



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
MESTRADO

**ESTUDO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE
ÓLEO DE COCO CATALISADO ENZIMATICAMENTE**

por

LIVIA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas para obtenção do
grau de mestre

Maceió-AL – Março, 2010.

ESTUDO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE COCO CATALISADO ENZIMATICAMENTE.

LIVIA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO E PESQUISA DE
PROCESSOS REGIONAIS

LINHA DE PESQUISA: PROCESSOS BIOQUÍMICOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA

MACEIÓ-AL
2010

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

R484e Ribeiro, Livia Maria de Oliveira.

Estudo do processo de produção de biodiesel de óleo de coco catalisado enzimaticamente / Livia Maria de Oliveira Ribeiro, 2010.

72 f. : il., tabs., grafs.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2010.

Bibliografia: f. 67-72.

1. Biodiesel. 2. Óleo de coco. 3. Transesterificação enzimática. I. Título.

CDU: 662.756.3

*Aos meus pais, Amadeu e Zelda, meus maiores
incentivadores, por toda dedicação e amor.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo de maravilhoso que ele proporciona em minha vida e por mais uma batalha vencida;

A minha irmã, Kalina, por ter me ajudado, mediante suborno, nas horas de cansaço e nervosismo;

Ao meu noivo, Diego, pela atenção, pelo amor e, principalmente, pela paciência;

A professora Renata pela orientação e por ter acreditado no meu trabalho;

Ao professor João Inácio pela paciência incansável e apoio dado em todos os momentos;

Ao professor Wagner por ter me ajudado a usar o software Statistica 7.0;

A professora Luciana por ter aceitado participar desta banca;

Ao Ramiro por sempre acreditar em mim e estar sempre pronto para ajudar;

A minha amiga Albanise, por dividir comigo os momentos de agonia na reta final do mestrado;

Ao pessoal do LTBA, em especial a Margarete, por sempre ter uma palavra de conforto;

A SOCOCO – Indústria Alimentícia de coco pela gentileza de fornecer o óleo de coco utilizado nessa pesquisa;

À FAPEAL – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas, pelo suporte financeiro, imprescindível para a realização deste meu objetivo profissional;

A todos que, de alguma forma, me ajudaram e me apoiaram para a realização de mais uma etapa da minha vida.

RESUMO

Atualmente a procura por combustíveis renováveis tem aumentado muito. Assim sendo, o biodiesel surge como alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua produção é mais barata e a emissão de poluentes diminui muito, além de ser uma fonte de energia renovável. A utilização dos óleos vegetais no Brasil tem um futuro promissor, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras sementes. Entre as várias oleaginosas pode-se destacar as sementes oleaginosas de soja, amendoim, coco, girassol, milho, mamona e algodão. O objetivo deste trabalho foi o estudo das variáveis que interferem na reação de transesterificação do óleo de coco para produção de biodiesel catalisada por lipase imobilizadas. As reações de transesterificação foram conduzidas em erlenmeyers fechados, mantendo-se a agitação fixa em 200rpm e catalisadas pela lipase comercial imobilizada Novozym 435, os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental 2^4 , sendo as variáveis estudadas: temperatura (40 – 60°C), concentração de enzimas (3 – 7%), razão óleo:etanol (1:6 – 1:10) e foi variado o tipo de álcool utilizado (metanol – etanol). O melhor resultado, 80,5% de conversão, foi obtido na condição de maior temperatura, maior razão molar, maior concentração de enzimas e etanol como álcool. Os rendimentos obtidos mostraram que os resultados com etanol foram mais significativos quando comparado ao metanol.

ABSTRACT

Nowadays the search for renewable fuel has increased a lot. That way, the biodiesel emerges as an alternative in relation to the petroleum and its derivatives since its production is cheaper and the emission of pollutant decreases very much, besides being a source of renewable energy. The utilization of vegetable oil in Brazil has a –future, once that Brazil is one of the biggest worldwide producers of soybean and has big expectations for the production of other seeds. Among the many oil derivates one can highlight the seeds of soybean, peanut, coconut, corn, sunflower and cotton. The objective of this work was the study of variables that interfere in the transesterification of coconut oil in the production of biodiesel in catalytic systems of immobilizes enzymes. The transesterification reactions were conducted in closed erlenmeyers, maintaining the stable agitation in 200rpm and catalyzed by commercial lipase Novozym 435. The experiment were accomplished according to a experimental planning 2⁴ where the variables studied were temperature (40-60°C), enzyme concentration (3-7%) reason oil-ethanol (1:6-1:10) and was varied the alcohol type used (methanol-ethanol). The best result, 80,5% of conversion, was obtained in the condition of highest temperature, higher molar reason, higher enzyme concentration and ethanol as alcohol. The income obtained showed that the results with ethanol were more significant when compared to methanol.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. BIODIESEL	3
2.1.1. MERCADO DE BIODIESEL NO BRASIL E NO MUNDO	4
2.1.2. VANTAGENS DO BIODIESEL NO BRASIL	5
2.2. MATÉRIAS PRIMAS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL	6
2.3. MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DO BIODIESEL	8
2.3.1. CRAQUEAMENTO	8
2.3.2. ESTERIFICAÇÃO	9
2.3.3. TRANSESTERIFICAÇÃO	10
2.4. ÓLEO DE COCO	12
2.5. ENZIMAS	13
2.6. LIPASES	15
2.7. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	16
2.8. TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	18
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. AMOSTRA	22
4.2. PRÉ TRATAMENTO DO ÓLEO DE COCO	22
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE COCO	22
4.3.1. ÍNDICE DE ACIDEZ	22
4.3.2. ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS	24
4.3.3. ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	25
4.3.4. ÍNDICE DE REFRAÇÃO	26
4.3.5. VISCOSIDADE	27
4.3.6. MASSA ESPECÍFICA	28
4.3.7. UMIDADE	29
4.3.8. PONTO DE CONGELAMENTO	30
4.3.9. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	31
4.4. ENZIMAS UTILIZADAS COMO CATALISADORES	33

4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	33
4.6. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	34
4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO	35
4.8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DO BIODIESEL DE COCO	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1. AMOSTRAS	38
5.2. PRÉ TRATAMENTO DO ÓLEO DE COCO	38
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE COCO	38
5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	40
5.5. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO	41
6. CONCLUSÃO	51
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS ANTERIORES	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de óleo de algumas oleaginosas.

Figura 2. Craqueamento térmico ou pirólise.

Figura 3. Reação de esterificação.

Figura 4. Alcoólise.

Figura 5. Transesterificação de triglicerídeos: seqüência de três reações consecutivas e reversíveis.

Figura 6. Reação de saponificação.

Figura 7. Métodos para imobilização de enzimas.

Figura 8. Refratômetro utilizado na determinação do índice de refração.

Figura 9. Sistema para determinação da viscosidade.

Figura 10. Sistema para determinação da massa específica.

Figura 11. Esquema do procedimento experimental para a reação de transesterificação enzimática.

Figura 12. Pré tratamento do óleo de coco.

Figura 13. Estudo da atividade enzimática em função da temperatura.

Figura 14. Confiança entre o modelo e os dados experimentais com 95% de confiança.

Figura 15. Distribuição dos resíduos.

Figura 16. Diagrama de Pareto com nível de significância de 5%.

Figura 17. Influência da razão molar, tipo de álcool e temperatura na variável de resposta.

Figura 18. Influência da razão molar, tipo de álcool e concentração de enzimas na variável de resposta.

Figura 19. Influência do tipo de álcool, concentração de enzimas e temperatura na variável de resposta.

Figura 20. Superfície de resposta para o rendimento em biodiesel em função da razão molar e temperatura.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das matérias primas para produção de biodiesel

Tabela 2. Área plantada, colhida e produção de frutos - 2000

Tabela 3. Principais classes de enzimas

Tabela 4. Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel

Tabela 5. Alguns exemplos de transesterificação encontrados na literatura

Tabela 6. Ácidos graxos saturados presentes nos óleos e gorduras

Tabela 7. Ácidos graxos insaturados presentes nos óleos e gorduras

Tabela 8. Principais técnicas utilizadas para planejamento experimental

Tabela 9. Valores extremos e intermediários das variáveis

Tabela 10. Quadro de experimentos

Tabela 11. Propriedades físico-químicas do óleo de coco

Tabela 12. Composição em ácidos graxos do óleo de coco

Tabela 13. Rendimentos obtidos na transesterificação do óleo de coco

Tabela 14. Coeficientes de regressão para o rendimento em biodiesel

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA)

1 INTRODUÇÃO

As crescentes preocupações econômicas e com o meio ambiente, além das previsões que as reservas de energia não renováveis cheguem ao fim nos próximos 50 anos tem incentivado a busca de novas fontes de energia tais como, energia solar, energia eólica e os biocombustíveis.

No Brasil, 39,7% da energia gerada é proveniente da queima de combustíveis derivados do refino do petróleo. É bem conhecido que o setor petroquímico é responsável por grandes danos ambientais [MME, 2005]. A extração, transporte e os processos industriais de transformação do petróleo são responsáveis por derramamentos de óleo cru, pela geração de resíduos e efluentes tóxicos de difícil degradabilidade e pela contaminação dos lençóis freáticos por gasolina e seus aditivos. Além disso, a queima de combustíveis derivados do petróleo resulta no acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa. Finalmente, as atividades industriais baseadas no petróleo não são auto-sustentáveis e seus produtos não tem como característica principal a biodegradabilidade.

Atualmente a procura por combustíveis renováveis tem aumentado muito. Assim sendo, o biodiesel surge como alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua produção é mais barata e a emissão de poluentes diminui muito, além de ser uma fonte de energia renovável.

As matérias primas para a produção de biodiesel são: óleos vegetais, gordura animal e óleos e gorduras residuais. Óleos vegetais e gorduras são basicamente compostos de triglicerídeos, ésteres de glicerol e ácidos graxos. Das várias metodologias descritas na literatura para obtenção do biodiesel, a transesterificação de óleos vegetais é atualmente o método de escolha, principalmente porque as características físicas dos ésteres de ácidos graxos são muito próximas daquelas do diesel [GERIS, *et al.*, 2007].

Transesterificação é um processo de conversão de triglicerídeos a ésteres de ácidos graxos e glicerina, através da reação com álcoois, podendo ter a presença de um ácido, uma base ou uma enzima, como catalisadores. Geralmente, para o caso da produção de biodiesel, os triglicerídeos usados são gorduras ou óleos animais e vegetais, os álcoois são etílicos ou metílicos, as bases são hidróxido de sódio ou potássio, o ácido é o sulfúrico e a enzima é a lipase, gerando como produto final os ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e a glicerina [WOLFF, *et al.*, 2008].

A metodologia comercial de obtenção de biodiesel utiliza frequentemente meios alcalinos para a transesterificação do óleo ou gordura, na presença de um álcool, produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol. Entretanto, esta metodologia apresenta alguns inconvenientes, como a dificuldade na recuperação do glicerol, o uso de catalisador alcalino que permanece no meio o tratamento posterior dos efluentes alcalinos, a natureza fortemente energética do processo, a interferência dos ácidos graxos livres e a presença de água na reação [www.biodieselbr.com].

Recentemente, foi observado que a catálise enzimática sintetiza especificamente ésteres alquílicos, permite a recuperação simples do glicerol, a transesterificação de glicerídeos com alto conteúdo de ácidos graxos, a transesterificação total dos ácidos graxos livres, a reutilização do catalisador quando usada a lipase imobilizada, e o uso de condições brandas no processo, tornando-se uma alternativa bastante atraente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

Após a crise do petróleo iniciada no final de 1973, todos os países importadores de petróleo foram prejudicados, principalmente aqueles em desenvolvimento como o Brasil. Essa crise causou uma necessidade de se obter novas fontes alternativas de energia. Uma das alternativas colocada em questão foi a utilização de óleo vegetal em substituição ao óleo diesel, pois estes óleos poluem menos e têm o poder calorífico bastante elevado. No Brasil, a opção para enfrentar esta crise se iniciou com a criação do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), porém os veículos de cunho comercial, como caminhões, ainda continuaram a utilizar o diesel como combustível [ARAUJO *et al.*, 2009].

Nos dias atuais, a procura por combustíveis renováveis tem sido bastante intensificada, de forma que o biodiesel surge como alternativa em relação aos derivados de petróleo, visando reduzir emissões de poluentes na atmosfera.

Biodiesel é o nome de um combustível de queima limpa, produzido de recursos domésticos renováveis. O biodiesel não contém petróleo, mas pode ser adicionado a ele formando uma mistura [ZHANG *et al.*, 2003]. Pode ser usado em um motor de ignição a compressão (diesel) sem necessidade de modificação. O biodiesel é simples de ser usado, biodegradável, não tóxico e essencialmente livre de compostos sulfurados e aromáticos.

Existem as seguintes definições para biodiesel [www.biodiesel.com]:

Definição geral

Combustível natural usado em motores diesel, produzido através de fontes renováveis, que atende as especificações da Agência Nacional do Petróleo - ANP.

Definição estendida

Combustível renovável derivado de óleos vegetais, como girassol, mamona, soja, babaçu e demais oleaginosas, ou de gorduras animais, usado em motores a diesel, em qualquer concentração de mistura com o diesel. Produzido através de um processo químico que remove a glicerina do óleo.

Definição técnica

Combustível composto de mono-alquilesteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais e designado B100.

Definição da legislação brasileira

Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

Para se produzir biodiesel, o óleo retirado das plantas é misturado com álcool (etanol ou metanol) e depois estimulado por um catalisador. Este processo químico é denominado de transesterificação, onde a glicerina é separada da gordura ou do óleol. O processo gera dois produtos, ésteres (o nome químico do biodiesel) e glicerina (produto valorizado no mercado de sabões). Depois, o óleo é separado da glicerina e filtrado.

O biodiesel de qualidade deve ser produzido seguindo especificações industriais restritas. Em nível internacional tem-se a ASTM D6751. Nos EUA, o biodiesel é o único combustível alternativo a obter total aprovação no Clean Air Act de 1990 e autorizado pela Agencia Ambiental Americana (EPA) para venda e distribuição [SALVADOR *et al.*, 2009] .

O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o óleo diesel em qualquer proporção. Tem aplicação singular quando em mistura com o óleo diesel de ultra baixo teor de enxofre, porque confere a este melhores características de lubricidade.

Mundialmente passou-se a adotar uma nomenclatura bastante apropriada para identificar a concentração do biodiesel na mistura. No caso de misturas a concentração de biodiesel é informada através de nomenclatura específica, definida como BX, onde X refere-se à percentagem em volume do biodiesel. Assim, B2, B5 e B20 referem-se, respectivamente, aos combustíveis com uma concentração de 2%, 5% e 20% de biodiesel adicionado ao diesel [FANGRUI *et al.*, 1999].

Até hoje, a produção de energia sempre esteve nas mãos das grandes potências mundiais. Agora, pela primeira vez na história, tem-se a possibilidade concreta de que pequenos produtores e pequenas empresas possam fazer parte desta indústria, inclusive nos centros urbanos.

A descentralização da produção de energia, incluindo as pequenas usinas produtoras, que cumpriram objetivos sócio-econômicos de inclusão social, desenvolvimento tecnológico, diminuição da dependência energética, todos importantes para o país, serve de estímulo para a produção entre mais produtores e diferentes matérias-primas, contribuindo para tornar o mercado mais livre e competitivo.

Através do seu efeito multiplicador, o biodiesel representará no mercado futuro uma nova etapa para a agroindústria, por envolver a produção de óleos vegetais, álcool e mais os insumos e co-produtos da produção dos ésteres.

2.1.1 Mercado de biodiesel no Brasil e no mundo

A Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 preve que, em 2013, todos os veículos de transporte de cargas do Brasil serão obrigados a usar o combustível conhecido como B5, ou seja, uma composição de 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel. Para essa adequação, as mudanças serão graduais. Nos primeiros três anos, a proporção de biodiesel no óleo diesel será de 2% em caráter experimental, sendo posteriormente ampliada até a obrigação do uso, em 5%. Essas projeções fazem parte do Programa Nacional de Biodiesel, que foi criado juntamente com a lei.

A quantidade de matéria-prima para o biodiesel brasileiro é extremamente grande. As regiões mais quentes do país são propícias para o cultivo de mamona, dendê (palma), babaçu, amendoim, pinhão manso, girassol, algodão, coco e soja. Todos esses frutos podem ser transformados em biodiesel. Entre as plantas cultivadas no Brasil, o dendê e o pinhão manso têm a melhor produtividade de óleo por hectare [SALVADOR, 2009].

