

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE UMA
MISTURA DE ÓLEOS USANDO A NOVOZYME 435
COMO CATALISADOR**

CAMILA TEIXEIRA DA MOTTA NEVES

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE UMA
MISTURA DE ÓLEOS USANDO A NOVOZYME 435 COMO
CATALISADOR**

CAMILA TEIXEIRA DA MOTTA NEVES

Sob a Orientação da Professora Dra.

Marisa Fernandes Mendes

e Coorientação da Dr.

Ana Iraidy Santa Brígida

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

Maio de 2019

N511a Neves, Camila Teixeira da Motta, 1991-
Avaliação da produção de biodiesel a partir de uma
mistura de óleos usando a Novozyme 435 como
catalisador / Camila Teixeira da Motta Neves. -
Seropédica, 2019.
73 f.: il.

Orientadora: Marisa Fernandes Mendes.
Coorientadora: Ana Iraidy Santa Brígida.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Engenharia Química, 2019.

1. produção de biodiesel. 2. mistura de óleos. 3.
lipase. 4. óleo de fritura. 5. modelagem cinética. I.
Fernandes Mendes, Marisa, 1972-, orient. II. Santa
Brígida, Ana Iraidy, 1981-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

CAMILA TEIXEIRA DA MOTTA NEVES

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31 / MAIO / 2019.

Prof.a. Dr^a. Marisa Fernandes Mendes
(Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ) (Orientadora)

Dr^a. Ana Iraidy Santa Brígida
(Embrapa Agroindústria Tropical) (Coorientadora)

Prof. Dr. Bruno Lobato Augusto
(Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ)

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Tôrres
(Departamento de Química e Ambiental/FAT/UERJ)

Prof. Dr. Sandro Pereira Ribeiro
(Departamento de Engenharia Química/Universidade de Vassouras)

Dedico esta dissertação aos meus pais, Solange Motta e Marcos Neves e a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram e estão próximos a mim, fazendo este trabalho acontecer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por não ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis, por me guiar em meus caminhos e pela força e bênçãos a mim concedidas.

Aos meus pais, Marcos Teles Neves e Solange Teixeira da Motta, e ao meu irmão Samuel Teixeira da Motta Neves, por toda o amor, incentivo e apoio, sem a ajuda e força dada por eles esse sonho não seria possível. A conquista é nossa.

Ao meu namorado, Guilherme dos Passos Mathias Pereira, pelo amor, companheirismo e amizade, pela compreensão em meus momentos de estresse e por sempre fazer o possível para me deixar mais feliz.

A Prof^a. Dr^a. Marisa Fernandes Mendes e a Prof^a. Dr^a. Ana Iraidy Santa Brígida, pela valiosa orientação, dedicação e paciência, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelas críticas construtivas que contribuíram para a melhoria do trabalho e para meu crescimento profissional.

A todos do grupo LTAB, que me acolheram desde que cheguei, por tornarem o dia a dia mais leve e por me ajudarem e me acalmarem nos momentos de dificuldades. Foi incrível compartilhar risadas, momentos bons e muitas estórias com vocês.

Ao grupo do Laboratório Produtos Naturais 4, em especial ao Leonardo Lucchetti, por terem sempre me recebido muito bem e me ajudado com as análises cromatográficas deste trabalho.

Aos amigos do grupo de carona, que fizeram as idas e vindas da Rural mais divertidas, pelas boas conversas e risadas no trânsito.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por mais esta oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional.

A todos os demais amigos que se fizeram presente, acreditaram em mim, me deram apoio e torceram pelo meu sucesso. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

RESUMO

NEVES, Camila Teixeira da Motta. **Avaliação da produção de biodiesel a partir de uma mistura de óleos usando a Novozyme 435 como catalisador.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O estudo a respeito da produção de biocombustíveis está motivado no crescente aumento da demanda energética assim como na preocupação ambiental. O biodiesel tem mostrado grande potencial para substituição ao óleo diesel, devido sua facilidade de produção e variedade de matérias primas disponíveis mundialmente. Dentre as possíveis rotas para a produção de biodiesel, têm-se a catálise enzimática que, apesar do custo elevado do biocatalisador, tem como vantagens a geração de produtos com maior pureza, poder de reutilização e possibilidade do uso de matérias primas de baixa qualidade, tornando possível a utilização de diferentes misturas, minimizando os custos de produção. Diante disso, este trabalho visou estudar a produção de biodiesel a partir de uma mistura de óleo de soja e óleo de fritura, usando a lipase comercial Novozyme 435 como biocatalisador. Para isso, foi avaliada a influência do teor de lipase adicionado ao meio (variando de 5 a 20%), do teor de óleo de fritura na mistura (variando de 0 a 100%) e do tempo de reação (variando de 4 a 10 h) na conversão em ésteres no produto. Os resultados obtidos mostraram que a Novozyme 435 foi capaz de alcançar elevadas conversões para a reação. Verificou-se uma conversão máxima de 98,05% utilizando uma razão molar de metanol para óleo de 3:1, 12,5% de lipase, uma mistura contendo 50% de óleo de fritura, 10 h de reação à 40 °C. O teor de lipase foi o fator que apresentou maior influência na conversão e, para concentrações acima de 13% de lipase no meio, a característica da mistura de óleos não influenciava na variável dependente. Desta forma, foi possível obter altas conversões mesmo utilizando altos teores de óleo de fritura na mistura. Estudou-se também a estabilidade operacional da Novozyme 435 no meio e observou-se que esta foi capaz de manter 94% de sua atividade após 5 ciclos de utilização. Posteriormente, foi realizada a modelagem cinética da reação. Dois modelos cinéticos foram propostos, o da Lei das Potências e de Eley-Rideal, e ambos correlacionaram bem os dados experimentais.

Palavras-Chave: lipase, biodiesel, planejamento experimental, modelagem cinética

ABSTRACT

NEVES, Camila Teixeira da Motta. **Evaluation of biodiesel production from an oil mixture using Novozym 435 as catalyst.** Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The increasing on energy demand as well as environmental concern still motivates the study on biofuels production. Biodiesel has shown great potential for substitution of diesel, due to its ease of production and to the variety of raw materials available worldwide. Among the possible routes for the production of biodiesel, there is enzymatic transesterification that, despite the high cost of the biocatalyst, has the advantage of generating products with higher purity, its reusability and it also allows the use of low quality raw materials. This makes it possible to use a mixture of different raw materials in order to minimize production costs. Therefore, this study aimed to study the production of biodiesel from a mixture of soybean oil and frying oil, using the commercial lipase Novozyme 435 as a biocatalyst. For this, the influence of the lipase dosage (varying from 5 to 20%), the frying oil content in the mixture (varying from 0 to 100%) and the reaction time (varying from 4 to 10 h) on the methyl ester yield. The results obtained showed that Novozyme 435 was able to achieve high yields for the reaction. A maximum yield of 98.05% was obtained using a methanol to oil molar ratio of 3:1, 12.5% lipase, a mixture containing 50% frying oil, and 10 h of time reaction at 40 ° C. The lipase content was the factor that showed the greatest influence on the yield and, for lipase dosage above 13%, the oil blend characteristic does not influence the dependent variable. Therefore, it is possible to obtain high yields even using high contents of frying oil in the mixture. The operational stability of Novozyme 435 was also studied in the medium and it was observed that the lipase was able to maintain 94% of its activity after 5 cycles of reuse. Subsequently, the kinetic modeling of the reaction was performed. Two kinetic models were proposed, the Power Law and Eley-Rideal mechanism, and both correlated well the experimental data.

Keywords: lipase, biodiesel, experimental design, kinetic modeling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção regional de biodiesel em 2017 (Adaptado de EPE, 2017).....	4
Figura 2. Capacidade instalada de produção de biodiesel e consumo (Adaptado de EPE, 2017).....	5
Figura 3. Participação das matérias primas para a produção de biodiesel no Brasil em 2017 (Adaptado de EPE, 2017)	8
Figura 4. Reação de transesterificação dos triglicerídeos (Adaptado de Talebian-Kiakalaieh <i>et al.</i> , 2013).....	10
Figura 5. Reação de hidrólise dos triglicerídeos (Adaptado de Atadashi <i>et al.</i> , 2013)...	11
Figura 6. Reação de saponificação (Adaptado de Atadashi <i>et al.</i> , 2013).....	11
Figura 7. Transesterificação do óleo de soja, óleo de girassol e óleo de farelo de arroz utilizando diferentes lipases e álcoois (Adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> , 2008).....	15
Figura 8. Dados experimentais (símbolos) e modelo cinético (linhas) da transesterificação do óleo de soja com metanol utilizando casca de ovo como catalisador. OVC: cascas de ovos moídas e calcinadas. OVULCx: cascas de ovos moídas submetidas a irradiação de ultrassom por x horas. (Adaptado de Risso <i>et al.</i> , 2018)	26
Figura 9. Fluxograma das Etapas Experimentais conduzidas para o Processo de Produção de Biodiesel	28
Figura 10. Esquema ilustrativo do aparato experimental para a reação de transesterificação enzimática, sendo (a) agitador magnético e (b) banho termostático	31
Figura 11. Gráfico de Pareto para a análise da conversão em ésteres metílicos.....	36
Figura 12. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura.....	38
Figura 13. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do tempo e do teor de lipase.	38
Figura 14. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de óleo de fritura e do tempo.....	39
Figura 15. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura para um tempo fixo de 10 h	40
Figura 16. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura para um tempo fixo de 7 h	40

Figura 17. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura para um tempo fixo de 4 h	41
Figura 18. Estudo da reutilização da Novozyme 435 para a produção de biodiesel.....	42
Figura 19. Conversões experimental e predita pelo modelo da Lei das Potências em função do tempo	43
Figura 20. Conversões experimental e predita pelo modelo de Eley-Rideal em função do tempo	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos nos óleos (Adaptado de Mahmudul <i>et al.</i> , 2017; Karmakar <i>et al.</i> , 2010; Gui <i>et al.</i> , 2008).....	6
Tabela 2. Viscosidade cinemática dos metil ésteres de ácidos graxos (Adaptado de Knothe & Razon, 2017)	7
Tabela 3. Densidade (a 15 °C) dos metil ésteres de ácidos graxos (Adaptado de Knothe & Razon, 2017).....	7
Tabela 4. Produção de biodiesel utilizando a Novozyme 435 e o óleo de soja e de fritura	19
Tabela 5. Variáveis e níveis correspondentes ao planejamento de experimentos.....	30
Tabela 6. Matriz do DCCR para a realização dos experimentos de produção de biodiesel	30
Tabela 7. Composição dos ácidos graxos presentes nas matérias primas.....	33
Tabela 8. Propriedades físico-químicas das matérias primas.....	34
Tabela 9. Resultados de conversão para cada ensaio do planejamento de experimentos	35
Tabela 10. Resultados de coeficientes de regressão, erro padrão e p-valor.....	36
Tabela 11. Análise de variância da conversão da reação de transesterificação em Biodiesel	37
Tabela 12. Soma do quadrado dos erros para os dados obtidos com os dois modelos sugeridos.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Biodiesel	3
2.2	Matéria prima.....	6
2.2.1	Óleo de soja.....	8
2.2.2	Óleo de fritura residual.....	9
2.3	Produção de biodiesel	10
2.4	Biocatalisadores	12
2.4.1	Lipases.....	13
2.5	Mistura de óleos.....	20
2.6	Considerações sobre a revisão bibliográfica.....	21
3	MODELAGEM CINÉTICA	22
3.1	Modelo de Lei das Potências	22
3.2	Mecanismo Eley-Rideal.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Materiais	27
4.2	Metodologia Experimental	27
4.2.1	Caracterização das matérias primas	27
4.2.2	Planejamento de experimentos.....	30
4.2.3	Procedimento experimental.....	31
4.2.4	Caracterização do produto.....	31
4.2.5	Reutilização da enzima.....	32
4.2.6	Estudo cinético	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1	Caracterização da matéria prima.....	33

5.2	Análise dos Resultados segundo o Planejamento Experimental	34
5.3	Estudo da Reutilização.....	41
5.4	Resultados da Modelagem cinética do Processo	43
5.4.1	Lei das Potências	43
5.4.2	Mecanismo de Eley-Rideal	44
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	46
7	REFERÊNCIAS BLIBLIOGRÁFICAS	47
	Anexo 1 – Cromatogramas gasosos dos óleos de soja e de fritura	58
	Anexo 2 – Cromatograma gasoso da amostra que apresentou a maior conversão	60

1 INTRODUÇÃO

O setor energético é um dos principais propulsores da economia de uma nação. Porém, problemas como a preocupação ambiental relacionada à emissão de gases poluentes, o aumento do preço dos combustíveis fósseis e a concentração das reservas de petróleo em algumas determinadas regiões fazem com que seja necessário buscar fontes alternativas de energia, de forma a aumentar a segurança energética e o desenvolvimento econômico.

Além disso, o desenvolvimento econômico e tecnológico associado ao crescimento populacional leva a uma maior demanda energética. De acordo com o Relatório Internacional de Energia (IEA, 2017), prevê-se um aumento de 28% no consumo energético mundial entre os anos de 2015 e 2040, sendo o setor de transportes o segundo maior no consumo energético mundial.

Hoje, a maior parte da energia produzida e utilizada no mundo é proveniente dos combustíveis fósseis. Porém, a conscientização a respeito dos danos ambientais causados pelas emissões de gases poluentes devido à utilização de combustíveis fósseis leva a uma intensificação da busca por combustíveis provenientes de fontes de energia renováveis e menos poluentes. No Brasil, esta preocupação se acentua visto que o setor de transporte é responsável por 48% das emissões de gases poluentes (SEEG, 2017).

De acordo com o Balanço Energético Nacional (BEN, 2018), a fonte de energia mais consumida no setor de transporte brasileiro é o óleo diesel, seguido da gasolina. Visto esse contexto, o biodiesel surge com uma alternativa promissora ao óleo diesel, já que é um combustível proveniente de fonte renovável, é biodegradável e com baixa emissão de gases poluentes. A tudo isso acrescenta-se o alto consumo de diesel no país, que mostra o potencial do mercado para a inserção deste biocombustível.

Além das vantagens já citadas, o biodiesel pode ser utilizado em motores a diesel sem que sejam necessárias modificações, possui uma maior eficiência de combustão e emite menos material particulado durante esse processo, é menos tóxico, é não inflamável e pode ser produzido a partir de uma grande gama de matérias primas. Porém, como desvantagem tem-se maiores emissões de óxidos de nitrogênio, alta viscosidade que pode gerar entupimento em filtros, linhas e injetores e maior suscetibilidade à degradação se armazenado por longos períodos.

Atualmente, o Brasil já é o segundo maior produtor de biodiesel e, além das vantagens ambientais, o aumento da produção e consumo de biodiesel tem como vantagens, econômicas e sociais, a diminuição da necessidade de importação de diesel e o incentivo à economia local, gerando empregos no setor primário.

O biodiesel é produzido, principalmente, a partir de óleos vegetais e gorduras animais. O principal processo de produção é a reação de transesterificação do material graxo com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador homogêneo básico. Porém, devido a problemas associados à utilização de catalisadores químicos, cresce o interesse pela utilização de biocatalisadores como uma opção menos agressiva ao meio ambiente para essa produção e que gere produtos de maior pureza.

Portanto, este trabalho tem como principais objetivos avaliar tecnicamente o uso de lipase como biocatalisador e a influência das principais variáveis do processo na reação de transesterificação enzimática utilizando a mistura de óleo de soja e óleo de fritura como matéria prima, fazendo o estudo cinético da reação e analisando a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador.

Diante disso, esta dissertação é apresentada em seis capítulos. O segundo capítulo trata da revisão da literatura sobre o biodiesel, as matérias primas, métodos de obtenção e sobre os biocatalisadores. No terceiro capítulo apresenta-se os modelos cinéticos aplicados a esta

dissertação, além dos trabalhos que já envolveram o uso desses modelos e seus principais resultados. O quarto capítulo aborda os materiais e métodos utilizados ao longo da dissertação e no quinto, são apresentados e analisados os resultados obtidos para os vários experimentos realizados e discussões acerca da metodologia estudada. Por fim, no sexto capítulo tem-se as conclusões e sugestões para trabalhos futuros seguindo a mesma linha de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo de revisão bibliográfica será apresentado um breve contexto histórico sobre o biodiesel, uma contextualização sobre o cenário atual, as matérias primas e os principais processos de produção. Além disso, destaca-se o uso de biocatalisadores na produção de biodiesel. Em seguida, é apresentada uma revisão enfatizando o uso de uma lipase comercial, a Novozyme 435, e os estudos utilizando misturas de óleo, como matéria prima.

2.1 Biodiesel

Rudolf Diesel, o inventor do motor a diesel em 1893, utilizou óleo de amendoim como combustível para o primeiro teste do seu principal modelo. Desde 1900 são reportados estudos utilizando óleos vegetais como combustível para motores diesel até que o combustível fóssil, diesel, substituiu completamente o uso de óleos vegetais visto que eram mais baratos, mais disponíveis e possuíam subsídios dos governos (LIN *et al.*, 2011). Além disso, esses estudos mostraram que a alta viscosidade desses óleos poderia levar a problemas operacionais nos motores devido à deposição de carbono. A partir disso, iniciou-se uma busca para minimização das diferenças características entre os óleos vegetais e o diesel. Foi quando, em 1937, o pesquisador belga George Chavanne descobriu e patenteou o processo de transesterificação, onde etil ésteres foi obtido a partir do óleo de palma e etanol (BISEN *et al.*, 2010). Apesar disso, os óleos vegetais ainda foram muito utilizados como combustível durante a Segunda Guerra Mundial, devido às restrições de distribuição do petróleo devido ao conflito. Com o fim da Segunda Guerra em 1945, a distribuição do petróleo se normalizou e as pesquisas sobre o biodiesel se tornaram escassas. Após quase 30 anos do fim da guerra, em 1973, teve-se a crise do petróleo onde os preços aumentaram excessivamente. Com isso, cientistas e governantes voltaram a buscar alternativas aos combustíveis fósseis (KNOTHE & RAZON, 2017). Em 1977, o cientista brasileiro, Expedito Parente, solicitou a primeira patente do processo industrial para a produção de biodiesel (LIN *et al.*, 2011).

