo de produção do biodiesel de babaçu e sebo bovino financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), por sua amizade e principalmente, pela compreensão e ajuda que me destes que também foram fatores relevantes na minha recuperação.

Ao Prof., Dr. José Cleiton Sousa dos Santos e a Prof.^a, Dr.^a, Maria Cristiane Martins de Souza, por suas contribuições no investimento e incentivo à pesquisa, e na minha formação em particular como professores e orientadores, culminando na realização deste trabalho. Suas carreiras me motivam no aprimoramento de minhas atribuições como profissional.

À todos os membros do grupo de engenharia enzimática GENEZ, pela troca de conhecimento pela ajuda concedida e pelos momentos de descontração, em especial ao meu amigo e também colega de curso Rodolpho Ramilton de Castro Monteiro, por sua paciência e ajuda e a querida Katia, técnica do Laboratório de Análises Químicas, por sua simpatia e alegria e também por seu grande profissionalismo diante das demandas diárias, me dando a oportunidade de aprender algo novo todos os dias.

À Prof.^a, Dr.^a Rita Karolinne Chaves de Lima, por quem tenho grande carinho e admiração, por sua inteligência e contribuições na minha formação, como orientadora nas bolsas de monitoria em Química I e II e Laboratórios de Química I e II, com quem muito pude aprender, por sua amizade e preocupação com minha formação, obrigado! Ao Programa de bolsas de monitoria da UNILAB – PBM, pelas oportunidades de enriquecimento acadêmico no exercício da atividade de monitoria.

Ao Programa de estágio da UNILAB, em especial à Divisão de Manutenção e Apoio Operacional – DIMOP, pela contribuição no meu enriquecimento profissional no exercício da função de estagiário da área de Manutenção e Eficiência Energética. Ao Engenheiro Mecânico Lucas Daniel de Mont'alverne Monteiro e também supervisor do estágio, pelo profissionalismo diante das demandas recorrentes, por sua instrução e orientação, por seu caráter profissional. Ao técnico em Edificações Rafael Holanda e sua secretária Vanielly Ferreira da Silva, por me receberem no setor e compartilharem comigo seu conhecimento, pela amizade que em tão pouco tempo pudemos desenvolver.

À Deus!!

*“Qualquer árvore que queira tocar os céus,
precisa ter raízes tão profundas ao ponto de tocar os
infernos”. C.G. Jung*

RESUMO

A produção de Biodiesel, estabelecida na indústria através da reação de transesterificação, utiliza majoritariamente óleos com baixo índice de acidez, portanto, extremamente refinados, o que diminui a aplicabilidade produtiva em termos de matérias-primas não tão refinadas e conseqüentemente com índices de acidez mais elevados. É nesse cenário que surgem rotas alternativas de produção, que possibilitam a utilização de matérias graxas não nobres, conferindo um apelo ambiental e uma perspectiva de aprimoramento de novas e mais econômicas metodologias de produção de biocombustíveis. O objetivo desse trabalho foi a síntese de biodiesel através da produção de ácidos graxos por meio da saponificação por rota química do óleo de coco residual assistida no ultrassom seguida de hidrólise ácida e posterior esterificação enzimática do material graxo produzido, utilizando a Lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) imobilizada em resina acrílica (Novozym ® 435) como biocatalizador enzimática, o que denomina-se hidroesterificação. A utilização do banho ultrassônico na etapa reacional inicial, teve o intuito de acelerar o processo de saponificação, uma vez que a cavitação provocada no fluido submetido a ondas ultrassônicas amplia a miscibilidade entre os reagentes possibilitando maior contato entre as interfaces de óleo e solução etanólica de KOH, acelerando o tempo de reação e diminuindo significativamente a necessidade de elevadas temperaturas para a execução do processo. Para a etapa de esterificação enzimática, um planejamento experimental fatorial 2^k do tipo PCC (Planejamento Completo Central) de quatro variáveis (temperatura, tempo reacional, razão molar e concentração de biocatalisador) foi realizado no *software Statistica*, no intuito de avaliar a influência das condições operacionais no rendimento do processo. Para tanto, inicialmente realizou-se 27 reações com diferentes combinações dos parâmetros reacionais, em seguida, após a determinação do ponto ótimo, o mesmo foi otimizado através de redes neurais. Fez-se um comparativo entre o desempenho do ponto ótimo otimizado da reação de esterificação enzimática quando realizado com agitação mecânica (incubadora) e banho ultrassônico. Verificou-se que dentre os parâmetros com influência lineares, o mais estatisticamente significativo, foi a razão molar. A melhor combinação para as 27 reações apresentou um rendimento de 88% em conversão de ácidos graxos em ésteres. Já para o comparativo do ponto otimizado entre agitação mecânica e banho ultrassônico, a primeira apresentou como melhor conversão 83,39 % e o segundo, 80,86%. A conversão obtida para o ponto otimizado nos dois sistemas reacionais descritos foi menor que o ponto ótimo do planejamento experimental inicial, isso deveu-se ao fato dos resultados obtidos para as 27 reações não obedecerem a distribuição normal o que contribuiu negativamente na obtenção do ponto otimizado exato via redes neurais, visto que foram necessárias a realização de adequações do modelo utilizado (Linear quadrático e especificações) para que os resultados pudessem ser representados estatisticamente.

Palavras-chave: Hidroesterificação, óleo residual de coco, etanol, lipase imobilizada, planejamento experimental.

ABSTRACT

The production of Biodiesel, established in the industry through the reaction of transesterification, mainly uses oils with low acidity index, therefore, extremely refined, which reduces the productive applicability in terms of raw materials not so refined and consequently with more acidity indexes high. It is in this scenario that alternative production routes emerge that allow the use of non-noble greases, giving an environmental appeal and a perspective of improvement of new and more economical biofuel production methodologies. The objective of this work was the synthesis of biodiesel through the production of fatty acids by the chemical route saponification of the residual coconut oil assisted in the ultrasound followed by acid hydrolysis and subsequent enzymatic esterification of the fatty material produced using Lipase B of *Candida antarctica* (CAL-B) immobilized on acrylic resin (Novozym® 435) as an enzymatic biocatalyst, which is called hydroesterification. The use of the ultrasonic bath in the initial reaction stage had the purpose of accelerating the saponification process, since the cavitation provoked in the fluid subjected to ultrasonic waves amplifies the miscibility between the reagents allowing greater contact between the oil interfaces and the ethanolic solution of KOH, accelerating the reaction time and significantly reducing the need for high temperatures for the execution of the process. For the enzymatic esterification step, a 2k experimental design of the PCC (Complete Central Planning) type of four variables (temperature, reaction time, molar ratio and biocatalyst concentration) was performed in the Statistica software, in order to evaluate the influence of the conditions operating costs. In order to do so, we initially performed 27 reactions with different combinations of the reaction parameters, then, after the determination of the optimal point, it was optimized through neural networks. A comparison was made between the optimum optimum performance of the enzymatic esterification reaction when performed with mechanical agitation (incubator) and ultrasonic bath. It was verified that among the parameters with linear influence, the most statistically significant, was the molar ratio. The best combination for the 27 reactions showed an 88% yield in conversion of fatty acids to esters. Comparing the optimized point between mechanical agitation and ultrasonic bath, the first one presented the best conversion 83.39% and the second, 80.86%. The conversion obtained to the optimized point in the two reaction systems described was less than the optimum point of the initial experimental design, due to the fact that the results obtained for the 27 reactions did not obey the normal distribution, which contributed negatively to obtaining the optimized point (neural networks), since it was necessary to make adaptations of the model used (Linear quadratic and specifications) so that the results could be represented statistically.

Keywords: Hydrosterification, residual coconut oil, ethanol, immobilized lipase, experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Mecanismo químico da hidrólise dos triacilglicerídeos presentes no processo de hidroesterificação.	2
Figura 2 -Esquema simplificado do processo de hidroesterificação.	4
Figura 3 -Mecanismo de esterificação enzimática com Etanol.	6
Figura 4 -Reação de hidrólise	9
Figura 5 -Representação estrutural de: triglicerídeo (1), ácido graxo (2) e glicerol (3).	10
Figura 6 -Percentual de óleo de algumas oleaginosas.	29
Figura 7 -Cocos Nucifera L.	30
Figura 8 -Cromatograma do óleo de coco residual	31
Figura 9 -Crescimento de bolha e implosão num líquido irradiado com ultrassom.	37
Figura 10 -Banho ultrassônico	39
Figura 11 -Ponteira ultrassônica	39
Figura 12 -Fluxograma de aplicação do PCC	41
Figura 13 -Esquema do procedimento experimental da 1ª Etapa - Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida	43
Figura 14 -Hidrólise ácida de triglicerídeos	45
Figura 15 -Esquema simplificado do processo de hidroesterificação	48
Figura 16 -Superfície de resposta para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em função da R.M e da Temperatura (RM de 1:4, 6% de conteúdo de biocatalisador (p/p) , temperatura de 55°C e tempo de 8h).	55
Figura 17 -Gráfico de Pareto gerado da interação entre as variáveis independentes (temperatura, tempo reacional, razão molar e conteúdo de biocatalisador) e a variável dependente (conversão).	54
Figura 18 -Valores observados experimentalmente versus valores previstos pelo modelo matemático para a síntese ésteres	57

Figura 19 -Conteúdo de [E] x Temperatura	58
Figura 20 -Temperatura x Tempo reacional	58
Figura 21 -Conteúdo [E] x Tempo reacional	58
Figura 22 -Conteúdo de [E] x R.M	58
Figura 23 -R.M x Tempo reacional	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Trabalhos que utilizaram o método de hidroesterificação.	3
Tabela 2 -Trabalhos da literatura que utilizaram esterificação em banho ultrassônico com catalisadores químicos e enzimáticos.	5
Tabela 3 -Vantagens da utilização do etanol em reações de esterificação.	6
Tabela 4 -Comparativo entre o processo de Hidroesterificação e Transesterificação	8
Tabela 5 -Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras	11
Tabela 6 -Ácidos Graxos saturados presentes em óleos e gorduras	28
Tabela 7 -Ácidos Graxos insaturados presentes nos óleos e gorduras	28
Tabela 8 -Identificação das matérias primas para produção de biodiesel.	29
Tabela 9 -Percentuais de ácidos graxos para o óleo de coco residual.	31
Tabela 10 -Comparativo entre catálise química e catálise enzimática	32
Tabela 11 -Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel.	33
Tabela 12 -Características da enzima livre e da enzima imobilizada.	36
Tabela 13 -Vantagens e Desvantagens entre Banho ultrassônico e Ponteira ultrassônica	38
Tabela 14 -Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental no software Statistica® 10 para produção enzimática de ésteres em sistema livre de solvente orgânico sob sistema de agitação mecânica.	46
Tabela 15 - Planejamento experimental software Statistica® 10	47
Tabela 16 -Conversão em ésteres para as reações 1 a 27	52

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
DG	Diglicerídeos / Diacilglicerídeos
MG	Monoglicerídeos
R.M	Razão Molar
[E]	Enzimas
CAL-B	Lipase de <i>Candida Antarctica</i> do tipo B

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	<i>Objetivos gerais</i>	<i>16</i>
2.2.	<i>Objetivos específicos</i>	<i>16</i>
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
3.1.	<i>Hidroesterificação</i>	<i>1</i>
3.2.	<i>Hidrólise</i>	<i>4</i>
3.3.	<i>Esterificação</i>	<i>4</i>
3.4.	<i>Subprodutos do processo de Hidroesterificação</i>	<i>7</i>
3.5.	<i>Óleos e Gorduras</i>	<i>9</i>
3.6.	<i>Composição em Ácidos Graxos de óleos e gorduras</i>	<i>11</i>
3.7.	<i>Matérias-primas para produção de biodiesel</i>	<i>28</i>
3.8.	<i>Óleo de coco</i>	<i>30</i>
3.9.	<i>Produção de biodiesel por catálise enzimática</i>	<i>32</i>
3.10.	<i>Lipases</i>	<i>34</i>
3.11.	<i>Imobilização de enzimas</i>	<i>35</i>
3.12.	<i>Ultrassom</i>	<i>36</i>
3.13.	<i>Planejamento experimental</i>	<i>39</i>
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1.	<i>1ª Etapa- Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida</i>	<i>41</i>
4.2.	<i>2ª Etapa - Esterificação enzimática</i>	<i>42</i>
4.3.	<i>Comparativo do ponto ótimo - incubadora x ultrassom</i>	<i>42</i>
5.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	44
5.1.	<i>1ª Etapa: Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida</i>	<i>44</i>
5.1.1.	<i>Descrição do aparato experimental</i>	<i>44</i>
5.1.1.1.	<i>Configuração do Equipamento de Ultrassom</i>	<i>44</i>

5.1.2. <i>Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom seguida de hidrólise ácida</i>	44
5.2. 2ª Etapa: Esterificação enzimática	46
5.2.1. <i>Descrição do aparato experimental</i>	46
5.2.1.1. <i>Configuração da incubadora shaker</i>	46
5.2.1.2. <i>Quantificação da Acidez</i>	48
5.3. Comparativo entre o ponto ótimo assistido por irradiação ultrassônica e agitação mecânica	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
6.1. <i>1ª Etapa: Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida</i>	51
6.2. <i>2ª Etapa: Esterificação enzimática</i>	52
6.3. <i>Comparativo entre o ponto ótimo assistido por irradiação ultrassônica e agitação mecânica</i>	58
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática na modificação de óleos e gorduras vem ganhando espaço, por apresentar vantagens quando comparada aos processos convencionais, que exigem a operação em temperaturas e pressões mais elevadas e grande consumo de produtos químicos, o que instiga a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem a obtenção de enzimas de diversas fontes com um custo reduzido. Dentre as vantagens da rota enzimática, pode-se apontar o maior rendimento e maior especificidade do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia e redução da quantidade de resíduos gerados (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases são enzimas naturalmente presentes no organismo dos seres vivos, responsáveis pelo metabolismo de óleos e gorduras. Estas enzimas possuem um grande potencial biotecnológico, pois em meio aquoso catalisam a hidrólise de triacilgliceróis e, em condições de baixa quantidade de água, podem promover também reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (JAEGER *et al.*, 1994). As lipases (triacilglicerolacilidrolases E.C.3.1.1.3) atuam na interface entre a fase aquosa e o óleo, catalisando a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG), produzindo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (NOOR *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004).

A metodologia convencional de produção de ésteres a partir de triacilgliceróis é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. No entanto, estudo recente tem investigado a viabilidade do processo de hidroesterificação, o qual permite, além da utilização de uma ampla variedade de lipases de baixo valor comercial, o uso de uma maior variedade de matérias primas, incluindo óleos de fritura, óleos de elevada acidez bem como matérias graxas residuais do processamento de óleos.

De acordo com Encarnação (2008), a hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise seguida de uma etapa de esterificação. A hidrólise consiste em uma reação química entre a gordura ou o óleo com a água, gerando-se glicerina e ácidos graxos. Após a hidrólise, a glicerina é removida e os ácidos graxos gerados são lavados para remoção de resíduos reacionais para em seguida serem esterificados com um álcool que “neutraliza” a acidez presente, gerando ésteres de elevada pureza. Na reação também se obtém, como subproduto, a água, que pode retornar para o processo de hidrólise, reintegrando-se ao processo, finalizando o ciclo (ENCARNAÇÃO, 2008).

O estudo da aplicação do ultrassom apresenta-se como uma alternativa na produção de ácidos graxos em condições otimizadas e com maiores rendimentos. O ultrassom apresenta vantagens significativas quando comparado ao processo convencional de aquecimento e agitação vigorosa. Isso deve-se ao aumento da miscibilidade entre reagentes, redução do tempo reacional, redução da quantidade de reagentes e aumento do rendimento e da seletividade da reação (STAVARACHE *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi produzir biodiesel a partir da produção de ácidos graxos utilizando como matéria prima o óleo de coco residual, através de saponificação assistida no ultrassom seguida de hidrólise e posterior esterificação enzimática do material graxo produzido, utilizando a Lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) em sua forma imobilizada (Novozyem ® 435) como biocatalisador enzimático, no intuito de averiguar a viabilidade da obtenção de biodiesel através dessa rota alternativa.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o ponto ótimo (temperatura, tempo reacional, razão molar e conteúdo de biocatalisador) para a síntese de ésteres de A.G.L catalisado pela CAL-B através de planejamento experimental do tipo PCC;
- Validar experimentalmente o ponto ótimo teórico através de dois sistemas reacionais;
- Determinar a influência dos parâmetros reacionais (temperatura, tempo reacional, razão molar e conteúdo de biocatalisador) no desempenho da reação;
- Comparar o curso da reação sob agitação mecânica e irradiação ultrassônica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção de biodiesel se tornou uma necessidade irrefutável nos últimos anos, visto o iminente esgotamento das reservas fósseis das quais o diesel convencional é proveniente, além da preocupação com os impactos ambientais que se tornam cada vez mais acentuados no decorrer dos últimos anos. Diante desta problemática, metodologias alternativas para obtenção desse biocombustível vêm sendo estudadas, desenvolvidas e aprimoradas no intuito de garantir a produção de um combustível que por um lado atenda os padrões de qualidade, bem como a crescente demanda, e por outro respeite os limites dos recursos naturais, preocupando-se com a minimização dos impactos, englobando o processo em sua plenitude, desde a escolha da matéria prima até às razões molares e concentrações de reagentes que constituem o processo de síntese do biocombustível, levando-se também em consideração os subprodutos, sejam eles indesejáveis ou com valor agregado, tanto aos produtores quanto ao ambiente.

Processos como, micro emulsões, pirólise, reação de transesterificação e reação de esterificação, são utilizados na produção de biodiesel. Dentre estes, a reação de transesterificação é o processo mais utilizado (LIMA, 2015). No entanto, é sabido que a reação de transesterificação industrial ocorre em catálise alcalina, através da utilização de catalisadores constituídos por bases fortes como hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio KOH, o que inevitavelmente gera reações paralelas de saponificação, portanto, exigindo invariavelmente matérias-primas semi-refinadas, encarecendo o custo de obtenção das mesmas.