O dendê (também conhecido como palma), produz de 3 a 6 toneladas de óleo por hectare cultivado. O pinhão manso, 1 a 6 toneladas de óleo por hectare. As duas plantas, junto com a mamona (cuja produtividade é de 0,5 a 0,9 t/ha), são as principais alternativas do programa. O sucesso não é só pelo ótimo desempenho produtivo, mas também porque tais plantas são cultivadas por médios e pequenos agricultores espalhados pelo país. Assim, incentivando a produção do biodiesel, o governo deseja manter as populações no campo e aumentar a renda dessas famílias.

Para as contas nacionais, o biodiesel pode ser uma alternativa para diminuir a dependência brasileira do óleo diesel, já que o país importa cerca de 10% de todo o óleo que consome o que custa US\$ 800 milhões ao ano. E o óleo diesel, usado tanto em caminhões como em carros de passeio, é o combustível mais consumido no país, registrando 56% do mercado [SALVADOR *et al.*, 2009].

Com o biodiesel, o Brasil também quer gerar dividendos ecológicos financeiros, participando mais efetivamente do mercado de certificados de carbono, ou seja, de títulos financeiros voltados para a diminuição da emissão de carbono na atmosfera, um dos principais causadores do efeito estufa.

Entretanto, existem alguns pesquisadores que considera que o biodiesel, assim como o etanol, pode vir a tornar-se ameaça ambiental, já que o grande aumento de áreas cultivadas forçará a diminuição das reservas naturais e provocará possíveis modificações no solo.

2.1.2 Vantagens do biodiesel no Brasil

Estratégicas

- Biodiesel é um substituto do óleo diesel, principal combustível consumido pelo país (mais de 36 bilhões de litros em 2002), [www.biodieselbr.com];
- Pode gerar a substituição de um combustível fóssil (diesel) por um renovável (Biodiesel);
- A utilização do biodiesel reduz a dependência externa do Brasil em relação ao seu combustível de maior consumo (cerca de 20% do óleo diesel consumido é importado diretamente como derivado);
- O biodiesel pode fortalecer o agronegócio e promover o crescimento regional sustentado.

Econômicas e Sociais

- O biodiesel é um combustível renovável, cujo processo produtivo gera um grande número de empregos na área rural;
- A redução das emissões gasosas com o uso do biodiesel, principalmente nas grandes cidades, representa significativa melhora para a saúde pública.

Ambientais e Energéticas

- A utilização do biodiesel representa ganho ambiental significativo, tanto no que se refere a redução das emissões, ao uso em motores ciclo diesel, quanto ao balanço de CO₂ emitido na queima e absorvido pela biosfera;
- A utilização do biodiesel apresenta redução de emissões de CO₂, reduzindo o efeito estufa: 1 tonelada de biodiesel significa uma redução de 2,5 toneladas de CO₂ [PRADO, *et al.*, 2006].
- A utilização do biodiesel apresenta diluição de contaminantes quando usado em mistura com o óleo diesel, como por exemplo, o teor de enxofre.

Tecnológicas

- O biodiesel, misturado com o óleo diesel, tende a melhorar as características deste derivado de petróleo – aumenta a lubricidade (importante para o óleo diesel de baixo teor de enxofre), reduz o teor de enxofre e eleva o número de cetano.

2.2 MATÉRIAS PRIMAS PARA OBTENÇÃO DO 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.

As principais origens e obtenção dessas matérias primas são descritas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. 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	Agriculturas temporárias e permanentes	Extração mecânica, com solventes e extração mista
Óleos e residuais de fritura	Cocções comerciais e industriais	Acumulações e coletas

Fonte: SALVADOR, 2009

A utilização dos óleos vegetais no Brasil tem um futuro promissor, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras sementes. Entre as várias oleaginosas que se têm 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 (Figura 1) [VARGAS *et al.*, 1998].

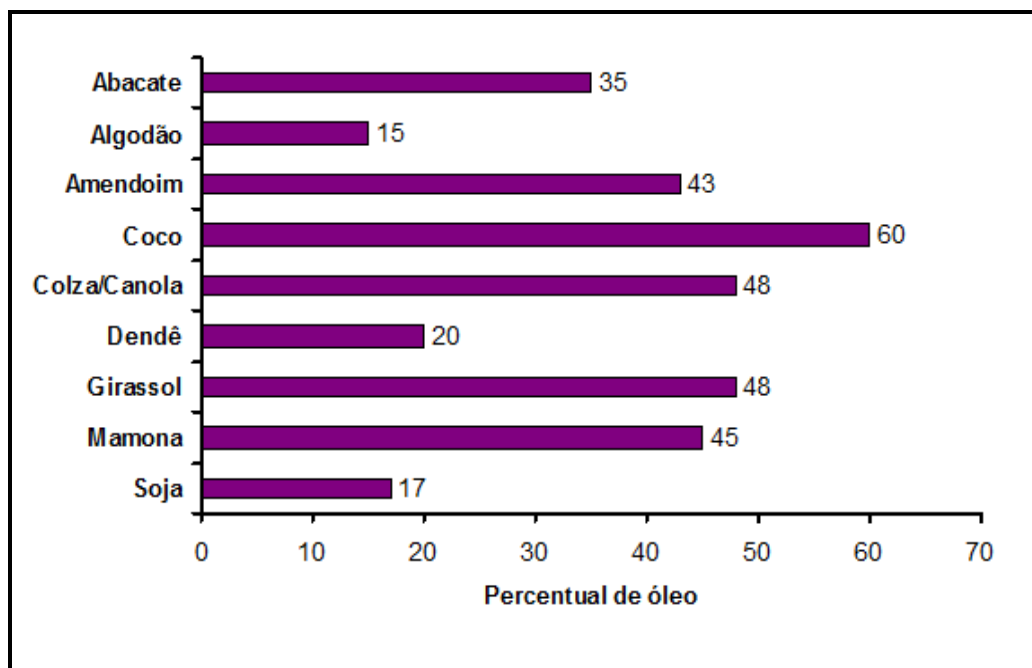


Figura 1. Percentual de óleo de algumas oleaginosas.

Dentre as principais matérias primas para o biodiesel no Brasil, destaca-se o dendê ou palma. O dendê se apresenta como uma das mais importantes culturas sob o ponto de vista de produção de óleo, pois atinge o extraordinário patamar de 5.000 kg de óleo por hectare por ano, índice este, por exemplo, cerca de 25 vezes maior que o rendimento de produção de óleo da soja. As maiores dificuldades se referem as limitações de tempo inerentes as culturas permanentes, pois são requeridos a realização de investimentos que somente começam a retornar cinco anos contados a partir do plantio.

O pinhão manso produz o biodiesel mais eficiente do mundo, embora não seja muito explorado no Brasil. Concentra em seus frutos até 40% de óleo, e ocorre espontaneamente em áreas de solos pouco férteis e de clima desfavorável a maioria das culturas alimentares tradicionais. O pinhão manso pode ser considerado uma das mais promissoras oleaginosas do sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil.

Dentre as gorduras e óleos animais com potencial para produção de biodiesel, destacam-se o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó, a banha de porco, entre outros. Os óleos e gorduras de animais possuem estruturas químicas semelhantes as dos óleos vegetais, sendo moléculas triglicéridicas de ácidos graxos. As diferenças estão nos tipos e distribuições dos ácidos graxos combinados com o glicerol.

Também são surpreendentes os volumes ofertados de sebo de animais, especialmente de bovinos, nos países produtores de carnes e couros, como é o caso do Brasil. Tais matérias primas são ofertadas, em quantidades substantivas, pelos curtumes e pelos abatedouros de animais de médio e grande porte. O sebo bovino é a matéria prima mais barata dentre as disponíveis atualmente para a produção de biodiesel no Brasil.

Os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial também podem ser utilizados como matéria prima. As possíveis fontes de óleos e gorduras residuais são: as lanchonetes, cozinhas industriais, comerciais e domésticas, onde são praticadas as frituras de alimentos, indústrias nas quais processam frituras de produtos alimentícios, os esgotos municipais, onde a nata sobrenadante é rica em matéria graxa, possível de extrair óleos e gorduras, e águas residuais de processos de certas indústrias alimentícias, como as indústrias de pescados, de couro, etc.

2.3 MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DO BIODIESEL

O biodiesel, um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, pode ser obtido por diferentes processos tais como: craqueamento, esterificação e transesterificação.

2.3.1 Craqueamento

O craqueamento térmico ou pirólise é o processo que provoca a quebra de moléculas por aquecimento a altas temperaturas, isto é, pelo aquecimento da substância na ausência de ar ou oxigênio a temperaturas superiores a 450°C, formando uma mistura de compostos químicos com propriedades muito semelhantes às do diesel de petróleo [WEISZ *et al.*, 1979].

Em algumas situações esse processo é auxiliado por um catalisador para a quebra das ligações químicas, de modo a gerar moléculas menores (Figura 2).

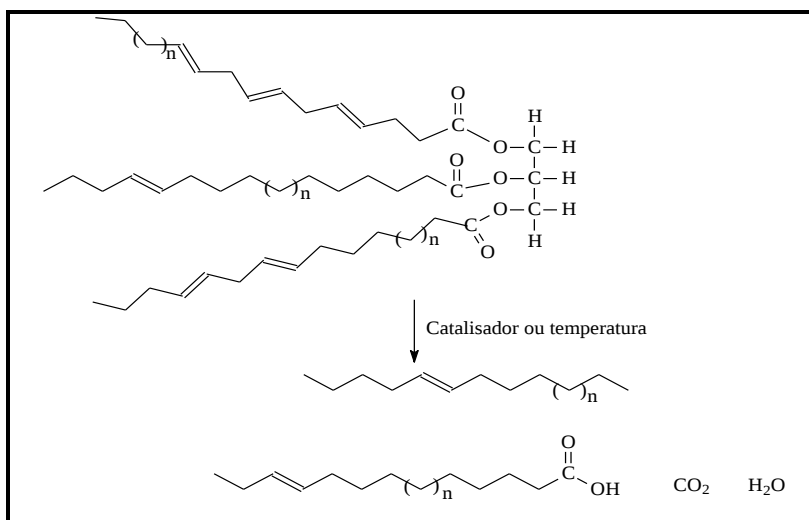


Figura 2. Craqueamento térmico ou pirólise. Fonte: SUAREZ, 2007.

O craqueamento não é um método muito utilizado para a produção de biodiesel, pois este processo tem custos elevados para uma produção em pequena escala e o rendimento é baixo se comparado com os da transesterificação e esterificação.

2.3.2 Esterificação

A reação de esterificação é um processo reversível, obtendo como produto principal um éster específico. Entre os diversos métodos que podem ser utilizados para sintetizar os ésteres, um bom exemplo é a reação de esterificação de Fischer (1895), na qual, sob aquecimento, um ácido carboxílico reage com um álcool, produzindo éster e água (Figura 3).

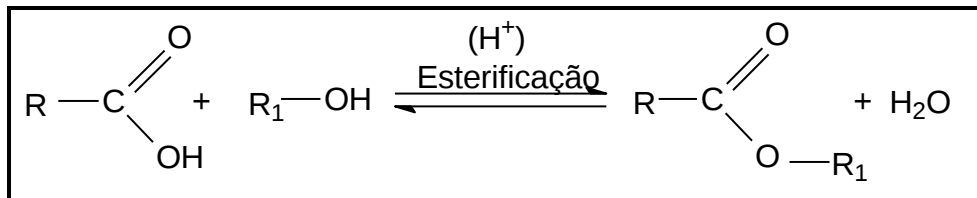


Figura 3. Reação de esterificação. Fonte: SILVA, 2008.

Esta reação, quando processada em temperatura ambiente, é lenta, mas pode ser acelerada com o emprego de aquecimento e/ ou catalisador (exemplo, o ácido sulfúrico H_2SO_4).

Conforme esquema global da reação, em um dado tempo, os produtos e reagentes entram em equilíbrio químico e, nesse momento, as velocidades das reações de formação dos produtos e de formação dos reagentes se mantêm constantes. O emprego de um catalisador e/ou o aumento da temperatura se tornam úteis para que o equilíbrio seja estabelecido mais rapidamente.

No entanto, o éster obtido pode reagir com a água (reação de hidrólise), gerando novamente ácido carboxílico e álcool; porém, a reação inversa é mais lenta. A hidrólise do éster em meio básico é denominada saponificação - do latim, *sapo* = sabão.

O processo de esterificação ocorre preferencialmente com álcoois de baixo peso molecular, sendo metanol o mais usado devido ao seu baixo custo de aquisição. O etanol utilizado na esterificação não necessita ser anidro uma vez que, geralmente a água pode ser retirada do sistema reacional. Entretanto, há uma grande dificuldade de encontrar na literatura dados termodinâmicos para a esterificação com os ácidos graxos, de alto peso molecular, e dos ésteres envolvidos nessas reações, importantes para a produção do biodiesel [www.biodiesel.gov.br].

2.3.3 Transesterificação

Das várias metodologias descritas na literatura para obtenção do biodiesel, a transesterificação de óleos vegetais é atualmente o método de escolha, principalmente porque as características físicas dos ésteres de ácidos graxos são muito próximas daquelas do diesel [MEHER *et al.*, 2004; MA *et al.*, 1999].

Além disso, este processo relativamente simples reduz a massa molecular para um terço em relação aos triglicerídeos, como também reduz a viscosidade e aumenta a volatilidade [SCHUCHARDT *et al.*, 1998].

Transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas onde um éster é transformado em outro através da troca do resíduo alcóxila [SCHUCHARDT *et al.*, 1998; PINTO *et al.*, 2005]. Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é denominado alcoólise (Figura 4). Esta reação é reversível e prossegue essencialmente misturando os reagentes. Contudo, a presença de um catalisador (ácido, base ou enzima) acelera consideravelmente esta conversão, como também contribui para aumentar o rendimento da mesma [MEHER *et al.*, 2004].

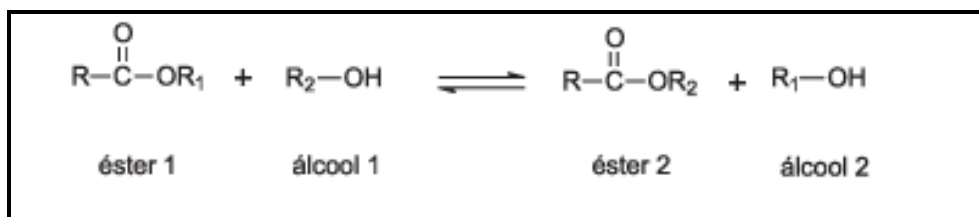


Figura 4. Alcoólise. Fonte: GERIS, 2007.

Na transesterificação dos óleos vegetais, um triglicerídeo reage com um álcool na presença de um catalisador, que pode ser um ácido, uma base forte ou uma enzima, produzindo uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e de glicerol. O processo total é uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis, em que di- e monoglicerídeos são formados como intermediários (Figura 5). Para uma transesterificação estequiometricamente completa, uma proporção molar 3:1 de álcool por triglicerídeo é necessária.

Entretanto, devido ao caráter reversível da reação, o agente transesterificante (álcool) geralmente é adicionado em excesso contribuindo, assim, para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado.

A reação de transesterificação é uma reação reversível, e necessita de excesso de álcool para deslocar o equilíbrio para direita. Os álcoois de cadeia curta (de 1 a 4 carbono) são os mais utilizados na reação, sendo no Brasil, o uso do etanol o mais vantajoso, pois este é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido através da biomassa, tornando o processo totalmente independente de petróleo e totalmente agrícola [FERRARI *et al.*, 2005].