De forma geral, um dos principais interesses no desenvolvimento do biodiesel é a segurança energética, ou seja, uma busca pela redução na dependência por combustíveis fósseis. A princípio, os combustíveis fósseis continuam a dominar o suprimento de energia mundial, porém a oferta é dominada por alguns poucos produtores, sendo muito deles no Oriente Médio. Com isso, o preço do petróleo sempre é considerado volátil e apresenta a tendência de aumentar em longo prazo. Assim, diversos governos fizeram uso de políticas de incentivo para a produção e o uso de biocombustíveis, aumentando assim a diversificação de fontes de energia e reforçando a segurança energética (LIN *et al.*, 2011).

No Brasil, os primeiros experimentos com biodiesel aconteceram na década de 1920. Com a crise do petróleo em 1973, o programa brasileiro de biocombustíveis teve seu início com a criação do PROÁLCOOL (Programa Nacional de Alcool) e PROÓLEO (Programa Nacional de Óleo) criados em 1975 e 1980, respectivamente. Porém, o incentivo para a produção de biodiesel só se iniciou de fato com a criação dos mecanismos de incentivo PROBIODIESEL (Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico para o Biodiesel) em 2002 e PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel) em 2005. Esses programas foram essenciais para a inserção do biodiesel na matriz energética brasileira (OLIVEIRA & COELHO, 2017). O PNPB busca a redução da dependência do Brasil nas importações de diesel e novas fontes de energia renovável. Este programa também visa incentivar pequenos agricultores a produzir matérias primas para a produção do biodiesel através do certificado Selo Social, que é fornecido pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário para produtores de biodiesel que compram sementes desses pequenos agricultores. Por sua vez, os produtores de

biodiesel com o Selo Social obtêm benefícios fiscais do governo federal (BERGMANN *et al.*, 2013).

Mais recentemente surgiu o RenovaBio, uma iniciativa de valorização do potencial de fontes renováveis associados ao compromisso de redução das emissões de gases de efeito estufa, assumidos pelo Brasil em âmbito internacional. Foi lançada em dezembro de 2016 e instituída em dezembro de 2017 com a promulgação da Lei nº 13.576. O programa baseia-se na contribuição dos biocombustíveis para a segurança energética, preservação ambiental e promoção de desenvolvimento econômico e social. O seu funcionamento está baseado em metas anuais de redução da intensidade de carbono, Certificação de Biocombustíveis (relacionado à produção/importação de biocombustíveis em função da intensidade de carbono) e Crédito de Descarbonização (ativo financeiro que variará de acordo com o volume de biocombustíveis comercializado visando o estímulo da produção) (EPE, 2017).

A obrigatoriedade da mistura do biodiesel no diesel mineral, no Brasil, veio com o artigo 2º da Lei nº 11.097/2005 e entrou em vigor em janeiro de 2008 com uma mistura de 2% (B2) de biodiesel em 98% de diesel. Esse percentual tem sido sucessivamente ampliado e tem-se, atualmente, a adição de 10% de biodiesel na mistura (B10) desde março de 2018. A ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) define o biodiesel como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal (ANP, 2018).

Em 2017, o Brasil produziu, aproximadamente, 4 milhões de m³ de biodiesel, sendo a região Centro-Oeste a principal produtora, como pode-se observar na Figura 1 (EPE, 2017).

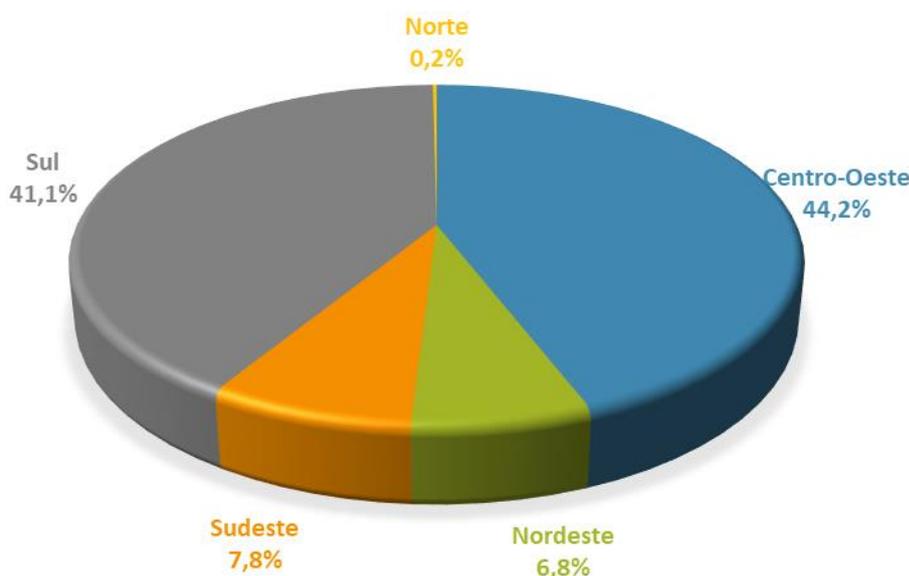


Figura 1. Produção regional de biodiesel em 2017 (Adaptado de EPE, 2017)

A produção e consumo de biodiesel tem crescido no país ao longo dos anos, como se pode observar na Figura 2, porém as usinas ainda não operam em sua capacidade máxima, visto que a capacidade de produção dessas usinas se manteve maior que a produção real e que o consumo desde 2006. Com isso, é provável que a produção de biodiesel continue aumentando, visto o aumento na demanda, devido ao aumento da adição na mistura com diesel que tem acontecido gradativamente e a possibilidade de aumento na produção.

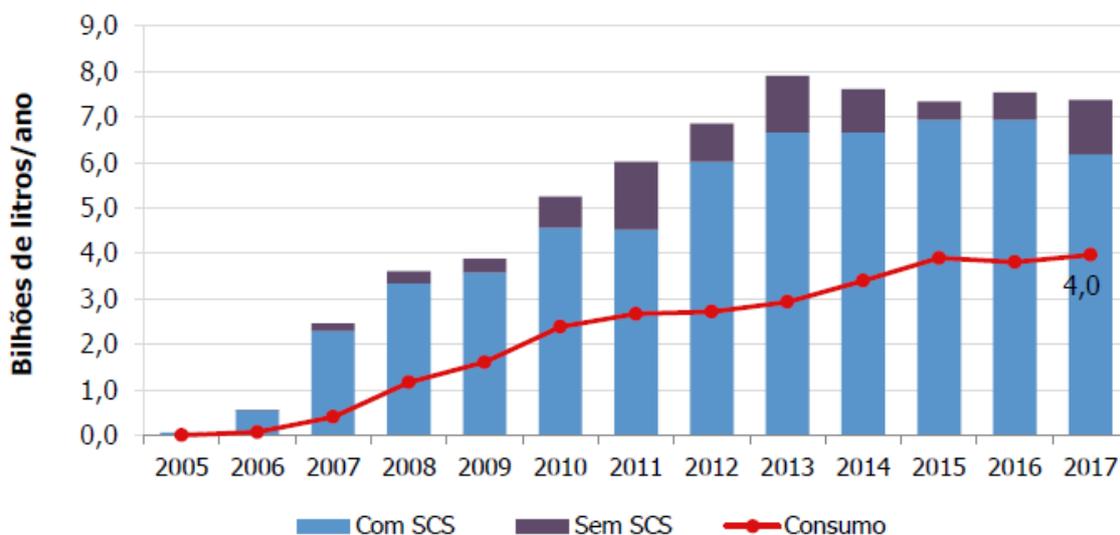


Figura 2. Capacidade instalada de produção de biodiesel de usinas com e sem certificado de Selo Social (SCS) e consumo (Adaptado de EPE, 2017)

Em relação ao cenário mundial, em 2016, o Brasil foi o segundo maior consumidor mundial de biodiesel, atrás apenas dos Estados Unidos com 7,8 milhões de m³ e seguido da Alemanha, Argentina e Colômbia (ANP, 2017). De acordo com a oferta interna de energia no Brasil, 43,2% do total é proveniente de fontes renováveis, número bem maior que a média mundial, que é de apenas 14,2%. Da porção renovável encontra-se o etanol, carvão vegetal, energia hidráulica, energia eólica, entre outros, sendo o biodiesel apenas 2,7%. O biodiesel corresponde a 1,2% da matriz energética brasileira (MME 2018).

Uma das principais vantagens do biodiesel reside no fato de que é altamente biodegradável. De acordo com Sharma *et al.* (2008), entre 90-98% do biodiesel é mineralizado em, aproximadamente, 25 dias sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Além disso, foi relatado que a adição de biodiesel ao diesel reduz o tempo de degradação, sendo assim a biodegradabilidade da mistura aumenta com o aumento da porcentagem de biodiesel na mistura.

Outra vantagem é que o teor de oxigênio presente na estrutura molecular do biodiesel (aproximadamente 11 a 15%) impulsiona o processo de combustão em motores de ignição por compressão e reduz a emissão de poluentes como por exemplo, monóxido de carbono, fuligem e partículas finas (ATADASHI *et al.*, 2013). De acordo com Schröder *et al.* (2013), a cada 5% de adição de biodiesel, a mistura leva a uma redução de 2,5 – 3,75% de emissão de CO₂, além da redução da emissão de hidrocarbonetos, monóxido de carbono e material particulado. Contudo, a adição de mais de 5% de biodiesel ao diesel leva ao aumento nas emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x), contribuindo com o aumento de nevoeiros.

Somado a isso, o biodiesel é produzido a partir de fontes renováveis, possuindo uma ampla gama de matérias primas para sua produção. Essas matérias primas podem ser encontradas em qualquer região do planeta, fazendo com que todos os países possam ser capazes de produzir seu próprio combustível, diminuindo a dependência nos países exploradores de petróleo. Como a matéria prima contabiliza boa parte do custo da produção, é de grande importância que se faça um estudo mais detalhado para a escolha mais adequada do óleo a ser utilizado (ATABANI *et al.*, 2012).

2.2 Matéria Prima

O biodiesel é produzido, principalmente, a partir de óleos vegetais e gorduras animais. Algumas das matérias primas mais utilizadas são os óleos de soja (HOSSEINI *et al.*, 2019), de amendoim (JUNIOR *et al.*, 2016), de milho (BALAMURUGAN *et al.*, 2018), de canola (KORKUT & BAYRAMOGLU, 2018), de palma (ARCHER *et al.*, 2018), de girassol (MERCURI *et al.*, 2016), de colza (MAZANOV *et al.*, 2016), de semente de algodão (SHANKAR *et al.*, 2017), de rícino (KEERA *et al.*, 2018) e de pinhão manso (LIN & CHEN, 2017), além de sebo bovino (MENDONÇA *et al.*, 2011), óleo de fritura (CORRO *et al.*, 2016) e óleos de microalgas (RAOUFI & GARGARI, 2018). A escolha da matéria prima a ser utilizada está basicamente relacionada com o clima e disponibilidade, de acordo com a região em que se deseja produzir o biodiesel (KARMAKAR *et al.*, 2010).

Além disso, é de grande importância a análise do teor de óleo presente em cada uma das matérias primas e suas características, visto que os custos relacionados ao cultivo da matéria prima e extração do óleo contido nela conta como, aproximadamente, 75% do custo de produção do biodiesel e suas características químicas influenciam na qualidade do produto final (DEMIRBAS, 2009).

O teor de cada ácido graxo presente na matéria prima está diretamente ligado às propriedades do combustível produzido a partir desta. Pode-se dizer, então, que as propriedades físicas e químicas do biodiesel estão relacionadas ao perfil de ácidos graxos presentes nas gorduras e óleos utilizados como matéria prima (KARMAKAR *et al.*, 2010). Na Tabela 1, pode-se observar o perfil de ácidos graxos de algumas matérias primas utilizadas para produzir biodiesel. Propriedades como número de cetano, índice de iodo e calor de combustão estão diretamente relacionadas com a composição química do biodiesel. O aumento da insaturação diminui o número de cetano e leva a uma fraca estabilidade à oxidação, o que significa maior suscetibilidade a degradação desse combustível se armazenado por longos períodos (MAHMUDUL *et al.*, 2017).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos nos óleos (Adaptado de Mahmudul *et al.*, 2017; Karmakar *et al.*, 2010; Gui *et al.*, 2008)

Ácido graxo	Soja	Girassol	Coco	Colza	Palma	Pinhão manso	Sebo
12:0			44-52				
14:0	<0,5	<1,0	13-19		0,5-2,0	0,1 -1,4	3-6
16:0	7-11	3-6	8-11	4,9	32-45	12-17	23-32
18:0	2-6	1-3	1-3	1,6	2-7	5-9,5	19-25
18:1	19-34	14-35	5-8	33	38-52	37-63	37-43
18:2	43-56	44-75	0-1	20,4	10-27	19-41	2-13
18:3	5-11	<1,5		7,4	<0,2		0-1
20:0	<1,0	0,6-4,0	0-0,5			0,3	

Outra característica que está ligada ao perfil de ácidos graxos do óleo e do éster de ácido graxo correspondente é a viscosidade. A viscosidade afeta o escoamento do combustível e também a atomização do combustível, após injetado na câmara de combustão, determinando também a possível formação de depósitos de carbono no motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência de aparecimento dos problemas citados anteriormente. A partir desse conceito, é que se busca a redução da viscosidade dos óleos vegetais para sua utilização como combustível. A viscosidade do biodiesel é uma ordem de magnitude menor que a do óleo utilizado para produzi-lo (KNOTHE & RAZON, 2017). A viscosidade de cada éster de ácido

graxo aumenta com o aumento da cadeia carbônica e com o aumento do grau de saturação, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Viscosidade cinemática dos metil ésteres de ácidos graxos ^a (Adaptado de Knothe & Razon, 2017)

Metil ésteres saturados		Metil ésteres insaturados	
Metil éster	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Metil éster	Viscosidade cinemática (mm ² /s)
8:0	1,19	16:1 Δ9c	3,67
10:0	1,72	18:1 Δ9c	4,51
12:0	2,43	18:1 Δ9t	5,85
14:0	3,30	18:2 Δ9c, 12c	3,65
16:0	4,38	18:3 Δ9c, 12c, 15c	3,14
18:0	5,86	18:3 Δ6c, 9c, 12c	3,01
20:0	7,4	20:1 Δ11c	5,77
22:0	9,31	20:4 Δ5c, 8c, 11c, 14c	3,11
24:0	11,53	22:1 Δ13c	7,33
		24:1 Δ15c	8,87

^a Os números indicam a quantidade de carbono, a quantidade de ligações duplas e indicação da posição da ligação dupla

Para que a mistura de ésteres de ácidos graxos seja considerada biodiesel, o valor da densidade deve estar entre o intervalo de 860-900 kg/m³. A densidade também varia de acordo com o perfil de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, com os metil ésteres de ácidos graxos. Alguns valores de densidade para alguns metil ésteres estão exemplificados na Tabela 3, onde se observa que a densidade aumenta com o aumento da insaturação (KNOTHE & RAZON, 2017).

Tabela 3. Densidade (a 15 °C) dos metil ésteres de ácidos graxos ^a (Adaptado de Knothe & Razon, 2017)

Metil ésteres saturados		Metil ésteres insaturados	
Metil éster	Densidade (g/cm ³)	Metil éster	Densidade (g/cm ³)
8:0	0,8802	16:1 Δ9c	0,8810
10:0	0,8764	18:1 Δ9c	0,8775
12:0	0,8730	18:1 Δ9t	0,8748
14:0	NA ^b	18:2 Δ9c, 12c	0,8902
16:0	NA ^b	18:3 Δ9c, 12c, 15c	0,9017
18:0	NA ^b	20:1 Δ11c	0,8766
		20:4 Δ5c, 8c, 11c, 14c	0,9064
		22:1 Δ13c	0,8744

^a Os números indicam a quantidade de carbono, a quantidade de ligações duplas e indicação da posição da ligação dupla

^b ponto de fusão maior que 15 °C

Na Europa, a principal matéria prima utilizada é o óleo de colza; já na Argentina e Estados Unidos a oleaginosa mais utilizada é a soja, enquanto que na Malásia e Tailândia, o biodiesel é produzido, principalmente, a partir de óleo de palma (MAHMUDUL *et al.*, 2017). No Brasil, a distribuição da participação das matérias primas se dá de acordo com a Figura 3, sendo possível observar que a soja é a matéria prima mais utilizada visto sua disponibilidade em todo território Brasileiro. Na Figura 3 também é possível observar que ainda existe uma escassez na diversificação das matérias primas utilizadas, visto que mais de 90% da produção está baseada em apenas 3 insumos principais. Matérias primas com elevado potencial, como é o caso do óleo de fritura que possui alta disponibilidade e baixo custo, ainda podem ser melhor exploradas.