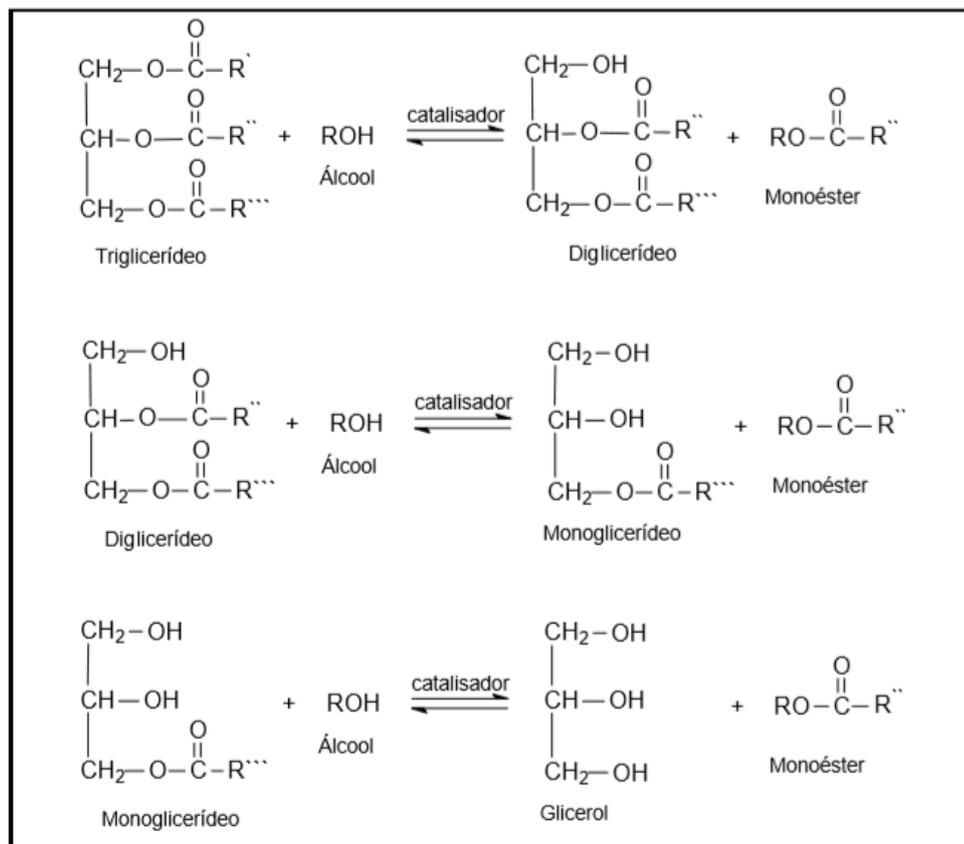
É diante deste cenário que um novo processo se apresenta como uma das novas alternativas na produção do biodiesel, uma vez que permite o uso de qualquer matéria-prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros) independente da acidez e da umidade que possuem. Essa é uma característica vantajosa quando se compara essa rota alternativa ao processo convencional de transesterificação que gera, inevitavelmente, sabões afetando o rendimento dessas plantas e dificultando a separação biodiesel/glicerina, trata-se da hidroesterificação (ENCARNAÇÃO, 2008).

3.1. Hidroesterificação

Segundo Santos *et al.*, (2016), a produção de biodiesel por hidroesterificação é um processo que envolve duas etapas consecutivas: a hidrólise e a esterificação. A primeira etapa consiste numa reação química entre os triacilglicerídeos da gordura ou óleo vegetal e a água. De acordo com Mills e McClain (1949), essa reação de hidrólise é uma pseudo-homogênea de

primeira ordem reversível (com excesso de um reagente, normalmente água) que ocorre em três etapas: na primeira etapa, os triacilglicerídeos são hidrolisados em diacilglicerídeos; na segunda etapa, os diacilglicerídeos são hidrolisados em monoacilglicerídeos e, na terceira etapa, os monoacilglicerídeos são hidrolisados em glicerol, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1-Mecanismo químico da hidrólise dos triacilglicerídeos presentes no processo de hidroesterificação.



Fonte: Santos *et al.*, (2015)

Em todas as etapas, são produzidos ácidos graxos livres. A quantidade de ácidos graxos livres é a somatória das três etapas. Podem ser utilizados catalisadores heterogêneos ou enzimáticos para conduzir e otimizar a reação ou ainda em processos não catalíticos em condições de fluidos subcríticos ou supercríticos. Isso confere a essa reação a vantagem de permitir o uso de matérias-primas com alto teor de acidez e de umidade, uma vez que o objetivo da hidrólise é obter alto teor de ácidos graxos livres, sendo a água um dos reagentes (PANDEY *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2016).

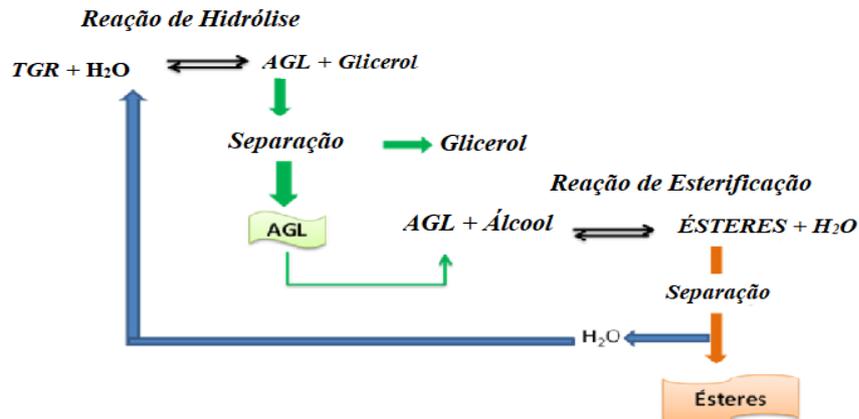
Independente da acidez e da umidade da matéria-prima, o produto final da hidrólise possui acidez superior a 99%. Portanto, ao invés de diminuir a acidez através de um refino, como é exigido na rota convencional de produção do biodiesel, a hidrólise aumenta propositalmente a acidez da matéria-prima. Além disso, obtém-se uma glicerina muito mais pura que a glicerina advinda da transesterificação. Matérias-primas de grau alimentício geram glicerinas de grau alimentício, a partir da hidroesterificação, algo que não ocorre na convencional reação de transesterificação, uma vez que quantidades significativas de sais, álcoois e outras impurezas encontram-se dissolvidos na glicerina. Atualmente, as três plantas de hidrólise (SGS, em Ponta Grossa-PR; Irgovel – Indústria Rio Grandense de 27 Óleos Vegetais, em Pelotas-RS; e ICSG – Indústria Campineira de Sabão e Glicerina, em Campinas - SP), em operação no Brasil, atingem conversões superiores a 99% (ENCARNAÇÃO, 2008). A tab 1 apresenta uma compilação de trabalhos que utilizaram o método da hidroesterificação.

Tabela 1-Trabalhos que utilizaram o método de hidroesterificação.

Referências	Gomes (2009)	Talukder et al. (2010)	De Souza et al. (2010)	Cavalcanti-Oliveira et al. (2011)	Soares et al. (2013)	Argueiras et al. (2014)
Etapa de HIDRÓLISE	Enzimática	Enzimática	Enzimática	Enzimática	Água Subcrítica	Enzimática
Modo de operação	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada
Catalisador (% em peso de óleo)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Candida rugosa</i> (0,05%)	VEEG pinhão manso (10%)	<i>Thermomyces lanuginos</i> (lípase líquida, 2,3 %)	Livre de catalisador	<i>Ricena nos communis</i> L. (2,5 m/v)
Temperatura e pressão	45°C e 1 atm	30°C e 1 atm	40°C e 1 atm	60°C e 1 atm	250°C e 60 atm	30°C e 1 atm
Substrato	Óleo residual da industria pesqueira (450g de óleo mais 600 mL enzima)	Óleo de cozinha usado:água (1:1) v/v	Tris-HCL 0,1 mol / L:óleo de pinhão manso (9:1) v/v	Óleo de soja:água (1:1) v/v	Óleo ácido de borra de soja:água (1:1) v/v	50% v/v óleo Tampão acetato 0,1 mol/L pH4
Conversão	81% em 48 h	100 % em 10h	98% em 2h	89% em 48h	95% em 1h	99,6 % em 6h

Fonte: Zenevicz (2015)

Figura 2-Esquema simplificado do processo de hidroesterificação.



Fonte: Zenevicz (2015)

3.2. Hidrólise

Denomina-se como hidrólise, a reação entre trigliceróis (sais de ácidos graxos) e água, em que são obtidos como produto ácidos graxos e como subproduto glicerol. A reação pode acontecer na presença de catalisadores básicos, ácidos ou enzimáticos. Após a hidrólise, os ácidos graxos separados de seus sais são esterificados com metanol ou etanol, obtendo-se o metil ou etil éster com elevada pureza. Uma vez que o glicerol é removido antes da etapa de esterificação, como mostra o esquema apresentado na Fig. 2, o mesmo não sofre qualquer alteração por parte de interação com o metanol/etanol ou com o éster, tornando a glicerina obtida mais pura que a glicerina advinda do processo de transesterificação (ZENEVICZ, 2015; GOMES, 2009).

3.3. Esterificação

Denomina-se esterificação a reação entre um ácido graxo e um álcool (metanol ou etanol) com consequente produção de ésteres alquílicos e formação de água como subproduto (ENCARNAÇÃO, 2008). A reação de esterificação é um processo reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (esterificação) como a reação inversa (hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool (NEVES, 2008).

Difere da transesterificação por utilizar ácidos graxos ao invés de triglicerídeos, o que a torna mais vantajosa devido à possibilidade do uso de matérias primas de baixo valor agregado (tais como resíduos e borras ácidas) e a não formação de glicerol. Nos casos em que já se dispõe do ácido graxo a ser empregado no processo, não há necessidade da realização da reação de hidrólise, que é característica do processo de hidroesterificação, uma vez que a matéria-prima já é um ácido graxo (ENCARNAÇÃO, 2008).

No entanto, a reação de esterificação exige elevadas concentrações de álcool para se alcançar conversões significativas. A mínima razão molar álcool/ácido graxo necessária deve ser de pelo menos 9:1, o que corresponde um excesso estequiométrico de 800%. Esse aspecto desvantajoso deve-se principalmente pela formação de água ao longo da reação, que provoca desativação do catalisador (H⁺) presente no meio, favorecendo a reação, reversa, de hidrólise. Contudo, a reação de esterificação pode ser catalisada por enzimas (COSTA FILHO, 2008). O trabalho de Kulkarni *et al.*, (2006), evidencia a viabilidade do uso de lipases na esterificação de matérias primas de elevada acidez livre em proporções estequiométricas e em condições brandas de temperatura (COSTA FILHO, 2008). A seguir a tab. 2 apresenta uma compilação de trabalho que utilizaram ultrassom na etapa de esterificação, utilizando catálise básica, ácida e enzimática.

Tabela 2-Trabalhos da literatura que utilizaram esterificação em banho ultrassônico com catalisadores químicos e enzimáticos.

ESTERIFICAÇÃO EM ULTRASSOM				
<i>Autor (ano)</i>	<i>Catalisador</i>	<i>Substrato</i>	<i>Conversão</i>	<i>Tempo</i>
Mootabadi <i>et al.</i> (2010)	H ₂ SO ₄	Ácido graxo destilado de palma e metanol	98%	720 min
Hingu <i>et al.</i> (2010)	KOH	Óleo de cozinha e metanol	99%	0,93 min
Chand <i>et al.</i> (2010)	KOH	Óleo de cozinha e metanol	89%	40min
Santos <i>et al.</i> (2009)	KOH	Óleo de cozinha e metanol	98%	30min
Huang <i>et al.</i> (2010)	H ₂ SO ₄	Ácido graxo e metanol	95%	90min
Santi <i>et al.</i> (2014)	<i>C.antarctica</i> B (CAL-B) IM	Ácido graxo de soja comercial e etanol	81%	180min

Fonte: Zenevicz (2015)

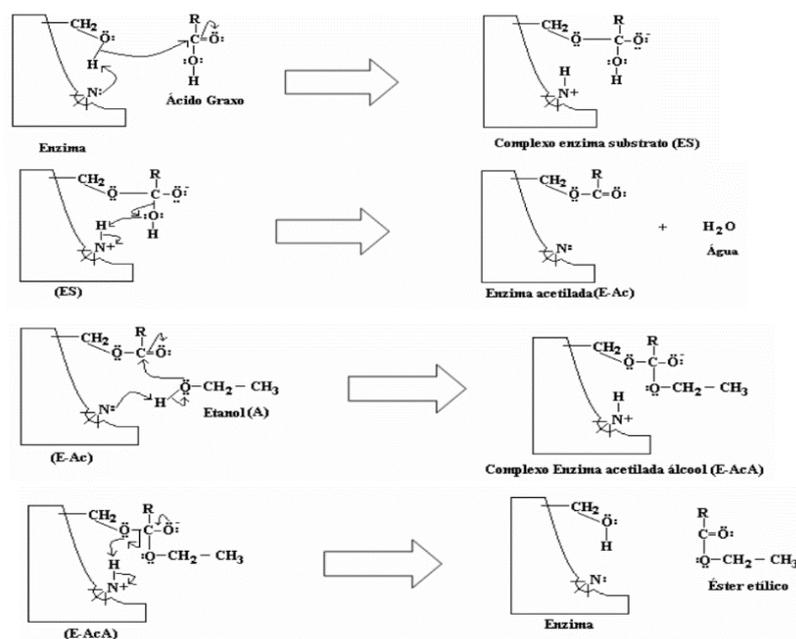
A esterificação pode ser realizada utilizando os álcoois metanol ou etanol. Na Tabela 1 são apresentadas as vantagens e desvantagens entre ambos, dentre as quais destacam-se para o etanol a autossuficiência e baixa toxicidade. O metanol ainda é o álcool mais utilizado devido a seu baixo custo e por reagir mais rapidamente com o óleo vegetal do que os outros álcoois. (ZENEVICZ, 2015). A seguir a tab.3 apresenta as vantagens e desvantagens da utilização do Etanol em reações de esterificação e a fig. 3 apresenta o mecanismo dessa reação.

Tabela 3-Vantagens da utilização do etanol em reações de esterificação.

CARACTERÍSTICAS	ETANOL	METANOL
Despesas com importação	Não	Sim
Impacto na cadeia produtiva	Grande	Pequeno
Geração de emprego no país	Muitos	Poucos
Tecnologia de Transesterificação dominada	Sim	Sim
Compatibilidade com materiais	Maior	Menor
Toxicidade	Moderada	Elevada
Impacto em caso de acidente	Baixo	Alto
Renovável	Sim	Não
Viabilidade Econômica comparativa	Equivalente	Equivalente

Fonte: Zenevicz (2015) adaptado de Jaeger *et al.* (1999)

Figura 3-Mecanismo de esterificação enzimática com Etanol.



Fonte: Costa Filho (2008)

Pelo fato de dispensar catalisadores homogêneos ou ácidos e bases de lavagem, a hidroesterificação, possui um custo operacional de US\$ 35/ton na produção de biodiesel enquanto que uma planta de transesterificação possui o dobro do custo operacional. Numa planta de 100.000 ton/ano, isso representa um gasto a mais de US\$ 3,5 milhões/ano (ZENEVICZ, 2015). Diante desses levantamentos econômicos, o processo de hidroesterificação pode ser tão atrativo, ou mais, que o processo de transesterificação alcalino para a produção de biodiesel.

3.4. Subprodutos do processo de Hidroesterificação

De acordo com Encarnação (2008), os principais subprodutos gerados no processo de transesterificação, são a glicerina e a oleína. A glicerina representa cerca de 11% e a oleína 1% a 2% do total de biodiesel produzido. Já a hidroesterificação tem como subprodutos água e glicerina. A obtenção de uma glicerina mais limpa é uma das principais vantagens da hidroesterificação (RAMOS *et. al.*, 2011). Na primeira etapa do processo que corresponde a hidrólise ácida, é gerada uma percentagem de glicerina de qualidade associada ao triglicerídeo que a gerou, equivalente a 10,5% da massa de triglicerídeos constituintes do óleo utilizado no início do processo (ENCARNAÇÃO, 2008).

A hidrólise ácida favorece a conversão dos triacilglicerídeos em ácidos graxos livres, permitindo que estes sejam utilizados na produção de ésteres. A esterificação de ácidos graxos corresponde a segunda etapa do processo de hidroesterificação, podendo gerar conversões próximas a 99%. A água gerada como subproduto, pode ser reutilizada na etapa de hidrólise finalizando o ciclo (ARCEO, 2012).

A hidroesterificação apresenta uma série de vantagens, quando comparada a rota tradicional de produção de biodiesel, transesterificação, as quais asseguram um processo químico com menor custo e com eliminação de etapas de purificação (TEIXEIRA, 2011). A tabela 4 apresenta um comparativo técnico entre os processos de hidroesterificação e transesterificação.