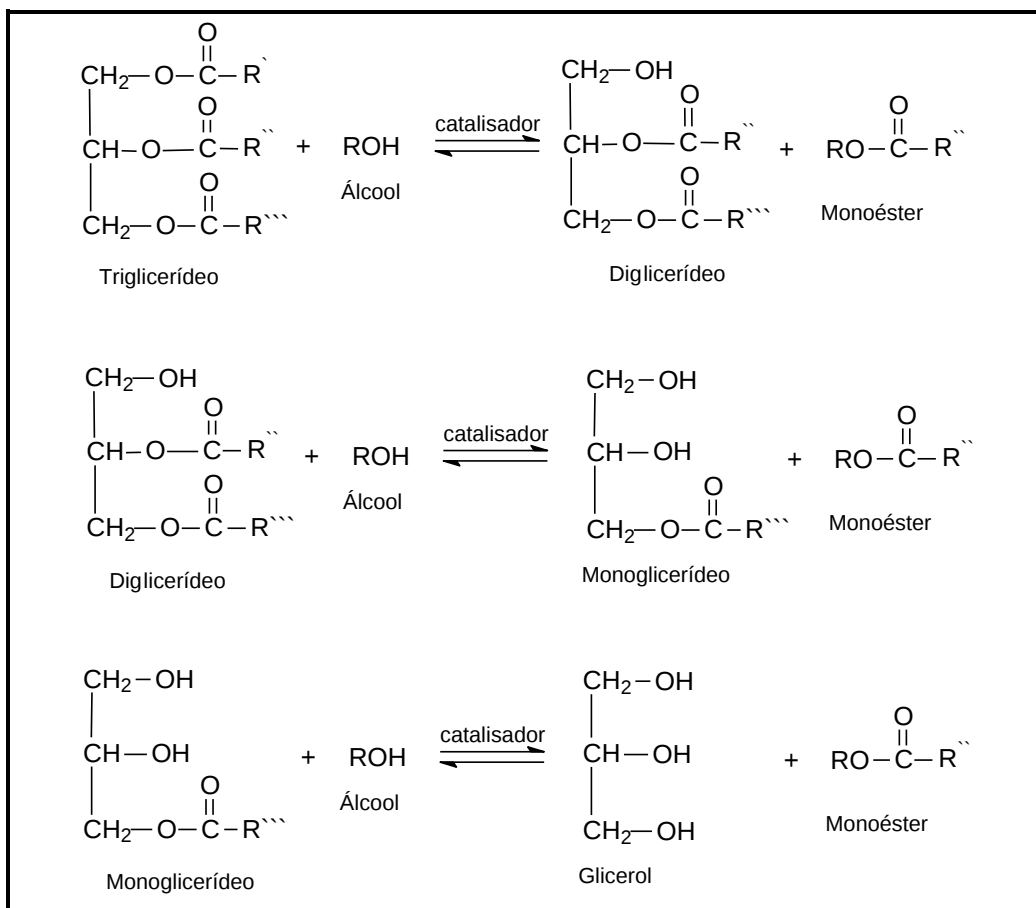


Figura 5. Transesterificação de triglicerídeos: sequência de três reações consecutivas e reversíveis. Adaptado de MA, 1999.

A reação de transesterificação pode ser realizada tanto em meio ácido como em meio básico ou utilizando enzimas [SALVADOR, 2009].

Entre os catalisadores básicos estão os hidróxidos de metais alcalinos, carbonatos e alcóxidos de metais alcalinos (metóxido de sódio, etóxido de sódio, propóxido de sódio e butóxido de sódio). A maior parte dos trabalhos descritos na literatura emprega catalisadores básicos, tais como KOH e NaOH onde foram observados maior rendimento e seletividade [FREDDMAN *et al.*, 1986].

Ácido sulfúrico, ácidos sulfônicos e ácido clorídrico são geralmente empregados como catalisadores ácidos [GERIS, 2007].

A conversão enzimática de óleos vegetais em biodiesel oferece uma opção ambientalmente mais atrativa que os processos convencionais [MODI *et al.*, 2006]. Recentemente, o uso de lipases como catalisadores para produção de biodiesel vem apresentando grande interesse devido às suas condições operacionais ambientalmente amigáveis. Entretanto, alguns álcoois, tais como metanol, podem diminuir a estabilidade das lipases e/ou inativá-las.

Vale ressaltar que a reação utilizando catalisador básico com o álcool leva à formação de água e poderá levar à hidrólise de algum éster produzido, com conseqüente formação de sabão (Figura 6). Esta saponificação indesejável reduz o rendimento do éster e dificulta consideravelmente a recuperação do glicerol, devido à formação de emulsão. Além disso, o consumo do catalisador reduz a eficiência da reação.

Portanto, para uma transesterificação catalisada por bases, ambos os óleos e álcool devem ser isentos de água [MA *et al.*, 1999]. Um baixo teor de ácidos graxos livres no óleo também é necessário se o processo de alcoólise ocorrer por catálise básica. Óleos vegetais que contenham alto teor de ácidos graxos livres ou água devem ser processados via catálise ácida.

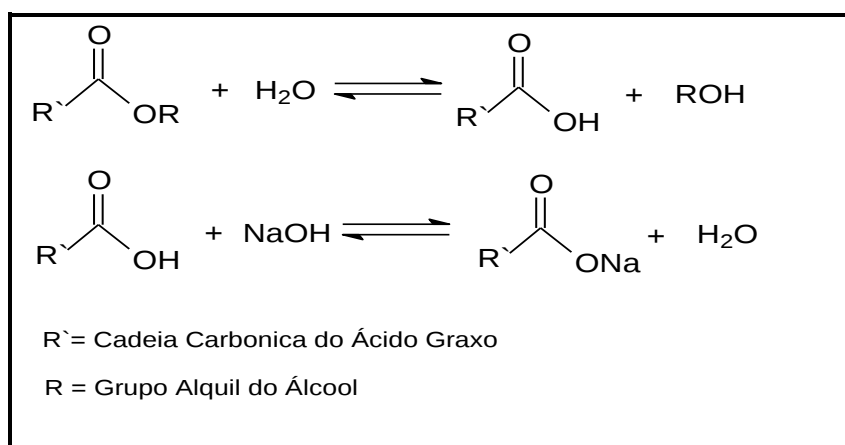


Figura 6. Reação de saponificação.

2.4 ÓLEO DE COCO

Cultura típica de clima tropical, o coqueiro vem sendo cultivado em cerca de 90 países. No Brasil, o cultivo do coco se desenvolve principalmente ao longo do litoral, sendo encontrado em áreas desde o Estado do Pará até o Espírito Santo. As estatísticas atuais demonstram que o Brasil possui mais de 266 mil hectares implantados com a cultura, praticamente em quase todas as Unidades da Federação. Em 2007, conforme dados do IBGE, a Bahia figurava como o maior produtor brasileiro, com 405.842 mil frutos, seguido pelo Ceará, com produção de 202.128 frutos e o Pará, com 173.846 mil frutos colhidos (Tabela 2).

Nesse mesmo ano, três estados nordestinos (Bahia, Ceará e Sergipe) chegaram a concentrar juntos, 52,9% da produção nacional de coco, evidenciando, portanto, o destaque da Região Nordeste nesse segmento agrícola.

Tabela 2. Área plantada, colhida e produção de frutos – 2007.

Estados	Área Plantada (ha)	Área Colhida (ha)	Produção (mil frutos)
Bahia	101.380	87.886	405.842
Ceará	48.427	48.427	202.128
Pará	28.195	27.947	173.846
Espírito Santo	10.996	10.895	152.487
Sergipe	56.831	56.830	101.996
Brasil	377.688	375.422	1.804.522

Fonte: IBGE

O coqueiro (*Cocos Nucifera* L.), originário do Sudeste asiático, foi introduzido no Brasil em 1553, onde se apresenta naturalizado em longas áreas da costa nordestina, proporcionando abundante matéria-prima tanto para as agroindústrias regionais quanto para uso alimentício.

O conteúdo de óleo na polpa é superior a 60%, o que equivale a uma produção de 500 a 3000 Kg de óleo/ha [MAZZANI, 1963]. Quanto aos ácidos graxos, 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 [BALACHANDRAN *et al.*, 1985].

2.5 ENZIMAS

Todas as reações químicas buscam o equilíbrio, mas a velocidade é frequentemente baixa. Para acelerar estas reações, as células possuem substâncias chamadas *enzimas*. As enzimas funcionam como agentes catalíticos e são específicas a uma reação química particular. Algumas são capazes de aumentar a velocidade de uma reação química em média 10^9 a 10^{12} vezes a velocidade da reação, transformando de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação. Atuam em concentrações muito baixas e em condições suaves de temperatura e pH.

Diferente dos catalisadores inorgânicos, as enzimas são substâncias orgânicas produzidas por células vivas. Também diferem dos catalisadores inorgânicos em especificidade; isto é, uma enzima particular somente catalisa um certo tipo de reação. Em contraste, cada catalisador inorgânico participa de muitos tipos diferentes de reações.

A velocidade de uma reação enzimática é influenciada pela concentração do substrato, pH, concentração da enzima, temperatura e presença de ativadores ou inibidores. Esses fatores afetam a atividade e podem dificultar a conversão de reagentes em produtos [SALVADOR, *et al.*, 2009]. O aumento da quantidade de enzima favorece o aumento da velocidade da reação, entretanto existe um limite onde com o acréscimo da enzima a taxa de formação de produto permanece constante.

As enzimas possuem um “sítio ativo”, onde se processam as reações químicas. Este é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia da proteína que se encontram em íntima e mútua proximidade espacial. Acredita-se que os aminoácidos que constituem o centro ativo formam na superfície da enzima uma espécie de “fenda”, na qual o substrato pode justar-se. Esta fenda deve possuir um formato definitivo, que acomoda algumas moléculas, como os substratos e inibidores, mas rejeita outras espécies e impeça-os de entrar em contato ativo com a enzima. Esta é mais uma explicação para a especificidade enzimática e a razão por que as estruturas secundárias e terciárias são importantes para a atividade da enzima. Elas determinam a forma global da molécula, e em particular, geram o centro ativo, que de outra maneira seria uma fileira uniforme de resíduos de aminoácidos [NELSON, *et al.*, 2000].

As enzimas não alteram o equilíbrio das reações, mas atuam reduzindo a energia livre de ativação. Alguns inibidores combinam-se com estas através de grupos funcionais fora do centro ativo, dificultando o acesso do substrato, causando mudanças na conformação da proteína e reduzindo a habilidade em diminuir a energia de ativação. Estes efeitos não são revertidos pelo aumento da concentração do substrato [NELSON, *et al.*, 2000].

Embora existam milhares de tipos de enzimas, elas podem ser agrupadas em seis classes principais, dependendo do tipo geral de reação que catalisam. Essas classes são: Oxirredutases, Transferases, Hidrolases, Liasas, Isomerases e Ligases. O nome de qualquer enzima sempre tem o sufixo -ase e é usualmente baseado na reação química particular que ela catalisa (Tabela 3).

Como o mecanismo celular dos sistemas vivos, animais, vegetais e microrganismos, dependem das enzimas, a fonte primária destas são tecidos animais (glândulas, principalmente), tecidos vegetais (sementes, frutas) e culturas de microrganismos, quer se fazendo uso de cultivo total, quer extraindo as enzimas do meio de cultura de bactérias, fungos e leveduras.

Não é de admirar, portanto, que a maior parte das enzimas produzidas industrialmente tenha aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais (principalmente alimentos), na produção de medicamentos (vitaminas, hormônios) e na produção de derivados de matérias primas animais e vegetais. Em todos os casos de aplicação citados, se trata, fundamentalmente, de imitar tecnologicamente o que é feito na natureza, embora em escala condicionada à necessidade e vontade do homem.

Tabela 3. Principais classes de enzimas.

Nome da Classe	Algumas Subclasses	Tipos de Reações Catalisadas
Oxirredutases	Desidrogenases	Formação de ligação dupla por eliminação de H ₂
	Oxidases	Oxidação
	Redutases	Redução
Transferases	Quinase	Transferência de um grupo fosfato
	Transaminase	Transferência de um grupo amino
Hidrolases	Nucleases	Hidrólise de um grupo fosfato
	Lipases	Hidrólise de um grupo éster
	Proteases	Hidrólise de um grupo amido
Liases	Descarboxilases	Eliminação de CO ₂
	Desidrases	Eliminação de H ₂ O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico
Ligases	Carboxilases	Adição de CO ₂
	Sintetases	Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

2.6 LIPASES

Lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triglicerídeos aos ácidos graxos correspondentes e glicerol [HOSHINO *et al.*, 1990].

Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microorganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Em geral, os microorganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucos*, *Candida Rugosa* e *Candida Antarctica* [FACCIO, *et al.*, 2003].

Quanto às propriedades físico-químicas, as lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. A maioria delas apresenta atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C, sendo que sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem [CASTRO, *et al.*, 2004].

Em geral, as lipases são ativas em uma ampla faixa de valores de pH, apresentando uma alta atividade da faixa de pH 5-9 [MACRAE e HAMOND, 1985; FACCIO, 2004].

Mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases (proteases, carbohidrolases e lipases), sendo que 5-10% cabem as lipases. As lipases são extremamente versáteis, pois catalisam várias reações e diversos substratos, quando comparadas às outras hidrolases [GANDHI, 1997; FACCIO, 2004].

A utilização de lipases e de enzimas em geral em escala industrial apresenta diversas vantagens relativamente a catálise química e aos catalisadores em geral [VILLENEUVE, 2007; SOO *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 2001]. Dentre elas, pode-se citar a sua elevada seletividade; a diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentícia; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Além disso, lipases são aceitas ecologicamente, não estão limitadas a seu papel natural e podem catalisar um grande espectro de reações. Entretanto, algumas desvantagens podem limitar a utilização destes catalisadores, como o alto custo de isolamento e purificação, a possibilidade de causar alergias, a instabilidade da sua estrutura uma vez isolada do meio natural (aquoso), e sua sensibilidade às condições reacionais: enzimas podem ser inibidas por substâncias que estão presentes no meio reacional, desnaturadas por solventes orgânicos ou por temperaturas relativamente elevadas [FABER, 2004]. Muitos métodos têm sido propostos a fim de minimizar estes inconvenientes, sendo um deles a imobilização de enzimas sobre suportes sólidos. No futuro, as lipases serão os catalisadores escolhidos para produção de biodiesel [AKOH *et al.*, 2007].

2.7 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade [MATEO *et al.*, 2007]. Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. A imobilização de enzimas apresenta diversas vantagens sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacamos: 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]. O uso das enzimas na sua forma imobilizada permite o reuso desse biocatalisador várias vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido.

A imobilização pode ocorrer de diferentes maneiras. No caso de lipases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência.

Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico, quando ligações covalentes com formação de ligação cruzada são formadas com a lipase, e o método físico, quando interações fracas ou retenção mecânica é utilizada (Figura 7). No método físico a lipase pode ficar retida ou microencapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes [DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004].

As atividades catalíticas e outras características das enzimas podem mudar dependendo do tipo de retenção (química ou física), da força da interação entre a enzima e o suporte utilizado que pode, em alguns casos, causar distorções estruturais na proteína. Ainda, a atividade catalítica da enzima em um determinado suporte pode ser alterada, aumentando ou diminuindo devido à fragmentação do suporte pela interação do sistema de agitação e o suporte [DABDOUB, *et al.*, 2009].

Assim, durante a reação, a enzima pode ser removida do suporte devido a essa interação promovendo a “perda de atividade” no reuso, devido à lixiviação e não à inativação da enzima [YADAV e JADHAV, 2005]. Por outro lado, se essa lixiviação não ocorrer e a enzima permanecer ligada ao suporte, o aumento da superfície de contato poderá ajudar no aumento da transferência de massa, aumentando consequentemente a eficiência da enzima como catalisador.

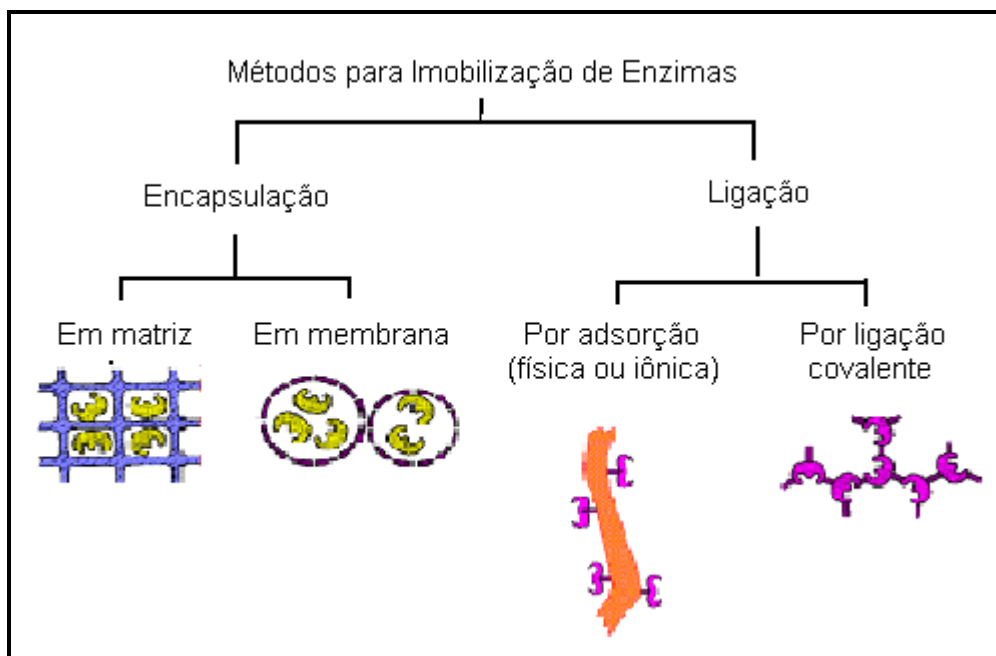


Figura 7. Métodos para Imobilização de Enzimas. Fonte: COSTA NETO, 2002; DALLA-VECCHIA, 2004.