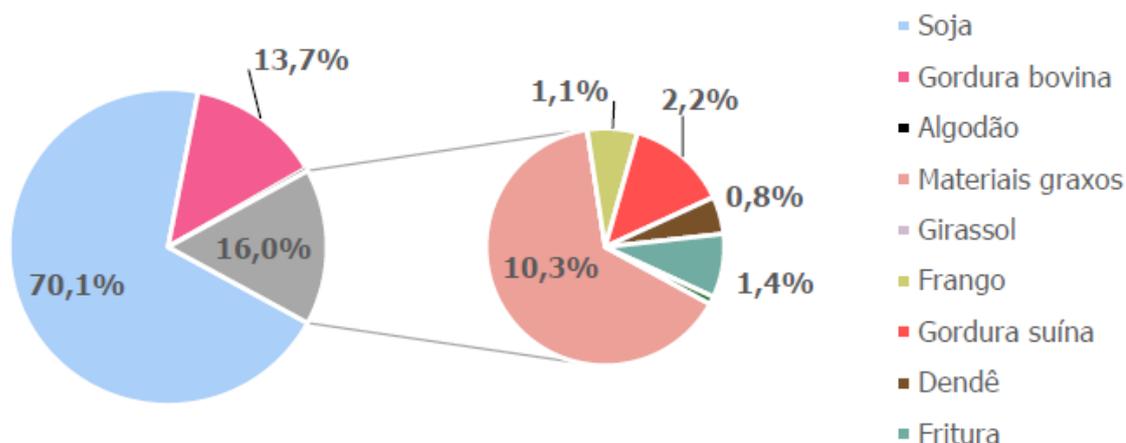


Figura 3. Participação das matérias primas para a produção de biodiesel no Brasil em 2017 (Adaptado de EPE, 2017)

De acordo com o potencial das matérias primas, foram utilizados, neste trabalho, o óleo de soja e o óleo de fritura como insumo para a produção de biodiesel.

2.2.1 Óleo de soja

A soja é uma planta da família *Fabaceae* e do gênero *Glycine* e pode ser cultivada em praticamente todo o território brasileiro. Hoje em dia, a soja é cultivada em monoculturas com safra anual e três meses de colheita (BERGMANN *et al.*, 2013). A soja já tem sido tradicionalmente utilizada como matéria prima para a produção de biodiesel no Brasil, sendo responsável por mais de 70% do biodiesel produzido no Brasil em 2017 (ANP, 2017).

No levantamento feito pela Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) observou-se um aumento de 35% na produção de grãos de soja no Brasil nos últimos 5 anos. A região Centro-Oeste é a maior produtora e a região sul a segunda maior, contabilizando 45,5% e 32,8%, respectivamente na safra 2017/18. O fato da soja não ser cultivada exclusivamente para a produção de biodiesel, mas também para a produção de farelos de proteínas, que são utilizados para produção de ração para frangos, porcos e gado, mostra-se a alta liquidez dos produtos no mercado (CASTANHEIRA *et al.*, 2014).

Dentre as vantagens de se utilizar a soja como insumo principal para a produção de biodiesel estão a sua disponibilidade em quantidade e qualidade suficientes e seu alto rendimento, visto que é produzida em uma cadeia bem estruturada e com tecnologias atualizadas e precisas. Além disso, seu cultivo é adaptado para todo o território brasileiro levando a baixos custos de transporte, moagem e armazenamento se comparada a outras

oleaginosas. Além disso, a soja é uma “commodity” com poucos produtores no mundo e grande quantidade de compradores (MORENO-PÉREZ *et al.*, 2017; OLIVEIRA & COELHO, 2017).

2.2.2 Óleo de fritura residual

A maioria das plantas de biodiesel utilizam óleos vegetais refinados como principal matéria prima. O custo relacionado ao uso de óleos refinados representa de 70 a 80% do custo total para a produção de biodiesel. Visto isso, os estudos utilizando óleos de baixa qualidade, como por exemplo o óleo de fritura residual, se faz importante para tornar o biodiesel mais economicamente atrativo. Apesar do óleo de fritura residual conter um alto teor de ácidos graxos livres, que pode ter uma influência negativa na reação de transesterificação a depender do catalisador utilizado, o custo do processo pode ser reduzido em duas ou três vezes quando utilizado óleo de fritura em substituição aos óleos refinados (LAM *et al.*, 2010; TALEBIAN-KIAKALAIH *et al.*, 2013). Além disso, estudos já mostraram que o biodiesel produzido a partir do óleo de fritura possui propriedades similares ao produzido a partir de óleos vegetais refinados quando testados em relação à performance e emissões de escape (OLIVEIRA & COELHO, 2017). Por isso, o óleo de fritura residual tem-se tornado uma alternativa promissora para a produção de biodiesel. Isto se deve à combinação de diferentes aspectos, como o econômico devido ao baixo custo de aquisição, ambiental já que evita que esse material seja descartado de forma incorreta e polua o meio ambiente, além de produzir um combustível menos poluente (ARAÚJO *et al.*, 2013).

O processo de fritura por imersão, onde são utilizados óleos vegetais como meio de transferência de calor é muito comum no setor alimentício, tanto doméstico quanto comercial. Esse processo gera um grande volume de óleo residual que geralmente não é descartado de forma correta, podendo poluir rios, aquíferos e o solo (OLIVEIRA & COELHO, 2017). Segundo a Companhia de Saneamento básico de São Paulo (SABESP), o despejo de forma incorreta de 1 L de óleo pode levar a contaminação de 25000 L de água, além de causar entupimento em tubulações, comprometendo as redes públicas de esgoto. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE), a capacidade de processamento das indústrias brasileiras em 2018 era de 63 milhões de toneladas/ano de óleos vegetais comestíveis, sendo os principais: o óleo de soja, de algodão, de girassol, de milho e de canola. De acordo com o IBGE (2018a), no Brasil, o consumo de óleos vegetais per capita é de, aproximadamente, 8 kg/ano. Assumindo a população atual brasileira contendo 208.494.900 habitantes (IBGE, 2018b) e que 18% do óleo utilizado é absorvido pelos alimentos durante o processo e os 82% restantes são considerados rejeitos, é possível estimar que $1,5 \times 10^6$ toneladas por ano de óleo residual são gerados. Esses dados ajudam a mensurar a quantidade de resíduo de óleo de fritura que são produzidos no país. Hoje em dia, já existem programas que ajudam no recolhimento dos óleos de fritura residuais como por exemplo: o ReÓleo em Florianópolis, o Projeto Renove em Salvador, o Programa de Reciclagem de Óleo de Fritura da Sabesp em São Paulo, o Projeto Cata Óleo em Ribeirão Preto, e o Programa de Reaproveitamento de Óleos Vegetais (PROVE) no Rio de Janeiro. O material recolhido é redirecionado para algumas aplicações, dentre elas a produção de biodiesel. Porém, mesmo com toda a disponibilidade dessa matéria prima, o biodiesel produzido a partir de óleo de fritura conta com apenas 1,4% da produção total brasileira, como foi apresentado na Figura 3, anteriormente.

Cada matéria prima possui sua determinada composição, que pode afetar diretamente a qualidade do biodiesel, influenciando também na escolha do processo de produção a ser utilizado, o que será discutido adiante.

2.3 Produção de Biodiesel

O uso direto dos óleos vegetais como combustível já foi estudado, porém seu uso tem como problema a alta viscosidade e baixa volatilidade. Com isso, estudos buscaram desenvolver métodos, a fim de aproximar as propriedades do óleo vegetal às propriedades do diesel mineral. Dentre esses métodos estão a diluição, microemulsão, pirólise e transesterificação (VERMA & SHARMA, 2016).

O método mais comum para a transformação de óleo em biodiesel é a transesterificação. O processo consiste de uma reação entre um mol de triglicerídeos, principal componente dos óleos e gorduras, com três moles de um grupo aceptor de grupo acila, geralmente um álcool de cadeia curta, como pode ser observado na Figura 4. Os produtos da reação são ésteres de ácidos graxos, o chamado biodiesel, e o glicerol, um subproduto da reação. O metanol é o álcool mais utilizado devido a sua alta reatividade e seu uso gera ésteres de ácidos graxos mais voláteis e um combustível menos viscoso, quando comparado ao produzido por etanol, por exemplo. A reação pode ser realizada por diferentes processos catalíticos ou em condições supercríticas. O catalisador tem como função o aumento da taxa de reação e a melhora na conversão em biodiesel (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; TALEBIAN-KIAKALAIEH *et al.*, 2013).

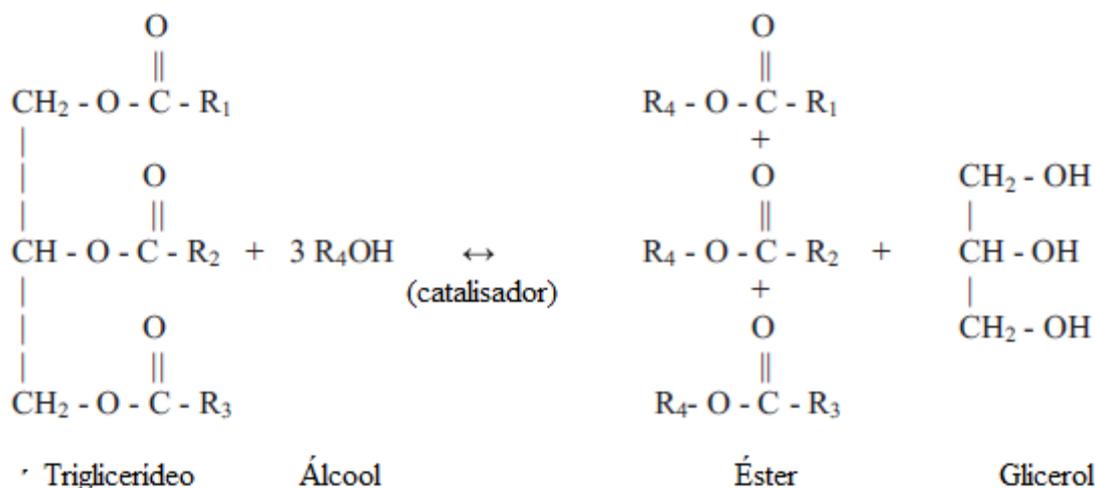


Figura 4. Reação de transesterificação dos triglicerídeos (Adaptado de Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013)

Um dos principais fatores que afetam a conversão da reação de transesterificação é a quantidade de álcool utilizada. Como a reação é reversível, o excesso de álcool garante que a maior parte dos triglicerídeos presentes seja convertida em ésteres. Porém, nesse processo há uma conversão máxima; com isso, o aumento da concentração de álcool para além da concentração ótima não só não aumentará a conversão, como ainda aumentará os custos com a recuperação do álcool. O tempo e a temperatura da reação também são fatores que afetam a conversão em biodiesel. A reação inicia de forma lenta devido às dificuldades de solubilização e dispersão do álcool no óleo. Após algum tempo, a reação acontece mais rapidamente. O aumento da temperatura leva a um aumento na conversão, visto que há uma diminuição na viscosidade do óleo, aumentando a taxa de reação. Porém, a utilização de uma temperatura maior que a temperatura ótima pode facilitar a reação de saponificação dos triglicerídeos e a vaporização do álcool (LEUNG *et al.*, 2010).

Além disso, a concentração e a natureza do catalisador utilizado têm papel crucial na conversão de triglicerídeos em biodiesel. Por isso, estudos têm explorado os mais diferentes

tipos de catalisadores para serem utilizados nesse processo. Os catalisadores se dividem, basicamente, em catalisadores homogêneos e heterogêneos.

Os catalisadores mais comumente utilizados para a produção de biodiesel em escala industrial são os catalisadores homogêneos alcalinos. Devido ao baixo custo, os mais utilizados são NaOH e KOH. Os catalisadores alcalinos homogêneos têm como vantagem alta taxa de reação com um baixo tempo de reação. O processo envolvendo catalisadores alcalinos exigem que a matéria prima utilizada seja anidro e que possuam menos de 3% de ácidos graxos livres. A presença de água na matéria prima leva a hidrólise dos triglicerídeos, gerando ácidos graxos livres, como pode ser visto na Figura 5. Já os ácidos graxos livres presentes na amostra reagem com o catalisador levando à formação de sabão, como pode ser observado na Figura 6. A formação de sabão consome e desativa o catalisador e, além disso, faz com que o processo de purificação do biodiesel produzido seja mais complexo (ATADASHI *et al.*, 2013).

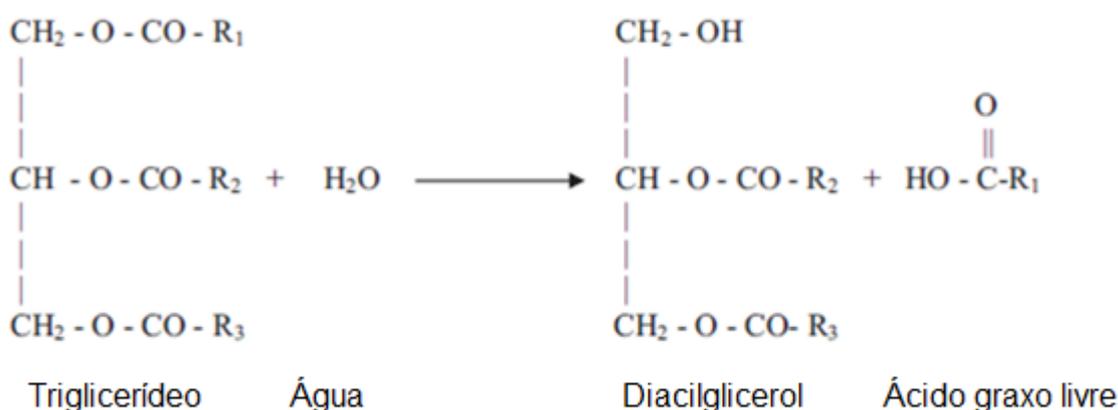


Figura 5. Reação de hidrólise dos triglicerídeos (Adaptado de Atadashi *et al.*, 2013)

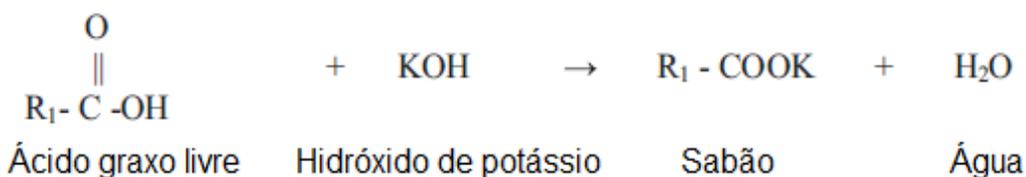


Figura 6. Reação de saponificação (Adaptado de Atadashi *et al.*, 2013)

Por outro lado, a catálise ácida tem como vantagem o teor de ácidos graxos livres presentes na matéria prima, que não interfere no processo. Porém, embora esse tipo de catálise apresente altas conversões, é necessário que haja um longo tempo de reação, temperaturas ainda mais elevadas, próxima do ponto de ebulição do álcool, e uma grande quantidade de álcool, podendo a razão molar álcool:óleo ser de aproximadamente 30:1 (GARCILASSO, 2014; SIMAS, 2008). Os catalisadores homogêneos ácidos mais utilizados são o ácido sulfúrico, ácido sulfônico e ácido clorídrico.

Devido aos problemas relacionados com a transesterificação básica, os catalisadores homogêneos ácidos são implantados com uma forma de pré-tratamento das matérias primas com baixa qualidade, ou seja, com alto teor de ácidos graxos livres e presença de água (ATADASHI *et al.*, 2013). Logo, a implantação de uma técnica de transesterificação em duas etapas pode proporcionar uma alta conversão, mesmo quando utilizadas matérias primas de baixa qualidade (ESONYE *et al.*, 2019; THOAI, *et al.*, 2019).

A busca por catalisadores heterogêneos se deu como forma de encontrar soluções para os problemas relacionados ao uso de catalisadores homogêneos como a dificuldade com a recuperação do glicerol, necessidade da remoção de sais inorgânicos do produto e tratamento das águas residuais alcalinas, o que ocasiona um custo adicional ao processo (BAJAJ *et al.*, 2010). A principal vantagem dos catalisadores heterogêneos é que eles podem ser facilmente recuperados e reutilizados, além de evitar a necessidade de etapas adicionais ao processo, como por exemplo, a lavagem dos produtos, reduzindo assim os custos do processo. Além disso, os catalisadores heterogêneos podem ser utilizados no processo de produção contínuo de biodiesel. Como desvantagem, tem-se que o sistema de três fases formado com a utilização do catalisador heterogêneo seja limitante para a transferência de massa (GULDHE *et al.*, 2015). Eles podem ser encontrados na forma ácida e básica, como por exemplo zeólitas, óxidos de metais alcalinos terrosos, zircônia e alumina.

Uma das desvantagens dos catalisadores químicos, tanto homogêneos quanto heterogêneos, são a alta demanda energética, devido a necessidade de altas temperaturas, e a possível poluição ambiental causada pelas águas residuais do processo (TAN *et al.*, 2010). Com isso, o uso de um biocatalisador, como as lipases, surge como uma opção com menor gasto energético, que com sua especificidade dificulta a ocorrência de reações secundárias, gerando menos subprodutos e, conseqüentemente, gerando um produto final com menos impurezas. Além disso, o glicerol gerado na reação de transesterificação enzimática tem maior pureza e, logo, maior valor de mercado, ajudando na compensação ao alto custo das enzimas. Algumas das lipases mais utilizadas são as lipases de *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida rugosa* e *Pseudomonas fluorescens* (POPPE *et al.*, 2015).

2.4 Biocatalisadores

Os biocatalisadores atuam como catalisadores de reações bioquímicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de organismos vivos (MONTEIRO E SILVA, 2009). Como qualquer outro catalisador, as enzimas fazem com que a reação atinja o equilíbrio mais rapidamente do que como ocorreria na ausência de catalisadores. Com isso, a utilização de enzimas surge como uma rota biológica de produção de biodiesel com diversas vantagens ambientais sobre a rota química (CHRISTOPHER *et al.*, 2014). As enzimas possuem uma estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica. A função das enzimas depende da sua estrutura, estabilidade e interação com outras moléculas (ORLANDELLI *et al.*, 2012; SCHOMBURG *et al.*, 2017).