Tabela 4-Comparativo entre o processo de Hidroesterificação e Transesterificação

HIDROESTERIFICAÇÃO	TRANSESTERIFICAÇÃO
Uso de qualquer tipo de matéria prima graxa, com qualquer acidez e umidade (custo mais baixo)	Uso de matérias primas somente refinada, com acidez (0,1 mg NaOH/g, máx.) e umidade (0,1 % v/v, máx.) (Custo mais alto)
Permite transformar borras de neutralização como matéria prima (proveniente de outros processos)	Transforma borras de neutralização em matéria prima
Utiliza catalisador heterogêneo (o catalisador é totalmente recuperado)	Utiliza catalisador homogêneo (o catalisador não é recuperado)
Maior velocidade de reação, capacidade produtiva maior	Menor velocidade de reação, capacidade produtiva menor
Utiliza pequena quantidade, em excesso, de reagente (álcool)	Utiliza grandes quantidades, em excesso, de reagente (álcool)
Na esterificação apenas água é gerada como subproduto, sendo ainda totalmente reaproveitada	Gera sabões, o que afeta o rendimento da produção e dificulta a separação biodiesel/glicerina
Maior pureza do biodiesel obtido, sem a necessidade de lavagem, requerendo apenas secagem	O biodiesel contém contaminantes (sabões) e requer sua purificação (etapa de lavagem com centrifuga)
Alta pureza da glicerina obtida, com baixo custo de purificação. Glicerina considerada de grau alimentício	Glicerina contém contaminantes (sabão, sal, álcool, resíduos graxos) difíceis de separar, com alto custo de processo (não pode ser considerada grau alimentício).
A glicerina obtida pode ser adicionada in natura em farelos ou rações.	A glicerina obtida no processo não pode ser adicionada em farelos ou rações (contaminação com metanol).
Custo operacional 50% menor, permitindo retorno do capital em tempo menor, e justificando o investimento inicial maior	Alto custo de produção
Não requer tratamento de efluentes, pois não tem resíduos líquidos e sólidos.	Requer tratamento de efluentes
Poucos equipamentos (baixo índice de manutenção)	Muitos equipamentos (requer manutenção especializada)
Grande simplicidade de operação (poucos operadores)	Requer grande quantidade de operadores
Facilidade para ampliação da capacidade da unidade produtiva	Pouca disponibilidade para ampliação da capacidade produtiva

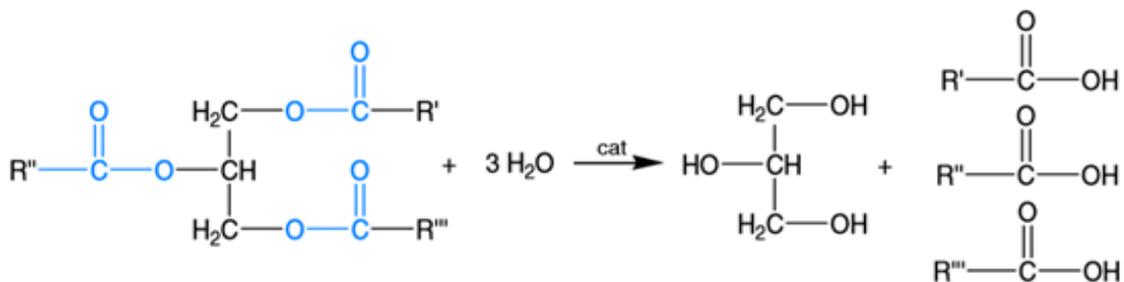
Fonte: Teixeira (2011)

3.5. Óleos e Gorduras: Conceitos

Os óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água) que pertencem à classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. O que difere óleos e gorduras é exclusivamente sua aparência física (RAMOS, 2016). São constituídas por uma mistura de diversos compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos graxos e seus derivados, tais como mono-, di- ou tri-acilglicerídeos e fosfatídios (OLIVEIRA, 2017). O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 20 °C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo de tal temperatura. (RAMOS, 2016)

No início do século XIX, o químico e físico francês Eugène Chevreul realizou as primeiras pesquisas acerca da constituição de óleos e gorduras descobrindo que a hidrólise de óleos e gorduras dava origem a ácidos graxos (GARCIA, 2006). A figura 4 apresenta a reação de hidrólise

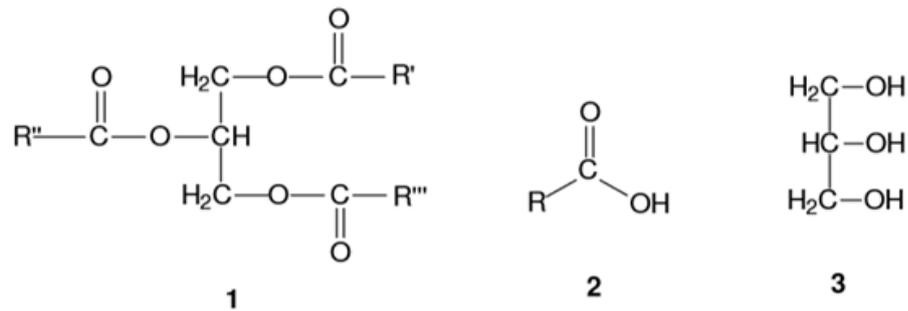
Figura 4-Reação de hidrólise



Fonte: Garcia (2006)

Ainda de acordo com Garcia (2006), a partir das descobertas de Chevreul, as gorduras e os óleos passaram a ser chamados de ésteres de glicerol (glicerídeos, diacilglicerídeos ou triglicerídeos). Concluiu-se que o triglicerídeo é um éster formado a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácidos graxos) e glicerol. A figura 5 mostra a representação estrutural do triglicerídeo e seus constituintes.

Figura 5-Representação estrutural de: triglicerídeo (1), ácido graxo (2) e glicerol (3).



Fonte: Garcia (2006)

Os ácidos graxos são ácidos orgânicos lineares, que diferenciam pelo número de carbonos que os constituem e também pela presença de insaturações. Existem diversos ácidos graxos conhecidos que são listados na tab. 2 para alguns óleos e gorduras.

Os glicerídeos são ésteres formados pela condensação de ácidos graxos e do tri-álcool conhecido popularmente por glicerina ou glicerol (propanotriol). Esses compostos são chamados de mono-, di- ou tri-acilglicerídios, dependendo se uma, duas ou três moléculas de ácido graxo se associam à glicerina, respectivamente (MORETTO & FETT, 1989).

Devido à enorme variedade de ácidos graxos, fica evidente que os óleos e gorduras são compostos de muitos tipos de triglicerídeos com diferentes graus de insaturação. A tab. 2 traz a distribuição de ácidos graxos de alguns óleos e gorduras.

Tabela 5-Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras

Óleo ou Gordura	COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRÁXOS (% EM MASSA)							Outros ácidos graxos (%)
	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:02	18:03	
Babaçu	44 - 45	15 - 16,5	5,8 - 8,5	2,5 - 5,5	12 - 16	1,4 - 2,8	-	8:0 (4,1 - 4,8); 10:0 (6,6 - 7,8)
Mamona	-	-	0,8 - 1,1	0,7- 1,0	2,0 - 3,3	4,1 - 4,7	0,5 - 0,7	18:1 - OH* (89); 20:1 (0,5), 18:0 - 2OH** (0,6 - 1,1)
Coco	44 - 51	13 - 18,5	7,5 - 11	1 - 3	5 - 8,2	1,0 - 2,6	-	8:0 (7,8 - 9,5); 10:0 (4,5 - 9,7)
Milho	-	-	7	3	43	39	-	-
Algodão	-	1,5	22	5	19	50	-	-
Linhaça	-	-	6	4	13 - 37	5 - 23	26 - 58	-
Oliva	-	1,3	7 - 16	1,4 - 3,3	64 - 84	4 - 15	-	-
Dênde	-	0,6 - 2,4	32 - 45	4,0 - 6,3	38 - 53	6 - 12	-	8:0 (2,7 - 4,3); 10:0 (3 - 7)
Amendoim	-	0,5	6 - 11,4	3 - 6	42,3 - 61	13 - 33,5	-	20:0 (1,5); 22:0 (3 - 3,5)
Colza	-	1,5	1 - 4,7	1,0 - 3,5	13 - 38	9,5 - 22	1 - 10	22,1 (40 - 60)
Soja	-	-	2,3 - 11	2,4 - 6	23,5 - 31	49 - 51,5	2 - 10,5	-
Girassol	-	-	3,6 - 6,5	1,3 - 3	14 - 43	44 - 68	-	-
Sebo	-	3 - 6	25 - 37	14 - 29	26 - 50	1 - 2,5	-	-

*Ácido Ricinoleico

** Ácido Dihidroxiesteárico

Fonte: Garcia (2006)

3.6. Composição em Ácidos Graxos de óleos e gorduras

Óleos e gorduras de origem animal, vegetal e/ou microbiana, são substâncias hidrofóbicas, formadas predominantemente de produtos de condensação entre glicerol e ácidos graxos chamados triglicerídeos (MORETTO e FETT, 1998).

Um aspecto particularmente importante dos triglicerídeos refere-se a sua origem renovável uma vez que são provenientes de plantas oleaginosas, peixe, etc. Na molécula de triglicerídeo, a porção que corresponde a porcentagem de ácidos graxos chega a 90% de seu peso e a glicerina representa os 10% restantes. Os ácidos graxos podem ser insaturados e saturados. Possuem uma cadeia linear formada por átomos de carbono ligadas diretamente entre si, em um número que varia de 6 a 22 átomos sendo particularmente importante os ácidos graxos

com 10 a 18 átomos que diferem um do outro pelo comprimento da cadeia do hidrocarboneto e pelo número e posição das duplas ligações. (RIBEIRO, 2010). As tabelas 6 e 7 apresentam os ácidos graxos saturados e insaturados, respectivamente, presentes em óleos e gorduras.

Tabela 6-Ácidos Graxos saturados presentes em óleos e gorduras

REPRESENTAÇÃO	FÓRMULA	NOME SISTEMÁTICO	NOME TRIVIAL
C4:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	Butanóico	Butírico
C6:0	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -COOH	Hexanóico	Capróico
C8:0	CH ₃ -(CH ₂) ₆ -COOH	Octanóico	Caprílico
C10:0	CH ₃ -(CH ₂) ₈ -COOH	Decanóico	Cáprico
C12:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -COOH	Dodecanóico	Láurico
C14:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ COOH	Tetradecanóico	Mirístico
C16:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COOH	Hexadecanóico	Palmítico
C18:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH	Octadecanóico	Estearico
C20:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₈ -COOH	Eicosanóico	Araquídico
C22:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -COOH	Docosanóico	Behênico
C:24:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -COOH	Tetracosanóico	Lignocérico

Fonte: Ribeiro (2010)

Tabela 7-Ácidos Graxos insaturados presentes nos óleos e gorduras

REPRESENTAÇÃO	NOME SISTEMÁTICO	NOME TRIVIAL
C 16:1(9)	9 - Hexadecanóico	Palmitoléico
C 18:1(9)	9 - Octadecanóico	Oléico
C 18:1(11)	11 - Octadecanóico	Vacênico
C 18:2(9,12)	9,12 - Octadecanóico	Linoléico
C 18:3(9,12,15)	9,12,15 - Octadecanóico	Linolênico
C 20:4(5,8,11,14)	5,8,11,14 - Eicosatetraenóico	Araquidônico

Fonte: Ribeiro (2010)

As ligações duplas dos ácidos insaturados estão localizadas na cadeia de forma não conjugada (sistema 1,4-diênico), frequentemente separada por grupos metilênicos (-CH₂-). No entanto, tanto as insaturações quanto o comprimento da cadeia carbônica afetam diretamente a viscosidade dos óleos. A viscosidade dos óleos, portanto, aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos graxos dos triglicerídeos e diminui quando aumenta a insaturação destes (RIBEIRO, 2010).

3.7. Matérias-primas para produção de biodiesel

A crescente preocupação em relação ao meio ambiente e a rápida diminuição das reservas de combustíveis fósseis no mundo, além do aumento do preço do petróleo, levaram à exploração de óleos vegetais na produção de combustíveis alternativos. A tabela 8 apresenta algumas fontes de matérias primas utilizadas na produção de biodiesel

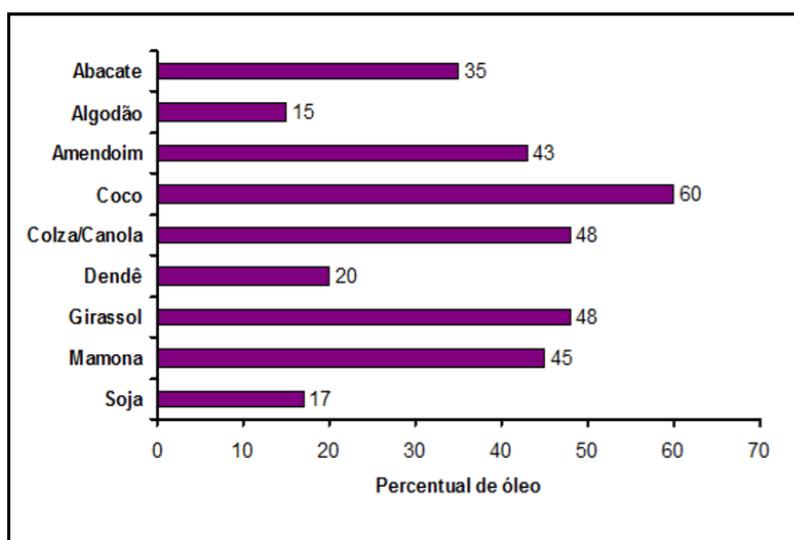
Tabela 8-Identificação das matérias primas para produção de biodiesel.

GRUPO	ORIGENS	OBTENÇÃO
Óleos e Gorduras animais	Matadouros, frigoríficos, curtumes	Extração com água e vapor
Óleos e Gorduras vegetais	Agricultoras temporárias e permanentes	Extração mecânica, com solventes e extração mista
Óleos e residuais de fritura	Cocções comerciais e industriais	Acumulação e coletas

Fonte: Salvador (2009)

Diante de sua grande diversidade de oleaginosas, o Brasil tem um futuro promissor na utilização de óleos vegetais uma vez que é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras sementes. Entre as várias oleaginosas que se tem conhecimento na literatura, as que apresentam um alto teor de óleo na semente são favoráveis à produção de biodiesel. Dentre estas, pode-se destacar as sementes oleaginosas de soja, amendoim, coco, girassol, milho, canola (colza), mamona e algodão. (RIBEIRO, 2010). A fig. 6 apresenta o percentual de óleo de algumas oleaginosas.

Figura 6-Percentual de óleo de algumas oleaginosas.



Fonte: Vargas *et al.* (1998)

3.8. Óleo de coco

Originário do Sudoeste asiático, o coqueiro (*Cocos Nucifera L.*) foi introduzido no Brasil em 1553, adaptando-se e distribuindo-se atualmente por longas áreas da costa nordestina, sendo abundante fonte de matéria-prima tanto para as agroindústrias regionais quanto para o consumo humano (FERREIRA, 1994; SOBRAL, 1976; ARAÚJO, 2008).

De acordo com Mazzani (1963) “o conteúdo de óleo na polpa é superior a 60%, o que equivale a uma produção de 500 a 3000 Kg de óleo/ha”. O endosperma do fruto do coqueiro é a principal fonte mundial de ácido láurico, usado na indústria de alimentos, cosméticos, sabões e na fabricação de álcool (BALACHNADRAN *et al.*, 1985; ARAÚJO, 2008).

Figura 7-*Cocos Nucifera L.*



Fonte: *Google* Imagens

O óleo de coco, obtido a partir da polpa do coco fresco maduro (*Cocos nucifera L.*) é composto por ácidos graxos saturados (mais de 80%) e ácidos graxos insaturados. Estão presentes na constituição do óleo de coco os seguintes ácidos graxos saturados: capróico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico e os insaturados são: oléico e linoléico. O óleo de coco é rico em ácido láurico, com concentração acima de 40%. As gorduras láuricas, caso do óleo de coco, são resistentes a oxidação não enzimática e ao contrário de outros óleos e gorduras apresentam temperatura de fusão baixa e bem definida (24,4 - 25,6 °C) (GOMES, 2009). A tab.9 apresenta a composição em ácidos graxos obtidas por Costa Filho (2008).

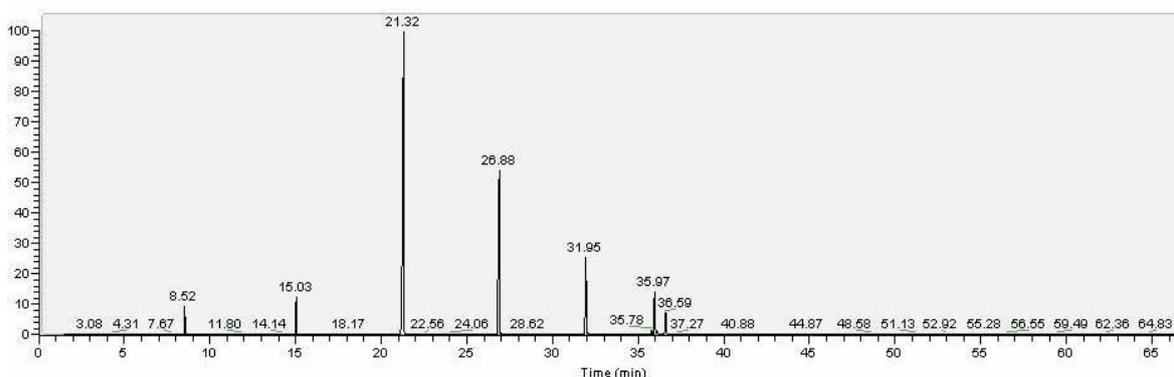
Tabela 9-Percentuais de ácidos graxos para o óleo de coco residual.

ÁCIDO GRAXO	REPRESENTAÇÃO	COMPOSIÇÃO (%)
Ácido caprílico	(C8:0)	2,640
Ácido cáprico	(C10:0)	3,740
Ácido láurico	(C12:0)	51,62
Ácido mirístico	(C14:0)	22,40
Ácido palmítico	(C16:0)	10,04
Ácido linoleico	(C18:2)	0,510
Ácido oléico cis	(C18:1)	0,650
Ácido oléico trans	(C18:1)	5,500
Ácido esteárico	(C18:0)	2,870

Fonte: Costa Filho (2008)

Com base na composição química, Costa Filho (2008) pode determinar que a massa molar média desse óleo é 217,60 g/mol. Atribui-se este valor de massa molar, ao elevado índice de acidez que o óleo de coco residual possui uma vez que é constituído majoritariamente por ácidos graxos livres e não por triglicerídeos.

A fig. 8 corresponde ao cromatograma obtido por Costa Filho (2008) do óleo de coco residual com os picos mais representativos e os seus respectivos tempos de retenção. De acordo com os dados numéricos, neste gráfico o pico mais intenso, cujo tempo de retenção é 21,32 minutos, refere-se ao ácido láurico (ácido dodecanóico), presente em maior quantidade na amostra de óleo de coco residual analisada.