Lipases de diversas fontes têm sido imobilizadas e usadas na produção de biodiesel, porém as mais utilizadas pela maioria dos pesquisadores foram obtidas de *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosus* [JEGANNATHAN *et al.*, 2008].

2.8 TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A obtenção de biodiesel por meio da catálise enzimática ocorre através da transesterificação dos triglicerídeos a partir da reação com um álcool, que pode ser metanol ou etanol, na presença de um catalisador enzimático (lipases), resultando na produção de alquilésteres dos ácidos graxos presentes na mistura que compõe o óleo vegetal ou a gordura animal utilizada.

Atualmente, o processo de produção comercial de biodiesel é por via química, mas a enzimática tem despertado o interesse da comunidade científica. Embora os processos de transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel, ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados tem sido reportados em artigos e patentes. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microorganismo que gera a enzima, novas tecnologias em imobilização, etc.), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais [COSTA NETO, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003].

Entretanto, uma vez otimizado o processo enzimático, este poderá apresentar algumas vantagens em relação ao químico (Tabela 4).

Tabela 4. 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 catalisador; - 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

Dos exemplos mais recentes encontrados na literatura, para obtenção do biodiesel oriundos da transesterificação de óleos ou gorduras utilizando lipases, observa-se que a maioria dos estudos utiliza metanol como receptor do grupo acila, isto porque ele é mais reativo, produz ésteres mais voláteis e, no mercado internacional, é mais barato, quando se comparado a outros álcoois de cadeia curta.

Entretanto, devido a sua toxicidade e devido ao fato do metanol ser produzido a partir do petróleo, alguns autores estão estudando outros álcoois como o etanol, propanol, isopropanol e butanol para a produção de ésteres componentes do biodiesel. O etanol tem maior preferência, pois é considerado renovável [AKOH *et al.*, 2007].

Os ésteres componentes do biodiesel são produzidos, em sua grande maioria, utilizando enzimas comerciais [AKOH, *et al.*, 2007]. Os tempos de reação encontrados na literatura estão entre 8 a 24h para conversões acima de 70%. Os principais fatores que afetam o rendimento destas reações são: razão molar óleo:álcool, tipo do álcool, temperatura de reação, quantidade de água e pureza do óleo ou da gordura.

Alguns exemplos de transesterificação (etanólise ou metanólise) de óleos e gorduras catalisada por lipases podem ser encontrados na Tabela 5.

Tabela 5. Alguns exemplos de transesterificação encontrados na literatura.

Tipo de óleo ou gordura	Catalisador	Álcool utilizado	Rendimento (%)	Referência
Girassol	PPL e CRL*	Metanol	25 (PPL), 40 (CRL) 3h	SAGIROGLU, 2008.
Girassol	<i>Aspergillus Oryzae</i>	Metanol	93,6 (8h)	CHEN, <i>et al.</i> , 2008.
Gordura animal	<i>Candida sp.</i>	Metanol	87,4 (10h)	LI, <i>et al.</i> , 2007.
Óleo de semente de algodão	<i>Candida antartica</i>	Metanol	97 (24h)	ROYON, <i>et al.</i> , 2007.
Óleo de soja	<i>Candida antartica</i>	Etanol	59 (1h)	BERNARDES, <i>et al.</i> , 2007.
Óleo de mamona	<i>Candida antartica</i> (Novozym 435)	Etanol	82 (6h)	FACCIO, 2004.
Óleo de soja	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Metanol	67 (1h)	NOUREDINI, <i>et al.</i> , 2005.

*PPL: Lipase do pâncreas do porco, CRL: lipase de *Candida Rugosa*.

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente não apenas afeta a atividade e estabilidade da enzima, como também modifica a sua especificidade. Altas quantidades de álcool têm inibido ou desnaturado lipases nos processos de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos ou metílicos. Os solventes menos nocivos as enzimas são aqueles hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima [FACCIO, 2004].

Os fatores quantidade de água e temperatura, nestas e em outras reações com transferência de grupos acila, é mais dependente do tipo de enzima. Valores em porcentagens de água (de 4 a 30%) e temperaturas entre 30 e 60°C são relatados para reações de transesterificação para produção de ésteres componentes do biodiesel [AKOH *et al.*, 2007].

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é usado em meio orgânico. Embora a atividade de água em um sistema enzimático típico em meio orgânico seja muito baixa (em torno de 0,01% p/v), pequenas variações no conteúdo de água pode provocar várias modificações na atividade enzimática, pois o excesso de água facilita a agregação das enzimas provocando assim o decréscimo da atividade.

As enzimas são praticamente inativas em sistemas completamente anidros. Admite-se que a enzima requer uma pequena camada de água, que atua como componente primário do microambiente da mesma, atuando como um tampão entre a superfície da enzima e seio do meio reacional, assim sendo, a biocatálise em meio orgânico é possível desde que se conserve esta pequena quantidade de água indispensável a enzima [DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; FACCIO, 2004].

Com relação a pureza do óleo ou da gordura, a literatura relata que óleos de fritura, bruto e de refinarias contêm ácidos graxos livres, fosfolipídeos e outras impurezas que podem inativar a lipase durante a transesterificação. WATANABE *et al.* (2001) compararam a transesterificação de um óleo de soja não degomado e degomado. A lipase de *Candida antarctica* não catalisou a reação para o primeiro caso e para o óleo degomado, a conversão foi de 94% após 24h.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo estudar a produção de biodiesel catalisada pela enzima imobilizada de *Candida antarctica* a partir de óleo de coco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do óleo de coco usado como matéria prima;
- Realizar reações de transesterificação, obtendo assim o biodiesel;
- Fazer um estudo do processo de produção de biodiesel a partir do óleo de coco utilizando-se a ferramenta Statistica 7.0.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

As amostras do óleo bruto de coco foram gentilmente cedidas pela SOCOCO S/A Indústria Alimentícia de Coco, localizada na cidade de Maceió-AL.

Segundo a empresa fornecedora, a extração do óleo de coco foi feita por prensagem mecânica, sendo este óleo extraído da polpa desidratada. Os cocos existentes nessa empresa são de diferentes variedades, tais como: coco anão, coco gigante e coco híbrido.

4.2 PRÉ TRATAMENTO DO ÓLEO DE COCO

O pré-tratamento para purificação do óleo de coco adquirido foi realizado através do processo de filtração, utilizando fibra vegetal (algodão) como meio filtrante, com o objetivo de reter os resíduos sólidos em suspensão.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE COCO

Foram realizadas análises no sentido de caracterizar o óleo de coco, com o intuito de utilizá-los como matéria prima para a produção de biodiesel.

Os seguintes parâmetros foram determinados através de análises físico-químicas:

- Índice de acidez;
- Índice de iodo;
- Índice de saponificação;
- Índice de refração;
- Viscosidade;
- Densidade;
- Umidade;
- Ponto de congelamento;
- Composição em ácidos graxos.

4.3.1 Índice de Acidez

O índice de acidez é definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama da amostra. A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio.

Os resultados desse tipo de análise são frequentemente expressos em termos de índice de acidez, podendo expressar também em mL de solução normal por cento ou em g do componente ácido principal, geralmente o ácido oléico. Os regulamentos técnicos costumam adotar esta última forma de expressão da acidez.

O método é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e animais, e gorduras animais.

O procedimento adotado para determinação do índice de acidez é descrito a seguir de forma simplificado estando de acordo com o método oficial da AOCS (Cd 3d-63) [AOCS, 1997].

Reagentes:

Solução 1:1 de álcool etílico e tolueno P.A.;

Fenolftaleína a 1%;

Biftalato de Potássio;

Hidróxido de potássio ou de sódio 0,1mol/L ou 0,01 mol/L (padronizado).

Procedimento:

O índice de acidez foi determinado pesando cerca de 1 grama do óleo em dois erlenmeyers com capacidade de 125 mL.

Adicionou-se 10 mL da solução (1:1) álcool etílico e tolueno nos erlenmeyers contendo óleo e a um terceiro sem amostra (para que se faça a prova em branco).

Em seguida, adicionou-se 4 gotas de fenolftaleína 1% (indicador de viragem), em todos os erlenmeyers.

A solução pode ser titulada com hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) numa concentração de 0,01 mol/L ou 0,1 mol/L.

A titulação foi finalizada quando se formar uma cor rósea, onde essa cor deve persistir por, no mínimo, 30 segundos.

Cálculos:

Para o cálculo de Índice de acidez foi utilizado a seguinte expressão:

Em % de ácido oléico:

$$I.A.(%) = \frac{V \times M \times f \times 0,282 \times 100}{m} \quad (1)$$

Onde:

V = volume de NaOH ou KOH gasto pela amostra (mL);

M = molaridade do NaOH ou KOH;

f = fator de correção: 1,4;

m = massa pesada da amostra (g);

O resultado obtido em % de ácido oléico foi utilizado neste trabalho, afim de comparar este com os valores da literatura,

4.3.2 Índice de Iodo pelo Método de Wijs

O índice de iodo de um óleo ou gordura é a medida do seu grau de insaturação dos ácidos graxos presentes e é expresso em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (% iodo absorvido).

Uma molécula de triglicerídeos, com uma dupla ligação na cadeia hidrocarbonada do ácido oléico, absorverá 1/3 (um terço) do iodo absorvido pela molécula, que apresenta três duplas ligações na cadeia do ácido linolênico.

Para cada óleo existe um intervalo de tempo característico do valor do índice de iodo esperado. Este valor também está relacionado com o método empregado na sua determinação. Geralmente é determinado pelo método de Wijs, que usa a solução de tricloreto de iodo, mas pode ser determinado pelo método de Hanus que utiliza brometo de iodo, e pelo método de Hubl, empregando uma solução de iodo e cloreto de mercúrio.

O método de Wijs é aplicável a todos os óleos e gorduras normais que não contenham ligações duplas conjugadas.

Reagentes:

Solução de Wijs (iodo, ácido acético);

Solução de iodeto de potássio 10%;

Clorofórmio;

Solução indicadora amido 1%;

Solução de tiosulfato de sódio 0,1mol/L, padronizado.

Procedimento:

A amostra foi inicialmente filtrada com papel de filtro (agente dessecante), afim de reter alguma impureza presente.

Em seguida, 0,05g da amostra foi pesada em três erlenmeyers de 125mL.

Adicionou-se 3 mL de clorofórmio para solubilizar as amostras nos erlenmeyers contendo óleo e a um terceiro sem amostra (para que se faça a prova em branco).

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, adicionou-se 10 mL de solução de Wijs.

Após agitação, os frascos foram reservados em local escuro, com temperatura entre 20 e 30°C. (o tempo de repouso das amostras é de 2 horas se o índice de iodo esperado for acima de 150, e de 1 hora se for abaixo de 150).

Decorrido o tempo, os frascos foram removidos do local de repouso e, adicionou-se 8 mL de iodeto de potássio (KI) 10% e 60 mL de água destilada para que sejam feitas as titulações com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, sob vigorosa agitação até que a coloração da amostra quase desapareça.

Após a coloração amarelada ter se tornado mais clara, adicionou-se aproximadamente 1 mL de indicador amido e a titulação continuou-se até que a fase inferior mudasse de coloração rosa para incolor.

Cálculos:

Para se calcular o índice de iodo na amostra, foi utilizada a seguinte expressão:

$$I.I = \frac{(V_B - V) \times M \times f \times 12,69}{m} \quad (2)$$

Onde:

V_B = volume gasto na prova em branco;

V = volume gasto do titulante;

M = Molaridade [0,1 mol/L de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)];

f = fator de correção;

m = peso da amostra de óleo;

4.3.3 Índice de Saponificação

O índice de saponificação é definido como o número de mg de hidróxido de potássio (KOH), necessários para saponificar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de 1 grama da amostra (óleo ou gordura).

O valor obtido indica indiretamente a quantidade em peso de ácidos graxos, obtidos após a saponificação, pois é inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos dos triglicerídeos presentes. É importante para demonstrar a presença de óleos e gorduras de alta proporção de ácidos graxos, de baixo peso molecular, em misturas com outros óleos e gorduras. Quanto menor o peso molecular do ácido graxo, maior será o índice de saponificação.

Para as gorduras vegetais, quanto mais altos os índices de saponificação mais se prestam para fins alimentícios [MORETTO e FETT, 1998].

Um equivalente químico de triglicerídeo equivale a 3 equivalentes de KOH (PM= 56).

$$PesoMedio = \frac{3 \times 56 \times 1000}{I.S.} \quad (3)$$

Reagentes:

Solução de ácido clorídrico 0,5 M;

Hidróxido de potássio;

Solução de fenolftaleína 1%;

Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4% m/v.

Procedimento:

A amostra foi filtrada, a fim de reter algumas impurezas existentes;

Pesou-se uma quantidade de amostra em 2 erlenmeyers de 250 mL, de tal modo que a titulação corresponda de 45 a 55% da titulação do branco. Esta massa normalmente é de 4 a 6 gramas;

Adicionou-se 50 mL da solução alcoólica de KOH.

Um branco foi preparado simultaneamente com a amostra.

Os erlenmeyers foram conectados a um sistema de refluxo, mantendo-os a um período de 2 horas ou até a completa saponificação da amostra (aproximadamente uma hora, para amostras normais).

Após o término do refluxo e resfriamento do frasco, o erlenmeyer foi desconectado do condensador. Em seguida, foi adicionado 1 mL do indicador e titulado com a solução de ácido clorídrico 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea.

Cálculo:

Para o cálculo de índice de Saponificação, a seguinte expressão foi utilizada:

$$I.S. = \frac{(V_B - V) \times f \times 28,05}{m} \quad (4)$$

Onde:

V_B = Volume gasto na titulação do branco;

V = volume gasto na titulação da amostra;

f = Fator da solução de HCl 0,5 M;

m = número de g da amostra.

4.3.4 Índice de Refração

A principal forma de deterioração dos óleos consiste na oxidação, que ocorre quando o oxigênio atmosférico é dissolvido no óleo e reage com os ácidos graxos insaturados, que são tanto mais reativos quanto maior número de insaturações em suas cadeias.

Dentre os métodos utilizados para verificar os níveis de oxidação estão o índice de peróxido e o índice de refração.

A determinação do índice de refração tem grande utilidade no controle dos processos de hidrogenação, não só para os óleos, mas, também para as gorduras, cuja temperatura indicada é de 40°C.

O índice de refração de óleos e gorduras é muito usado como critério de qualidade e identidade pois, quando referente a um óleo, este índice aumenta com o índice de iodo e pode ser usado no controle de processos de hidrogenação de óleos insaturados.

Para a medição do índice de refração utiliza-se o refratômetro. Este aparelho pode identificar tanto o índice de refração de uma substância quanto seu percentual de brix (quantidade de sólidos solúveis em uma solução). Com o valor do brix pode-se calcular o valor do índice de refração.

Equipamento:

Refratômetro ATAGO Hando Refractometer equipado com escala-padrão e algodão (Figura 8).

Procedimento:

O refratômetro deve ser ajustado previamente com água, fazendo circular uma corrente de água pelo aparelho;

Em seguida, deixou-se estabilizar;

Foram colocadas no prisma inferior algumas gotas da amostra. Fechou-se os prismas, travando-os firmemente.

Esperou-se 1 a 2 minutos até que a amostra atingisse a temperatura do aparelho. Ajustou-se o instrumento e a luz para obter a leitura mais distinta possível e, então, determinou-se o índice de refração ou o °brix.



Figura 8. Refratômetro utilizado na determinação do índice de refração.

4.3.5 Viscosidade

A viscosidade mede-se por meio de viscosímetros, aparelhos em que geralmente se determina o tempo que um certo volume de líquido leva a escoar através de um orifício de pequeno diâmetro.

Pode ser encarada como o atrito interno de um fluido provocado essencialmente pela interação entre as moléculas deste. Devido à viscosidade deve-se exercer uma força para que uma camada de fluido deslize ou escorregue sobre outra. Tanto os líquidos como os gases são viscosos, embora os primeiros sejam muito mais que os gases. Constata-se também que o coeficiente de viscosidade para os líquidos decresce com o aumento da temperatura.