A principal aplicação dos biocatalisadores são em detergentes industriais. As enzimas do tipo proteases são aplicadas para ajudar a remover manchas de proteína de tecidos, já as lipases e amilases são utilizadas para ajudar a remover manchas de óleo/gordura e resíduos de alimentos que contém amido, respectivamente (HASAN *et al.*, 2010). Na indústria alimentícia, no setor de panificação são utilizadas amilases, xinalases, oxidoreduases e proteases que ajudam no manuseio, estabilidade e qualidade da massa, além de influenciar no sabor e cor do produto final. No setor alimentício e de bebidas, são utilizadas as enzimas proteases, lactases e lipases para ajudar a desenvolver sabores nos produtos da indústria de laticínios. Proteases são utilizadas para amaciar o músculo na indústria de carnes. Pectinases e amilases são utilizadas para diminuição de viscosidade e clarificação na indústria de produção de sucos. Já no processo de produção de cervejas são utilizadas proteases, amilases, glucanases e celulasas. Na indústria de vinhos, as enzimas utilizadas são amilases, glucanases, pectinases e catalases (PATEL *et al.*, 2016). Na indústria têxtil, celulasas são utilizadas no processo de coloração de jeans e também é utilizada juntamente com as proteases na etapa de polimento para tingimento, melhoria de cor e vivacidade na superfície do tecido. Na indústria de papel e celulose, xilanase e lignase são

usadas para melhorar a qualidade da polpa, removendo lignina e hemicelulose. Outra enzima utilizada no processo é a lipase, que tem o papel de remover resinas “pitch” da madeira (CHOI *et al.*, 2015). Na indústria farmacêutica, os biocatalisadores têm um papel importante em tornar o processo mais ecologicamente sustentável e mais limpo. Diversos tipos de enzimas podem ser utilizadas na síntese de insumos farmacêuticos ativos. Dentre eles, o uso de transaminase na síntese de sitagliptina, um medicamento utilizado no tratamento de diabetes, é um dos mais conhecidos processos biocatalíticos nessa indústria (ROSENTHAL & LÜTZ, 2018). Além disso, as enzimas podem estar presentes na produção de combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis, como é o caso do álcool e do biodiesel. Na produção de álcool, as enzimas podem ser utilizadas no processo de sacarificação, processo de hidrólise onde o amido é convertido em açúcares fermentáveis que em seguida vai para o processo de fermentação. Esse processo envolve a utilização de amilases e celulasas (HARRIS *et al.*, 2014). Já para a produção de biodiesel, lipases são utilizadas na reação de transesterificação para converter triglicerídeos em ésteres, o que será melhor discutido posteriormente (POPPE *et al.*, 2015).

2.4.1 Lipases

As enzimas são classificadas de acordo com a principal reação que elas catalisam e possuem, então, seu número de identificação. Dentre os diversos tipos de enzimas disponíveis, cabe a produção de biodiesel a utilização das lipases. As lipases (triacilglicerol lipase) são identificadas com EC 3.1.1.3 e fazem parte da classe das hidrolases e atuam sobre a ligação éster presente nos acilgliceróis (BRENDA). De forma geral, as lipases atuam em ampla faixa de pH, algumas são resistentes a altas temperaturas e não necessitam de cofatores, o que faz delas altamente aplicáveis em processos industriais. As lipases podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos, e tem um papel importante no metabolismo de óleos e gorduras (MESSIAS *et al.*, 2011).

Algumas das vantagens do uso de lipases são: condições de operação mais amenas frente a catalisadores químicos; alta seletividade ao reagente e especificidade na reação; ausência de reações secundárias, gerando produtos mais puros; ocorrência simultânea das reações de transesterificação e esterificação, sendo assim tolerado matérias primas com alto teor de ácidos graxos livres; biodegradabilidade das enzimas; e capacidade de reutilização, quando imobilizada, mantendo boa atividade catalítica (CHRISTOPHER *et al.*, 2014). Além disso, em reações de produção de biodiesel catalisada por lipase, o glicerol produzido como subproduto da reação tem maior pureza do que os obtidos a partir da transesterificação química, que pode conter de 5 a 7% de teor de sal, reduzindo assim os custos com uma posterior purificação (AARTHY *et al.*, 2014). Porém, ainda há alguns desafios que precisam ser superados para melhorar a viabilidade econômica do processo como, por exemplo: o alto custo das enzimas, especialmente as imobilizadas; inibição enzimática por reagentes e produtos; e longos tempos de reação (BAJAJ *et al.*, 2010).

A viabilidade econômica é essencial para a aplicação industrial de um processo. Como o custo das lipases compreendem, aproximadamente, 90% do custo do processo de produção de biodiesel, é de vital importância a imobilização dessas lipases. As enzimas imobilizadas têm como vantagem sua fácil recuperação, reutilização, a possibilidade de seu uso em operação contínua, obtenção de um produto livre de catalisador e uma melhora na estabilidade (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). A escolha do suporte para imobilização é importante para que seja mantida a maior atividade possível da lipase e para que haja a menor limitação possível para o acesso do substrato ao sítio ativo e para a saída dos produtos. Alguns dos vários materiais utilizados na imobilização de lipases são as resinas poliméricas, sílica, nanotubos de carbono, partículas magnéticas, microesferas, entre outros (AMINI *et al.*, 2017).

As lipases são enzimas que possuem um mecanismo singular de atuação, conhecido como ativação interfacial, e que pode ser explicado a partir de sua estrutura tridimensional e seu sítio ativo. O sítio ativo das lipases é, geralmente, composto pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou ácido glutâmico. Além disso, o sítio ativo das lipases é coberto por uma cadeia polipeptídica, que é comumente chamada de tampa. Essa cadeia polipeptídica contém resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que interagem com as regiões hidrofóbicas do sítio ativo. Porém, quando a lipase se adsorve a uma interface, a tampa se desloca, deixando o sítio ativo exposto para o meio reacional e acessível ao substrato. Desta forma, expõe-se também a zona hidrofóbica do sítio ativo que favorece a interação com a interface lipídica (RAMPIN, 2007; RODRIGUES, 2009; SILVA, 2013).

No sítio ativo ocorrem múltiplas interações fracas entre os aminoácidos e o substrato fazendo com que o encaixe do substrato no sítio ativo seja preciso, formando o dito complexo enzima-substrato e também restringindo a liberdade rotacional do mesmo. Logo, as forças de ligação do complexo formado fornecem uma parte da energia de ativação. Os estados de transição dos substratos estão ligados mais fortemente à enzima e logo após ocorre um rearranjo dos grupos funcionais participantes da catálise para a liberação dos produtos (RAMPIN, 2007). O processo catalítico é iniciado pelo ataque nucleofílico ao átomo de carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da hidroxila do grupo serina (SER), formando o complexo intermediário. Depois, um próton é transferido do ácido conjugado da amina da histidina (HIS) para o oxigênio ligado ao grupo alquil do substrato, formando uma parte da molécula de glicerol e levando à formação do intermediário covalente (enzima acilada). Por exemplo, se o substrato fosse um triglicerídeo formaria um diglicerídeo, se o substrato fosse um diglicerídeo formaria um monoglicerídeo e então se o monoglicerídeo fosse o substrato formar-se-ia o glicerol. Na próxima fase, a molécula de álcool é ativada pelo resíduo da histidina e, então, o íon de hidroxila promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila, formando o complexo enzima acilada – álcool. Por fim, há o retorno da ligação π (C=O), desfazendo o complexo, liberando o segundo produto, éster, e regeneração da enzima (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; MANOEL, 2014).

Apesar das condições de operações ótimas variarem de acordo com o tipo de lipase e o tipo de imobilização utilizada, alguns fatores importantes que afetam a reação de transesterificação catalisada por lipases são: teor de água, temperatura, inibição por álcool e inibição por glicerol (ZHAO *et al.*, 2015).

O teor de água no meio reacional tem um papel importante nas reações catalisadas por lipases. É necessário que haja um mínimo de água no meio para que se mantenha a conformação ativa da enzima. Contudo, o excesso de água pode levar ao aumento na hidrólise dos óleos e, conseqüentemente, no do teor de ácidos graxos livres (AGUIEIRAS *et al.*, 2015).

A temperatura ótima para a reação de transesterificação enzimática depende do tipo de lipase utilizada e, normalmente, varia entre 30 e 55 °C. A temperatura ótima é resultante da interação entre a estabilidade operacional da lipase utilizada e da taxa de reação. No caso da Novozyme 435, a temperatura ótima reportada é de 40 °C (GOG *et al.*, 2012).

De acordo com Cerveró *et al.* (2014), a conversão da transesterificação enzimática aumenta com o aumento da concentração de álcool, porém a adição de um grande excesso de álcool leva a redução da atividade enzimática. O número de átomos de carbono é inversamente proporcional ao grau de desativação da enzima, visto que quanto maior a cadeia carbônica, maior a solubilidade do álcool no óleo. Entretanto, alguns autores já obtiveram conversões de mais de 90% com quantidades estequiométricas quando se utilizou uma lipase como catalisador (FILHO, 2008)

Assim como o álcool, o glicerol, um subproduto da reação, também causa um efeito inibidor na atividade das lipases. À medida que o glicerol é produzido pela reação de transesterificação, forma-se uma camada hidrofílica ao redor da lipase imobilizada evitando

que o substrato hidrofóbico (triglicerídeos) entre em contato com a mesma (GULDHE *et al.*, 2015). Para reduzir os impactos da inibição tanto do álcool quanto de glicerol na reação, há a possibilidade da utilização de um solvente, porém nesse caso há a necessidade da adição de uma nova etapa de purificação e eliminação do solvente, gerando novos custos ao processo (VÉRAS *et al.*, 2011).

Muitas lipases imobilizadas podem ser obtidas comercialmente, como por exemplo a Novozyme 435, a Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. A Novozyme 435 é uma lipase de *Candida antarctica* B (CALB), imobilizada em resina acrílica macroporosa, produzida a partir de fermentação de *Aspergillus niger* geneticamente modificado (AVHAD & MARCHETTI, 2015). A CALB é uma lipase não específica, ou seja, atua randomicamente nas três posições dos triglicerídeos (SANTIN, 2013). Esta lipase comercial já é amplamente utilizada devido à sua rápida taxa de reação e alta disponibilidade mundial. Muitos trabalhos já reportaram a eficiência da Novozyme 435 na produção de biodiesel e alguns outros compararam esta com outras lipases e outros catalisadores (RODRIGUES *et al.*, 2008; TALUKDER *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2017).

Rodrigues *et al.* (2008) compararam a conversão da reação de produção de biodiesel utilizando as lipases comerciais Novozyme 435, Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM com diferentes álcoois e diferentes matérias primas. As condições base do processo foram 2,5 g de óleo, temperatura de 30 °C, 15% de enzima, razão molar álcool:óleo de 7,5:1 e um tempo de reação de 6 h. A conversão foi obtida a partir de análise da concentração de glicerol determinada por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência). Nesse estudo foi possível observar que quando o álcool utilizado foi o metanol, a Novozyme 435 levou a uma maior conversão da reação se comparada às outras lipases comerciais utilizando tanto óleo de soja quanto óleo de girassol e óleo de farelo de arroz, como pode ser observado na Figura 7. O estudo também mostrou que a melhor conversão, aproximadamente 45%, foi obtida quando metanol foi utilizado numa razão molar de 5:1 na reação de transesterificação do óleo de soja.

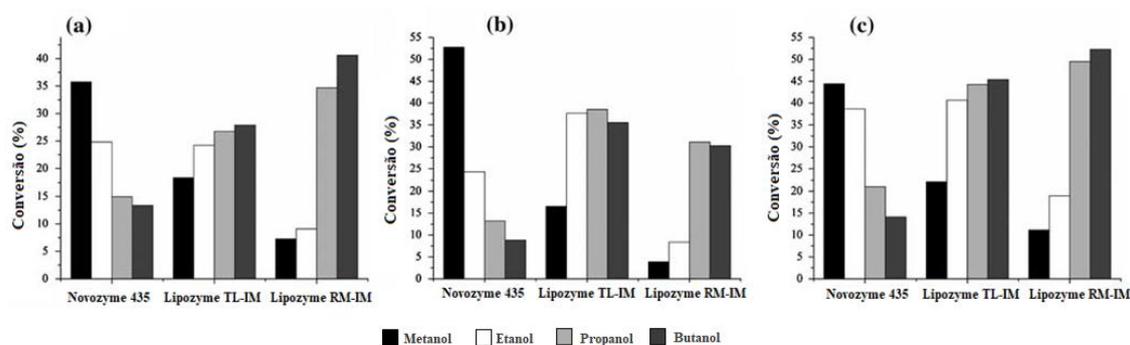


Figura 7. Transesterificação do óleo de soja^a, óleo de girassol^b e óleo de farelo de arroz^c utilizando diferentes lipases e álcoois (Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2008)

Em 2009, Talukder *et al.* publicaram um trabalho comparativo entre a utilização da Novozyme 435 e um catalisador comercial heterogêneo ácido, Amberlyst 15, para a produção de biodiesel a partir do destilado de ácido graxo de palma. A análise de conversão também foi feita utilizando HPLC, porém analisando-se a fase superior onde se encontravam os ésteres metílicos. O estudo mostrou que uma conversão máxima de aproximadamente 95% foi obtida com a adição de 10% de lipase, enquanto que a mesma conversão só pode ser obtida com a adição de 30% de Amberlyst 15, além disso o tempo de reação utilizando a lipase foi menor do que o quando utilizado o Amberlyst 15, 2 e 7 h, respectivamente, mostrando que a enzima tem uma maior atividade catalítica. Observou-se também que no caso da utilização da enzima, a

temperatura ótima (50 °C) foi menor que a utilizando o catalisador heterogêneo químico (60 °C).

Souza *et al.* (2016) fizeram uma triagem entre a enzima comercial Novozyme 435 e as preparações de lipases de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus oryzae* que foram imobilizadas posteriormente. As reações foram realizadas em um reator cilíndrico encamisado, de 50 mL de capacidade. A matéria prima utilizada foi o óleo de palma, 15 g, e as condições utilizadas foram 45 °C, razão molar etanol:óleo de 9:1 e tempo de reação de 72 h. A caracterização dos etil ésteres foi feita utilizando Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H). As enzimas que levaram a uma maior conversão foram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* com 91,1%, a lipase de *Burkholderia cepacia* com 98,3% e a Novozyme 435 com 98,9%.

Nguyen *et al.* (2017) analisaram a transesterificação enzimática da gordura obtida a partir das larvas da mosca soldado negra nas seguintes condições: razão molar metanol:gordura de 3:1, 10% de enzima, tempo de reação de 4 h e em uma temperatura de 20 °C. Comparou-se a utilização das enzimas comerciais Novozyme 435 e Lipozyme RM-IM, além das enzimas de *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae*, as análises foram feitas utilizando cromatografia gasosa acoplada a detector FID. As enzimas comerciais mostraram uma maior eficiência ao comparar com as outras enzimas utilizadas. Ainda assim, a Novozyme 435 levou a uma maior conversão da reação, de 56,78%. Apesar da baixa conversão obtida neste teste, foi feito em seguida um planejamento de experimentos afim de analisar a razão molar de substratos (3:1-9:1), teor de Novozyme 435 (10-20%), tempo de reação (4-12 h) e temperatura do meio reacional (20-40 °C). Obteve-se uma conversão ótima de 97,65%, nas condições de 6,33:1 de álcool para óleo, 20% de enzima, 9,48 h e 26 °C. Também foi feita uma análise da reutilização da Novozyme 435 neste sistema e observou-se que após o uso desta por 20 ciclos ainda foi possível obter uma conversão de 92,5%.

Visto a eficiência da enzima comercial Novozyme 435 na conversão de óleos em biodiesel frente a outras lipases, diversos estudos analisaram as condições operacionais de utilização desta na transesterificação dos óleos de soja e de fritura para a produção de biodiesel.

Primeiramente, Hernández-Martín & Otero (2008) estudaram a produção do biodiesel utilizando o óleo de soja e etanol. Foram utilizados 2 g da matéria prima em um reator de 100 mL sob agitação de 200 rpm por 7 h. Foram analisadas o efeito da quantidade de enzima (5, 10, 15, 20, 25, 35 e 50%), da temperatura da reação (25, 35, 50 e 60 °C) e da razão molar etanol:óleo (1:3, 1:1, 2:1 e 6:1) através de cromatografia gasosa acoplada a detector FID. Obteve-se uma conversão máxima de, aproximadamente, 98% nas condições de 50% em massa de enzima, temperatura de 25 °C e razão etanol:óleo de 1:6. Além disso, em um teste de reutilização, foi possível observar que a Novozyme 435 manteve 84% de sua atividade inicial após 9 ciclos.

Em 2009, Zheng *et al.* também analisaram a produção de biodiesel a partir do óleo de soja, só que neste caso o metanol foi utilizado como aceptor de grupo acila, em reatores de 25 mL contendo 2 mmol de óleo. Foram analisados os efeitos da temperatura, velocidade de agitação, quantidade de solvente (álcool terc-amílico), razão molar metanol:óleo, quantidade de enzima e teor de água no meio reacional na conversão final, sendo esta obtida a partir de cromatografia gasosa acoplada a detector FID. Zheng *et al.* (2009) obtiveram conversão de 97%, similar ao obtido por Hernández-Martín & Otero (2008) só que utilizando uma quantidade menor de lipase (2%) e menor de álcool (razão metanol:óleo de 1:3). Além disso, as condições que levaram a maior conversão foram em uma temperatura de 40 °C, velocidade de agitação de 150 rpm, adição de 6 mL de solvente e teor de água no meio de 2%, porém, com um tempo reacional de 15 h. Zheng *et al.* (2009) também estudaram a estabilidade operacional do

biocatalisador nessas condições e observou-se que a Novozyme 435 manteve a conversão em mais de 95% mesmo depois da reutilização por 150 ciclos.