Figura 8-Cromatograma do óleo de coco residual

Fonte: Costa Filho (2008)

3.9. Produção de biodiesel por catálise enzimática

A partir da década de 1990, surgiram os primeiros processos de catálise enzimática para síntese do biodiesel, como uma resposta aos aspectos de desvantagem da catálise alcalina homogênea, processo mais utilizado na produção industrial, principalmente pela perspectiva de utilização de materiais de partida com altos teores de água e de ácidos graxos livres e o apelo ambiental decorrente da utilização de processos mais brandos. (RAMOS *et al.*, 2016).

A síntese de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores vem atraindo o interesse de pesquisadores e produtores de biodiesel, por ser uma abordagem verde para a produção de um combustível renovável por meio de um catalisador biológico. A produção de biodiesel por esterificação direta de ácidos graxos e álcoois (metanol ou etanol) catalisada pela lipase é uma alternativa interessante para diminuir os custos operacionais associados ao processo convencional (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; JÚNIOR *et al.*, 2003). A catálise enzimática mostra elevado grau de pureza dos produtos, maior flexibilidade na matéria-prima, menor geração de efluentes e exige condições de reação brandas (REMONATTO, 2017). Entretanto, o custo de produção desse catalisador é significativamente maior do que um catalisador químico (FELIZARDO *et al.*, 2006). A atb.10 mostra uma comparação entre a catálise química a catálise enzimática.

Tabela 10-Comparativo entre catálise química e catálise enzimática

CARACTERÍSTICAS ANALISADAS	CATÁLISE QUÍMICA	CATÁLISE ENZIMÁTICA
Temperatura de reação (°C)	60 - 70	30 - 40
Ácidos graxos livres no óleo não refinado	Produtos saponificados	Ésteres
Água na matéria-prima	Interferência na reação	Interferência na reação
Rendimento em ésteres alquílicos	Alto	Alto
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres	Lavagens consecutivas	Nenhuma
Reutilização do catalisador	Nenhuma (quando catálise homogênea)	Fácil (quando imobilizado)

Fonte: Costa Filho (2008)

Dalla-Vecchia *et al.*, (2004) elaborou uma tabela com vantagens e desvantagens entre as duas formas de produção que podem ser verificadas na tab.11.

Tabela 11-Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel.

PROCESSOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Químico	Simplicidade Alto rendimento Curto tempo de reação	Dificuldade de separação do catalizador Impossibilidade de reutilização do catalisador Dificuldade de utilização do etanol hidratado Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador (suporte) Obtenção de produtos com maior grau de pureza Possibilidade de utilizar etanol hidratado na reação	Longo tempo de reação Custo das enzimas Baixo rendimento

Fonte: Dalla-Vecchia *et al.*, (2004)

As lipases, classificadas como triacilglicerídeo hidrolases (EC 3.1.1.3), catalisam reações de síntese de ésteres em meios com baixo teor de umidade, como em solventes orgânicos, por serem relativamente estáveis e ativas em meios nessas condições, características não comuns na maioria das outras classes de enzimas. A principal vantagem da síntese enzimática de biodiesel é que o material de partida não precisa ser livre de umidade ou de ácidos graxos livres pois as lipases podem catalisar reações de esterificação e de transesterificação, em presença de água, em um mesmo processo de síntese. Além disso, pelo fato da não ocorrência de reações paralelas de saponificação, a purificação do biodiesel é facilitada e o glicerol gerado como coproduto da reação de transesterificação pode ser recuperado com maior índice de pureza. (CHRISTOPHER, 2014; RAMOS, 2016).

As enzimas demonstram ser biocatalisadores promissores em muitas reações orgânicas. Características como elevada atividade, especificidade e seletividade, são vantajosas em sua aplicabilidade, podendo catalisar sob condições mais brandas e ecologicamente mais favoráveis. A enzima pode ser utilizada na sua forma solúvel ou imobilizada, no entanto, a primeira é limitada em processos de larga escala, em razão do seu alto custo e produção e da estabilidade (SILVA, 2013).

Enzimas solúveis podem inativar devido ao efeito do solvente ou em razão dos choques mecânicos (MENDES *et al.*, 2013; SILVA, 2013). Portanto, estudos têm sido propostos para estabilizar a atividade enzimática e aumentar sua estabilidade operacional (MENDES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013). É neste contexto que a técnica de imobilização de enzimas apresenta-se como uma estratégia promissora, uma vez que possibilita o aprimoramento das propriedades da enzima, tais como: a estabilidade operacional, seletividade, especificidade e a redução da inibição pelo meio ou produto (MATEO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013).

3.10. Lipases

Lipases são enzimas hidrolíticas presentes em animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, possuem a função de catalisar a hidrólise de triglicerídeos aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (HOSHINO *et al.*, 1990). São catalisadores naturais que aceleram a velocidade das reações, apresentando grande versatilidade na catálise de diversas reações que ocorrem sob condições brandas, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo da neutralidade. As velocidades de algumas reações podem alcançar valores 10^{12} vezes maiores do que as não catalisadas (VOET; VOET, 1995; SOUZA, 2013).

As enzimas obtidas a partir de microrganismos possuem maior estabilidade térmica frente às extraídas de animais e vegetais, sendo também facilmente separadas por filtração ou centrifugação, constituindo um dos grupos de enzimas de maior adesão pela indústria nos últimos anos. Os microrganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* e leveduras do gênero *Candida* (HASAN *et al.*, 2006; ZENEVICZ, 2015).

Diante da significativa resistência que apresentam à elevadas concentrações de AGL, são aliadas na redução significativa do custo com matéria-prima a ser processada, uma vez que possibilitam a utilização de material graxo com baixo refino e, portanto, elevada acidez. São inúmeras as aplicações destas enzimas, incluindo refino ou reestruturação de óleo e gorduras, hidrólise de óleos, esterificação e incorporação de outros compostos em moléculas lipídicas (KHAN & ALZOHAIY, 2010).

Em relação aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas apresentam vantagens que destacam a viabilidade de seu uso em aplicações industriais, uma dessas vantagens é a

formação de produtos considerados "verdes" devido a alta especificidade das enzimas, evitando a formação de produtos indesejáveis e ambientalmente danosos. As condições brandas de reação nas quais podem ser executados os processos enzimáticos, também favorecem sua demanda industrial como catalisador (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SOUZA, 2013)

O uso de lipases proporciona a redução da unidade de processamento de biodiesel, tornando o processo mais simples uma vez que minimiza a necessidade de etapas no tratamento para a purificação de biodiesel e também para sub/coprodutos gerados, resultando em um processo ambiental compatível (GOG *et al.*, 2012). As lipases possuem grande capacidade catalítica e a vantagem de sua utilização frente a rota convencional é a possibilidade de uso de matérias-primas oleosas com índice de acidez elevado (GULDHE *et al.*, 2015). A seguir uma descrição das principais características da lipase de *Candida antarctica* Novozym® 435.

- **Novozym 435 (*Candida antarctica*):** Produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esférico, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVOZYMES *apud* ZENEVICZ, 2015).

3.11. Imobilização de enzimas

De acordo com Remonato (2017):As enzimas podem ser empregadas de formas distintas em variados processos, livres, ou seja, em sua forma solúvel, ou também em sua forma imobilizada, aderida a diferentes matrizes. Para Soumanou (2013), a imobilização enzimática consiste em anexar enzimas a materiais de suporte apropriados por inclusão, adsorção ou ligação covalente. Em ambas as formas, os biocatalisadores apresentam muitas vantagens, assim como muitas restrições. Para a sua aplicação deve-se levar em conta a especificidade do processo ao qual está sendo destinada, o design dos reatores, as características das matérias-primas e os produtos de interesse a serem formados.

O processo de imobilização visa estabilizar as lipases e reduzir seu custo por uso, a fim de tornar os processos enzimáticos industrialmente viáveis. As lipases imobilizadas são facilmente separadas do meio de reação através de processos físicos, como filtração, e podem, portanto, ser reutilizadas. A imobilização também facilita o desenvolvimento de processos contínuos, que geralmente são realizados em reatores simples de tanque agitado ou em reatores de leito empacotado (SAUMANOU, 2013).

A tabela 12 apresenta as principais características das enzimas na forma livre e imobilizada

Tabela 12-Características da enzima livre e da enzima imobilizada.

CARACTERÍSTICAS	
ENZIMA LIVRE	ENZIMA IMOBILIZADA
Dificuldade de recuperação e Reutilização	Fácil separação substrato /produto e capacidade de reuso
Alto custo, baixa eficiência e insolúvel em meio não aquoso	Alta eficiência
Atividade instável, influenciada pela temperatura e pH	Atividade estável em uma ampla faixa de temperatura e pH

Fonte: Silva (2013)

A imobilização de enzimas é uma prática extremamente vantajosa quanto se trata da utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacam-se

- A utilização de pequenos volumes de amostra;
- Aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica;
- Reutilização;
- Pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações;
- Fácil separação da enzima dos produtos da reação (ZHANG *et al.*, 1998; GIRELLI *et al.*, 2007; RIBEIRO, 2010).

A utilização de enzimas imobilizadas possibilita o reuso desse biocatalisador sucessivas vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido.

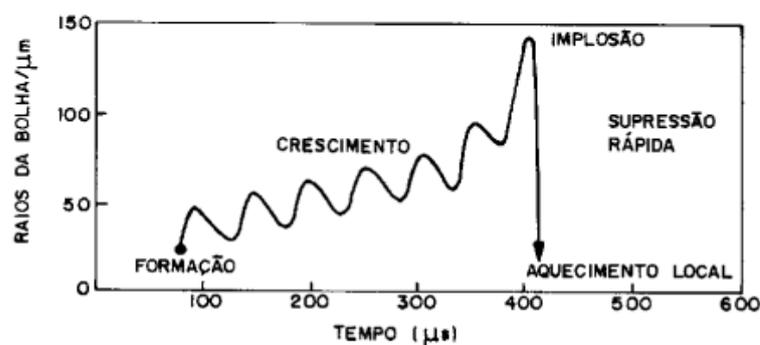
3.12. Ultrassom

O ultrassom é definido como um som de frequências acima do limiar para a audição humana, tipicamente acima de 20 kHz. Sons desse tipo são gerados por transdutores ultrassônicos que podem apresentar-se na forma de sonda ou placa. A submissão de um fluido a este tipo de som resulta em um fenômeno denominado sonicação – definido como o uso de energia acústica para produzir mudanças físicas e/ou químicas. Os transdutores amplificam a vibração mecânica causando o fenômeno da cavitação (GOPINATH, 2006 *apud* MERCANTILI, DAVIS, HIGSON, 2014). Os efeitos do ultrassom são a consequência do fenômeno da cavitação que denomina a formação, crescimento e colapso de microbolhas gasosas em fase líquida. (İNCE, TEZCANLI, *et al.*, 2001).

A origem da cavitação se deve ao fato que, durante a expansão, os gases adsorvidos no líquido ao redor da cavidade ou na interface, evaporam-se resultando na expansão da cavidade. Durante a etapa de compressão, estes gases ou vapores não retornam completamente ao líquido, resultando num aumento efetivo da cavidade. Ciclos periódicos de compressão e expansão causam aumento do tamanho da cavidade. A cavidade ao atingir um tamanho crítico implode-se, liberando grande quantidade de calor e pressão num curto período de tempo e em pontos localizados do líquido. (MARTINES, DAVOLOS & JAFELICCI, 2000)

Os efeitos do ultrassom são divididos em químicos e mecânicos; as altas temperaturas são responsáveis por efeitos químicos como formação de radicais, enquanto que os gradientes de cisalhamento fortes induzem efeitos mecânicos (KEE, GAUTHIER, 2007).

Figura 9-Crescimento de bolha e implosão num líquido irradiado com ultrassom.



Fonte: Martines (1999)

A frequência e a potência do campo ultrassônico influenciam no comportamento da cavitação alterando a velocidade de interação entre as microbolhas do fluido submetido à

sonicação e conseqüentemente a eficiência das reações que porventura venham se utilizar dessa tecnologia em sua metodologia de obtenção.

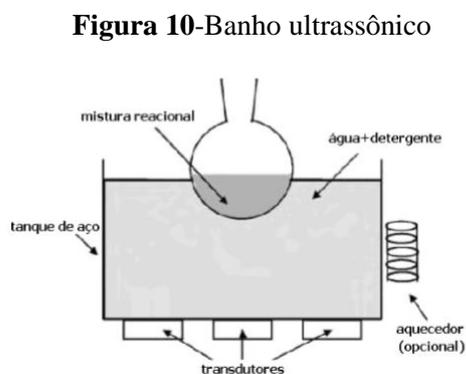
Segundo Martines (1999), o ultrassom de alta potência (baixa frequência) normalmente leva a um crescimento mais rápido das micro-bolhas que depois colapsam com uma liberação local de altas temperaturas e pressões - um fenômeno conhecido como cavitação transitória; enquanto o ultrassom de baixa potência (alta frequência) leva a ciclos de oscilação das microbolhas, gerando assim micro-correntes no fluido (micro-fluxo) - isso é conhecido como cavitação estável.

A tab. 13 apresenta algumas vantagens e desvantagens entre as tecnologias de ultrassom mais utilizadas, sendo estas o banho ultrassônico (fig.10) e a ponteira ultrassônica (fig.11).

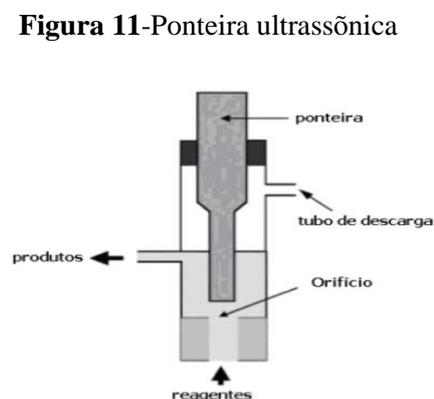
Tabela 13-Vantagens e Desvantagens entre Banho ultrassônico e Ponteira ultrassônica

	BANHO ULTRASSÔNICO	PONTEIRA ULTRASSÔNICA
VANTAGENS	Equipamento ultrassônico mais amplamente disponível;	A ponteira pode suportar altas intensidades de ultrassom (10-1000 W/cm ²);
	Boa distribuição de energia através das paredes do vaso de reação;	A intensidade pode ser controlada.
	Não necessita de uma adaptação especial para reação;	Frequência fixa;
	Permite fazer <i>scale-up</i> facilmente.	Dificuldade no controle da temperatura;
DESVANTAGENS	Intensidade reduzida, se comparado à ponteira ultrassônica;	Pode ocorrer erosão, conduzindo à contaminação por partículas metálicas;
	Frequência fixa;	Não permite <i>scale-up</i> .
	A posição do vaso de reação em banhos afeta a intensidade de sonicação.	

Fonte: Lima (2010)



Fonte: Lima (2010)



Fonte: Lima (2010)

3.13. Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma técnica que atualmente vem sendo usada em grande escala. Através dele, pesquisadores podem determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultado:

- Redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos;
- Redução de tempo do processo;
- Redução de custo operacional;
- Melhoria no rendimento do processo;

Algumas aplicações típicas do planejamento de experimentos são:

- Avaliação e comparação de configurações básicas de projeto;
- Avaliação de diferentes materiais;
- Seleção de parâmetros de projeto;
- Determinação de parâmetros de projeto que melhorem o desempenho de produtos;
- Obtenção de produtos que sejam mais fáceis de fabricar que sejam projetados, desenvolvidos e produzidos em menos tempo, que tenham melhor desempenho e confiabilidade que os produzidos pelos competidores.

Os três princípios básicos de um planejamento de experimentos são replicação, aleatoriedade e blocagem.

- **Repetição (réplicas):** é o processo de repetir cada uma das combinações (linhas) da matriz experimental sob as mesmas condições de experimentação. Montgomery (1991) enfatiza o fato que a utilização de réplicas apresenta duas propriedades importantes: permite obter uma estimativa do erro experimental. Essa estimativa do erro torna-se a unidade básica de medição para se determinar se as diferenças observadas nos dados são estatisticamente diferentes. Além dessa condição, sendo a média amostral utilizada para estimar o efeito de um fator no experimento, a repetição permite a obtenção de uma estimativa mais precisa desse efeito, pois o desvio-padrão amostral (S) deve ser inversamente proporcional ao tamanho da amostra \sqrt{n} ;
- **Aleatorização:** é a suposição básica para a validação de métodos estatísticos em Planejamento Experimental, pois a utilização da distribuição Normal e suas “variações” possuem o pressuposto no qual, as observações devem ser variáveis aleatórias independentes. A aleatorização deve ser observada durante a alocação de material e equipamento para os experimentos e, que a ordem pela qual os experimentos são ensaiados devem ser aleatoriamente definidas. Através da aleatorização, pode se minimizar os efeitos de fatores não-controláveis;
- **Blocagem:** o planejamento utilizando blocos tem como objetivo eliminar o efeito de um ou mais fatores no resultado do experimento. Com isso, realiza-se o experimento em condições (blocos) mais homogêneas. Desta forma, têm-se um maior controle do experimento (efeito dentro de cada bloco), assim como as informações, uma vez que se evidencia o efeito dos blocos (efeito entre blocos).

Anteriormente, o processo de otimização era realizado através de uma abordagem clássica, modificando uma variável de cada vez enquanto se mantinha as demais constantes. Essa metodologia dura longos períodos, requer grandes conjuntos de dados experimentais e não é a mais eficiente quando se pretende mostrar a interação entre as variáveis do processo (CHOWDHURY *et al.*, 2014). Em contrapartida, as metodologias estatísticas de planejamento experimental permitem a interação das variáveis (fatores independentes) para obter a melhor resposta (fator dependente) com um número reduzido de observações (MONTEIRO, 2019).

O Planejamento Composto Central (PCC) – do inglês, *Central Composite Design* (CCD) destaca-se dentre as variedades de planejamentos experimentais estatísticos tradicionais.

Ao fazer uso de um PCC, é possível utilizar a Metodologia de Superfície de Reposta (MSR), que consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas na modelagem e análise de problemas onde a resposta de interesse sofre influência de diversas outras variáveis, tendo como objetivo a otimização dessa resposta, além de reduzir o número de experimentos suficientes para fornecer resultados estatisticamente aceitáveis (GETACHEW; CHUN, 2016).