Materiais:

Viscosímetro com banho;

Termômetro de precisão;

Cronômetro.

Procedimento:

Foram colocados cerca de 7 mL de amostra no viscosímetro, afim de determinar o tempo (t) de escoamento desta amostra (em segundos) através de um capilar (Figura 9) . A temperatura deve ser controlada em 40 °C.

Para uma melhor precisão, o experimento foi realizado em triplicata.

Cálculo:

Para o cálculo da viscosidade, foi feita uma média aritmética dos 3 tempos multiplicada pela constante do viscosímetro (k). A constante do viscosímetro utilizada neste experimento foi de 0,1125.

$$\nu = Mt \times k \quad (5)$$

Onde:

ν = viscosidade

M = Média dos tempos

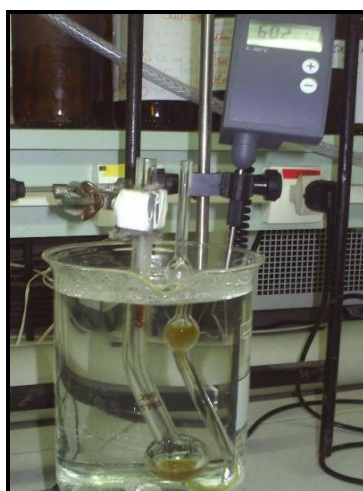


Figura 9. Sistema para determinação da Viscosidade.

4.3.6 Massa Específica

Densidade absoluta ou massa específica é uma característica própria de cada material, por isso é classificada como sendo uma propriedade específica. O termo densidade absoluta é geralmente atribuído para representar a razão entre a massa e o volume de objetos sólidos (ocos ou maços) e massa específica é definido para representar a razão entre a massa e o volume de líquidos e substâncias.

Em geral, a densidade dos sólidos é maior que a dos líquidos e esta, por sua vez, é maior que a dos gases.

Os líquidos são substâncias com densidades bem menores em relação aos sólidos, pois, as partículas de suas moléculas se encontram mais distanciadas umas das outras. Suas massas específicas variam um pouco e para se medir a massa específica de líquidos e fluidos, existem dois tipos de equipamentos: o *picnômetro* e o *densímetro* (este último é mais utilizado por fornecer a leitura direta da densidade, além de ser mais preciso).

Materiais:

Densímetro com banho;
Aquecedor.

Procedimento:

Uma pequena quantidade de amostra do óleo foi colocada em um tubo de ensaio. Com o auxílio de uma aquecedor, a amostra foi aquecida até uma temperatura de 40 °C, afim de obter a leitura diretamente no visor do densímetro.

Atualmente a leitura da massa específica está sendo feita utilizando densímetros digitais, como por exemplo o densímetro digital da Anton Paar, modelo DMA 35n (Figura 10).

Deve-se fazer análises a 40 °C e 20 °C, dependendo do tipo do óleo.



Figura 10. Sistema para determinação da massa específica.

Cáculo:

Para o cálculo da massa específica a essas temperaturas, basta-se resolver a média aritmética dos valores adquiridos no visor do densímetro.

4.3.7 Umidade

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. Geralmente a umidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em: umidade de superfície, que refere-se à água livre ou presente na superfície externa do alimento, facilmente evaporada e umidade

adsorvida, referente à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com o mesmo.

A umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Na realidade, não é somente a água a ser removida, mas outras substâncias que se volatilizam nessas condições. O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco. O aquecimento direto da amostra a 105°C é o processo mais usual.

Materiais:

Estufa;
Balança Analítica;
Dessecador com sílica gel;
Cápsula de porcelana ou de metal.

Procedimento:

2 a 10 g da amostra foram pesadas em cápsula de porcelana ou de metal, previamente tarada.

Essas amostras foram aquecidas durante 3 horas. Em seguida, esperou resfriar em dessecador até a temperatura ambiente;

Pesou-se novamente;

A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante.

Cálculo:

$$Umidade = \frac{(100 \times n)}{m} \quad (6)$$

Onde:

n = nº de gramas de umidade (perda de massa em g)

m = nº de gramas da amostra

4.3.8 Ponto de Congelamento

Na tentativa de se obter a densidade a 20 °C, viu-se a necessidade de determinar o ponto de congelamento do óleo de coco.

Materiais:

Tubo de Ensaio;
Termômetro

Procedimento:

Uma certa quantidade do óleo foi colocada em um tubo de ensaio;
Em seguida, foi introduzido ao tubo um termômetro preciso;
O tubo foi resfriado até o aparecimento dos primeiros pontos de cristalização;
Anotou-se esta temperatura.

4.3.9 Composição em Ácidos Graxos

Os óleos e gorduras de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), formadas predominantemente de produtos de condensação entre glicerol e ácidos graxos chamados triglicerídeos [MORETTO e FETT, 1998].

Um aspecto particularmente importante dos triglicerídeos na atualidade refere-se a sua origem renovável como, por exemplo: plantas oleaginosas, peixe, etc. Na sua molécula, a porção referente aos ácidos graxos corresponde cerca de 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 (ligação carbono-carbono), em um número que varia de 6 a 22 átomos sendo particularmente importante os ácidos graxos com 10 a 18 átomos.

Estes diferem basicamente um do outro pelo comprimento da cadeia do hidrocarboneto e pelo número e posição das duplas ligações. As ligações duplas dos ácidos insaturados estão localizadas na cadeia de forma não conjugada (sistema 1,4-diênico), freqüentemente separada por grupos metilênicos ($-\text{CH}_2-$). No entanto, tanto as insaturações quanto o comprimento da cadeia carbônica afetam diretamente a viscosidade dos óleos. Sendo assim, a viscosidade dos óleos aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos graxos dos triglicerídeos e diminui quando aumenta a insaturação destes.

Os ácidos graxos que ocorrem com mais frequência na natureza são conhecidos pelos seus nomes comuns, conforme mostra as tabelas 6 e 7 [MORETTO, *et al.*, 1998].

Tabela 6. Ácidos graxos saturados presentes nos 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	Eicoisanóico	Araquídico
C22:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -COOH	Docosanóico	Behênico
C24:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -COOH	Tetracosanóico	Lignocérico

Tabela 7. Ácidos graxos insaturados presentes nos óleos e gorduras.

Representação	Nome Sistemático	Nome Trivial
C 16:1(9)	9- Hexadecenoico	Palmitoleico
C 18:1(9)	9- octadecenoico	Oléico
C 18:1(11)	11- octadecenoico	Vacênico
C 18:2(9,12)	9,12 – octadecadienoico	Linoléico
C 18:3(9,12,15)	9,12,15 – octadecatrienoico	Linolênico
C 20:4(5,8,11,14)	5,8,11,14 – eicosatetraenoico	Araquidônico

De uma maneira geral, os ácidos graxos com cadeia inferior a 10 átomos de carbono são líquidos a temperatura ambiente e aqueles com 10 ou mais são sólidos, ocorrendo aumento progressivo do ponto de fusão com aumento no comprimento da cadeia carbônica. Ácidos graxos saturados com mais de 24 átomos de carbono, raramente ocorrem em óleos comestíveis [MORETTO, *et al.*, 1998].

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa após utilização da técnica de derivatização, onde esta técnica consiste em transformar os óleos em seus respectivos ésteres de forma analítica para possibilitar sua detecção por cromatografia (ISO 5509-78), usando uma coluna polar. A aparelhagem e as condições cromatográficas foram: Cromatógrafo 3400 CX da VARIAN, com coluna cromatográfica capilar Stabilwax da VARIAN. A coluna possui comprimento de 30 m e 0,25 mm de diâmetro. A temperatura do injetor utilizada foi de 240 °C e a temperatura do detector de 250 °C. O volume de amostra injetado foi de 0,5 µL.

4.4 ENZIMAS UTILIZADAS COMO CATALISADORES

Neste trabalho foi utilizada a lipase comercial do tipo *Candida antartica* (Novozym 435), produzida por fermentação submersa e adsorvida sobre resina acrílica macroporosa numa concentração de 3% m/m. Consiste de partículas com diâmetro na escala de 0,3 – 0,9 mm, contendo 1,4% de água [FACCIO *et al.*, 2003].

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato ou a formação de 1 micromol de produto por minuto, nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato).

A atividade lipolítica da enzima imobilizada deve ser determinada espectrofotometricamente acompanhando-se o aumento na absorbância a 410nm, devido à liberação de *p*-nitrofenol resultante da hidrólise do *p*-nitrofenil-laurato (p-NPL), segundo método descrito por Pinto *et al* (2005).

Será estudada a atividade lipolítica da enzima imobilizada em três temperaturas diferentes, 40°C, 50°C e 60°C em pH 7,0.

Equipamento:

Espectrofotômetro BEL SP 2000 UV.

Preparo da Solução:

Para preparar 100mL de solução, deve-se inicialmente pesar 0,018g de *p*-nitrofenil laurato (pNL) e dissolver em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida adicionar 99 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7.

Técnica:

Após o preparo do reagente, deve-se adicionar 30mL em um bécker, colocar sob agitação e adicionar 0,03g da enzima imobilizada. A reação será acompanhada através da retirada de 2 mL da amostra a cada 1,5 minutos de reação durante 7,5 minutos. A absorbância deverá ser lida imediatamente após a retirada da alíquota.

Cálculo:

Para se calcular a atividade, pode-se utilizar a equação 7:

$$A = \frac{\Delta Abs \times D \times f \times V_R}{\Delta t \times m_A} \quad (7)$$

Onde:

A = atividade da enzima (U/Kg), onde uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições propostas;

Δabs = variação de absorbância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorbância;

D = diluição da amostra realizada para a leitura da solução enzimática;

f = fator de conversão dos valores de absorbância para a concentração de p-nitrofenol.

Δt = tempo decorrido de análise;

V_R = volume reacional;

m_A = massa de enzima imobilizada utilizada no ensaio, em Kg;

$\Delta Abs / \Delta t$ = coeficiente angular da reta obtida.

4.6 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

As reações em escala laboratorial foram realizadas em erlenmeyers de 250mL fechados com tampa de vidro. A lipase comercial, em concentrações pré estabelecidas, foi adicionada a mistura óleo-álcool e os frascos foram incubados em uma câmara rotativa a 200 rpm com temperatura controlada. A quantidade de óleo de coco utilizada foi mantida fixa em 25g.

Após decorrido o tempo de reação, a amostra foi filtrada (com o objetivo de reter as enzimas para posterior recuperação e reutilização) e então levada para evaporação do álcool em um evaporador rotativo à 90°C numa rotação de 40 rpm.

Adotado este procedimento, a mistura reacional resultante foi levada a um funil de separação, onde a fase superior, concentrada em ésteres etílicos ou metílicos (biodiesel), foi separada da fase inferior que continha os demais produtos da reação (mono e diglicerídeos, glicerol e impurezas), bem como os substratos não reagidos (álcool e óleo).

A Figura 11 representa de forma clara a reação de transesterificação enzimática.

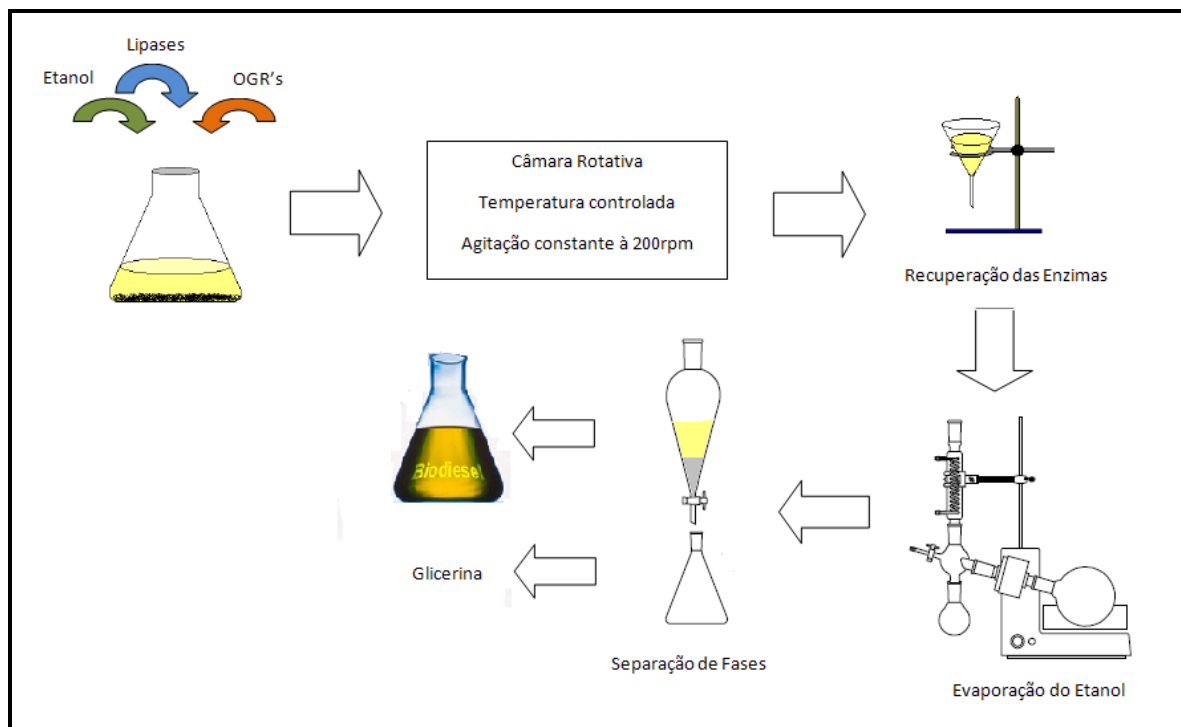


Figura 11. Esquema do procedimento experimental para a reação de transesterificação enzimática.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Para determinação do rendimento (%) em biodiesel, a caracterização dos ésteres metílicos ou etílicos foi efetuada empregando a técnica de cromatografia gasosa (CG). Os produtos obtidos da reação de transesterificação foram analisados por cromatografia gasosa usando um instrumento VARIAN CP-3800 equipado com um detector FID (Flame Ionization Detection) e uma coluna capilar curta de 2,3 m. A temperatura do detector foi de 250 °C e a do injetor de 240 °C. A temperatura do forno foi programada de 150 até 260 °C a uma taxa de aquecimento (rampa) de 10 °C/min. O trioctanoato de glicerila (tricaprilina) foi usado como padrão interno e o gás Hidrogênio, de alta pureza (99,95 %), usado como gás de arraste.

A amostra a ser analisada foi preparada a partir da mistura de 0,15 mL do biodiesel previamente purificado com 1 mL de solução padrão (tricaprilina mais hexano em dessecador). Uma alíquota de 1 µL da amostra foi então injetada no cromatógrafo, com o auxílio de uma seringa de vidro de 10 µL.

O cálculo do rendimento em ésteres foi efetuado com base nas massas e nas áreas sob os picos correspondentes aos ésteres etílicos ou metílicos e ao padrão interno, através da equação 8:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_p A_b f}{m_b A_p} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

m_p = peso do padrão interno (0,08 g)

A_b = soma das áreas dos picos referentes aos ésteres contidos na amostra (picos detectados entre 8 min e 13 min);

f = e o fator de resposta (0,78);

A_p = área do pico referente ao padrão interno (Tricaprilina mais hexano - pico detectado entre 15 min e 18 min);

m_b = peso da amostra (0,15 g).

As análises de conversão foram feitas em duplicata, sendo em seguida calculada a conversão média de cada experimento.

4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DO BIODIESEL DE COCO

O planejamento experimental é uma ferramenta muito utilizada para pesquisas em laboratório. Esta ferramenta possibilita que as pesquisas com várias variáveis possam ser realizadas e que os efeitos das variações sejam encontrados facilmente, já que um dos problemas mais frequentes para quem realiza experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre as outras variáveis de interesse [BARROS, *et al.*, 1996].

O planejamento experimental tem como função entender melhor o processo em estudo e dessa forma melhorar (otimizar) as condições de operação.

O principal objetivo do planejamento de experimentos é, através de princípios estatísticos, extrair do sistema em estudo, o máximo de informação útil, realizando o mínimo de experimentos possíveis e assim determinar a interação entre variáveis de forma racional e econômica. O principal aspecto a ser definido no planejamento é que tipo de informação deve ser buscada, isto é, ao final dos experimentos o que se quer saber. Dependendo do que se queira, algumas técnicas serão mais vantajosas, enquanto outras serão simplesmente inúteis [BARROS, *et al.*, 1996]. A Tabela 8 mostra as principais técnicas utilizadas para o planejamento experimental.