Assim como Zheng *et al.* (2009), Rodrigues *et al.* (2008) também utilizaram metanol e óleo de soja para estudar a produção de biodiesel. Neste caso, foi analisada a influência da temperatura e da razão molar na conversão final. As reações foram realizadas em erlenmeyer de 50 mL com agitador magnético a 200 rpm a 30 °C, utilizando 2,5 g de óleo, 15% de Novozyme 435 e 4% de água no meio. Foi estudado o efeito da razão molar álcool:óleo (3:1 – 12:1), observou-se um aumento da conversão com o aumento da razão molar até a razão molar de 5:1, onde foi obtido a conversão máxima de aproximadamente 45% em 6h. Para razões molares maiores do que 5:1 observou-se o decréscimo da conversão, mostrando a inativação do biocatalisador na presença de altas concentrações de álcool. Além disso, Rodrigues *et al.* também analisaram a estabilidade da Novozyme 435 quando submetida a diferentes tratamentos entre ciclos de utilização. Após cada utilização, as enzimas eram recuperadas por filtração e em seguidas lavadas com diferentes solventes (hexano, etanol, propanol e água). Observou-se que o hexano, único solvente polar testado, foi o que possibilitou que a enzima mantivesse a maior atividade relativa, aproximadamente 90% após 7 ciclos.

Já Halim & Kamaruddin (2008) estudaram a reação de transesterificação do óleo de fritura, também com o metanol. Buscou-se a escolha do melhor solvente orgânico, entre t-butanol, acetona, acetonitrila, isooctano, heptano e hexano, para auxiliar na solubilidade do álcool no óleo. Além disso, estudou-se o efeito da razão molar álcool:óleo (3:1, 4:1, 6:1 e 8:1), da quantidade de lipase (1, 2, 4, 8, 10 e 15 %) e agitação (140, 160, 180, 200 e 220 rpm). Obteve-se uma conversão máxima de 88% em 12 h, utilizando o t-butanol como solvente, com uma velocidade de agitação de 200 rpm, 4% em massa da Novozyme 435, razão metanol:óleo de 4:1 e temperatura de 40 °C. Halim & Kamaruddin também fizeram o estudo cinético da reação através do mecanismo Ping Pong Bi Bi levando em consideração a inibição enzimática pelo álcool, obtendo um coeficiente de determinação do modelo de 0,9.

A reação de transesterificação entre o óleo de fritura e metanol também foi estudada por Maceiras *et al.* (2009). Neste caso, analisou-se o efeito da quantidade de catalisador (5, 7, 10, 12 e 15 %), da razão molar álcool:óleo (1:1, 10:1, 20:1, 25:1 e 30:1) e do tempo de reação (0,5, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 h) na conversão em biodiesel, obtida a partir de cromatografia gasosa. Obtiveram uma conversão de 89,1% utilizando 2 g de óleo a uma temperatura de 50 °C, velocidade de agitação de 150 rpm, tempo de 4 h, 10% de catalisador em massa e razão metanol:óleo de 25:1.

Em 2011, Rosset *et al.* estudaram a reação do óleo de soja com etanol, analisando as variáveis quantidade de catalisador (0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5%), tempo de reação (1, 4, 8, 15 e 24 h) e teor de água no meio reacional de (0,1, 0,5, 1, 2 e 4%). Os experimentos foram realizados utilizando 5 g de óleo e 15 mL de etanol adicionados em um erlenmeyer de 125 mL colocado em um agitador orbital. As conversões foram obtidas a partir da análise de RMN- H^1 e cromatografia gasosa. O melhor resultado obtido foi de 87% a 32 °C, 150 rpm, 5% de catalisador em massa e 24 h. Esse estudo mostrou também que a variação no teor de água dentro dos limites propostos não causou diferença significativa na conversão da reação obtida.

Chesterfield *et al.* (2012) também estudaram a reação de transesterificação a partir do etanol, porém, neste caso, a matéria prima principal utilizada foi o óleo de fritura. O aparato experimental utilizado consistia de um reator cilíndrico de vidro de 1 L acoplado a um agitador a uma velocidade de 1200 rpm, mantido em um banho termostático. Foram utilizados 6,25 g/L de lipase durante 30 h. As variáveis de processo estudadas foram temperatura (24, 35, 45, 54, 64 e 75 °C) e razão molar etanol:óleo (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 e 9:1). O produto foi analisado através de cromatografia gasosa e a maior conversão foi obtida com quantidade estequiométrica de etanol (3:1) e temperatura de 64 °C. Apesar de não ter sido apresentado a conversão final da reação, a concentração de ésteres etílicos no produto final da reação foi de, aproximadamente,

950 mmol/L. Além disso, foi feito um estudo cinético da reação baseado no mecanismo Ping Pong Bi Bi, O modelo forneceu um ajuste satisfatório aos dados experimentais, coeficiente de determinação igual a 0,904.

Já Haigh *et al.* (2013) estudaram a produção de biodiesel a partir do óleo de fritura e metanol. As reações foram realizadas em um reator batelada encamisado acoplado a um condensador e um agitador, a temperatura do meio foi monitorada através de um termopar. A concentração de ésteres no produto final foi analisada por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. As variáveis analisadas foram velocidade de agitação (450, 550, 650 e 750 rpm), temperatura (30, 40, 50, 55 e 60 °C), quantidade de enzima (0,75, 1, 1,25 e 1,5%) e razão molar metanol:óleo (3,9:1, 6,2:1, 7,8:1, 11,6:1 e 15,5:1). A melhor conversão obtida foi de 90% em 4 h com uma baixa quantidade de enzima (1%), álcool numa razão de 6,2:1, a 50 °C e com uma agitação de 650 rpm. A partir da melhor condição foi feito um teste de reutilização do biocatalisador e observou-se uma redução na conversão de aproximadamente 5% entre ciclos.

Devido ao problema da inibição da atividade enzimática causada pelos álcoois de cadeia curta, Gharat & Rathod (2013) e Go *et al.* (2013) estudaram a viabilidade da produção de biodiesel utilizando o dimetil carbonato (DMC) como aceptor de grupo acila.

Primeiramente, Gharat & Rathod (2013) utilizaram o óleo de fritura e o DMC como matérias primas principais, analisando o tempo reacional, temperatura da reação (40, 50, 60, 70 °C), quantidade de lipase (5, 10, 15 e 20%), velocidade de agitação (200, 400 e 600 rpm) e razão molar DMC:óleo (2:1, 6:1, 9:1 e 12:1). Além disso, analisou-se o efeito da adição, ou não, de solventes ao meio como éter, tetraidrofurano, butanol e xileno. As reações ocorreram em um reator com capacidade de 50 mL, equipado com um condensador e um agitador de seis pás imersos em um banho termostático. As análises do produto da reação foram feitas através de HPLC. A melhor conversão, de 77,9%, foi obtida em 24 h, sem a adição de um solvente, a uma temperatura de 60 °C, 10% de catalisador em massa, agitação de 200 rpm e razão DMC:óleo de 6:1. O estudo também mostrou que a Novozyme 435 perdia apenas 1% da sua atividade inicial a cada ciclo de reutilização realizado.

Já Go *et al.* (2013), também utilizaram o DMC mas como matéria prima foi utilizado o óleo de soja. Analisou-se a influência da razão molar DMC:óleo (5:1, 10:1, 15:1 e 20:1), quantidade de catalisador (10, 15, 20 e 30%), temperatura (40, 50, 60 e 70 °C) e teor de água no meio (0,5, 0,7, 1, 2 e 3%). As análises foram feitas utilizando cromatografia gasosa acoplada a detector FID. Neste estudo, a conversão máxima obtida foi maior do que a obtida por Gharat & Rathod (2013), de 96,4%, porém em um tempo maior de reação, 48 h. As condições que levaram a conversão máxima foram de 60 °C, 20% de catalisador, 0,7% de água e razão DMC:óleo de 10:1.

Por fim, Cerveró *et al.* (2014) analisaram a possibilidade de adição gradual de álcool a reação a fim de, também, evitar a desativação da enzima devido ao excesso de álcool no meio. Foram utilizados 50 mL de óleo de soja, 5% de Novozyme 435, 37 °C e uma razão molar metanol:óleo de 3:1 em um reator de vidro com capacidade de 100 mL acoplado a um agitador orbital termostaticado e as análises do biodiesel foi feita através de RMN H¹. Analisou-se duas opções de adição gradual de álcool. A primeira adicionando 1/3 no início da reação e 2/3 após 7 h do início da reação. A segunda opção foi feita adicionando o álcool em três etapas: 1/3 no início da reação, 1/3 em 7 h e 1/3 após 14 h do início da reação. A condição que levou ao melhor resultado foi a adição em três etapas, levando a uma conversão de 90% em 24 h.

Na Tabela 4 estão listados as condições de operação e conversões obtidas nos estudos encontrados durante a revisão bibliográfica para a produção de biodiesel através de catálise enzimática, utilizando a Novozyme 435, a partir de óleo de soja e óleo de fritura.

Tabela 4. Produção de biodiesel utilizando a Novozyme 435 a partir de óleo de soja e de fritura

Óleo	Enzima	Metodologia	Condição ótima	Conversão	Referências
Óleo de soja	Novozyme 435	Reator de 100 mL 200 rpm, 7 h 2 g de óleo	Catalisador: 50 % Temperatura: 25 °C Óleo:etanol: 1:6 Temperatura: 40 °C Agitação: 150 rpm	≈ 98%	Hernández-Martín & Otero (2008)
Óleo de soja	Novozyme 435	Reator de 25 mL 2 mmol de óleo 15 h	Álcool terc-amílico: 6 mL Óleo:metanol: 1:3 Catalisador: 2 % Teor de água: 2 %	97%	Zheng <i>et al.</i> (2009)
Óleo de soja	Novozyme 435	Erlenmeyer de 50 mL 200 rpm, 30 °C 2,5 g de óleo 15% de catalisador 4% de água no meio	Óleo:metanol: 1:5	≈ 45% em 6 hrs	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
Óleo de fritura	Novozyme 435	Frasco de 100 ml 40 °C, 12 h	Solvente: t-butanol Óleo:metanol: 1:4 Catalisador: 4% Agitação: 200 rpm	88%	Halim & Kamaruddin (2008)
Óleo de fritura	Novozyme 435	Tubo de ensaio 2 g de óleo 50 °C, 150 rpm	Óleo: metanol: 1:25 Tempo: 4 h Catalisador: 10 % Catalisador: 5 %	89,1%	Maceiras <i>et al.</i> (2009)
Óleo de soja	Novozyme 435	Erlenmeyer 125 mL 32 °C, 150 rpm 5 g de óleo e 15 mL de etanol	Tempo: 24 h Teor de água: não gerou diferença significativa	87%	Rosset <i>et al.</i> (2011)
Óleo de fritura	Novozyme 435	Reator de 1 L 1200 rpm, 30 h Catalisador: 6,25 g/L	Óleo:etanol: 1:3 Temperatura: 64 °C	Não apresentado	Chesterfield <i>et al.</i> (2012)
Óleo de fritura	Novozyme 435	Reator em batelada encamisado 4 h	Óleo:metanol: 1:6,2 Agitação: 650 rpm Temperatura: 50 °C Catalisador: 1,0 %p/p Solvente: nenhum	90%	Haigh <i>et al.</i> (2013)
Óleo de fritura	Novozyme 435	Reator de 50 ml 2 g de óleo Aceptor acila: dimetil carbonato	Tempo de reação: 24 h Temperatura: 60 °C óleo:DMC: 1:6 Catalisador: 10% Agitação: 200 rpm	77,87%	Gharat & Rathod (2013)
Óleo de soja	Novozyme 435	Frascos de 20 mL 48 h, 180 rpm Aceptor acila: dimetil carbonato	Catalisador: 10 – 30 % Óleo:DMC: 1:10 Temperatura: 60 °C Teor de água: 0,7 %	96,4 %	Go <i>et al.</i> (2013)
Óleo de soja	Novozyme 435	Frascos de 100 mL 50 mL de óleo, 37 °C 5% de catalisador Óleo:metanol: 1:3	Adição gradual de álcool 1/3 no início, 1/3 em 7 h e 1/3 em 14 h	≈ 90 % em 24 hrs	Cerveró <i>et al.</i> (2014)

2.5 Mistura de Óleos

Um dos problemas relacionados ao uso de óleos vegetais refinados está no seu alto custo e no impasse entre a competição pelo seu uso para a produção de biodiesel e para o setor alimentício. Por isso, o uso de fontes de triglicerídeos alternativas como gordura animal, óleos não comestíveis e óleos residuais tem ganho importância. Contudo, sua alta viscosidade, menor disponibilidade e uso em indústrias como fonte de biolubrificantes tem como problema a dificuldade de autossuficiência dessas matérias primas alternativas para a produção de biodiesel. Logo, a mistura de óleos comestíveis e não comestíveis surge como uma forma de superar esses problemas e de diversificar as matérias primas utilizadas (GUPTA *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2015; AZÓCAR *et al.*, 2010).

A transesterificação de uma mistura de óleos já foi reportada para casos onde foi utilizado catalisadores básicos. Como por exemplo, Macedo *et al.* (2009) estudou a transesterificação com metanol da mistura contendo óleos de mamona e babaçu utilizando KOH como catalisador. Barbosa *et al.* (2010) e Milli *et al.* (2011) também analisaram a produção de biodiesel utilizando KOH como catalisador e metanol como aceptor de grupo acila, mas, nesses casos, utilizou-se a mistura de óleo de soja com óleo de mamona e a mistura de sebo bovino com óleo de canola ou algodão, respectivamente, como matéria prima. Já Qiu *et al.* (2011), Ponte *et al.* (2012), Moura *et al.* (2012) e Almeida *et al.* (2015) estudaram a transesterificação metanólica utilizando NaOH como catalisador. As misturas analisadas foram: óleo de soja e óleo de colza; óleo de mamona e óleo de algodão ou canola; óleo de mamona e soja; e óleo residual de peixe, óleo de palma e óleo de fritura, respectivamente. Gupta *et al.* (2019) estudaram a transesterificação com KOH e metanol de uma mistura contendo óleo de palma, óleo de linhaça, óleo de *Millettia pinnata* e óleo de *Citrullus colocynlis*. Tavares *et al.* (2017) também utilizaram a transesterificação utilizando KOH como catalisador e metanol, mas a mistura utilizada foi sebo bovino e óleo de fritura. Por fim, Fadhil *et al.* (2017) analisaram a transesterificação metanólica da mistura de óleo residual de peixe e óleo de mamona com diferentes catalisadores, como NaOH, KOH e CH₃ONa.

Já para o caso da transesterificação enzimática envolvendo mistura de óleos foram encontrados apenas os trabalhos de Pizarro & Park (2003), Azócar *et al.* (2010) e Vêras *et al.* (2011).

Pizarro & Park (2003) analisaram a utilização da terra de branqueamento proveniente do processo de refino de óleo vegetal bruto para a produção de biodiesel. Os resíduos de óleo presentes nesse material, aproximadamente 30% em peso, foram extraídos com hexano. Nesse estudo foi utilizado uma solução de enzimas de *Rhizopus oryzae* como catalisador. As condições operacionais analisadas nesse estudo foram o teor de enzimas (40, 60, 100, 140, 180, 200, 225 e 250 IU/ml), o teor de água presente na amostra (15, 25, 33, 50, 75 e 100%) e a razão molar metanol:óleo (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e 1:6). A caracterização da amostra foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a detector FID. A conversão máxima de, aproximadamente, 50%, foi obtida utilizando 200 IU/ml de catalisador, com 75% de água adicionada ao processo e razão molar 1:4 a 37 °C, 175 rpm em 72 h.

Já no trabalho de Azócar *et al.* (2010), foi utilizado uma mistura de óleo de soja com óleo de colza para a produção de biodiesel com metanol e Novozyme 435 como catalisador. Foi realizado um planejamento experimental afim de analisar e otimizar a influência da porcentagem de óleo de fritura na mistura (0-100%), a razão molar de metanol para óleo (1,5-4,5 mol/mol), temperatura da reação (35-55 °C) e massa de biocatalisador (3-15 % m/m). As reações foram realizadas em frascos contendo 1 mL de óleo a 200 rpm e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas foi utilizada para análise do teor de ésteres no biodiesel. A condição ótima foi a que utilizou apenas óleo de fritura (mistura com 100% de óleo de fritura),

razão de metanol:óleo de 3,8:1, 15% de catalisador em massa e 44,5 °C, levando a uma conversão de quase 100 %. Nesse estudo observou-se que, quanto maior o teor de óleo de fritura na mistura maior a conversão, porém foi possível obter biodiesel dentro das normas com misturas contendo 60% de óleo de fritura. O modelo representativo gerado pelo processo constou que, com 95% de confiança, todos os termos lineares e quadráticos relativos as variáveis estudadas foram significativos, além dos termos de interação entre porcentagem de óleo de fritura e razão molar de substratos, porcentagem de óleo de fritura e teor de biocatalisador, e razão molar de substratos e temperatura.

Por último, o resíduo do refino do óleo de palma e da indústria de processamento de frangos foram utilizados por Vêras *et al.* (2011) para produzir biodiesel utilizando etanol e a Novozyme 435. As condições utilizadas foram uma mistura com 50% de cada material, 60 °C, 400 rpm e razão etanol:óleo de 5:1. A síntese de biodiesel foi realizada em um reator onde a temperatura e agitação foram controlados por software do próprio reator e o teor de ésteres metílicos foi medido a partir de análises em HPLC. Além disso, foi analisada a influência do teor de catalisador variando de 1-15%. A melhor conversão obtida foi de 95% com 10% em peso de catalisador.