Figura 12-Fluxograma de aplicação do PCC



Fonte: Monteiro (2019) (adaptado de Chowdhury *et al.*, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento das etapas constituintes deste trabalho, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental, englobando desde os testes preliminares até a estratégia adotada para a otimização do processo de obtenção de biodiesel enzimático através de agitação mecânica e posterior comparativo entre o desempenho desse sistema com o de banho de ultrassom.

4.1. 1ª Etapa- Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida

Para as reações de saponificação, utilizou-se óleo de coco residual, (M.M de 648 g/mol), catalisador alcalino hidróxido de potássio, (KOH) e álcool etílico (95 %, Cequímica), sendo estas executadas em banho ultrassônico (volume de 9,5 L, frequência ultrassônica de 37 kHz, potência ultrassônica total de 300 W). Logo em seguida, para realização da hidrólise ácida, utilizou-se os sais de ácidos graxos (sabão), anteriormente produzidos, H₂SO₄ (ácido sulfúrico,

Sigma) e água destilada, essas reações consistiram na 1ª Etapa. Após a conclusão da 1ª Etapa, realizou-se a verificação do índice de acidez por método titulométrico tradicional, utilizando hidróxido de sódio NaOH de normalidade 0,1 N; álcool etílico (1:1 v/v, 95 % de pureza, Cequímica) e indicador fenolftaleína 1%.

4.2. 2ª Etapa - Esterificação enzimática

Para as reações de esterificação enzimática, utilizou-se catalisador enzimático Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL- B) cedida gentilmente pela Novozymes (Madrid, Espanha) com concentração da Enzima Novozym® 435 de 2, 6 e 10 % p/p em relação A.G.L, álcool etílico (Cequímica) com R.M de 1:1, 1:3, 1:5 (A.G/etanol) e AGL do óleo de coco residual. As reações foram executadas em dois sistemas reacionais, sendo estes incubadoras com agitação mecânica (200 rpm; 650 W; 35, 40 e 55°C; 2, 6 e 8h) e banho ultrassônico (volume de 9,5 L, frequência ultrassônica de 37 kHz, potência ultrassônica total de 300 W)

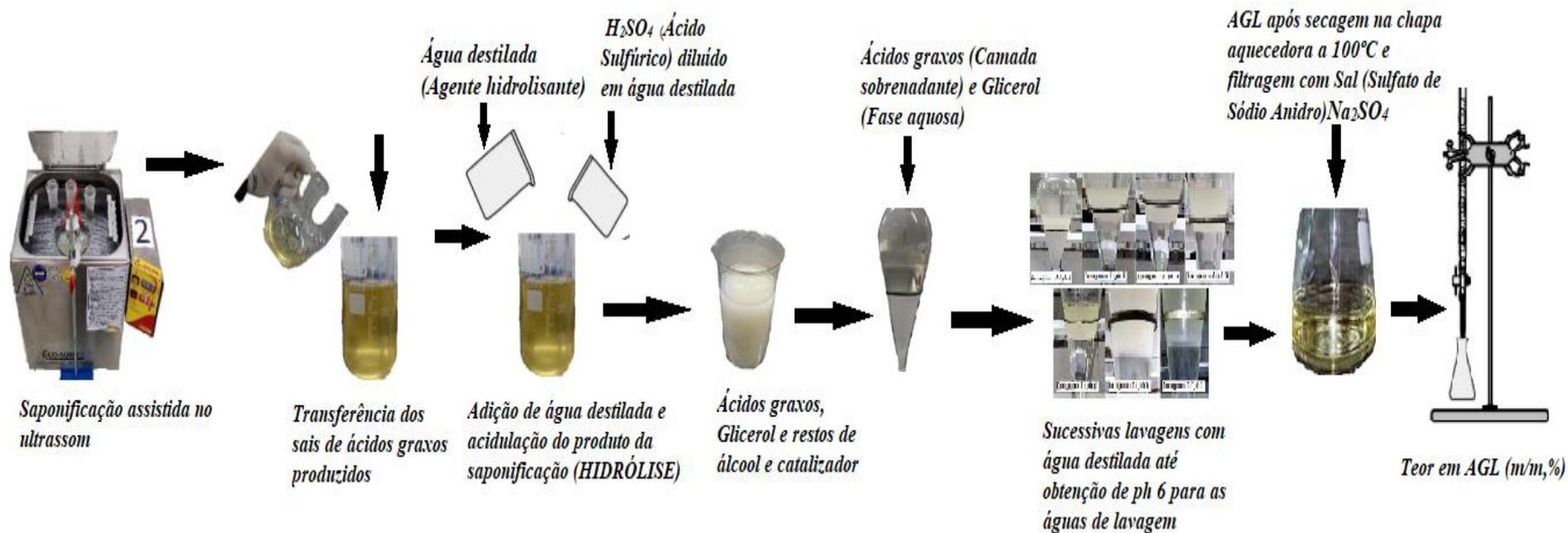
4.3. Comparativo do ponto ótimo - incubadora x ultrassom¹²

Para a realização do comparativo entre as conversões dos dois sistemas reacionais incubadora e ultrassom, utilizou-se catalisador enzimático Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL-B) com concentração da enzima Novozym® 435 de 6 % p/p em relação A.G.L, A.G.L do óleo de coco residual e álcool etílico (95 % de Pureza, Cequímica) com R.M de 1:4 (A.G/etanol).

¹ As condições experimentais (R.M (1:4), Temperatura 55°C, Concentração de [E] e Tempo de 6 horas) para o comparativo do ponto ótimo foram estabelecidas por redes neurais no software Statistica® 10 Statsoft Inc.

² Ambos os sistemas reacionais incubadora e banho ultrassônico foram parametrizados na temperatura de 55°C e Tempo reacional de 6 e 8 h.

Figura 13-Esquema do procedimento experimental da 1ª Etapa - Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida



Fonte: Elaborado pelo autor

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. 1ª Etapa: Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida

5.1.1. Descrição do aparato experimental

5.1.1.1. Configuração do Equipamento de Ultrassom

Utilizou-se para a realização dos experimentos desta etapa um banho ultrassônico (Unique Inc., modelo USC 2800A, Brasil). O equipamento apresenta o volume de 9,5 L com as seguintes dimensões: 300 × 240 × 150 mm (comprimento × largura × altura). Dois transdutores de disco foram colocados no fundo do reator. A frequência ultrassônica foi de 37 kHz e a potência ultrassônica total de 300 W. O equipamento ainda possui controle de temperatura e tempo.

5.1.2. Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom seguida de hidrólise ácida

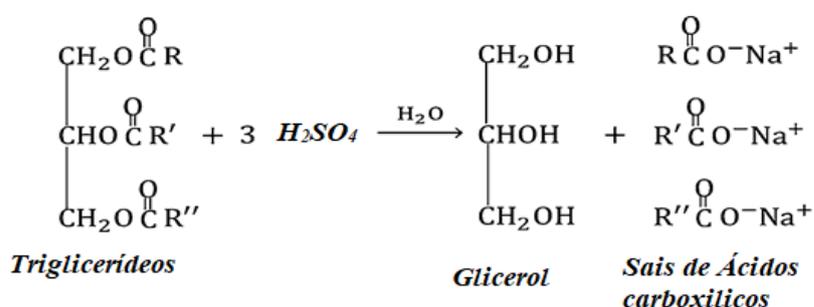
O procedimento experimental utilizado no processo de produção de ácidos graxos, partiu da adaptação feita por Lima (2010) do procedimento descrito por Mano *et al.* (1987) ajustando-o para o uso de ultrassom, uma vez que este segue a rota convencional de obtenção de AGL. As reações de saponificação foram realizadas com 100 g de óleo.

No procedimento adotado, adicionou-se à amostra de óleo previamente aquecida (uma vez que o óleo de coco a temperatura ambiente tende a apresentar floculação e solidificação de seu conteúdo, sendo necessário o aquecimento para garantir sua homogeneização) uma solução alcoólica (álcool etílico) de KOH (1:5; KOH:óleo; m/m e 2:1; álcool: óleo; V/m) e agitou-se manualmente a mistura antes de submetê-la ao banho ultrassônico, no intuito de garantir a homogeneização da solução. A mesma foi transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL para então serem levados a sonicação, que durou 60 min. O banho ultrassônico já havia sido previamente parametrizado com valores de temperatura e tempo de 60°C e 60 min, respectivamente, para garantir o aquecimento da água para receber a mistura reacional.

Após o término da reação de saponificação, aguardou-se o conteúdo se resfriar naturalmente. Logo após, os sais de ácidos graxos produzidos foram transferidos para um béquer de 1000 mL. Adicionou-se então 600 mL de água (agente hidrolisante) misturando-a com cuidado, para não formar espuma. Depois de dissolvido todo o sabão, acrescentou-se uma

solução de 20 mL H₂SO₄ em 66,67 mL de água destilada, sucessivas vezes até a obtenção de pH abaixo de 4, para assim garantir a total libertação do ácido orgânico do seu sal. A mistura foi transferida para um funil de decantação e depois a camada aquosa (correspondente ao glicerol, impurezas, resto de álcool e catalisador alcalino) foi separada da massa de ácido sobrenadante, que foi então lavada sucessivas vezes com água a 80°C, aplicando agitação moderada em movimentos circulares, ao conteúdo do funil. As lavagens foram executadas até a obtenção de pH 6 para as águas de lavagem. A massa de ácido graxo obtida foi aquecida até chegar aos 110°C para ser desumidificada, no entanto, os ácidos graxos ainda apresentaram leve turbidez, indicando a presença de água, mesmo após o aquecimento. Aplicou-se ao produto da hidrólise com resíduos de água, sulfato de sódio anidro, uma vez que este forma com a água um sal decahidratado (Na₂SO₄.10H₂O) que apresentou-se em um caráter gelatinoso no fundo do béquer, facilitando a posterior filtragem que foi realizada para remoção da água retida no sal. A equação geral da reação é mostrada na fig.14 (LIMA, 2010).

Figura 14-Hidrólise ácida de triglicerídeos



Fonte: Mercantili *et al.*, (2013)

5.2. 2ª Etapa: Esterificação enzimática

5.2.1. Descrição do aparato experimental

5.2.1.1. Configuração da incubadora shaker

O equipamento utilizado nos experimentos foi uma incubadora shaker, modelo N-715 com capacidade de 34 x 25ml – 34 x 50ml – 20 x 125ml – 20 x 250ml – 10 x 500ml – 6 x 1000ml – 4 x 2000ml, motor de indução trifásico (acionado por inversor de frequência), dimensões da plataforma (LxP) de 475 x 495mm, controle digital microprocessado em LCD p/ timer, temperatura, velocidade, rampas aceleração e frenagem e programas (inversor de frequência) e potência de 1300 W.

Após a obtenção dos AGL obtidos na 1ª Etapa, realizou-se o planejamento experimental no *software Statistica*® 10 Statsoft Inc com 27 ensaios, apresentando ponto central em quadruplicata, onde foi avaliada a influência de quatro variáveis (Temperatura 25, 40 e 55°C; Razão Molar (A.G/etanol) 1:1, 1:3, 1:5; Concentração da Enzima Novozym ® 435 2, 6 e 10 % (p/p em relação aos substratos); Tempo 2, 6 e 8 h. As variáveis estudadas e os respectivos níveis são apresentados na Tab. 14 e as 27 combinações reacionais estão expostas na Tab. 15. Os resultados foram analisados usando como ferramenta o *software Statistica*® 10 Statsoft Inc., e através do gráfico de Pareto, determinaram-se as variáveis significativas e não significativas.

Tabela 14-Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental no *software Statistica*® 10 para produção enzimática de ésteres em sistema livre de solvente orgânico sob sistema de agitação mecânica.

VARIÁVEL	NOME	NÍVEL CODIFICADO		
		-1	0	1
X1	Temperatura (°C)	25	40	55
X2	Tempo reacional (hora)	2	6	8
X3	Razão molar (álcool/ácido)	1:1	1:3	1:5
X4	Concentração [E]	2	6	10

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 15 - Planejamento experimental software Statistica® 10

ENSAIO	X1	X2	X3	X4
1	25(-1)	2(-1)	1:1(-1)	2(-1)
2	25(-1)	2(-1)	1:1(-1)	10(1)
3	25(-1)	2(-1)	1:5(1)	2(-1)
4	25(-1)	2(-1)	1:5(1)	10(1)
5	55(1)	2(-1)	1:1(-1)	2(-1)
6	55(1)	2(-1)	1:1(-1)	10(1)
7	55(1)	2(-1)	1:5(1)	2(-1)
8	55(1)	2(-1)	1:5(1)	10(1)
9	25(-1)	8(1)	1:1(-1)	2(-1)
10	25(-1)	8(1)	1:1(-1)	10(1)
11	25(-1)	8(1)	1:5(1)	2(-1)
12	25(-1)	8(1)	1:5(1)	10(1)
13	55(1)	8(1)	1:1(-1)	2(-1)
14	55(1)	8(1)	1:1(-1)	10(1)
15	55(1)	8(1)	1:5(1)	2(-1)
16	55(1)	8(1)	1:5(1)	10(1)
17	40(0)	2(-1)	1:3(0)	6(0)
18	40(0)	8(1)	1:3(0)	6(0)
19	25(-1)	5(0)	1:3(0)	6(0)
20	55(1)	5(0)	1:3(0)	6(0)
21	40(0)	5(0)	1:1(-1)	6(0)
22	40(0)	5(0)	1:5(1)	6(0)
23	40(0)	5(0)	1:3(0)	2(-1)
24	40(0)	5(0)	1:3(0)	10(1)
25(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)
26(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)
27(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)
28(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)

Fonte: Elaborado pelo autor

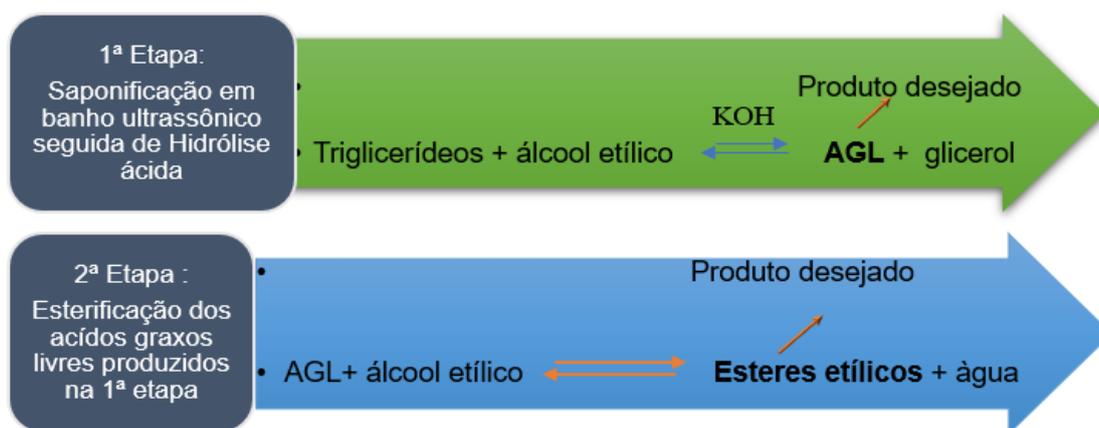
Os dados experimentais ajustados são mostrados pelo modelo proposto na Equação 1 que corresponde a equação polinomial de segunda ordem para as variáveis.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum X_{ii} X_i^2 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde Y é a variável resposta, β_0 é a constante, β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes para os efeitos linear, quadrático e para interação, respectivamente, e X_i e X_j são os níveis codificados das variáveis X_i e X_j . A equação quadrática acima foi usada para plotar superfícies para todas as variáveis.

A integração das 1ª e 2ª Etapas estabeleceu o processo de hidroesterificação que consistiu na junção da saponificação assistida no ultrassom com utilização de catalizador básico (KOH) seguida de hidrólise ácida com a esterificação enzimática dos ácidos graxos produzidos, conforme esquema apontado na Figura 15. Produziu-se o hidrolisado de AGL a partir do óleo de coco residual. Em seguida, o esterificou com álcool etílico utilizando como catalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) na sua forma imobilizada através das condições estabelecidas por planejamento experimental fatorial do tipo PCC. A seguir, esquema simplificado do processo de hidroesterificação.

Figura 15-Esquema simplificado do processo de hidroesterificação



Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.1.2. Quantificação da Acidez

O índice de acidez corresponde à quantidade em miligramas de uma base (NaOH ou KOH), necessárias para neutralizar acidez livre de um grama de amostra. As metodologias para determinação do índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres são sugeridas pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.) métodos oficiais Cd 3d-63. No presente trabalho, foi utilizada a respectiva norma com modificações, descrita por Moreto e Fett (1998), que correspondem as seguintes etapas:

- Inicialmente, neutralizou-se álcool etílico absoluto comercial (98%) titulando-o com solução de NaOH (hidróxido de sódio) de normalidade conhecida (0,1 N), utilizando um frasco *erlenmeyer* de 250 mL para executar o procedimento, onde o álcool é alocado juntamente com 3 gotas do indicador fenolftaleína para indicação do ponto de viragem;
- Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, pesou-se 2g da amostra (óleo de coco residual/ácidos graxos);
- Adicionou-se à amostra 25 mL do álcool etílico neutralizado e três gotas de solução indicadora de fenolftaleína 1%;
- Titulou-se a amostra com solução de NaOH 0,1N até o surgimento de uma coloração levemente rosa, que persistiu por pelo menos 15 segundos.

O índice de acidez foi determinado de acordo com a equação 2.

$$IA \left(mg \frac{KOH}{g} \right) = \frac{V \times f \times 56,11 \times N}{m} \quad (Equação 2)$$

Em que:

- *IA* é o índice de acidez (mgKOH/g);
- *V* é o volume gasto de solução de NaOH na titulação da amostra (mL),
- *f* é o fator de correção da solução de NaOH;
- *N* é a normalidade da solução de NaOH (mol/L);
- *m* a massa da amostra (g).