Tabela 8. Principais técnicas utilizadas para planejamento experimental.

Objetivo	Técnica
Triagem de variáveis	Planejamento fracionário
Avaliação da influência de variáveis	Planejamento fatorial completo
Construção de modelos empíricos	Modelagem por mínimos quadrados
Otimização	RSM, simplex

Fonte: BARROS, SCARMINIO e BRUNS, 1996

Para determinação das condições experimentais que maximizassem a síntese do biodiesel resultante da reação e para avaliar a influência das variáveis escolhidas, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo com 2 níveis e 4 variáveis.

As variáveis estudadas nessa etapa foram: razão molar álcool-óleo, temperatura, percentagem de enzimas e tipo do álcool. Baseado em estudos realizados preliminarmente, a agitação foi mantida constante, uma vez que foi verificado não haver nenhuma alteração no rendimento do processo variando a mesma de 200 a 500 rpm [OLIVEIRA e ALVES, 2000]. O tempo de reação foi fixado em 24 horas. Os limites associados a cada variável estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores extremos e intermediários das variáveis.

Variáveis	Extremos Negativos (-1)	Extremos Positivos (+1)
Razão Molar álcool-óleo [R]	1:6	1:10
Temperatura [T] (°C)	40	60
Percentagem de Enzimas [E] (%p/p)	3	7
Tipo de Álcool	Etanol	Metanol

A matriz experimental para o planejamento fatorial 2^4 é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Quadro de Experimentos.

<i>Ensaio</i>	<i>Tipo</i>	<i>R (O:Álcool)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>E (%p/p)</i>
1	Etanol/-1	1:6/-1	40/-1	3/-1
2	Etanol/-1	1:6/-1	40/-1	7/+1
3	Etanol/-1	1:6/-1	60/+1	3/-1
4	Etanol/-1	1:6/-1	60/+1	7/+1
5	Etanol/-1	1:10/+1	40/-1	3/-1
6	Etanol/-1	1:10/+1	40/-1	7/+1
7	Etanol/-1	1:10/+1	60/+1	3/-1
8	Etanol/-1	1:10/+1	60/+1	7/+1
9	Metanol/ +1	1:6/-1	40/-1	3/-1
10	Metanol/ +1	1:6/-1	40/-1	7/+1
11	Metanol/ +1	1:6/-1	60/+1	3/-1
12	Metanol/ +1	1:6/-1	60/+1	7/+1
13	Metanol/ +1	1:10/+1	40/-1	3/-1
14	Metanol/ +1	1:10/+1	40/-1	7/+1
15	Metanol/ +1	1:10/+1	60/+1	3/-1
16	Metanol/ +1	1:10/+1	60/+1	7/+1

Através dos dados experimentais obtidos, foi elaborado um modelo empírico com as variáveis estudadas codificadas pela letra x. Este modelo servirá para estimar o rendimento do biodiesel de coco usando valores codificados das variáveis estudadas no presente trabalho. Estes valores codificados devem pertencer ao intervalo $-1 \leq x \leq +1$, o qual foi considerado neste trabalho.

Sendo assim, foi adotado o modelo matemático para a previsão das respostas desejadas:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^x \beta_j x_j + \sum_{i < j}^x \beta_{ij} x_j x_i \quad (9)$$

Onde:

y = variável de interesse (rendimento) em percentagem;

x = variável que apresenta os fatores em escalas codificadas. Como no presente trabalho está sendo considerado apenas os níveis baixo e alto, x assume os valores -1 e +1;

β = parâmetros cujos valores serão determinados.

Para fins práticos, a estimativa de β_0 é a média geral das respostas e, as estimativas dos demais parâmetros foram obtidas através da tabela de Regressão dada pelo software utilizado, neste trabalho o STATISTICA 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AMOSTRAS

Como pré-determinado, as amostras de óleo de coco foram fornecidas pela SOCOCO S/A Indústria Alimentícia de Coco, localizada na cidade de Maceió-AL.

5.2 PRÉ TRATAMENTO DO ÓLEO DE COCO

As amostras obtidas foram submetidas a filtração, utilizando fibra vegetal (algodão) como meio filtrante, com o objetivo de reter os resíduos sólidos em suspensão. A Figura 12 mostra o processo de filtração e a amostra filtrada.



Figura 12. Pré tratamento do óleo de coco.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE COCO

A Tabela 11 apresenta o resultado das propriedades físico-químicas do óleo de coco utilizado para a realização deste trabalho.

Tabela 11. Propriedades físico-químicas do óleo de coco

<i>Propriedades</i>	<i>Valores</i>	<i>Literatura</i>
Índice de Acidez (g de ác. oléico/100g)	0,30	Máximo 5,0*
Índice de Iodo (g I ₂ /100g de óleo)	18	5 – 30**
Índice de Saponificação	256,2	248 – 265*
Índice de Refração (n _D ⁴⁰)	1,448	1,448 – 1,450*
Viscosidade (cst)	27,2	24,85***
Densidade (g/cm ³), 40 °C	0,905	0,908*
Umidade	0,35	0,53****
Ponto de Congelamento	22 °C	--

*www.anvisa.gov.br, ** www.institutobiosantos.com.br, *** JITPUTTI *et al*, 2006, **** ARAUJO *et al*, 2009.

Como se pode perceber pela Tabela 11, os valores encontrados neste trabalho para a caracterização do óleo de coco estão de acordo com os valores descritos na literatura. Em particular, observa-se que as amostras de óleo de coco apresentaram um baixo índice de acidez, provavelmente devido a algum processo de refino ou degomagem acontecido na indústria fornecedora do óleo. Esta suposição baseia-se no aspecto visual das amostras que apresentaram cor clara e quase nenhuma presença de sólidos em suspensão.

Para se obter resultados satisfatórios na reação de transesterificação com catalisadores básicos, o ideal é que o teor de ácidos graxos livres seja inferior a 3% de ácido oléico (aproximadamente 6mg KOH/ g da amostra), pois os ácidos graxos livres podem reagir com o catalisador formando produtos saponificados, diminuindo então a eficiência do processo reacional [FERRARI *et al.*, 2005]. Portanto, o resultado apresentado pelo óleo de coco mostra que este pode ser utilizado para a obtenção do biodiesel, pois além dos valores estarem inferior a 3% de ácido oléico, a reação de transesterificação deste trabalho foi catalisada por enzimas, não apresentando risco de formação de sabão durante a reação.

Uma vez determinado o índice de saponificação do óleo, e certificando que o resultado se encontra dentro dos parâmetros fornecido na literatura, fica fácil determinar seu peso molecular. Como o peso molecular é inversamente proporcional ao índice de saponificação e fazendo uso da equação 4, foi obtido para o óleo de coco: PM = 654,97g/mol.

O índice de refração é característico para cada tipo de óleo e está relacionado com o grau de insaturação das ligações, compostos de oxidação e tratamento térmico. Este índice aumenta com o número de duplas ligações, conjugações, tamanho da cadeia hidrocarbonada e índice de iodo. O óleo de coco é composto, em sua maioria, por ácidos graxos saturados (cerca de 47% de ácido láurico e 18% de ácido mirístico). Na composição dos principais óleos vegetais, o óleo de coco é uma exceção, pois os ácidos graxos saturados estão presentes em quantidades muito maiores que os insaturados. Essa composição explica o baixo valor encontrado para o índice de refração.

A composição de ácidos graxos para óleo de coco é apresentada na Tabela 12, onde os resultados obtidos estão de acordo com os da literatura.

Tabela 12. Composição em ácidos graxos do óleo de coco

Ácido Graxo	Nomenclatura	Valores obtidos (%)	Literatura
C 6:0	capróico	-	0,4 – 0,6
C 8:0	caprílico	7,186792	5,0 – 10,0
C 10:0	cáprico	5,826097	4,5 – 8,0
C 12:0	láurico	48,398725	43,0 - 51,0
C 14:0	mirístico	20,216485	16,0 - 21,0
C 16:0	palmítico	9,76259	7,5 – 10,0
C 18:0	esteárico	2,893973	2,0 – 4,0
C 18:1	oléico	8,31455	5,0 – 10,0
C 18:2	linoléico	2,282234	1,0 – 2,5
C 18:3 - C 24:1	-	-	< 0,5

Fonte: www.anvisa.gov.br

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para determinação da temperatura ótima para a atividade lipolítica da enzima imobilizada estudada (Novozym 435), foram realizados testes experimentais variando-se a temperatura para pH 7. Os resultados são apresentados na Figura 13.

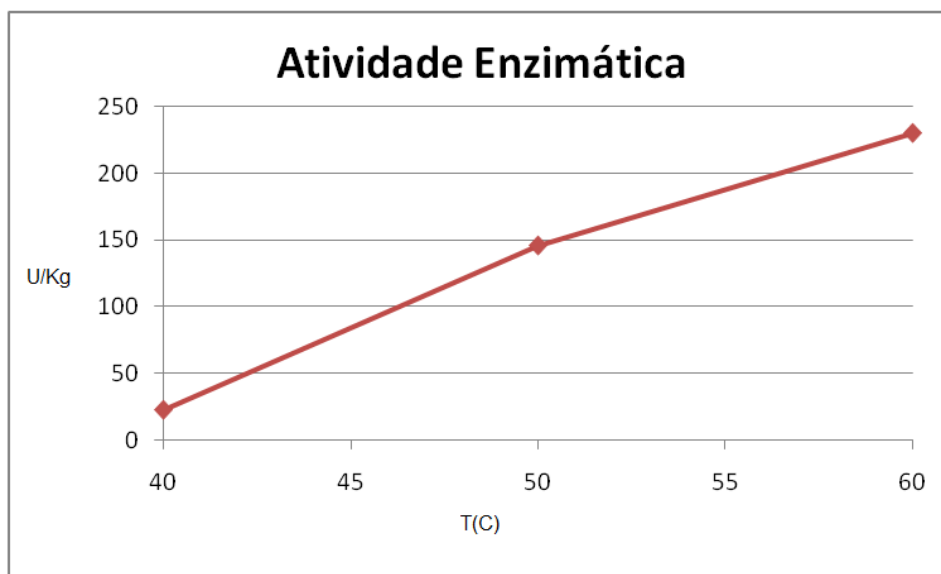


Figura 13. Estudo da atividade enzimática em função da temperatura.

Os resultados indicados na Figura 13 mostram que a atividade enzimática aumentou com o aumento da temperatura dentro da faixa estudada. Porém o aumento da temperatura não garante o aumento da conversão em biodiesel, pois outros fatores podem influenciar nessa atividade.

5.5 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Os dados experimentais obtidos na transesterificação enzimática do óleo de coco utilizando a lipase comercial Novozym 435 como catalisador são apresentados na Tabela 13. Os dados apresentados de rendimento referem-se a um tempo de 24 horas de reação. Cabe ressaltar que os experimentos foram feitos com réplica em cada ponto.

Uma análise na Tabela 13 observa-se que o maior rendimento (80,5%) foi obtido na condição de maior temperatura (60°C), maior concentração de enzima (7%), maior razão óleo-álcool (1:10) e utilizando etanol como álcool.

Tabela 13. Rendimentos obtidos na transesterificação do óleo de coco

<i>Ensaio</i>	<i>Tipo</i>	<i>R</i> <i>(O:Álcool)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>E</i> <i>(%p/p)</i>	<i>1^o</i> <i>Corrida</i>	<i>2^o</i> <i>Corrida</i>	<i>Rendimento</i> <i>(%)</i>
1	Etanol	1:6	40	3	48	50,2	49,1
2	Etanol	1:6	40	7	61	62,8	61,9
3	Etanol	1:6	60	3	61,5	65,1	63,3
4	Etanol	1:6	60	7	76,9	75,3	76,1
5	Etanol	1:10	40	3	79,3	76,7	78
6	Etanol	1:10	40	7	72,2	75,5	73,8
7	Etanol	1:10	60	3	77,6	70,6	74,1
8	Etanol	1:10	60	7	84	77,1	80,5
9	Metanol	1:6	40	3	58,4	55,9	57,1
10	Metanol	1:6	40	7	68,4	59,7	64
11	Metanol	1:6	60	3	19,2	19,6	19,4
12	Metanol	1:6	60	7	14,2	13,8	14
13	Metanol	1:10	40	3	68,2	67,2	67,7
14	Metanol	1:10	40	7	77,9	78,1	78
15	Metanol	1:10	60	3	10,3	10,6	10,4
16	Metanol	1:10	60	7	12,5	11,4	12

Uma vez determinado o rendimento do processo, um modelo estatístico foi construído, com o objetivo de representar os dados experimentais e verificar a significância das variáveis, bem como avaliar possíveis interações entre elas.

O modelo estatístico para o cálculo do rendimento de biodiesel de coco pode ser representado pela equação 10:

$$y = 54,97 + 2,57x_1 - 11,24x_2 + 4,35x_3 - 14,64x_4 - 3,82x_2x_3 - 15,14x_2x_4 - 2,66x_3x_4 \quad (10)$$

Onde:

Os parâmetros de regressão 2,57; -11,24; 4,35; -14,64; -3,82; -15,14; -2,66 foram obtidos a partir da Tabela 14, e o parâmetro 54,97 é a média de todas as respostas obtidas dos experimentos;

y é a estimativa do rendimento (resposta) em percentagem;

x_1 é a variável codificada da concentração de enzimas e que pertence ao intervalo $-1 \leq x \leq 1$;

x_2 é a variável codificada da temperatura e que pertence ao intervalo $-1 \leq x \leq 1$;

x_3 é a variável codificada da razão molar e que pertence ao intervalo $-1 \leq x \leq 1$;

x_4 é a variável codificada do tipo de álcool e que pertence ao intervalo $-1 \leq x \leq 1$;

Os experimentos realizados seguindo o deliniamiento experimental previsto apresentaram um rendimento médio de 55% com um intervalo entre 53,3% e 56,6%. Pode-se observar que a interação tipo de álcool e temperatura apresentou o maior efeito, em módulo, no rendimento. A Tabela 14 apresenta os coeficientes de regressão para a resposta, ou seja, para o rendimento.

Tabela 14. Coeficientes de regressão para o rendimento em biodiesel

<i>Fatores</i>	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>Limite de confiança de -95%</i>	<i>Limite de confiança de +95%</i>
Média	54,97	0,79	69,42	0,0000	53,32	56,62
(1)E%	2,57	0,79	3,25	0,004	0,93	4,22
(2)Temperatura	-11,24	0,79	-14,2	0,0000	-12,89	-9,6
(3) R molar	4,35	0,79	5,49	0,0000	2,7	5,99
(4) Tipo	-14,64	0,79	-18,48	0,0000	-16,28	-12,99
1 x 2	-0,65	0,79	-0,83	0,4166	-2,3	0,99
1 x 3	-0,81	0,79	-1,07	0,3165	-2,46	0,83
1 x 4	-0,91	0,79	-1,15	0,2621	-2,56	0,73
2 x 3	-3,82	0,79	-4,82	0,0000	-5,46	-2,17
2 x 4	-15,14	0,79	-19,12	0,0000	-16,79	-13,5
3 x 4	-2,66	0,79	-3,36	0,0029	-4,31	-1,02

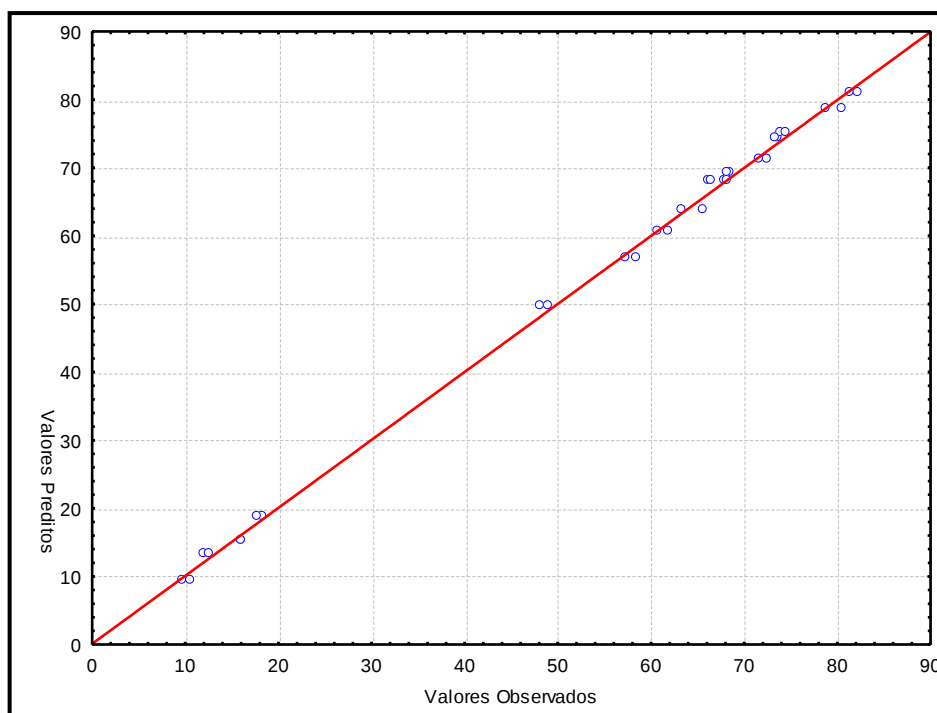
A análise de variância (ANOVA) (Tabela 15) mostra que o modelo utilizado neste trabalho é estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre a resposta e as variáveis significativas, pois o valor do coeficiente de determinação é satisfatório ($R^2 = 0,98$). Este valor indica que 98% da variação do rendimento pode ser atribuída a variáveis independentes e somente 2% da variação total não podem ser explicados pelo modelo, o que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA)

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
(1)E%	212,18	212,18	10,57	0,0038
(2)Temperatura	4045,50	4045,50	201,62	0,0000
(3) R molar	605,52	605,52	30,18	0,0000
(4) Tipo	6856,21	6856,21	341,7	0,0000
2 by 3	466,65	466,65	23,26	0,0000
2 by 4	7338,66	7338,66	365,74	0,0000
3 by 4	226,85	226,85	11,31	0,0000
Erro	421,36	20,065		
Total	20234,48			

$R^2 = 0,98$

A linearidade e boa concordância do modelo podem ser observadas na Figura 14 com um intervalo de confiança de 95%.