2.6 Considerações Sobre a Revisão Bibliográfica

A partir da revisão bibliográfica observou-se que estudos envolvendo misturas de óleos e catálise básica ainda são escassos e são ainda mais raros os trabalhos envolvendo misturas de óleos e transesterificação enzimática. Como resultado da revisão, não foram encontrados trabalhos envolvendo a produção de biodiesel a partir da mistura de óleo de soja e óleo de fritura.

A maioria dos trabalhos apresentados não geraram modelos representativos do processo de produção em função das suas variáveis significativas.

Com isso, nesta dissertação optou-se por analisar a transesterificação enzimática, utilizando a Novozyme 435, da mistura de óleo de soja com óleo de fritura residual.

3 MODELAGEM CINÉTICA

A cinética da reação de transesterificação tem sido estudada por diversos pesquisadores, com o foco principal na modelagem da taxa de reação. As taxas de reação desenvolvidas têm grande importância para o projeto de reatores para a produção de biodiesel.

Muitos trabalhos utilizam o mecanismo Ping Pong Bi Bi para descrever a ação catalítica das lipases considerando ou não a inibição por metanol e/ou por glicerol (HALIM & KAMARUDDIN, 2008; MAGALHÃES, 2010; CHESTERFIELD *et al.*, 2012; BASRI *et al.*, 2013; GOFFERJÉ *et al.*, 2014; AZÓCAR *et al.*, 2014). O termo Ping Pong está relacionado ao mecanismo em que o primeiro substrato se liga ao sítio ativo e, em seguida, ocorre a liberação do primeiro produto para que então ocorra a entrada do segundo substrato e, por fim, a liberação do segundo produto. Para essa aplicação são necessários muitos experimentos variando a concentração dos dois substratos e, conseqüentemente, muitas análises para se obter as constantes cinéticas, tornando o processo mais trabalhoso e dispendioso (MAGALHÃES, 2010). Devido a isso, esse trabalho sugere dois outros modelos para descrever a cinética desta reação que, a princípio, ainda não foram propostos para representar a transesterificação enzimática, mas que já foram utilizados para descrever a transesterificação utilizando catalisadores heterogêneos químicos.

3.1 Modelo de Lei das Potências

De forma geral, o mecanismo da reação de transesterificação pode ser ilustrado de acordo com as reações mostradas nas Equações 1, 2 e 3. Primeiramente, o triglicerídeo (TG) reage com um álcool de cadeia curta (ROH), produzindo uma molécula de diglicerídeo (DG) e uma de biodiesel (BD). Em seguida, a molécula de diglicerídeo gerada na reação anterior reage com mais uma molécula de álcool, produzindo uma molécula de monoglicerídeo (MG) e mais uma molécula de biodiesel. Por fim, a molécula de monoglicerídeo reage com outra molécula de álcool formando glicerol (GL) e mais uma molécula de biodiesel. Todas as 3 etapas são consideradas reversíveis; por isso, todas possuem uma constante cinética relativa a reação direta e outra relativa a reação inversa, sendo representada como K_1 e K_2 para a reação 1, K_3 e K_4 para a reação 2 e K_5 e K_6 para a reação 3, respectivamente.



A partir das reações ilustradas nas Equações 1, 2 e 3, tem-se a reação global, onde uma molécula de triglicerídeo reage com três moléculas de álcool gerando uma molécula de glicerol e três de biodiesel, que está ilustrada na Equação 4. Essa reação também é reversível e, por isso, possui uma constante cinética para a reação direta (k_4) e uma constante para a reação inversa (k_{-4}).



Já foi observado que as concentrações de diglicerídeos e monoglicerídeos são baixas e praticamente constantes no meio reacional ao longo do tempo se comparadas às concentrações de álcool, óleo, ésteres e glicerol, o que indica que as reações intermediárias são rápidas (FIRDAUS *et al.*, 2016; KROUMOV *et al.*, 2007). Com isso, pode-se considerar a reação global como representante única da transesterificação a ser utilizada para os cálculos cinéticos. De acordo com a Lei das Potências, a velocidade de uma reação é diretamente proporcional ao produto das concentrações molares dos reagentes elevadas a expoentes. Se considerarmos a reação como elementar, as ordens parciais coincidem com os coeficientes estequiométricos da reação (BALL, 2002). Então, considerando a reversibilidade da reação, a taxa de reação (r) em relação ao consumo dos reagentes pode ser descrita pelas Equações 5 e 6.

$$r = k_t \times [\text{TG}] \times [\text{ROH}]^3 - k_{-t} \times [\text{BD}]^3 \times [\text{GL}] \quad (5)$$

Sendo:

$$r = - \frac{d[\text{TG}]}{dt} \quad (6)$$

sendo $\frac{d[\text{TG}]}{dt}$ a variação da concentração de triglicerídeos em função do tempo, considerando um reator batelada a volume constante.

O termo relativo à variação da concentração de triglicerídeos é negativo, visto que essas concentrações diminuem ao longo do tempo, pois o mesmo está sendo consumido.

Os trabalhos de Al-Shakkari *et al.* (2017) e Shu *et al.* (2019) analisaram a aplicação do modelo da Lei das Potências para descrever a transesterificação de óleos utilizando catalisadores heterogêneos químicos.

Al-Sakkari *et al.* (2017) utilizaram o modelo cinético da Lei das Potências para descrever a transesterificação do óleo de soja, utilizando o pó residual do forno utilizado na produção de cimento, como catalisador heterogêneo. Os parâmetros cinéticos obtidos foram $0,001 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ para a reação direta e $0,1708 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ para a reação inversa. O modelo cinético ajustado apresentou um coeficiente de determinação de 0,9621 quando a reação foi considerada reversível, demonstrando um bom ajuste aos dados experimentais.

Shu *et al.* (2019) estudaram a reação de esterificação do ácido oleico em diferentes temperaturas, razões molares álcool:óleo e massas de catalisadores, utilizando nanotubos de carbono impregnado com ácido sulfúrico concentrado como catalisador. O coeficiente de determinação para os modelos cinéticos obtidos foi maior que 0,92 para a maioria dos testes feitos. Por exemplo, usando uma razão molar de metanol para ácido oleico de 6:1, 0,5% de catalisador e 7 h de reação a 65 °C foram obtidos $8,5 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ L h}^{-1}$ e $4,25 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ L h}^{-1}$ como parâmetros cinéticos para as reações direta e inversa, respectivamente.

3.2 Mecanismo Eley-Rideal

O mecanismo de Eley-Rideal é, geralmente, utilizado para descrever a catálise heterogênea. Neste caso, um dos substratos é adsorvido quimicamente no sítio ativo e, no seu estado ativado, reage com o segundo substrato (HAGEN, 2006). Nos trabalhos encontrados utilizando o mecanismo de Eley-Rideal para descrever a reação de transesterificação, considera-se o álcool como substrato a ser adsorvido no sítio ativo e, em consequente, o triglicerídeo reage com o sítio ativo no seu estado ativado (complexo formado entre o sítio ativo e o álcool).

Essa descrição é similar ao que acontece na reação de transesterificação enzimática descrita na seção 2.4.1 do Capítulo 2 do presente trabalho; porém, neste caso, o triglicerídeo é o substrato adsorvido no sítio ativo. Com isso, de forma análoga ao demonstrado por Al-Sakkari *et al.* (2017), o mecanismo sugerido para Eley-Rideal é ilustrado, em seguida, por três reações de equilíbrio apresentadas nas Equações 7, 8 e 9. Primeiramente, o triglicerídeo (TG) é adsorvido pelo sítio ativo (S) gerando o complexo triglicerídeo-sítio ativo (TGS). Em seguida, ocorre a reação superficial, onde as moléculas de álcool (ROH) reagem com o complexo ativado (TGS) formando as moléculas de metil éster (FAME) e o complexo glicerol- sítio ativo (GLS). Por fim, ocorre a dessorção do glicerol (GL), restaurando o sítio ativo (S).



Com isso, as taxas de reação do modelo estão descritas nas Equações 10, 11 e 12. A Equação 10 representa a adsorção do triglicerídeo no sítio ativo do catalisador, sendo k_{ad} e k_{ad}^{-} as constantes cinéticas das reações direta e inversa de adsorção do triglicerídeo, respectivamente, e C_{TG} , C_V e C_{TGS} as concentrações de triglicerídeo, de sítios ativos disponíveis e do complexo triglicerídeo-sítio ativo, respectivamente. O segundo passo, Equação 11, representa a reação superficial, que é considerada a etapa limitante, onde k_s e k_s^{-} são as constantes cinéticas direta e inversa da reação superficial, respectivamente, e, C_{TGS} , C_{ROH} , C_{FAME} e C_{GLS} são as concentrações de complexo triglicerídeo-sítio ativo, de álcool, de metil ésteres e do complexo glicerol-sítio ativo, respectivamente. Já a última etapa representada na Equação 12, tem-se a dessorção do glicerol do sítio ativo do catalisador, sendo k_d e k_d^{-} as constantes cinéticas das reações direta e inversa de dessorção de glicerol, respectivamente, e C_{GLS} , C_{GL} e C_V as concentrações do complexo glicerol-sítio ativo, de glicerol e de sítios ativos disponíveis, respectivamente.

$$r_{ad} = k_{ad} \times C_{TG} \times C_V - k_{ad}^{-} \times C_{TGS} \quad (10)$$

$$r_s = k_s \times C_{TGS} \times C_{ROH}^3 - k_s^{-} \times C_{FAME}^3 \times C_{GLS} \quad (11)$$

$$r_d = k_d \times C_{GLS} - k_d^{-} \times C_{GL} \times C_V \quad (12)$$

A partir da Equação 10, da taxa de reação de adsorção, pode-se obter a Equação 13. Além disso, assume-se que a reação direta é rápida e sua constante possui um alto valor, sendo K'_{ad} a razão entre as constantes direta e inversa da reação de adsorção, Equação 14.

$$C_{TGS} = K'_{ad} \times C_{TG} \times C_V \quad (13)$$

$$K'_{ad} = \frac{k_{ad}}{k_{ad}^{-}} \quad (14)$$

As mesmas considerações são feitas para a reação de dessorção, Equação 12, obtendo-se, então, a Equação 15 e 16.

$$C_{GLS} = \frac{1}{K'_d} \times C_{GL} \times C_V \quad (15)$$

$$K'_d = \frac{k_d}{k_d^{-}} \quad (16)$$

Aplicando o balanço de massa para os sítios ativos, onde a concentração total de sítios ativos (CT) é obtido a partir da soma da concentração de sítios ativos disponíveis (CV), concentração de sítios ativos no complexo triglicerídeo-sítio ativo (CTGS) e concentração de sítios ativos no complexo glicerol-sítio ativo (CGLS), tem-se a Equação 17. Em seguida, substituindo as Equações 13 e 15, tem-se a Equação 18.

$$C_T = C_V + C_{TGS} + C_{GLS} \quad (17)$$

$$C_V = \frac{C_T}{\left(1 + K'_{ad} \times C_{TG} + \frac{1}{K'_d} \times C_{GL}\right)} \quad (18)$$

Substituindo a Equação 18 na equação de taxa da reação superficial, Equação 11, tem-se a forma final da taxa de reação, Equação 19.

$$r_s = \frac{K' \times C_{TG} \times C_{ROH}^3 - K'' \times C_{GL} \times C_{FAME}^3}{\left(1 + K'_{ad} \times C_{TG} + \frac{1}{K'_d} \times C_{GL}\right)} \quad (19)$$

sendo:

$$K' = k_S \times K'_{ad} \times C_T \quad (20)$$

$$K'' = \frac{k_{S^-}}{K'_d} \times C_T \quad (21)$$

Após revisão da literatura, foram encontrados os trabalhos de Ilgen & Akin (2012), Van de Steene *et al.* (2012), Al-Sakkari *et al.* (2017) e Risso *et al.* (2018) que já utilizam o modelo de Eley-Rideal para estudo da cinética da reação de transesterificação e em alguns casos compararam este modelo a outros.

Ilgen & Akin (2012) estudaram a cinética da produção de biodiesel a partir de óleo de canola e metanol utilizando dolomita como catalisador através do mecanismo de Eley-Rideal. Os parâmetros obtidos foram $5,794 \times 10^{-4} \text{ L}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ g}_{cat}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para a constante de taxa de reação e $0,15072 \text{ L mol}^{-1}$ para a adsorção de metanol. O modelo obtido apresentou um ajuste de 0,9774 aos dados experimentais.

Van de Steene *et al.* (2012) estudaram o mecanismo de Eley-Rideal para a reação de transesterificação do etil acetato com metanol, utilizando o catalisador comercial Lewatit K1221. Os autores sugeriram dois mecanismos, um considerando a adsorção do acetato no sítio ativo e outro considerando a adsorção do álcool. Os dois modelos apresentaram bom ajuste da curva, porém o modelo que considerava a adsorção do metanol na superfície do catalisador foi o que resultou em uma menor soma dos quadrados dos erros (27). Já o mecanismo considerando a adsorção do acetato apresentou uma soma residual dos quadrados de 35. Esse estudo também comparou o mecanismo de Eley-Rideal com o mecanismo de Langmuir-Hinshelwood, mecanismo aonde os dois substratos são adsorvidos no sítio ativo e aí então reagem entre si, porém este apresentou uma maior soma dos quadrados dos erros (48). O modelo baseado no mecanismo de Eley-Rideal considerando adsorção de metanol apresentou os parâmetros cinéticos de $0,259 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ kg}_{cat}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $50,190 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $0,015 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ para a constante de taxa da reação, energia de ativação e adsorção do metanol, respectivamente.

Além do modelo cinético da Lei das Potências, Al-Sakkari *et al.* (2017) também estudaram o modelo cinético obtido a partir do mecanismo de Eley-Rideal. Foi sugerido um modelo considerando a reação irreversível e um considerando a reversibilidade da reação.

Então, observou-se que a modelo reversível de Eley-Rideal ($R^2=0,9908$) apresentou melhor ajuste que o modelo irreversível de Eley-Rideal ($R^2=0,6339$). Além disso, este modelo também apresentou um ajuste melhor que o modelo obtido a partir da Lei das Potências ($R^2=0,9621$). Também foi feita uma comparação entre a soma dos quadrados dos erros dos modelos estudados e o modelo de Eley-Rideal foi o que apresentou o menor valor, confirmando-se como o modelo de melhor ajuste dentre os apresentados. Os parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Eley-Rideal considerando a reação reversível foram $0,6731 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ para a reação direta, $139,3176 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ para a reação inversa, $1,6750 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3$ para a adsorção de álcool e, $0,3740 \text{ mol L}^{-1}$ para a dessorção de glicerol.

Risso *et al.* (2018) estudaram a utilização de catalisadores produzidos a partir de cascas de ovos, conchas de ostras e moluscos para produção de biodiesel utilizando óleo de soja e metanol. Nesse caso, foi proposto o mecanismo de Eley-Rideal, porém considerando a concentração de metanol constante devido à alta razão molar e a reação superficial como irreversível. De acordo com os autores, os modelos gerados têm boa concordância com os dados experimentais. Usando a casca de ovo calcinada, o parâmetro cinético relativo a reação superficial obtida foi de $1,2 \text{ g}^{-1} \text{ L min}^{-1}$, o parâmetro cinético relativo a adsorção de metanol foi de $0,6 \text{ L mol}^{-1}$ e o parâmetro cinético relativo a dessorção de glicerol foi de $82,2 \text{ L mol}^{-1}$. Os dados experimentais e a representação do modelo para o uso da casca de ovo como catalisador podem ser observados na Figura 8.

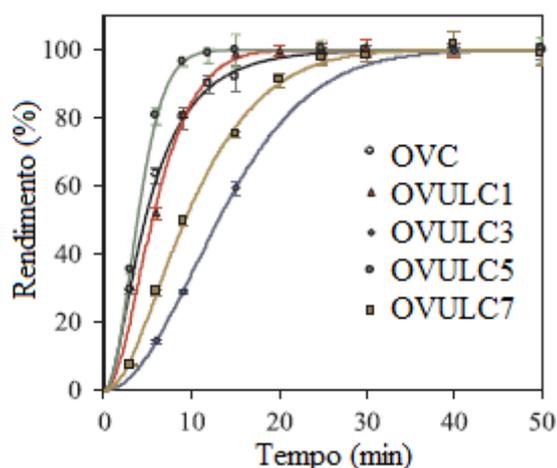


Figura 8. Dados experimentais (símbolos) e modelo cinético (linhas) da transesterificação do óleo de soja com metanol utilizando casca de ovo como catalisador. OVC: cascas de ovos moídas e calcinadas. OVULCx: cascas de ovos moídas submetidas a irradiação de ultrassom por x horas. (Adaptado de Risso *et al.*, 2018)

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos relacionando a transesterificação enzimática com os modelos cinéticos propostos, estes modelos apresentaram boa correlação de dados para estudos de transesterificação utilizando outros tipos de catalisadores heterogêneos. Devido a isso, estes modelos foram sugeridos para relacionar os dados da transesterificação enzimática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados neste trabalho, assim como a metodologia aplicada durante os experimentos. Primeiramente, foi utilizada uma unidade experimental localizada no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (LTAB), localizado no Departamento de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Esta unidade tinha como propósito produzir biodiesel, utilizando matéria prima alternativa e catalisador biológico. As análises do produto obtido foram feitas no Laboratório de Produtos Naturais 4 e Serviço de Métodos Analíticos do Instituto de Tecnologia em Fármacos, localizados na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ).