O valor do fator de correção da solução de NaOH varia de acordo com a solução utilizada. Para determinar o percentual de conversão do ácido graxo em ésteres foi necessário determinar a acidez da solução alimentada no reator. Tendo posse dos valores de índice de acidez inicial e final (após a reação) é possível determinar a conversão de ácidos graxos. A conversão foi calculada pelo acompanhamento da redução do índice de acidez de acordo com a Equação 3. Este cálculo foi possível, pois à medida que os ésteres vão sendo formados, a quantidade de ácidos graxos livres (AGL) diminui e, portanto, o índice de acidez decresce (COSTA FILHO, 2008). Para o cálculo da conversão em ésteres utilizou-se o valor do índice de acidez da amostra branco, que consiste em um ensaio sem a presença do catalizador enzimático e o índice de acidez de um ensaio sob as mesmas condições da amostra branco, mas com a presença do catalizador enzimático, possibilitando a verificação da influência do

catalizador nas conversões. O cálculo para a conversão dos ácidos graxos em esteres é apresentado na Equação 3.

$$\text{Conversão \%} = \frac{IA_b - IA_f}{IA_b} \times 100\% \quad (\text{Equação 3})$$

em que:

- IA_b = valor do índice de acidez do branco (mgKOH/g);
- IA_f = valor do índice de acidez final da reação (mgKOH/g).

Para a conversão dos triglicerídeos em AGL utilizou-se a equação 4.

$$\text{Conversão \%} = \frac{C_{AO} - C_{AT}}{C_{AO}} \times 100\% \quad (\text{Equação 4})$$

em que:

- *Conversão %* é a taxa de redução do índice de acidez na reação (%);
- C_{AO} = valor do índice de acidez do meio reacional no tempo zero (mgKOH/g);
- C_{AT} = valor do índice de acidez do meio reacional em um tempo t da reação (mgKOH/g).

5.3. Comparativo entre o ponto ótimo assistido por irradiação ultrassônica e agitação mecânica

Após a obtenção do ponto ótimo para as 27 reações delineadas no planejamento experimental no *software* Statistica® 10 Statsoft Inc., determinou-se o ponto otimizado para a execução da reação. Para a validação dessa nova configuração de parâmetros experimentais, realizou-se esterificações assistidas sob agitação mecânica e em banho ultrassônico. Para acompanhamento da conversão em ésteres, fez-se verificação de índice de acidez de amostras reacionais em intervalos de 2 em 2 horas em um período total de 8 horas, no intuito de averiguar qual dos sistemas reacionais (incubadora ou ultrassom) apresentaria conversões mais elevadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. 1ª Etapa: Saponificação assistida em banho ultrassônico seguida de hidrólise ácida

Para a verificação da conversão do óleo em ácidos graxos, realizou-se verificação do índice de acidez. A determinação do índice de acidez foi realizada através de método titulométrico, em que se neutralizou amostras de óleo de coco antes e após serem submetidas a hidrólise ácida registrando os valores de NaOH 0,1 N gastos na execução desta etapa do procedimento, para em seguida aplicá-los na (equação 2), para então se obter os valores de I.A do óleo de coco residual e dos AGL produzidos. De posse desses dados, pode-se verificar a conversão dos triglicerídeos em ácidos graxos livres, utilizando a (equação 4). Os valores gastos nas titulações da matéria-prima inicial e dos ácidos graxos produzidos estão contidos na tabela abaixo.

Os valores para IA encontrados para óleo residual e AGL foram, 1,83 e 172,34, respectivamente, sendo este último, aproximadamente 95 vezes maior que o primeiro demonstrando uma grande conversão dos TRG (Triglicerídeos) em A.G.L. diante da notória mudança de pH do conteúdo. Isto pode ser matematicamente determinada através da equação 2 que determina o valor da conversão em porcentagem.

Lima (2010) realizou planejamento experimental para a etapa de saponificação assistida em banho ultrassônico obtendo como melhores conversões 94,3% quando utilizou 0,3 KOH/óleo, 2,4 EtOH/óleo a 18 W/L e 92,3% quando utilizou-se 0,3 KOH/óleo, 2,4 EtOH/óleo a 9 W/L. No presente trabalho, não se realizou a verificação da conversão em sais de ácidos graxos no decorrer da saponificação em banho ultrassônico, porém após a reação de hidrólise, obteve-se uma conversão de 98,93% em ácidos graxos (1:5; KOH:óleo; m/m e 2:1; álcool: óleo; V/m). Diante dos dados de Lima e da conversão verificada neste trabalho pôde-se afirmar que o banho ultrassônico é bastante eficiente na execução de reações de saponificação quando comparado com a metodologia convencional de saponificação em condensador sob refluxo, uma vez que esta ocorre durante um maior tempo reacional.

6.2. 2ª Etapa: Esterificação enzimática

A quantificação das conversões dos AGL em ésteres na 2ª Etapa do trabalho foi realizada aplicando-se os valores do índice de acidez de cada ensaio e seu respectivo ensaio branco na equação 3. Os resultados obtidos estão expostos na tabela 16.

Tabela 16-Conversão em ésteres para as reações 1 a 27

Ensaio	X1	X2	X3	X4	Conversão (%)
1	25(-1)	2(-1)	1:1(-1)	2(-1)	36,92
2	25(-1)	2(-1)	1:1(-1)	10(1)	44,61
3	25(-1)	2(-1)	1:5(1)	2(-1)	81,63
4	25(-1)	2(-1)	1:5(1)	10(1)	85,20
5	55(1)	2(-1)	1:1(-1)	2(-1)	41,93
6	55(1)	2(-1)	1:1(-1)	10(1)	35,48
7	55(1)	2(-1)	1:5(1)	2(-1)	66,00
8	55(1)	2(-1)	1:5(1)	10(1)	64,00
9	25(-1)	8(1)	1:1(-1)	2(-1)	37,98
10	25(-1)	8(1)	1:1(-1)	10(1)	39,53
11	25(-1)	8(1)	1:5(1)	2(-1)	84,90
12	25(-1)	8(1)	1:5(1)	10(1)	83,96
13	55(1)	8(1)	1:1(-1)	2(-1)	39,06
14	55(1)	8(1)	1:1(-1)	10(1)	40,62
15	55(1)	8(1)	1:5(1)	2(-1)	88,00
16	55(1)	8(1)	1:5(1)	10(1)	83,00
17	40(0)	2(-1)	1:3(0)	6(0)	84,54
18	40(0)	8(1)	1:3(0)	6(0)	84,21
19	25(-1)	5(0)	1:3(0)	6(0)	87,27
20	55(1)	5(0)	1:3(0)	6(0)	81,48
21	40(0)	5(0)	1:1(-1)	6(0)	35,48
22	40(0)	5(0)	1:5(1)	6(0)	80,85
23	40(0)	5(0)	1:3(0)	2(-1)	82,45
24	40(0)	5(0)	1:3(0)	10(1)	83,33
25(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)	85,96
26(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)	85,96
27(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)	85,08
28(C)	40(0)	5(0)	1:3(0)	6(0)	84,21

Fonte: Autor

A partir da obtenção da melhor conversão em ésteres após a execução das 27 reações, sendo essa de 88%, correspondente ao ensaio 15 (55°C; 8h; 1:5; 2%[E]), um modelo estatístico pode ser construído, com o objetivo de representar os dados experimentais e verificar a

influência de cada variável no desempenho das reações, bem como avaliar possíveis interações entre elas. Carneiro *et al.*, (2014) obteve 81,86 % para Novozym® 435 como sua melhor conversão, também verificou que a temperatura em que os biocatalisadores obtiveram maior conversão foram as maiores que 45°C. Araujo *et al.*, (2009) obteve o melhor resultado para as seguintes condições de seu planejamento experimental: razão molar (1:6), temperatura de 60°C, tempo de reação de 90 minutos, com uma conversão de 85,29%.

Os efeitos mais significativos foram a razão molar, tempo, seguida da interação tempo x razão molar e temperatura. Verificou-se que Araujo *et al.*, (2009) obteve uma conversão próxima a obtida neste trabalho em um menor período, no entanto, utilizando maior razão molar e maior temperatura, possibilitando a suposição de que se fossem aumentadas as R.M (ácidos:álcool) maiores conversões seriam obtidas. Outros resultados relevantes encontrados por Araujo *et al.*, (2009) conferem com os obtidos neste trabalho, como a verificação da R.M como condição mais significativa estatisticamente nas conversões e ao fato de sua melhor conversão ter sido obtida a uma temperatura de 60°C muito próxima a de 55°C utilizada neste trabalho. O diagrama de Pareto (fig.17) comprova a significância estatística da RM nas conversões obtidas no presente trabalho. A verificação de Araujo em relação a maiores conversões em uma temperatura de 60°C também entram em concordância com a conclusão de Carneiro *et al.*, (2014) em relação a maiores conversões para temperaturas superiores a 45°C. O modelo estatístico para o cálculo do rendimento de esterificação de ácidos graxos de óleo de coco residual pode ser representado pela equação 5 que apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão.

$$Z = 4,1696 - 0,0317 * X_3 + 0,0790 * X_3^2 - 0,4096 * Y + 0,0031 * Y^2 \quad (\text{Equação 5})$$

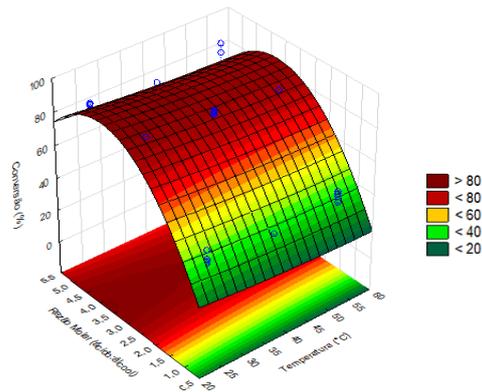
Onde:

- Z é a conversão em Ésteres etílicos (%);
- X_3 é a R.M;
- Y corresponde a combinação entre os termos independentes que exerceram influência significativamente estatística na conversão.

O modelo codificado de 2ª ordem representado pela Equação 5, validado pela análise de variância, foi usado para gerar a superfícies de resposta e curva de contorno para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em função da R.M, da temperatura, do

conteúdo de enzima e do tempo reacional, A fig 16 apresenta a superfície de resposta para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em função da R.M e da Temperatura.

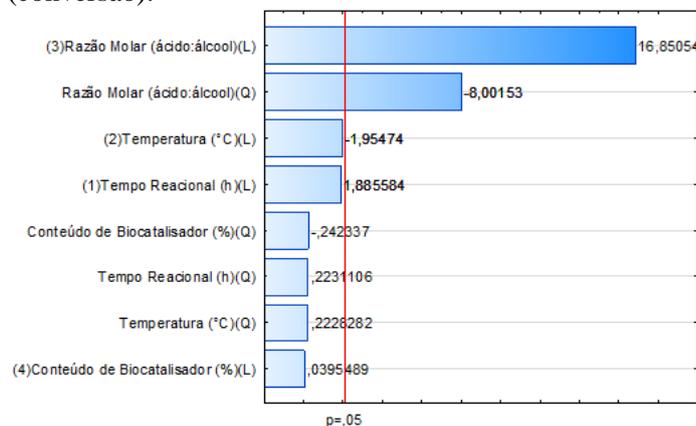
Figura 16-Superfície de resposta para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em função da R.M e da Temperatura (RM de 1:4, 6% de conteúdo de biocatalisador (p/p), temperatura de 55°C e tempo de 8h).



Fonte: Autor

Analisando a superfície de resposta, é possível verificar o aumento da conversão a medida que se incrementa a R.M, visto a crescente elevação da superfície. Para um nível de significância de 5%, os resultados obtidos indicam que a R.M é o parâmetro que mais influencia no desempenho das reações. Concentração de enzima, temperatura e tempo reacional não tiveram grande significância. Esses valores significativos ($p < 0,05$) podem ser melhor visualizados no diagrama de Pareto na fig. 17.

Figura 17-Gráfico de Pareto gerado da interação entre as variáveis independentes (temperatura, tempo reacional, razão molar e conteúdo de biocatalisador) e a variável dependente (conversão).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores expostos ao lado de cada coluna no gráfico de Pareto, correspondem a influência que cada variável estudada exerce, isoladamente, sobre a resposta do sistema, portanto, ao rendimento do sistema. A interpretação para os parâmetros em seus efeitos lineares, mostra que influência da R.M foi de 16,85, enquanto a influência da temperatura foi de aproximadamente -1,9547, já a do tempo reacional foi de aproximadamente 1,88 e do conteúdo de biocatalisador foi de aproximadamente 0,04. Diante da análise dos dados, é irrefutável a verificação de que a R.M exerceu maior significância estatística na conversão, seguida da temperatura, enquanto que o tempo reacional e concentração de biocatalisador apresentaram baixas contribuições. Além disso, R.M foi a única variável linear que mostrou um valor positivo no gráfico de Pareto, demonstrando que a alteração do nível da variável de -1 para 1 (ou de 1:1 para 1:5) aumenta significativamente a resposta (conversão).

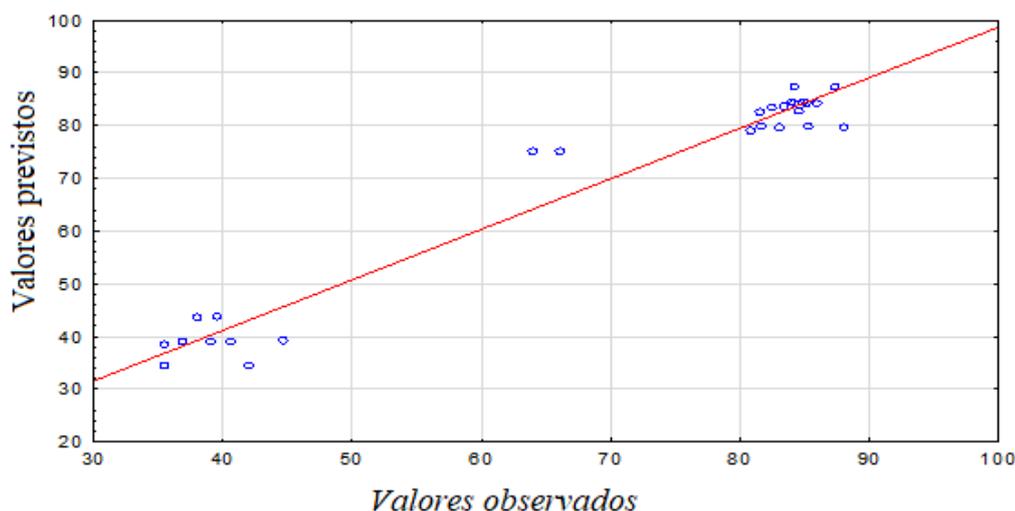
Ribeiro (2010) obteve as seguintes conclusões acerca das variáveis não significativas em seu trabalho: concentração de enzima e tipo do álcool, concentração de enzima e razão molar e concentração de enzima e temperatura não tiveram efeitos significativos, já que estes parâmetros não cruzaram a linha limite de significância $p > 0,05$ estabelecida. Esse resultado mesmo não sendo significativo forneceu a Ribeiro uma informação bastante interessante e atrativa de que também podemos compartilhar. Um dos problemas na utilização de catálise enzimática são os custos das enzimas utilizadas no processo, onde para tornar esse meio viável, uma menor quantidade de enzima utilizada tornaria o processo mais atrativo.

O resultado encontrado por Ribeiro em seu trabalho, mostra que o rendimento não sofre muita influência quando é utilizado 7% ou 3% de enzima, ou seja, o biodiesel de óleo de coco pode ser produzido utilizando concentrações de enzima abaixo de 7% fornecendo bons rendimentos. Para este trabalho também se verificou que o conteúdo de biocatalisador não influenciou significativamente quando variado em 2, 6 e 10 %, e através dos gráficos de superfície de resposta (fig. 16) verificou-se que as interações entre conteúdo de enzima x tempo reacional, conteúdo de enzima x temperatura e temperatura x tempo, não tiveram significância estatística na conversão dos ésteres.

A fig. 18 apresenta os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelo modelo matemático descrito pela Equação 5 das conversões para a síntese de ésteres láuricos de A.G.L do óleo de coco residual. Observa-se pouca dispersão dos pontos que estão próximos a reta representativa o que assegura a adequação do modelo matemático diante da proximidade dos pontos experimentais à reta de regressão linear, que apresenta um coeficiente de

determinação (R^2) relativamente alto (0,89). Este valor indica que 89% da variação do rendimento pode ser atribuída às variáveis independentes e apenas 11% da variação total não podem ser explicados pelo modelo, o que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais, mas que ainda pode ser aprimorado. Dessa forma pode-se concluir que o modelo matemático proposto é capaz de explicar os dados coletados com relativa qualidade, no entanto, deve-se ressaltar que aprimoramentos ainda podem ser realizados para garantir dispersões mínimas e, portanto, uma maior adequação do modelo aos resultados experimentais.

Figura 18-Valores observados experimentalmente versus valores previstos pelo modelo matemático para a síntese ésteres



Fonte: Elaborado pelo autor

A seguir, nas fig. 19 a 23, são apresentados os demais gráficos de superfícies de resposta para as variáveis significativas e não significativas que compuseram os parâmetros reacionais.

As figuras 22 e 23, Conteúdo de [E] x R.M e R.M x Tempo reacional, demonstram a influência da RM nas conversões em ésteres. Já nas figuras 19, 20 e 21, que levam em consideração outros fatores independentes excetuando a RM, é possível a verificação a superfície plana, nos gráficos de superfície de resposta, demonstrando que os fatores combinados, Conteúdo de [E] x Temperatura; Temperatura x Tempo reacional e Conteúdo [E] x Tempo reacional não tiveram significância estatística nas conversões .