**Figura 14.** Confiança entre o modelo e os dados experimentais com 95% de confiança

Outra forma de avaliar o modelo estatístico utilizado na análise de variância é através dos erros de ajustamento, que devem ser independentes e normalmente distribuídos. Tais verificações foram contempladas quando se analisa a relação entre o número de ensaios e os resíduos, onde se observa uma distribuição aleatória entre os resíduos de todos os ensaios, sugerindo resíduos independentes (Figura 15).

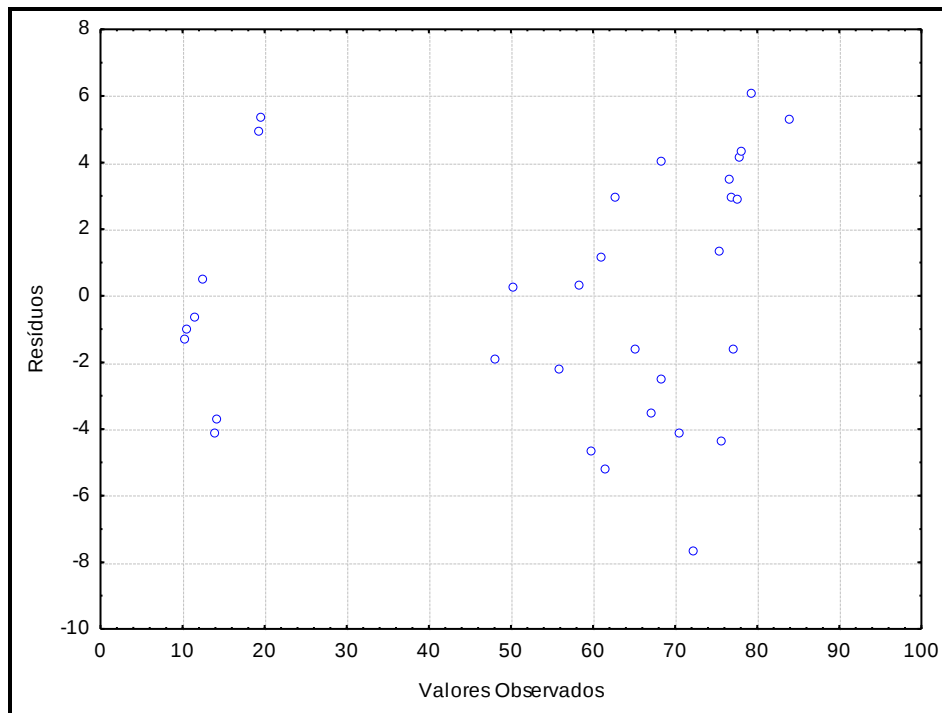


Figura 15. Distribuição dos resíduos

Para um nível de significância de 5%, os resultados obtidos indicam que a concentração de enzima, temperatura, razão molar, tipo do álcool e interações entre temperatura e razão molar, temperatura e tipo de álcool e razão molar e tipo de álcool são significativas. Esses valores significativos ($p < 0,05$) podem ser melhores visualizados através do diagrama de Pareto na Figura 16:

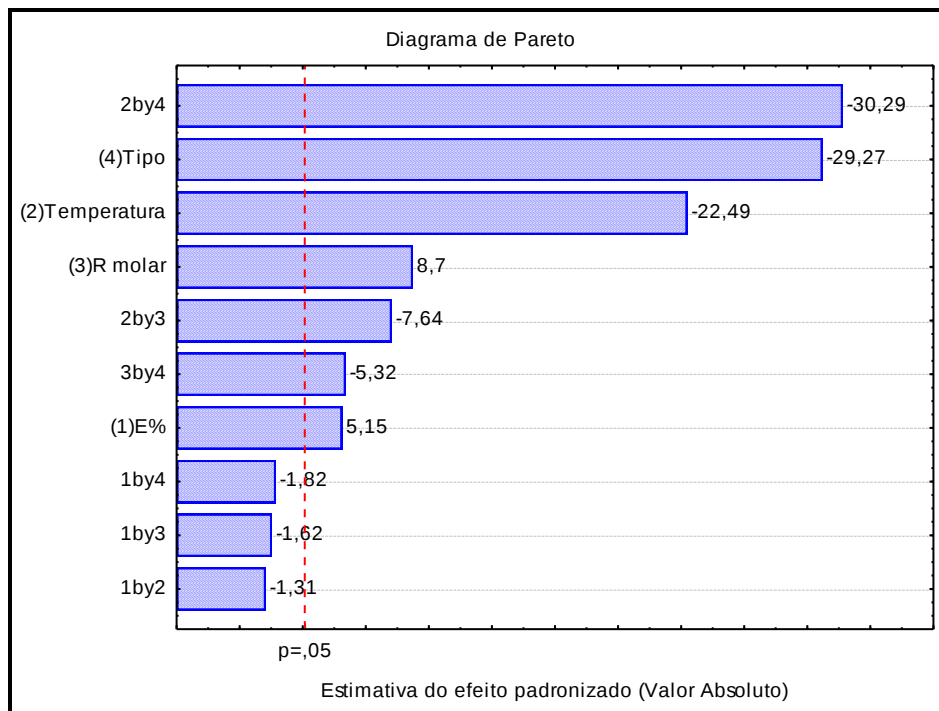


Figura 16. Diagrama de Pareto com nível de significância de 5%.

Os valores presentes no diagrama de Pareto representam a influência que cada variável estudada exerce, isoladamente, sobre a resposta do sistema (neste caso, o rendimento), e são interpretados da seguinte maneira:

Variáveis significativas:

- O rendimento da reação diminui 30,29%, em média, quando a temperatura passa de seu nível inferior (40°C) para o seu nível superior (60°C) e quando é trocado etanol (nível inferior) por metanol (nível superior);
- O rendimento da reação diminui 29,27%, em média, quando é utilizado metanol (nível superior) ao invés de etanol (nível inferior);
- O rendimento da reação diminui 22,49%, em média, quando a temperatura passa de seu nível inferior (40°C) para seu nível superior (60°C);
- O rendimento da reação aumenta 8,7%, em média, quando a razão molar passa de seu nível inferior (1:6) para seu nível superior (1:10);
- O rendimento da reação diminui 7,64%, em média, quando a temperatura passa de seu nível inferior (40°C) para o seu nível superior (60°C) e a razão molar passa de seu nível inferior (1:6) para seu nível superior (1:10);
- O rendimento da reação diminui 5,32%, em média, quando a razão molar passa de seu nível inferior (1:6) para seu nível superior (1:10) e quando é trocado o tipo de álcool utilizado, etanol (nível inferior) por metanol (nível superior);
- O rendimento da reação aumenta 5,15%, em média, quando a concentração de enzimas passa de seu nível inferior (3%) para seu nível superior (7%).

Variáveis não significativas:

As interações entre 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 $p > 0,05$. Esse resultado mesmo não sendo significativo nos fornece uma informação bastante interessante e atrativa. 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 neste 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 produzindo utilizando concentrações de enzima abaixo de 7% fornecendo bons rendimentos

As Figuras 17, 18 e 19 mostram qual o melhor limite (-1 ou +1) que influencia positivamente no rendimento do processo.

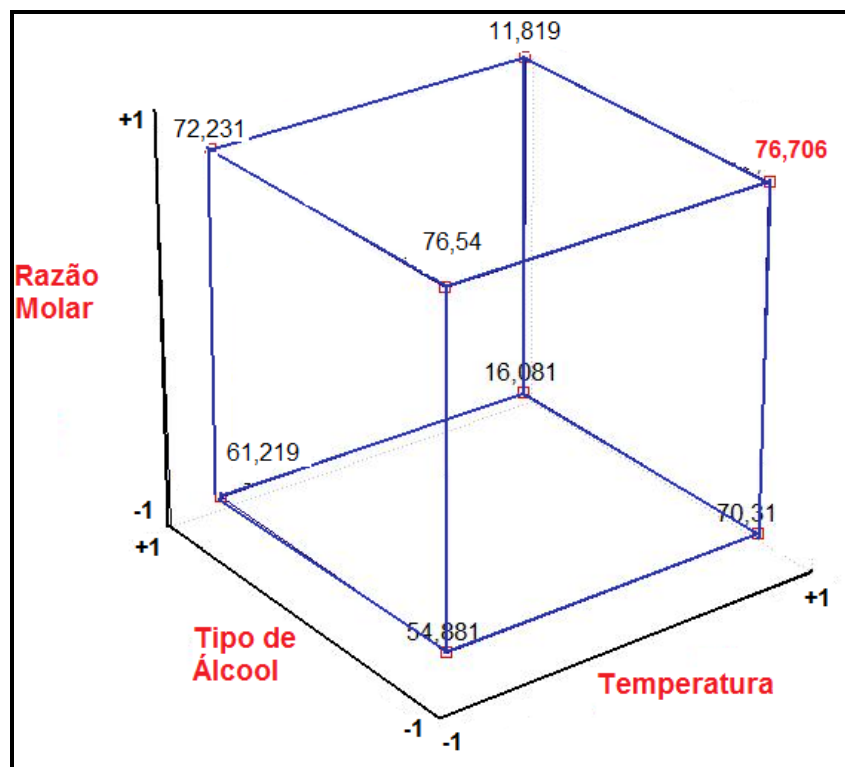


Figura 17. Influência da razão molar, tipo de álcool e temperatura na variável de resposta.

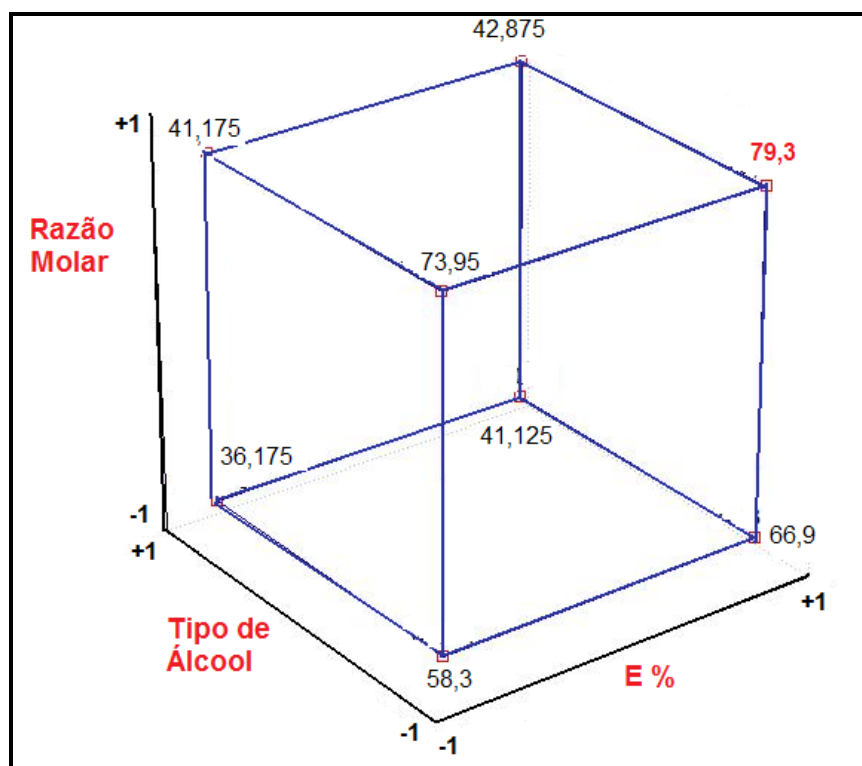


Figura 18. Influência da razão molar, tipo de álcool e concentração de enzimas na variável de resposta.

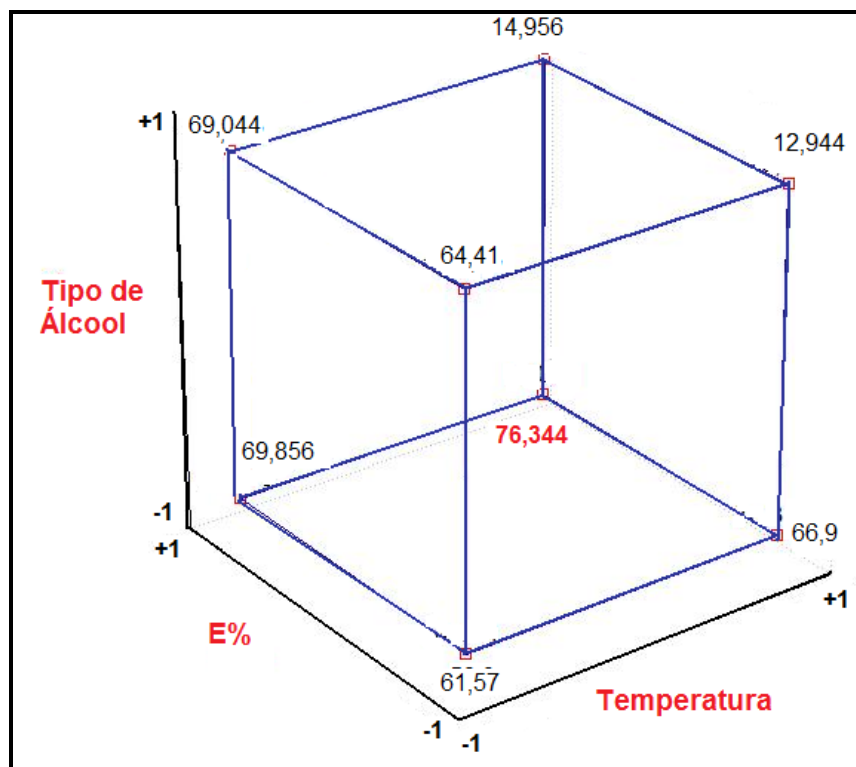


Figura 19. Influência do tipo de álcool, concentração de enzimas e temperatura na variável de resposta.

Analisando as Figuras 17 a 19, observa-se que os maiores rendimentos (76,706%; 79,3%; 76,344%) ocorrem, na maioria dos casos, nos extremos positivos das variáveis independentes, ou seja, para se obter altos rendimentos deve-se utilizar uma quantidade máxima da razão molar (1:10), alta temperatura (60°C), máxima concentração de enzimas (7%) e etanol como álcool.

*Influência da Concentração de enzimas:

Quanto maior a concentração de enzima, maior é o rendimento da reação [OLIVEIRA *et al.*, 2004; JOÃO *et al.*, 2008]. Neste trabalho a concentração de enzimas apresentou um efeito positivo, apresentando um maior rendimento quando utilizado uma maior quantidade de enzima 7%. Entretanto, quando se utilizou 3% de enzima este rendimento não diminuiu tão significativamente, podendo-se ainda otimizar essa variável em estudos futuros mantendo-se as outras variáveis nas melhores condições.