4.1 Materiais

O óleo de fritura utilizado neste trabalho foi doado por restaurantes locais. Já o óleo de soja refinado foi comprado em mercado local. A enzima utilizada como catalisador foi a Novozyme 435, gentilmente doada pela Novozymes Latin America Ltda. Trata-se de uma triacilglicerol lipase (E.C.3.1.1.3) inespecífica, extraída da *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica macroporosa.

Os reagentes químicos utilizados para a realização dos experimentos que compõem essa dissertação foram:

- Álcool metílico P.A., 99,8% de pureza, Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda;
- Álcool etílico P.A., 99,5% de pureza, Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda;
- Éter etílico P.A., Vetec Química Fina Ltda;
- Fenolftaleína pura, Vetec Química Fina Ltda;
- Hidróxido de sódio P.A., Vetec Química Fina Ltda;
- Complexo trifluoreto de boro-metanol, Sigma Aldrich;
- Hexano P.A., Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda e
- Sulfato de sódio anidro P.A., Vetec Química Fina Ltda.

4.2 Metodologia Experimental

Um fluxograma apresentando todas as etapas experimentais conduzidas para o processo de produção de biodiesel através da transesterificação enzimática a partir da mistura de óleos é apresentado na Figura 9. O fluxograma é composto pelas etapas de caracterização dos óleos utilizados, preparo das misturas, reação de transesterificação, separação de fases, recuperação das lipases e caracterização do produto final.

4.2.1 Caracterização das matérias primas

Primeiramente, o óleo residual de fritura foi filtrado para que as impurezas provenientes do processo de cocção de alimentos fossem removidas. A partir disso, o óleo de soja refinado e o óleo de fritura foram analisados, a fim de determinar suas características físico-químicas, como índice de acidez, viscosidade cinemática, massa específica, teor de água e perfil de ácidos graxos. Cada análise necessária à caracterização dos mesmos é descrita detalhadamente a seguir.

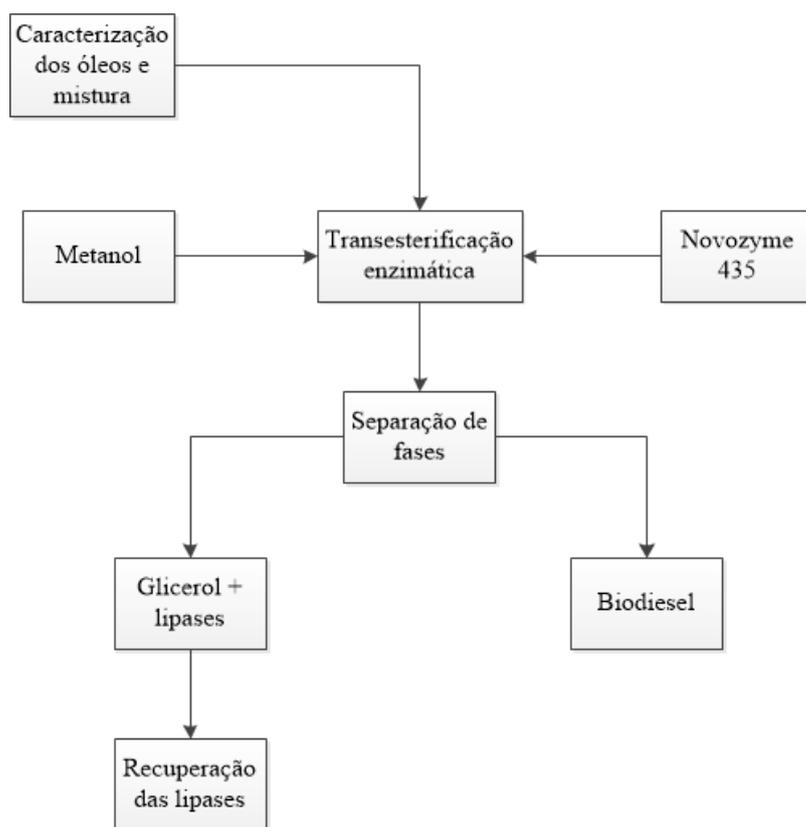


Figura 9. Fluxograma das Etapas Experimentais conduzidas para o Processo de Produção de Biodiesel

4.2.1.1 Índice de acidez

O índice de acidez (IA) para óleos e gorduras é definido como o número de mg de hidróxido de potássio (KOH) necessário para neutralizar os ácidos graxos livres de um grama de amostra. Um alto índice de acidez nas matérias primas indica a baixa qualidade do óleo que pode ser devido aos problemas no processamento e/ou na armazenagem, visto que o aquecimento e a luz são responsáveis por acelerar a hidrólise dos glicerídeos presentes nos óleos (CHHETRI *et al.*, 2008).

O procedimento foi realizado de acordo com a norma Cd 3d-63 da American Oil Chemists' Society (AOCS). Neste procedimento, cerca de 5 g de óleo foram diluídos em 50 mL de uma solução contendo álcool etílico e éter etílico, na proporção de 1:1. Esta solução foi, então, titulada com KOH 0,1M, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% em álcool (duas ou três gotas) como indicador. Previamente, foi feita a titulação apenas do solvente e indicador (branco) para a minimização de erros experimentais.

O índice de acidez é calculado a partir do volume de solução de KOH utilizado para neutralizar a amostra através da Equação 22.

$$IA \text{ (mg KOH/g)} = \frac{C_{KOH} \times (V_a - V_b) \times MM_{KOH}}{m} \quad (22)$$

sendo V_a o volume da solução de KOH (mL) utilizado na titulação da amostra, V_b o volume da solução de KOH (mL) utilizado na titulação do branco, C a concentração molar da solução titulante, MM_{KOH} a massa molar do hidróxido de potássio (56,11 g/gmol) e m a massa da amostra (g).

4.2.1.2 Viscosidade

A viscosidade é a medida da expressão da resistência do fluido ao escoamento, ou seja, ao deslocamento de parte de suas moléculas sobre moléculas. A medição da viscosidade foi realizada em um Reômetro HAAKE RheoStress 1, localizado no Laboratório de Escoamento de Fluidos DEQ/IT/UFRRJ.

4.2.1.3 Massa específica

A massa específica é uma grandeza física definida como a massa por unidade de volume de uma substância em uma temperatura específica. Neste trabalho, a medida experimental da massa específica foi realizada utilizando um densímetro digital (Gehaka, modelo DSL 920), com $\pm 0,0001 \text{ g/cm}^3$ de incerteza.

4.2.1.4 Perfil de ácidos graxos

As amostras de óleo foram derivatizadas utilizando o método do trifluoreto de boro. O processo de derivatização é feito para que se possa avaliar a composição dos óleos em função dos ácidos graxos, já que a adição direta dos óleos pode danificar a coluna cromatográfica.

Primeiramente, pesou-se 50 mg da amostra de óleo em um balão de 50 mL, depois adicionou-se 10 mL da solução metanólica de hidróxido de sódio (0,5 M). O balão foi adicionado a um condensador e deixou-se em refluxo por 10 min. Então, adicionou-se 5 mL do complexo trifluoreto de boro e deixou-se em ebulição por mais 2 min. Por fim, 5 mL de hexano foram adicionados ao balão e, após 1 min de ebulição deixou-se a amostra esfriar naturalmente. A amostra foi transferida para um balão de separação e adicionou-se uma solução saturada de NaCl para acelerar a separação de fases. Separou-se a fase superior em um béquer e uma espátula de Na_2SO_4 anidro foi adicionada para remover qualquer traço de água. A fase orgânica foi filtrada, utilizando um filtro seringa e reservada para posterior análise cromatográfica.

A análise cromatográfica foi feita utilizando um cromatógrafo de fase gasosa Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna Agilent 122-1831 modelo DB-17HT (30 m de comprimento x 0,25 mm x 0,15 μm de espessura de filme) acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM). A composição do óleo foi caracterizada por comparação dos espectros de massa na biblioteca do aparelho (Wiley Library Software 7N). As condições de operação cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial do forno de 110 °C, taxa de aquecimento de 5 °C/min, temperatura final de 365 °C, temperatura do injetor de 250 °C, temperatura do detector de 250 °C, tempo inicial de 10 min, tempo final de 35 min, split 1:50, H_2 como gás de arraste com vazão de 1 mL/min e volume de injeção de 2 μL .

As análises cromatográficas foram realizadas para identificar os componentes presentes nos óleos com suas respectivas quantidades proporcionais. A partir da composição química obtida em determinado óleo, foi possível determinar seu peso molecular médio. De acordo com Pighinelli (2007), o peso molecular dos óleos pode ser calculado com base na composição em ácidos graxos dos óleos demonstrados pela Equação 23.

$$MM_{\text{óleo}} = 3 \times \sum_{i=1}^n (X_i \times MM_i) + MM_G - 3 \times MM_{\text{água}} \quad (23)$$

sendo $MM_{\text{óleo}}$ o peso molecular do óleo em g/mol, X_i a quantidade do ácido graxo i na amostra, MM_i o peso molecular do ácido graxo i em g/mol, MM_G o peso molecular de uma molécula de glicerol e $MM_{\text{água}}$ o peso molecular da água perdida na formação dos triglicerídeos.

4.2.2 Planejamento de experimentos

A metodologia que combina o planejamento fatorial com a análise de superfícies de respostas está fundamentada na teoria estatística. Essa metodologia tem como vantagem uma redução no número de experimentos, sendo os fatores analisados simultaneamente e, com isso, torna-se possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Com isso, a conversão reacional da produção de biodiesel foi avaliada, a partir de um planejamento experimental, para analisar a influência de cada variável independente na variável dependente, conversão, e para determinar as condições operacionais ótimas do processo. As variáveis avaliadas estatisticamente foram a quantidade de catalisador (lipase), teor de óleo de fritura na mistura de óleos e tempo de reação. Na Tabela 5, pode-se observar os fatores e níveis selecionados para o planejamento experimental proposto.

Tabela 5. Variáveis e níveis correspondentes ao planejamento de experimentos

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
% enzima	X1	5	8	12,5	17	20
% óleo de fritura	X2	0	20	50	80	100
Tempo (h)	X3	4	5,2	7	8,8	10

O planejamento adotado foi o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo um fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos que estão ilustrados na Tabela 6. A variável dependente escolhida como resposta foi a conversão de ésteres metílicos.

Tabela 6. Matriz do DCCR para a realização dos experimentos de produção de biodiesel

Ensaio	Níveis das Variáveis Independentes Codificados			Níveis Reais das Variáveis Independentes		
	Lipase (%)	Óleo de fritura (%)	Tempo (h)	Lipase (%)	Óleo de fritura (%)	Tempo (h:min)
1	-1	-1	-1	8	20	05:12
2	-1	-1	1	8	20	08:48
3	-1	1	-1	8	80	05:12
4	-1	1	1	8	80	08:48
5	1	-1	-1	17	20	05:12
6	1	-1	1	17	20	08:48
7	1	1	-1	17	80	05:12
8	1	1	1	17	80	08:48
9	-1,68	0	0	5	50	07:00
10	1,68	0	0	20	50	07:00
11	0	-1,68	0	12,5	0	07:00
12	0	1,68	0	12,5	100	07:00
13	0	0	-1,68	12,5	50	04:00
14	0	0	1,68	12,5	50	10:00
15	0	0	0	12,5	50	07:00
16	0	0	0	12,5	50	07:00
17	0	0	0	12,5	50	07:00

As condições operacionais escolhidas foram feitas baseando-se na revisão bibliográfica, apresentada no Capítulo 2, visando principalmente os estudos que utilizaram um dos óleos escolhidos como matéria prima para este trabalho e que utilizaram a mesma enzima de interesse.

4.2.3 Procedimento experimental

A reação de transesterificação enzimática foi conduzida utilizando uma mistura de óleo de soja refinado com óleo de fritura residual, lipase como catalisador e metanol como acceptor de grupo acila. O esquema do aparato experimental utilizado, localizado no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, pode ser observado na Figura 10. Este sistema é composto por um agitador magnético, um tubo de ensaio e um banho térmico.

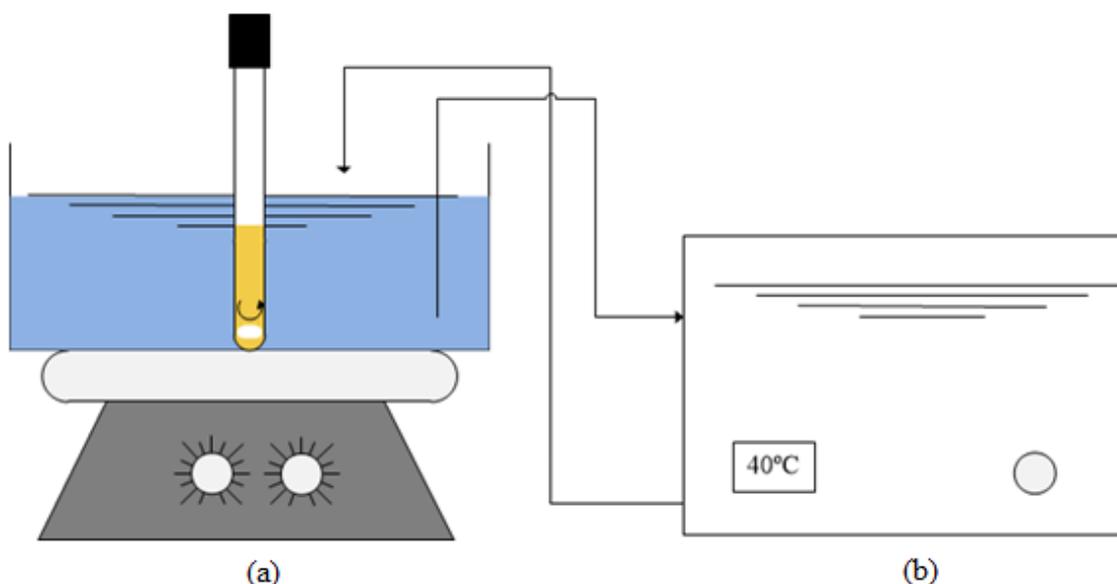


Figura 10. Esquema ilustrativo do aparato experimental para a reação de transesterificação enzimática, sendo (a) agitador magnético e (b) banho termostático

Primeiramente pesou-se, aproximadamente, 2 g da mistura de óleos em um tubo de ensaio e depois adicionou-se metanol em uma razão molar de óleo para álcool de 1:3. Posteriormente, adicionou-se a massa de lipase necessária, de acordo com o planejamento de experimentos, no tubo de ensaio com o auxílio de um funil de vidro. A temperatura do sistema foi mantida a 40 °C, utilizando um banho maria com circulação externa de água (Novatecnica – modelo NT 249), sob agitação de 350 rpm, utilizando o agitador magnético Fisatom (modelo 752A). Após o tempo experimental estabelecido previamente, a reação foi interrompida retirando o tubo de ensaio do aparato experimental.

Para a separação da fase de metil ésteres, a amostra foi centrifugada em uma centrífuga (Daiki – Modelo 80-2B) por 10 min a uma velocidade 2500 rpm. Foram retiradas alíquotas da fase superior que seguiram para análises posteriores.

4.2.4 Caracterização do produto

O produto obtido foi analisado por cromatografia gasosa para avaliar seu enquadramento nas normas vigentes.

4.2.4.1 Cromatografia gasosa

Para a quantificação dos ésteres de ácidos graxos presentes nas amostras, transferiu-se 250 mg da amostra para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com n-hexano. A solução foi então injetada em um cromatógrafo gasoso para a análise da conversão em ésteres metílicos. A análise cromatográfica foi feita utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.2.1.4 deste trabalho, porém, neste caso, o cromatógrafo de fase gasosa Hewlett-Packard 6890 foi acoplado a um detector de ionização de chamas (CG-FID).

A conversão em ésteres metílicos foi determinada a partir da análise cromatográfica para cada um dos ensaios realizados e foi definida como a soma das porcentagens dos ésteres metílicos, identificados e quantificados através de análise cromatográfica.

4.2.5 Reutilização da enzima

Uma das grandes vantagens de utilizar uma enzima imobilizada é que esta pode ser recuperada e reutilizada. Após realizados os experimentos do planejamento experimental, foram conduzidos experimentos, de forma a testar a capacidade de reutilização da lipase estudada. Como resultado, espera-se avaliar novamente a conversão em ésteres, visando avaliar a capacidade de reuso dessa enzima.

Para esses experimentos, a temperatura foi mantida a 40 °C e a razão molar álcool óleo foi mantida a 1:3. As condições experimentais de tempo de reação, teor de óleo de fritura na mistura e quantidade de enzima foram as condições ótimas obtidas a partir do planejamento realizado anteriormente. Após cada reação de reutilização, o biocatalisador imobilizado foi lavado três vezes com hexano P.A. e, em seguida, filtrou-se a vácuo a suspensão obtida. Os resultados e comparações são apresentados no capítulo de resultados e discussões.

4.2.6 Estudo cinético

Além do estudo do planejamento de experimentos, que visa avaliar os efeitos das variáveis do processo e maximizar a conversão da reação, foi feito também um estudo da modelagem matemática da cinética da reação.

Para a análise da cinética de reação, novamente as condições operacionais levaram ao melhor resultado de conversão foram escolhidas. Foi feito um experimento para cada tempo de reação, evitando assim a alteração no volume de controle, caso fossem necessários tirar alíquotas durante a reação. Então, todos os experimentos foram realizados nas mesmas condições de temperatura, razão molar álcool:óleo, porcentagem de mistura de óleo e quantidade de catalisador, de acordo com o experimento do planejamento que gerou o melhor resultado, alterando-se apenas o tempo de reação.