Figura 19-Conteúdo de [E] x Temperatura

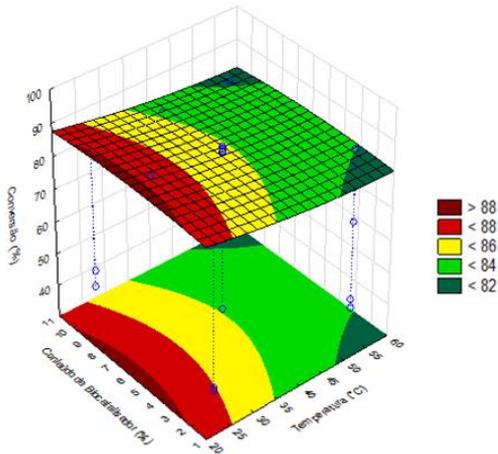


Figura 20-Temperatura x Tempo reacional

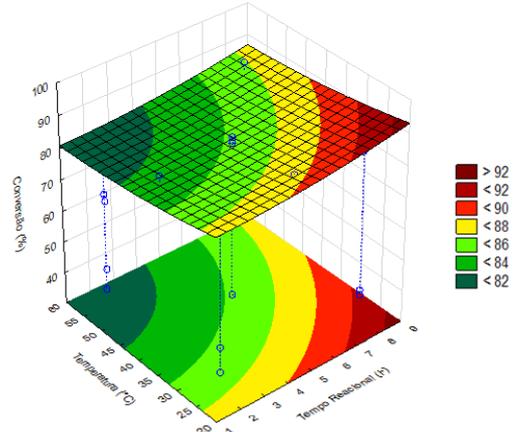


Figura 21-Conteúdo [E] x Tempo reacional

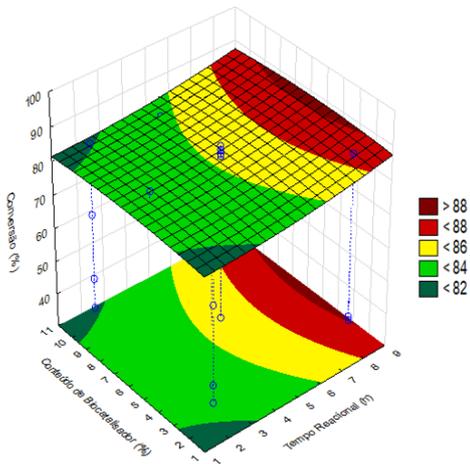


Figura 22-Conteúdo de [E] x R.M

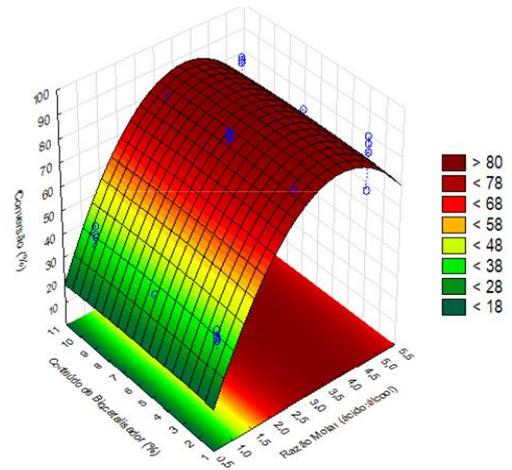
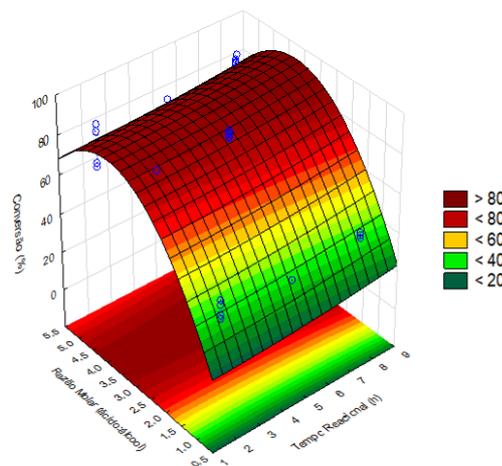


Figura 23-R.M x Tempo reacional



Fonte: Elaborados pelo autor

6.3. Comparativo entre o ponto ótimo assistido por irradiação ultrassônica e agitação mecânica³

Durante a execução do experimento nos dois sistemas reacionais foram analisadas amostras de 2 em 2 horas em um período total de 8 horas para verificação da conversão em ésteres no decorrer do tempo, no entanto, a partir de 2 horas decorridas verificou-se que o índice de acidez das amostras não apresentou grandes variações, indicando que a conversão máxima já é obtida 2 a 4 horas de reação, essa divergência entre o ponto otimizado estabelecido por redes neurais no *software Statistica* e o ponto ótimo verificado na prática, bem como, à menor conversão obtida para o ponto otimizado nos dois sistemas reacionais descritos quando comparada a conversão obtida para o ponto ótimo das 27 reações iniciais, estabelecidas por planejamento experimental fatorial do tipo PCC, deveu-se ao fato dos resultados obtidos para as 27 reações não obedecerem a distribuição normal o que contribuiu negativamente na obtenção do ponto otimizado exato via redes neurais, visto que foram necessárias a realização de adequações do modelo utilizado (Linear quadrático e especificações) para que os resultados pudessem ser representados estatisticamente, como já foi mencionado.

Para esta etapa comparativa, conclui-se que observações feitas em intervalos de tempo menores em um tempo total de 2 a 4 horas, seriam mais eficientes para uma melhor verificação da influência do tempo no decorrer das reações, visto que a conversão máxima é obtida nas primeiras horas de reação e depois se estabiliza, como pode ser visto no gráfico 1, permitindo-se supor uma certa afinidade da enzima lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em relação aos ácidos graxos láuricos, provenientes no óleo de coco, diante da produção de ésteres em um curto período.

No estudo realizado por Sun *et al* (2009), a não linearidade da especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica foi demonstrada em resultados obtidos utilizando apenas ácidos graxos saturados. Nesse estudo, a lipase utilizada foi produzida por *Rhizopus chinensis* em fermentação em estado sólido e o sistema reacional consistiu na utilização de n-heptano, ácidos e álcoois em concentrações de 0,6 mol/L. Utilizou-se os ácidos graxos de C4:0 a C16:0 e os álcoois primários do metanol ao 1-octanol, obtendo indicativos, para os ésteres etílicos formados, de maior afinidade da enzima pelos ácidos graxos na seguinte ordem, considerando-

³ Os resultados obtidos para esta etapa encontram-se na fig.24.

se as conversões no tempo final de reação: Caprilato (C8:0) > Laurato (C12:0) > Miristato (C14:0) > Palmitato (C16:0) > Caprato (C10:0) > Caproato (C6:0). Verificou-se que nesse estudo, o ácido láurico foi o que apresentou a segunda maior atividade, utilizando como aceptor de elétrons do mesmo álcool deste trabalho (etanol) (REINEHR, 2014). Vaidya *et al.*, também fez observações semelhantes às de Sun *et al.* em relação à especificidade pelos ácidos graxos, os quais relataram estudo de especificidade utilizando enzimas comerciais imobilizadas. A enzima de *Candida antarctica* imobilizada em resina de acrilato, apresentou melhores resultados de atividade específica quando o ácido graxo utilizado foi o ácido láurico, o que de acordo com Reinehr (2014) foi explicado pela resistência da difusão de substratos de cadeia longa na estrutura mais rígida das enzimas imobilizadas.

Lipases diferentes apresentam características distintas entre si. A especificidade enzimática está relacionada com o caráter eletrofílico do carbono na molécula doadora de acila, da acidez, do efeito estérico, da proporção dos substratos e da hidrofobicidade do grupo carboxílico. Assim, a fonte de lipases, o método de imobilização, a natureza do solvente e as propriedades dos substratos podem explicar, segundo os autores, as tendências conflitantes encontradas na literatura para os estudos de especificidade (ZAIDI *et al.*, 2002; NAIK *et al.* 2010; PLEISS *et al.* 1998; REINEHR *et al.* 2014).

Batistella (2011), afirma em seu trabalho que na transesterificação de óleo de soja utilizando solvente orgânico (n-hexano) por meio de sistema ultrassônico, houve uma tendência ascendente para os catalisadores (enzimas Lipozyme RM IM e Novozym® 435), evidenciando um aumento no rendimento nas primeiras 4 horas de reação, utilizando a enzima Lipozyme RM IM, o rendimento foi de aproximadamente 55% e para a Novozym® 435 o rendimento foi de aproximadamente 37%. As condições dos experimentos foram: razão molar (1:3) (óleo/etanol), temperatura de 65°C (T), concentração da enzima de 5% (p/p) [E], sem adição de água e 100% de potência de ultrassom (frequência de 37 kHz e potência de 132 W).

Batistella (2011) também obteve em seu trabalho um rendimento de 57% em ésteres etílicos utilizando a enzima Novozym® 435 em sistema com solvente orgânico (n-hexano), utilizando ultrassom, nas seguintes condições: 27,1% (p/p) de enzima e temperatura de 63°C, como também fez a verificação de que o uso de iso-octano conduziu a um aumento gradual na atividade da lipase em relação ao tempo de contato, atingindo um valor máximo de atividade relativa de 126%. Os solventes que apresentaram aumento na atividade da lipase foram terc-

butanol ($\log P = 0,8$) e n-hexano ($\log P = 3,50$), demonstrando serem mais eficazes uma vez que mantiveram a atividade das enzimas durante o tratamento com ultrassom (REINEHR, 2014).

Com base nos resultados apresentados por Batistella (2011), pode-se dizer que o solvente exerce influência direta sobre a atividade, estabilidade e especificidade da enzima (DE PAULA *et al.*, 2005). Permitindo-se supor que o motivo pelo qual as reações realizadas sob agitação mecânica (incubadoras) neste trabalho, obtiveram conversões um pouco mais elevadas quando comparadas as conversões obtidas em sistema de banho ultrassônico, atribuiu-se ao comportamento do solvente (etanol) nestes dois meios reacionais distintos, bem como a própria escolha do solvente. Isso poderia ser de fato verificado se um novo planejamento experimental, incluindo tipos de álcool como variáveis independentes, fosse executado, no intuito de avaliar quais proporcionariam as melhores conversões quando submetidos aos sistemas reacionais incubadora e banho ultrassônico.

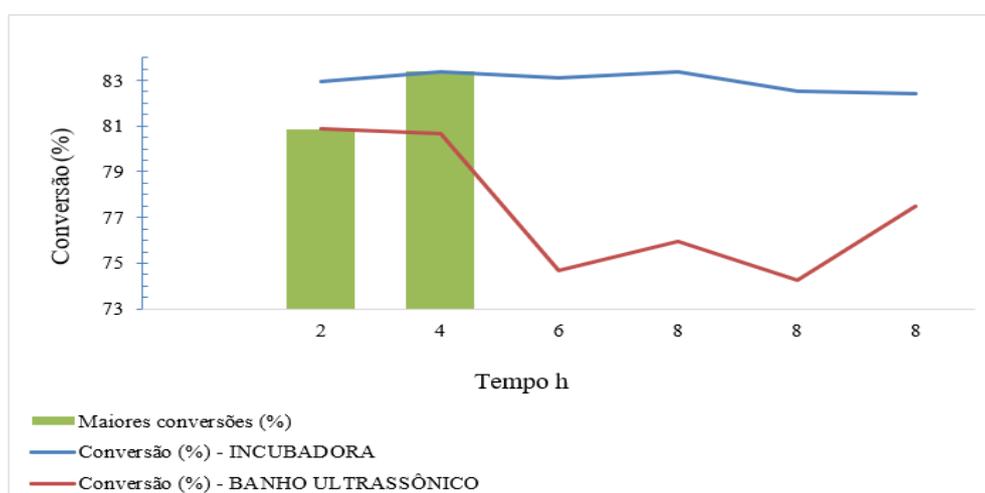
Santos (2009), observou que para a reação com auxílio de ultrassom houve uma conversão 8,28% superior ao processo convencional (sem ultrassom), confirmando-se o efeito positivo do uso do ultrassom para a reação de esterificação. Verificou também que nos dez primeiros minutos reacionais, não é visível diferença na conversão entre as reações assistidas ou não por ultrassom, isto atribuiu-se ao fato de que no início, as conversões são altas para ambos os processos.

No presente trabalho, as conversões entre incubadora e banho ultrassônico também foram muito próximas, porém essa similaridade perdurou até o fim das 8 horas de ocorrência da reação. Além disso, a incubadora demonstrou ser mais eficiente, uma vez que apresentou conversões um pouco maiores em relação ao ultrassom, 83,39% e 80,86 % respectivamente, embora tenham sido condicionadas pelo mesmo planejamento experimental. Ognjanovic *et al.* (2009) observaram durante seus estudos de conversão em biodiesel com a lipase Novozym® 435, que a concentração de água apresentou efeitos negativos na conversão. Os melhores rendimentos (95% metil ésteres) foram obtidos nas menores concentrações de água, ou seja, sem adição de água na reação. Os resultados deste comparativo podem ser visualizados na fig.24. No presente trabalho, não foi adicionado água no decorrer da reação, no entanto, pode-se supor que a própria água formada como subproduto estaria interferindo no rendimento da reação desempenhada em banho ultrassônico, ou mesmo nos dois sistemas reacionais. Baixa

atividade de água (baixo teor de água livre) em reações afeta positivamente a síntese de ésteres de ácidos graxos, mas o efeito deste parâmetro sobre a produtividade de transesterificação não é tão inequívoco (Antczak *et al.*, 2009; Bajaj *et al.*, 2010).

A conversão alcançada não foi suficiente para a caracterização do produto final como biodiesel, uma vez que não foi realizada a caracterização do produto final da esterificação, para averiguar se o mesmo encontrava-se dentro dos padrões da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis), além disso os valores máximos de conversão não ultrapassaram 90%. Contudo, propõe-se a utilização de metodologias adicionais para esta rota, no intuito de aprimorar as conversões, que embora tenham sido satisfatórios, não permitiram a obtenção de biocombustível, uma sugestão seria a utilização da peneira molecular, pois sendo a reação de esterificação termodinamicamente estável e diante dos resultados estáveis de índice de acidez averiguadas de 2 em 2 horas, pôde-se concluir que mesmo com excesso de álcool, a reação apresentou-se equilibrada e, portando, a água gerada como subproduto estaria reagindo com o éster e produzindo novamente ácidos graxos, reação inversa de hidrólise. A peneira seria eficiente em remover água para garantir a extração do máximo potencial reacional de conversão em ésteres. A fig. 24 mostra a comparativo entre as conversões obtidas nos sistemas reacionais incubadora e banho ultrassônico.

Figura 24 – Comparativo entre as conversões – INCUBADORA / ULTRASSOM⁴



Fonte: Autor

⁴ A R.M (1:4) utilizada nesta etapa comparativa foi obtida através do *software Statistica*, bem como temperatura 55°C, Tempo de 6 e 8h e 6% de conteúdo de biocatalisador esses parâmetros correspondem ao ponto otimizado para execução dos ensaios.

7. CONCLUSÃO

Para a 1ª Etapa deste trabalho, o banho ultrassônico demonstrou ser uma metodologia extremamente eficiente uma vez que em apenas 60 min e a uma temperatura de 60°C, pode-se obter os sais de ácidos graxos. Isso foi verificado quantitativamente através de verificação do índice de acidez que saltou de 1,83 para 172, 34 após a hidrólise. O menor tempo reacional, bem como a utilização de uma temperatura mais baixa, representam, conseqüentemente, menores gastos energéticos e redução de custos de produção, demonstrando perspectivas de aprimoramento desta metodologia para aplicação em escala industrial.

A obtenção do produto da saponificação em 60 min e em condições mais brandas atribui-se ao fenômeno da cavitação, que ocorre no fluido submetido a ondas ultrassônicas possibilitando maior miscibilidade e contato entre as interfaces de misturas reacionais que por sua vez estejam imersas nessas condições. O índice de acidez após a hidrólise foi aproximadamente 95 vezes maior que o do óleo antes de ser submetido ao processo, demonstrando que os sabões obtidos na saponificação em banho ultrassônico viabilizaram a produção de AGL aptos a esterificação.

Para a 2ª Etapa, que consistiu na esterificação enzimática dos AGL produzidos na 1ª Etapa, verificou-se através da análise do gráfico de Pareto que os efeitos da temperatura, concentração de enzima e tempo não foram significativamente estatísticos quanto a R.M. O modelo encontrado necessitou de adequações para que se pudesse utilizar a análise estatística. A melhor combinação para as 27 reações apresentou um rendimento de 88% em conversão de AGL em ésteres tendo como condições reacionais, temperatura de 55°C, tempo reacional de 8 h, 1:5 (ácidos:álcool) e 2 % de conteúdo de biocatalisador (p/p). Já para o comparativo do ponto otimizado entre agitação mecânica e banho ultrassônico, a primeira apresentou como melhor conversão 83, 39 % em um tempo reacional de 4 h e o segundo, 80, 86% em um tempo reacional de 2 h, ambos utilizando R.M de 1:4, 6% de conteúdo de biocatalisador (p/p) e temperatura de 55°C.

A cerca das conversões, concluiu-se que as mesmas não foram suficientes para considerar o produto final como biodiesel, visto que os valores máximos de conversão não ultrapassaram 90%, além de não terem sido realizadas as análises correspondentes a caracterização do produto obtido para verificação de sua composição, bem como se a amostra

encontrava-se dentro dos padrões de qualidades propostos pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) para que então pudesse ser avaliada como biocombustível.

Para a etapa comparativa entre as conversões nos sistemas reacionais, incubadora e banho ultrassônico, verificou-se que após 2 horas decorridas o índice de acidez das amostras não apresentou grandes variações, indicando que a conversão máxima já é obtida nas primeiras horas de reação, aproximadamente entre 2 e 4 horas. Concluiu-se, portanto que a verificação do IA em intervalos de tempo menores em um tempo total de 2 h, seria mais eficiente para uma melhor verificação da influência do tempo no decorrer das reações, visto que a conversão máxima é obtida nas primeiras horas de reação.

Os resultados comprovam a viabilidade da catálise enzimática para produção de biodiesel a partir de substratos de elevada acidez livre, no entanto aprimoramentos devem ser complementados a esta rota alternativa, no intuito de potencializar as conversões para que estas sejam superiores a 90%. A viabilidade da utilização do óleo de coco residual utilizado neste trabalho, bem como de outras fontes de matéria prima não refinadas ou de elevada acidez, garantem um caráter sustentável à essa rota alternativa, diante da possibilidade de utilização de matérias-primas não nobres, bem como a perspectiva de aprimoramento desta metodologia para utilização em escala industrial, além do fato de que se pode obter boas conversões com concentrações não tão elevadas de enzima (abaixo de 5%), o que é vantajoso do ponto de vista econômico, já que o alto custo da enzima é um fator que restringe a produção industrial de ésteres por catálise enzimática.