*Influência da Razão molar:

A razão molar do substrato é uma variável com grande influência na reação da síntese do biodiesel. Álcool em excesso na razão estequiométrica 3:1 é usado para assegurar uma alta taxa de reação e minimizar as limitações de difusão. Entretanto, níveis excessivos de álcool podem inibir a atividade da enzima e diminuir, assim, sua atividade catalítica ao longo da reação de transesterificação. Assim, uma alta razão óleo:álcool significa uma maior polaridade

do meio, produzida pelo álcool e pela água. Isso inativa a enzima e por consequência o rendimento de alquil ésteres [SALVADOR *et al.*, 2009].

Como neste trabalho foram utilizados dois tipos de álcool, essas influências foram avaliadas separadamente.

Quando utilizado etanol, a razão molar apresentou efeito positivo, demonstrando, neste caso, não haver inibição das enzimas por excesso do álcool. Este resultado corrobora o obtido por FACCIO (2004) onde observou-se efeitos semelhantes quando da utilização do óleo de mamona.

Em relação ao metanol, a razão molar apresentou efeito negativo, demonstrando que a menor razão molar (1:6) apresentou melhores resultados. Isso pode ser explicado devido ao fato de ocorrer maior desativação das enzimas pelo álcool de menor número de átomos de carbono [BERNARDES *et al.*, 2007].

*Influência da Temperatura:

A taxa de reação aumenta com a temperatura. Neste trabalho foi utilizada uma faixa de temperatura entre 40°C e 60°C, onde dentro desta faixa, a atividade da enzima aumentou com o aumento da temperatura. Este aumento já foi comentado na determinação da atividade lipolítica (Figura 13).

Porém, quando a temperatura interage com um álcool, esse comportamento não pode ser generalizado. A temperatura influencia de maneira diferentes para cada tipo de álcool. Neste trabalho foram utilizados metanol e etanol como agentes alcoólicos. Essa interação pode ser vista na Figura 16.

Quando utilizado etanol como álcool, a temperatura apresentou um efeito positivo, demonstrando não haver inibição da enzima por altas temperaturas.

Quando o etanol é trocado por metanol, percebeu-se uma queda bastante significativa no rendimento. Isso pode ocorrer provavelmente devido a temperatura de ebulição do metanol estar bem próxima da temperatura máxima utilizada (60°C), já que o metanol é um álcool bastante volátil, evaporando a 64,7°C.

*Influência do Tipo de Álcool:

O metanol utilizado como álcool na reação de transesterificação não apresentou bons rendimentos quando comparado ao etanol. O resultado obtido para este álcool neste trabalho corroboram o obtido por outros pesquisadores. O metanol é um solvente altamente hidrofílico e, portanto, é capaz de solubilizar e de remover a camada de água essencial que envolve as enzimas, o que pode causar a perda da atividade catalítica da lipase [BERNARDES *et al.*, 2007]. Segundo CHEN e WU (2003) os baixos resultados obtidos com metanol pode ser o fato de que o material usado para imobilizar as enzimas (resina acrílica) pode adsorver compostos polares como o metanol. Quando a concentração de álcoois na mistura é grande, os álcoois formam pequenas gotas que se ligam as resinas das partículas.

A ligação desses álcoois nas enzimas bloqueia a reação (entrada) com os triglicerídeos, causando baixos rendimentos.

A utilização do etanol em reações de transesterificação para obtenção do biodiesel de coco apresentou efeito positivo. Este resultado é bastante interessante e atrativo, pelo fato do etanol possuir algumas vantagens de uso em relação ao metanol, das quais podemos citar: menor toxicidade, é renovável, e pode ser facilmente obtido aqui na região.

Uma vez descobertas as melhores condições para a produção de biodiesel dentro da faixa estudada neste trabalho, foi possível obter a superfície de resposta para o rendimento utilizando-se a razão molar e a temperatura como variáveis independentes (Figura 20). As outras duas variáveis estudadas (concentração de enzimas e tipo de álcool) foram fixadas em seus melhores resultados (7% e etanol). Analisando a Figura 20, percebe-se que utilizando o etanol como álcool e 7% de enzima, o rendimento aumenta quando se utiliza uma razão molar de 1:10 (+1) a 60°C (+1).

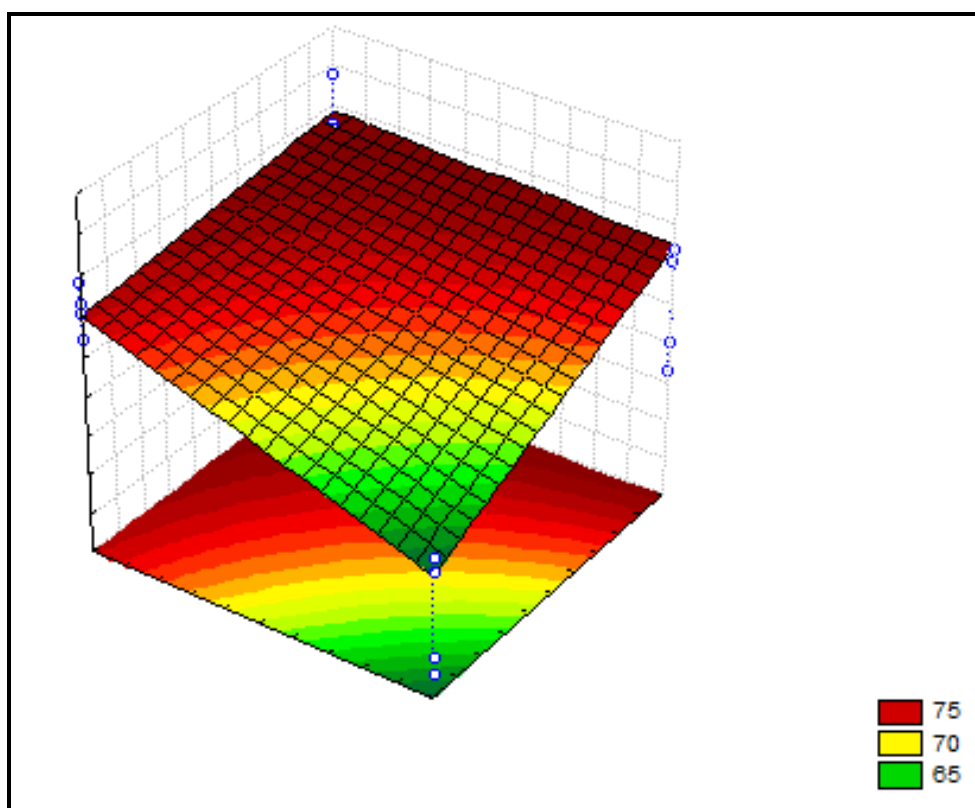


Figura 20. Superfície de resposta para o rendimento em biodiesel em função da razão molar e temperatura.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram realizados estudos das principais propriedades físico-químicas do óleo de coco, como índice de acidez, índice de iodo, índice de saponificação, índice de refração, viscosidade, massa específica, umidade, ponto de congelamento e composição em ácidos graxos. A importância de se determinar estas propriedades, antes da realização das reações de transesterificação é analisar a qualidade do óleo para obtenção do biodiesel. Através dos resultados obtidos, referentes a essas propriedades, é possível constatar que o óleo de coco analisado está numa faixa aceitável de utilização, visto que todos os valores encontrados na caracterização vão ao encontro aos valores descritos na literatura.

A obtenção do biodiesel de coco foi conduzida por catálise enzimática, na presença de metanol ou etanol, como agentes de alcoólise. As condições de processo; temperatura, razão molar óleo:álcool, concentração de enzimas e tipo de álcool, foram variadas afim de se verificar a influência destas. Para tal, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4 .

Esse planejamento experimental mostrou-se eficiente no estudo da influência das variáveis de processo. Os efeitos do tipo de álcool, temperatura, razão molar, concentração de enzima e interações entre temperatura e razão molar, temperatura e tipo de álcool e razão molar e tipo de álcool foram bastante significativos. O modelo encontrado se apresentou ajustado às respostas do planejamento fatorial apresentando características de um modelo significativo sob o ponto de vista estatístico e também preditivo dentro dos intervalos estudado para cada variável.

O melhor rendimento obtido neste trabalho (80,5%) foi adquirido nas condições de 60°C , utilizando 7 % de enzima, razão molar óleo:álcool 1:10 e etanol como álcool. Os resultados obtidos quando utilizado metanol não foram tão relevantes quando comparados ao etanol. Os resultados adquiridos utilizando etanol mostraram-se bastante atrativo, devido ao etanol ser renovável e facilmente obtido na região de estudo deste trabalho.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar as propriedades físico-químicas do biocombustível obtido, tais como: viscosidade, massa específica, índice de acidez e índice de saponificação;
- Utilizar menores quantidades de enzimas, pois pôde ser observado que a utilização de menores quantidades destas não diminui tão significamente o rendimento;
- Estudar a influência da água como variável independente;
- Reutilizar a enzima utilizada, lipase *Candida Antarctica* (Novozym 435), a fim de avaliar seu rendimento. Esse se torna um dos tópicos mais interessantes, pois sabendo que uma das desvantagens dos processos enzimáticos é o alto custo das enzimas, um bom rendimento obtido com a reutilização destas poderá tornar o processo mais atrativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C.C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8995-9005, **2007**;

AOCS, American Oils Company's Society, Official Method Cd 3d-63. Formerly Cd 3a-63. Reapproved, **1997**;

ARAUJO, G. S.; CARVALHO, R. H. R.; DE SOUSA, E. M. B. D; Producao de Biodiesel a partir de Oleo de coco bruto (Cocos nucifera L.), *2^o International workshop advances in cleaner production*, São Paulo, **2009**;

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

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Planejamento e Otimização de Experimentos, 2a ed., Editora Unicamp, pp. 60 – 131, **1996**;

BERNARDES, O. L.; LANGONE, M. A. P.; MERÇON, F.; Produção de biodiesel através da transesterificação de óleo de soja por via química e enzimática, *XI Encontro da SBQ*, Rio de Janeiro, **2007**;

CASTRO, H. F., MENDES, A. A., SANTOS, J. C., AGUIAR, C. L., Modificação de óleos e gorduras por biotransfromação, *Quimica Nova*, vol. 27, **2004**;

CHEN, J.; WU, W. Regeneration of Immobilized Cândida Antarctica Lipase for Transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, p. 466-469, **2003**;

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D.; DING, F.; Lipase mediated methanolysis of soybean oils for biodiesel production. *J. Chem. Techno. Biotechnol.*; v. 83, pp. 71 – 76, **2008**;

COSTA NETO, P.R., ROSSI, L.F.S., ZAGONEL, G.F.E., RAMOS, L.P., Transesterificação de óleo comestível usado para produção de biodiesel e uso em transporte, *www.biodieselbr.com*, **2005**;

COSTA NETO, P. R. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, **2002**;

DABDOUB, M. J., BRONZEL, J. L., RAMPIN, M. A., Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria, *Química Nova*, vol. 32, **2009**;

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

FABER, K.; Biotransformation in organic chemistry. *A Textbook*, 5th, ed, Springer, New York, pp. 454, **2004**;

FACCIO, C.; Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 99 p., **2004**;

FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIM, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; Produção de ésteres etílicos através de reação enzimática do óleo de mamona em n-hexano, IX Seminário institucional de iniciação científica, 2003, Santo Ângelo/RS. Anais do IX Seminário Institucional de Iniciação Científica, **2003**;

FANGRUI Ma, MILFORD A. HANNA, Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70:1-15,**1999**;

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja - taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v.28, n.1, pp. 19 - 23, **2005**;

FREDDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E.H, Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 1598, **1986**;

GANDHI, N. N.; Applications of lipases. *Journal of the American oil chemisty society*, v. 74, n.6, pp. 621 – 634, **1997**;

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V.D.; CARVALHO, J. R. M.; Biodiesel de Soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, v.30, n.5, pp. 1369 – 1373, **2007**;

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**;

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

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P.; *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28, 253, **2008**;

JITPUTTI, J.; KITIYANAN, B.; RANGSUNVIGIT, P.; BUNYAKIAT, K.; ATTANATHO, L.; JENVANITPANJAKUL, P. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. *Chemical Engineering Journal* 116, 61-66, **2006**;

JOÃO, J. H.; SKORONSKI, E.; OLIVEIRA, D. C.; Síntese do biodiesel através da transesterificação enzimática utilizando a gordura dos abatedouros de suínos, XVI Encontro de Química da Região Sul, **2008**;

LI, N.; ZONG, M.H.; LIU, X. M.; MA, DING. Regioselective synthesis of 3'-O - caproyl-floxuridine catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase. *J. Mol. Catal. B-enzymatic*, v.47. n.1-2, pp. 6-12, **2007**;

MA, F.; HANNA, M. A.; Biodiesel production: a review; *Bioresour. Technol.* 70, 1, **1999**;

MACRAE, A. R.; HAMOND, R.C.; Present and future applications of lipases. *Biotechnology and genetic reviews*, v.3, Intercept Ltd., **1985**;

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUIZA, R.; Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas, *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451, **2007**;

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

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N.; Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 10, 248. **2004**;

MME: Ministério das Minas e Energia – Reunião Prodeem – Mercado invisível [online]. Disponível na Internet via <http://www.mme.gov.br/Prodeem/prodeem.htm>

MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N.; Biodiesel from soybean oil - experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories, *Biotechnol. Lett.*, 28, 637, **2006**.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos. Editora: Livraria Varela. São Paulo,. 150 p, **1998**;

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N.; Principles of Biochemistry; 3rd. edition, 73, 1191, **2000**;

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S.; Immobilized *Pseudomas cepacia* lipase for biodiesel fuel protection from soybean oil. *Bioresource technol.*; v.96, pp. 769 – 777, **2005**;

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona, **2004**;

OLIVEIRA, D.; ALVES, T. L. M.; A kinetic study of lipase catalyzed alcoholysis of palm kernel oil. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 84 – 86, pp. 59 – 68, **2000**;

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E.A.; PEREIRA, W. A.; ANDRADE, P. A.; BRAZ, J.; Nanosized and reusable SiO₂/ZrO₂ catalyst for highly efficient biodiesel production by soybean transesterification, *Braz. Chem. Soc.* v.16, pp. 1313, **2005**;

PRADO, E. A.; ZAN, R. A.; GOLFETTO, D. C.; SCHWADE, V. D.; Biodiesel: Um tema para uma aprendizagem efetiva, Anais do XXXIV COBENGE. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, **2006**;

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S.; Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technol.*; v.98, n.3, pp. 648 – 653, **2007**;

SAGIROGLU, A., Conversion of sunflower oil to biodiesel by alcoholysis using immobilized lipase. *Artificial cells blood subst.biotechnol*, v.36, n.2, pp. 138 – 149, **2008**;

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, **1998**;

SHIMADA, Y.; WATANABE, H.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, pp. 133–142, **2002**;

SILVA, L. L.; Estudos de óleos residuais oriundos de processo de fritura e qualificação desses para obtenção de monoésteres (biodiesel), Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Maceió – Al, **2008**;

SOO, E. L.; SALLEH, A. B.; BASRI, M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; KAMARUDDIN, K.; Response surface methodological study on lipase catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochem.* v.39, n.11, pp. 1511 – 1518, **2004**;

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química Nova.* v. 30, n.3, pp. 667 – 676, **2007**;

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**;

VILLENEUVE, P.; Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol. Advances*, v.25, n.6, pp. 515 – 536, **2007**;

YADAV. G. D.; JADHAV, S. R.; Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non aqueous medium. *Microporous Mesoporous Mat.*; v. 86, n. 1-3, pp. 215 – 222, **2005**;

WATANABE, Y.; MIYAWAKI, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; Equilibrium constant for lipase catalyzed condensation of mannose and lauric acid in water miscible organic solvents.; *Enzyme Microb. Technol.*, v.29, n. 8 – 9, pp. 494 – 498, **2001**;

WEISZ, P. B.; HAAG, W.O.; RODEWALD, P. G.; Catalytic production of high-grade fuel (gasoline) from biomass compounds by shape-selective catalysis. *Science*, **1979**;

WOLFF, A. S., BAGGIO, B. S., ANTUNES, F. S., Produção enzimática de biodiesel, Trabalho de graduação para o departamento de engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2008**;

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**;

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

www.anvisa.gov.br, acessado em 23/02/2010;
www.biodieselbr.com, acessado em 23/02/2010;
www.biodiesel.gov.br, acessado em 01/02/2010;
www.institutobiosantos.com.br/projeto.html, acessado em 12/10/2009.