8. REFERÊNCIAS

AL-ZUHAIR, S. (2005). Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1442–1448. <https://doi.org/10.1021/bp050195k>

AL-ZUHAIR, S. Production of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils: A Kinetics Study. *Biotechnology Progress*, [s.l.], v. 21, n. 5, p.1442-1448, 7 out. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp050195k>.

AL-ZUHAIR, S., JAYARAMANA, K. V., KRISHNAN, S., & CHAN, W. H. (2006). The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 30(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.04.007>

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY, AOCS. Official Method Cd-3d-63 Acid Value, 1997.2p.

American Oil Chemists Society, AOCS. Official Method Cd-3d-63 Acid Value, 1997.2p.

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

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

ARAÚJO, G. S.; CARVALHO, R. H. R.; SOUSA, E. M. B. D. de. Produção de Biodiesel a partir de Óleo de Coco (*Cocos nucifera* L.) Bruto. International Workshop Advances In Cleaner Production: key elements for a sustainable world energy water and climate change, São Paulo - Brasil, p.5-8, 20 maio 2009. Anual. Disponível em: <<http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/4a/3/g.%20s.%20araujo%20-%20resumo%20exp.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2019.

ARCEO, A. A. Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. 2012. 205 f. Tese (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BAJAJ, A.; JOHAN, P.; JHA, PN.; MEHROTRA, R., Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.62, p.9-14, 2010.

BALACHANDRAN, F. M.; ARUMUGHAN, C.; MATHEW, A. G. Distribution of major chemical constituents and fatty acids in different regions of coconut endosperm. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62(11): 1583-6, 1985.

BATISTELLA, L. Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2011

BIOCOMBUSTIVEIS-BRASIL (BIOBRAS). Hidroesterificação: tecnologia de segunda geração na produção de Biodiesel Disponível em: <http://biocombustiveis-brasil.blogspot.com/2008/05/hidroesterificacao-tecnologia-de-segunda.html> Acesso em: 24 de fav. 2019.

BORDADO, J.M. Production of Biodiesel from Waste Frying Oils, Waste Management, v. 26, p. 487-494, 2006

CARNEIRO, E. A.; MARQUES, M. L.; GONÇALVES, L. R. B. Esterificação Enzimática de Ácidos Graxos de óleo de coco utilizando lipase de *Candida antarctica*. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis/sc, v. 1, p.3-7, 19 out. 2014. Anual. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/esterificacao-enzimatica-de-cidos-graxos-de-leo-de-coco-utilizando-lipase-de-candida-antarctica-16609>>. Acesso em: 05 mar. 2019.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. Química Nova, v. 18, p. 544 –554, 1995.

CHOWDHURY, A. et al. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. Industrial Crops and Products, [s.l.], v. 52, p.783-789, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.007>.

COSTA FILHO, Edilson Holanda. ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BODIESEL UTILIZANDO ÓLEO RESIDUAL E ETANOL. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química,, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ce, 2008. Cap. 4. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/15749>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004;

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004;

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

ENCARNAÇÃO, Ana Paula Gama. Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica. 2008. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2008. Cap. 2. Disponível em: <<http://www.tpqb.eq.ufrj.br/download/biodiesel-via-trans-e-hidroesterificacao.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2019

AL-ZUHAIR, S. (2005).

FEDERAL, U., RIO, D. O., KURADOMI, R. Y., & GRANDE, R. I. O. (2009). Livros Grátis.

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKEMEIER, R.; production of biodiesel from waste frying oils. v: 26 (5) pp: 487-494, 2006. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.025>

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKEMEIER, R.; production of biodiesel from waste frying oils. v: 26 (5) pp: 487-494, 2006. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.025>

FERREIRA, J. M. S.; WAREICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. Cultura do coqueiro no Brasil. Aracaju, EMBRAPA-SPI, 1994, 300 p.

FLUMIGNAN, D. L., VIVIANE, V. E., DOS SANTOS, L. K., VILAÇA, S. M., STRINGACI, J. C. T., & CALERA, G. C. (2016). Estado da arte da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade. Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica Do IFPB, 1(28), 178. <https://doi.org/10.18265/1517-03062015v1n28p178-190>

GARCIA, C. M., Prof, O., & SCHUCHARDT, U. F. (2006). Transesterificação de óleos vegetais.

MILLS, V. H.; MCCLAIN, K. Fat hydrolysis. Industrial & Engineering Chemistry, v. 41, n. 9, p. 1982-1985, 1949.

GETACHEW, A.T.; CHUN, B. Optimization of coffee oil flavor encapsulation using response surface methodology. Lwt - Food Science and Technology, [s.l.], v. 70, p.126-134, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.025>.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E.; MESSINA, A.; Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds, *Sens. Actuators B*, 121, 515, 2007;

GOMES, Michele Mendes da Rocha. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2009. Cap. 5.

HASAN F., SHAH A. A., HAMEE A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.235-251, 2006.

HOSHINO, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids, *Agric. Biol. Chem.* 54, 1459, 1990.

INCE, N. H., TEZCNLI, G., Belen, R. K., & APIKYAN, G. (2001). Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: The state of the art and environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. [http://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00224-1](http://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00224-1)

INCE, N. H., TEZCNLI, G., Belen, R. K., & APIKYAN, G. (2001). Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: The state of the art and environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. [http://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00224-1](http://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00224-1)

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.151, p.29-63, 1994.

JÚNIOR, N. M.; SOUZA, P. H. G.; PEREIRA, R. E.; CARVALHO, L. M.; FARIA, W. L. S.; SALES, A. S.; BOM, E. P. S.; ARANDA, D. A. G. “Produção de biodiesel etílico utilizando misturas de óleo de fritura e óleo de soja por catálise básica”. In *Anais do 12º Congresso Brasileiro de Catálise*. Angra dos Reis – RJ, Brazil, 2, 947–951 (2003).

KEE, R. A., & GAUTHIER, M. (2007). Methacrylate) Copolymers : Synthesis and Enhanced Polyelectrolyte Effect in Solution. *Polymer*, 44, 2335–2346. <http://doi.org/10.1002/pola>

KHAN, A.A.; ALZOHAIRY, M.A. Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Research Journal of Biological Sciences*, v. 5, p. 565–575, 2010.

KULKARNI, MG., DALAI, A.K. waste Cooking Oil – An Economical Source for Biodiesel: A Review, *Ind.Eng. Chem. Res.*, v. 45, p. 2901 - 2913,

LIMA, L. P., SANTOS, F. F. P., COSTA, E., & FERNANDES, F. A. N. (2012). Production of free fatty acids from waste oil by application of ultrasound. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2(4), 309–315. [Http://Doi.Org/10.1007/s13399-012, 2\(4\), 309–315. http://doi.org/10.1007/s13399-012-0056-0](http://doi.org/10.1007/s13399-012-0056-0)

MANO, E.B.; SEABRA, A.P. *Práticas de Química Orgânica*. Editora EDART, 1987.

MARTINES, M. A. U., Davolos, M. R., & JAFELICCI, M. (2000). O Efeito do ultra-som em reações químicas. *Química Nova*. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v23n2/2126.pdf>, Acesso em 13 de fev. 2019.

MAZZANI, B. *Plantas Oleaginosas*. Barcelona: Ed. Salvat. 1963, 380p.

MERCANTILI, L., DAVIS, F., & HIGSON, S. P. J. (2014). Ultrasonic initiation of the alkaline hydrolysis of triglycerides (saponification) without phase catalysis. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(1), 133–141. <http://doi.org/10.1007/s11743-013-1450-8>

MORETO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*, São Paulo: Varela, p. 114-133, 1998.

NAIK, S.; BASU, A.; SAIKIA, R.; MADAN, B.; PAUL, P.; CHATERJEE, R.; BRASK, J.; SVENDSEN, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, 65, 18.

NETO, S., CARLOS, J., & SANTOS, O. (2013). Graduandos do Curso de Licenciatura em Química, CES, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba. 2 Professor da Universidade Federal de Campina Grande, CES /UFCG.

NEVES, A. A. Avaliação do aproveitamento de óleos alimentares usados para produção de biodiesel na área metropolitana do Porto. Dissertação de Mestrado - Universidade do Porto . Porto, 2008.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, v.39, p.13-20, 2003

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JUGOVIC, Z. K., Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology*. v.100, p. 5146-5154, 2009.

OLIVEIRA, F. C. C., SUAREZ, P. A. Z., & SANTOS, W. L. P. dos. (2008). Biodiesel: Possibilidades e Desafios. *Química Nova Na Escola*, 28, 3–8. <https://doi.org/doi:10.1533/9780857097385.2.441>

OLIVEIRA, J. P. (2012). Estudo da geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento ambiental. <http://repositorio.ufes.br/bitstream/10/6135/1/Jairo%20Pinto%20de%20Oliveira.pdf>

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D.; *CHEM. PHYS. LIPIDS* 1998, 93, 67.

RAMOS, L. P., KOTHE, V., CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F., MUNIZ-WYPYCH, A. S., NAKAGAKI, S., KRIEGER, N., ... Cordeiro, C. S. (2017). Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. *Revista Virtual de Química*, 9(1), 317–369. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170020>

REINEHR, Christian Oliveira et al. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions.. *Química Nova*, [s.l.], v. 37, n. 3, p.455-459, 2014. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140077>.

RIBEIRO, Livia Maria de Oliveira. Estudo do processo de produção de biodiesel de óleo de coco catalisado enzimaticamente. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010. Cap. 5. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp145212.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

SALVADOR, A. A.; RIBAS, C.; MASO, L.; PALHARES, S.; Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática, Trabalho de graduação para o departamento de engenharia de alimentos e engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009;

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. “Transesterification of Vegetable Oils: a Review”. *J. Braz. Chem. Soc.*, 9, 199–210 (1998).

SILVEIRA, Z. de C. (2003). Análise Estatística e Otimização de Parâmetros de Projeto em Componentes de Sistemas Mecânicos. http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/262988/1/Silveira_ZildadeCastro_D.pdf

SOBRAL, J. P. Composição química e digestibilidade do farelo de coco. Piracicaba, 62p. Dissertação de Mestrado-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo, 1976.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D.; *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 2607.

TEIXEIRA, E. L. Produção de biodiesel através de hidroesterificação do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl.) via Catálise Heterogênea Ácida. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2011.

VARGAS, R.M., SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., The importance of *Quimica Nova* and *Journal of The Brazilian Chemical Society* for the development of chemistry in Brazil, *Journal Brazilian Chemists Society*, 9 (1): 199, 1998;

VARGAS, R.M., SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., The importance of *Quimica Nova* and *Journal of The Brazilian Chemical Society* for the development of chemistry in Brazil, *Journal Brazilian Chemists Society*, 9 (1): 199, 1998;

ZAIDI, A.; GAINER, J. L.; CARTA, G.; MRANI, A.; KADIRI, T.; BELARBI, Y.; MIR, A.; *J. Biotechnol.* 2002, 93, 209.

ZENEVICZS, Mara Cristina Picoli. Hidroesterificação enzimática de óleo de soja e de fritura em sistema de ultrassom. 2015. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/sc, 2015. Cap. 4. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/156524>>. Acesso em: 29 fev. 2019.

ZHANG, Y.; XIAO, Y.; KELLAR, K. J.; WAINER, I. W.; Immobilized nicotinic receptor stationary phase for on-line liquid chromatographic determination of drug-receptor affinities; *Anal.Biochem.*, 264, 22, 1998;

MANO, E.B.; SEABRA, A.P. *Práticas de Química Orgânica*. Editora EDART, 1987. AL-ZUHAIR, S. (2005). Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1442–1448. <https://doi.org/10.1021/bp050195k>

AL-ZUHAIR, S., JAYARAMANA, K. V., KRISHNAN, S., & CHAN, W. H. (2006). The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 30(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.04.007>

American Oil Chemists Society, AOCS. Official Method Cd-3d-63 Acid Value, 1997.2p.

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

BAJAJ, A.; JOHAN, P.; JHA, PN.; MEHROTRA, R., Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.62, p.9-14, 2010.

BATISTELLA, L. Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2011

BIOCOMBUSTIVEIS-BRASIL (BIOBRAS). Hidroesterificação: tecnologia de segunda geração na produção de Biodiesel Disponível em: <http://biocombustiveis-brasil.blogspot.com/2008/05/hidroesterificacao-tecnologia-de-segunda.html> Acesso em: 24/02/2019

BORDADO, J.M. Production of Biodiesel from Waste Frying Oils, *Waste Management*, v. 26, p. 487-494, 2006

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. *Química Nova*, v. 18, p. 544 –554, 1995.

CHOWDHURY, A. et al. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. *Industrial Crops and Products*, [s.l.], v. 52, p.783-789, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.007>.

COSTA FILHO, E. H. (2008). Estudo da produção enzimática de biodiesel utilizando óleo residual e etanol. Disponível em: http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15749/1/2008_dis_ehcostafilho.pdf Acesso em: 20/02/19

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004;

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

Federal, U., Rio, D. O., Kuradomi, R. Y., & Grande, R. I. O. (2009). Livros Grátis.

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKEMEIER, R.; production of biodiesel from waste frying oils. v: 26 (5) pp: 487-494, 2006. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.025>

FLUMIGNAN, D. L., VIVIANE, V. E., DOS SANTOS, L. K., VILAÇA, S. M., STRINGACI, J. C. T., & CALERA, G. C. (2016). Estado da arte da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade. *Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica Do IFPB*, 1(28), 178. <https://doi.org/10.18265/1517-03062015v1n28p178-190>

GARCIA, C. M., Prof, O., & SCHUCHARDT, U. F. (2006). Transesterificação de óleos vegetais.

MILLS, V. H.; MCCLAIN, K. Fat hydrolysis. *Industrial & Engineering Chemistry*, v. 41, n. 9, p. 1982-1985, 1949.

GETACHEW, A.T.; CHUN, B. Optimization of coffee oil flavor encapsulation using response surface methodology. *Lwt - Food Science and Technology*, [s.l.], v. 70, p.126-134, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.025>.

INCE, N. H., TEZCNLI, G., Belen, R. K., & APIKYAN, G. (2001). Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: The state of the art and environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. [http://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00224-1](http://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00224-1)

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.151, p.29-63, 1994.

Kee, R. A., & Gauthier, M. (2007). Methacrylate) Copolymers : Synthesis and Enhanced Polyelectrolyte Effect in Solution. *Polymer*, 44, 2335–2346. <http://doi.org/10.1002/pola>

KHAN, A.A.; ALZOHAIY, M.A. Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Research Journal of Biological Sciences*, v. 5, p. 565–575, 2010.

LIMA, L. P., SANTOS, F. F. P., COSTA, E., & FERNANDES, F. A. N. (2012). Production of free fatty acids from waste oil by application of ultrasound. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2(4), 309–315. <http://doi.org/10.1007/s13399-012-0056-0>

MARTINES, M. A. U., Davolos, M. R., & JAFELICCI, M. (2000). O Efeito do ultra-som em reações químicas. *Química Nova*. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v23n2/2126.pdf>, Acesso em 13/02/19

MERCANTILI, L., DAVIS, F., & HIGSON, S. P. J. (2014). Ultrasonic initiation of the alkaline hydrolysis of triglycerides (saponification) without phase catalysis. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(1), 133–141. <http://doi.org/10.1007/s11743-013-1450-8>

MORETO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos, São Paulo: Varela, p. 114-133, 1998.

NETO, S., CARLOS, J., & SANTOS, O. (2013). Graduandos do Curso de Licenciatura em Química, CES, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba. 2 Professor da Universidade Federal de Campina Grande, CES /UFCG.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, v.39, p.13-20, 2003

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JUGOVIC, Z. K., Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology*. v.100, p. 5146-5154, 2009.

OLIVEIRA, F. C. C., SUAREZ, P. A. Z., & SANTOS, W. L. P. dos. (2008). Biodiesel: Possibilidades e Desafios. *Química Nova Na Escola*, 28, 3–8. <https://doi.org/doi:10.1533/9780857097385.2.441>

OLIVEIRA, J. P. (2012). Estudo da geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento ambiental. <http://repositorio.ufes.br/bitstream/10/6135/1/Jairo%20Pinto%20de%20Oliveira.pdf>

RAMOS, L. P., KOTHE, V., CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F., MUNIZ-WYPYCH, A. S., NAKAGAKI, S., KRIEGER, N., ... Cordeiro, C. S. (2017). Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. *Revista Virtual de Química*, 9(1), 317–369. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170020>

SALVADOR, A. A.; RIBAS, C.; MASO, L.; PALHARES, S.; Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática, Trabalho de graduação para o departamento de engenharia de alimentos e engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009;

SILVEIRA, Z. de C. (2003). Análise Estatística e Otimização de Parâmetros de Projeto em Componentes de Sistemas Mecânicos. http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/262988/1/Silveira_ZildadeCastro_D.pdf

Sun, S. Y.; Xu, Y.; Wang, D.; *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 2607.

VARGAS, R.M., SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., The importance of *Química Nova* and *Journal of The Brazilian Chemical Society* for the development of chemistry in Brazil, *Journal Brazilian Chemists Society*, 9 (1): 199, 1998.

LIMA, Larissa Pinto de. Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom visando à produção de biodiesel. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ce, 2012. Cap. 3. Disponível em: <http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFC-7_da237b3dbe945f1100c2d7339df37598>. Acesso em: 13 mar. 2019.

VOET, D.; VOET, J. *Biochemistry*. 2. ed. [S.l.]: Wiley, 1995.

SOUZA, M. C. M. Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. 2013. 74 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ce, 2013.

SOUMANOU, Mohamed M.; PÉRIGNON, Marlène; VILLENEUVE, Pierre. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, [s.l.], v. 115, n. 3, p.270-285, 13 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201200084>.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.