Os modelos utilizados foram descritos no capítulo 3 do presente trabalho. Os parâmetros cinéticos foram obtidos através de ajuste do modelo aos dados experimentais, utilizando um estimador de parâmetros, visando a minimização da função objetivo, representada na Eq 24. Os modelos foram analisados usando testes estatísticos, a fim de avaliar sua aplicabilidade e confiabilidade.

$$FO = \sum_{i=1}^N (Y_{\text{calc}} - Y_{\text{exp}})^2 \quad (24)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados das etapas propostas neste trabalho, como a caracterização das matérias primas, análise do planejamento de experimentos envolvendo os parâmetros operacionais da produção de biodiesel, a análise da capacidade de reutilização do biocatalisador empregado, bem como o estudo cinético da reação pertinente ao processo de produção de biodiesel.

5.1 Caracterização da Matéria Prima

As amostras de óleo foram submetidas ao processo de derivatização, a fim de determinar a composição de cada óleo. O perfil de ácidos graxos presentes em cada uma das amostras foi obtido a partir da identificação dos ácidos graxos e seu teor na amostra, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Na Tabela 7 estão apresentados os ácidos graxos presentes na amostra e o percentual relativo de cada componente, tanto no óleo de soja quanto no óleo de fritura e na mistura com 50% de cada matéria prima. Além disso, os cromatogramas dos óleos de soja e de fritura obtidos através de CG-EM estão apresentados em anexo.

Tabela 7. Composição dos ácidos graxos presentes nas matérias primas

Ácido graxo	Fórmula molecular	Massa molar	Óleo de soja	Óleo de fritura	Mistura 50%
			% molar	% molar	% molar
Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,43	10,76	14,30	12,41
Palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254,414	-	0,57	0,34
Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,468	33,54	39,02	36,11
Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,452	48,83	41,65	45,37
Linolênico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,436	5,97	3,64	4,93
Eicosanóico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312,538	0,54	0,50	0,52
Behênico	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340,592	0,35	0,31	0,32

A composição do óleo de soja e o teor de cada um dos ácidos obtidos estão de acordo com os resultados obtidos por Tacias-Pascacio *et al.* (2017), Nie *et al.* (2015), Wang *et al.* (2015), Cerveró *et al.* (2014), Haigh *et al.* (2013) e Barbosa *et al.* (2010).

Na Tabela 7, é possível observar que não houve alterações significativas na composição de ácidos graxos, ao se comparar o óleo de soja com o óleo de fritura. Porém, pode-se observar que houve um aumento no teor de ácidos graxos saturados e, conseqüentemente, uma diminuição no teor de ácidos graxos insaturados presentes no óleo de fritura quando comparado ao óleo de soja. O óleo de fritura e o óleo de soja utilizados possuem 84,9% e 88,3% de ácidos graxos insaturados e 15,1% e 11,7% de ácidos graxos saturados, respectivamente. Este fato é uma consequência do processo de cocção de alimentos, visto que as altas temperaturas as quais ele é submetido, atua na quebra das ligações duplas, aumentando o teor de ácidos graxos saturados na composição do óleo de fritura residual (DANTAS, 2016).

A partir da composição apresentada na Tabela 7, foi possível determinar a massa molecular do óleo de soja e do óleo de fritura residual através da Equação 23 do item 4.2.1.4 do presente trabalho. De acordo com os dados obtidos, a massa molar do óleo de soja determinada foi de 874,48 g/mol, a massa molar do óleo de fritura foi de 871,85 g/mol e a massa molar da mistura 50/50 foi de 873,17 g/mol. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Cerveró *et al.* (2014) de 871 g/mol para o óleo de soja e por Dantas (2016) de 870,9 g/mol para o óleo de fritura.

Além disso, as características físico-químicas do óleo de soja e do óleo de fritura foram obtidas a partir da metodologia descrita no Capítulo 4 do presente trabalho com a intenção de compara-las e determinar sua qualidade. As análises foram realizadas em triplicata e o desvio padrão (DP) foi calculado para cada propriedade analisada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Propriedades físico-químicas das matérias primas

Propriedade	Unidade	Óleo de soja		Óleo de fritura	
		Valor	DP (%)	Valor	DP (%)
Índice de acidez	mg KOH/g	0,309	9,061	16,809	5,036
Massa específica	kg/m ³	0,907	0,111	0,909	0,112

O índice de acidez indica o teor de ácidos graxos livres presentes na amostra. Durante o processo de fritura, a presença de água e calor acelera a hidrólise de triglicerídeos aumentando a acidez do óleo (DANTAS, 2016). Por isso, observa-se a alta acidez do óleo de fritura (16,809 mg KOH/g) se comparado ao óleo de soja refinado (0,309 mg KOH/g). Sonare & Rathod (2010) também observaram o aumento no índice de acidez quando compararam o óleo de girassol refinado (0,706 mg KOH/g) com o óleo após o uso para a cocção de alimentos (2,805 mg KOH/g), corroborando com o observado neste trabalho. O óleo de fritura residual apresentou um maior índice de acidez comparado aos valores apresentados por Almeida *et al.* (2015) e Tavares *et al.* (2017). Isso pode ser devido ao longo tempo de armazenamento deste material e, pelo fato de não ter sido realizado nenhum pré-tratamento desse óleo. Liu *et al.* (2010), Haigh *et al.* (2014) e Babaki *et al.* (2017) também utilizaram óleos residuais de fritura com alto índice de acidez, 84,15 mg KOH/g, 16,6 mg KOH/g e 76 mg KOH/g, respectivamente.

Como já foi citado anteriormente neste trabalho, a massa específica e a viscosidade da amostra estão relacionados ao perfil de ácidos graxos presentes na amostra (KARMAKAR *et al.*, 2010; MAHMUDUL *et al.*, 2017). Por isso, a densidade observada nas duas amostras é similar, visto que o perfil de ácidos graxos presentes (Tabela 7) também é similar.

As viscosidades cinemáticas obtidas para o óleo de soja e óleo de fritura foram, respectivamente, 34,598 mm²/s e 40,915 mm²/s. A viscosidade do óleo de fritura é maior do que a viscosidade do óleo de soja; devido ao aumento no grau de saturação do óleo após ser utilizado no processo de fritura dos alimentos, já que, quanto maior o grau de insaturação, menor a viscosidade do ácido graxo (KNOTHE & RAZON, 2017).

Os resultados obtidos para a massa específica e viscosidade cinemática do óleo de soja estão de acordo com os obtidos por Martínez *et al.* (2014). Já os resultados obtidos de densidade e viscosidade para o óleo de fritura são corroborados pelos obtidos por Azócar *et al.* (2010).

5.2 Análise dos Resultados segundo o Planejamento Experimental

Foi realizado um delineamento composto central rotacional 2³ para avaliar o efeito das variáveis independentes (quantidade de lipase, teor de óleo de fritura na mistura de óleo e tempo de reação) na conversão de ésteres metílicos. Os resultados dos 17 experimentos conduzidos estão apresentados na Tabela 9.

A conversão em ésteres metílicos foi determinada a partir da análise cromatográfica para cada um dos ensaios realizados e foi definida como a soma das porcentagens dos ésteres metílicos, identificados e quantificados através de análise cromatográfica. A conversão em ésteres variou entre 89 e 98,05%. Analisando os resultados mostrados na Tabela 9, observa-se que 7 dos 17 ensaios realizados, experimentos 2, 5, 6, 8, 10, 11 e 14, tiveram como resultado uma conversão maior do que 96,5%, que é o preconizado pela Agência Nacional de Petróleo,

Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), como o teor de éster mínimo para que o produto seja considerado como biodiesel. Também é possível observar que a conversão máxima obtida foi de 98,05% utilizando 12,5% m/m de lipase, uma mistura contendo 50% v/v de óleo de fritura, após 10 h de reação. O cromatograma desse experimento que levou a uma maior conversão está apresentado no Anexo 2 deste trabalho. Estas condições foram utilizadas para realizar os experimentos de estudo da reutilização e estudo cinético discutidos nas próximas sessões. Como não existem outros trabalhos sobre a transesterificação enzimática dessa mistura de óleos, não foi possível comparar a conversão obtida e as condições ótimas.

Tabela 9. Resultados de conversão para cada ensaio do planejamento de experimentos

Ensaio	Lipase (%)	Óleo de fritura (%)	Tempo (h:min)	Conversão (%)
	X1	X2	X3	Y
1	8	20	05:12	94,74
2	8	20	08:48	97,28
3	8	80	05:12	90,28
4	8	80	08:48	93,74
5	17	20	05:12	97,91
6	17	20	08:48	97,79
7	17	80	05:12	95,10
8	17	80	08:48	97,44
9	5	50	07:00	89,00
10	20	50	07:00	97,97
11	12,5	0	07:00	97,56
12	12,5	100	07:00	96,47
13	12,5	50	04:00	96,48
14	12,5	50	10:00	98,05
15	12,5	50	07:00	94,15
16	12,5	50	07:00	95,77
17	12,5	50	07:00	95,02

A influência das três variáveis independentes codificadas, teor de lipase, teor de óleo de fritura na mistura e tempo de reação, na conversão de biodiesel foi analisada estatisticamente considerando um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Para tal análise, os coeficientes de regressão, erro padrão, t-valor e p-valor foram calculados em função da variável resposta, com os dados apresentados na Tabela 9 e estão apresentados na Tabela 10.

De acordo com o nível de confiança estabelecido, o p-valor correspondente a cada fator deve ser menor que 0,05 para indicar que este seja estatisticamente significativo. Diante disso e de acordo com os dados de p-valor presentes na Tabela 10, conclui-se que o fator linear referente ao teor de lipase e o fator linear referente ao teor de óleo de fritura foram os parâmetros considerados estatisticamente significativos. Pode-se observar, também, que o fator linear relacionado à quantidade de biocatalisador adicionado ($p\text{-valor} = 0,011870$) foi o que apresentou menor magnitude no valor de p, o que indica que esta variável é a mais significativa do processo.

Tal resultado pode ser corroborado através da análise do gráfico de Pareto, mostrado na Figura 11. As alturas representam o efeito das variáveis (t-valor) e estão dispostas em ordem decrescente. Novamente, é possível observar que o fator linear do teor de lipase e o fator linear do teor de óleo de fritura foram os parâmetros significativos, sendo o primeiro o mais significativo. Além disso, pode-se observar que o fator linear teor de lipase tem efeito positivo na conversão em biodiesel, ou seja, quanto maior a quantidade de lipase, maior a conversão.

Wang *et al.* (2015), Azócar *et al.* (2010) e Halim & Kamaruddin (2008) observaram o mesmo efeito com relação à quantidade de lipase na conversão da reação utilizando a lipase imobilizada de *Candida sp.* e óleo de fritura, Novozyme 435 e mistura de óleo de soja e óleo de colza e, Novozyme 435 e óleo de fritura, respectivamente. Além disso, foi possível observar que o fator linear do teor de óleo de fritura mostra um efeito negativo sobre a conversão em ésteres metílicos, indicando que o aumento desse fator não favorece a conversão da reação de transesterificação. Este fato já era esperado visto que nos estudos citados na revisão bibliográfica, os experimentos utilizando a Novozyme 435 e óleo de fritura (HAIGH *et al.*, 2013; MACEIRAS *et al.*, 2009; HALIM & KAMARUDDIN, 2008) apresentaram conversões ótimas relativamente inferiores aos estudos que utilizaram a Novozyme 435 e óleo de soja (CERVERÓ *et al.*, 2014; GO *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍN & OTERO, 2008).

Tabela 10. Resultados de coeficientes de regressão, erro padrão e p-valor

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	95,00977	0,466610	0,000024
<i>Coefficientes lineares</i>			
(1) Lipase (L)	1,99832	0,220148	0,011870
(2) Óleo de fritura (L)	-0,95210	0,219436	0,049217
(3) Tempo (L)	0,79549	0,220148	0,068213
<i>Coefficientes quadráticos</i>			
(1) Lipase (Q)	-0,62941	0,244473	0,119403
(2) Óleo de fritura (Q)	0,62196	0,241271	0,123695
(3) Tempo (Q)	0,70894	0,244473	0,099167
<i>Coefficientes de interação</i>			
(1) por (2)	0,60560	0,286568	0,168888
(1) por (3)	-0,47198	0,286568	0,241314
(2) por (3)	0,42480	0,286568	0,276490

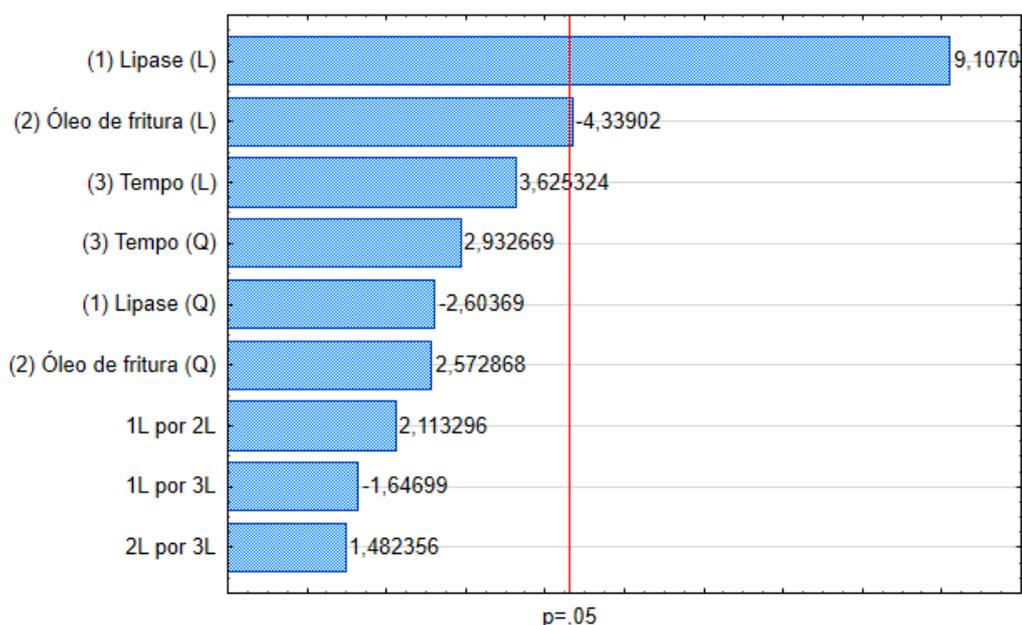


Figura 11. Gráfico de Pareto para a análise da conversão em ésteres metílicos

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%, apresentada na Tabela 11.

Através dos resultados da análise de variância, apresentados na Tabela 11, pode-se observar que o p-valor do modelo foi menor que 0,05, mostrando que o modelo é altamente significativo. Além disso, é possível observar através do teste F, que a análise de regressão também foi significativa, visto que o valor de F calculado (19,82636) foi maior que o F tabelado (3,738892).

Tabela 11. Análise de variância da conversão da reação de transesterificação em Biodiesel

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F-cal	F-tab	p-valor
Regressão (R)	2	82,8382	41,41911	19,82636	3,738892	8,23671E-05
Resíduo (r)	14	29,2473	2,089093			
Falta de ajuste	5	10,0915				
Erro puro	2	1,3139				
Total (R+r)	16	112,0855				

Então, como o F calculado foi maior que o F tabelado, foi possível gerar um modelo quadrático de regressão para representar o processo utilizando as variáveis codificadas (Equação 25). Com base na análise de variância, o modelo de regressão pode ser simplificado gerando um modelo representativo do processo, Equação 26, como uma função apenas das variáveis significativas do processo.

$$Y = 95,00977 + 1,99832 X_1 - 0,95210 X_2 + 0,79549 X_3 + 0,60560 X_1 X_2 - 0,47198$$

$$X_1 X_3 + 0,42480 X_2 X_3 - 0,62941 X_1^2 + 0,62196 X_2^2 + 0,70894 X_3^2 \quad (25)$$

$$Y = 95,00977 + 1,99832 X_1 - 0,95210 X_2 \quad (26)$$

sendo Y a conversão em ésteres metílicos, X1 o teor de lipase, X2 o teor de óleo de fritura e X3 o tempo de reação.

O modelo representativo foi utilizado para predizer os novos valores de conversão e o desvio relativo encontrado foi de 1,44%, mostrando que a relação das variáveis significativas foi relevante e apropriada. Pode-se considerar que o modelo é válido e apropriado para representar as relações entre as variáveis selecionadas.

Diante de todos os resultados, foi possível gerar superfícies de resposta, visto que elas definem as condições mais adequadas para maximizar a variável dependente. As superfícies de resposta que ilustram a conversão de biodiesel em função da quantidade de lipase, teor de óleo de fritura na mistura e tempo de reação estão apresentadas nas Figura 12, 13 e 14.

A Figura 12 mostra a interação entre o teor de lipase e o teor de óleo de fritura na mistura de óleos e sua influência na conversão em ésteres metílicos. É possível observar que o aumento no teor de lipase leva a um aumento na conversão da reação. Além disso, a superfície de resposta também mostra que o aumento no teor de óleo de fritura na mistura faz com que a conversão seja reduzida. Porém quando o teor de lipase é alto (maior do que 13%), o teor de óleo de fritura interfere menos na conversão da reação, mantendo a conversão em ésteres maior que 97% independente da característica da mistura. Esse fato pode ser corroborado pelo p-valor muito próximo de 0,05 obtido para o teor de óleo de fritura (p-valor = 0,049217), o que mostra que esse fator tem uma significância bem menor na conversão em ésteres.

Já na Figura 13, é possível observar a dependência da conversão em metil ésteres no tempo de reação e na quantidade de lipase utilizada. Novamente, observa-se um aumento da conversão com o aumento da quantidade de catalisador adicionada ao meio reacional. Além disso, é possível observar que a variação no tempo reacional tem uma menor influência na conversão se comparado à quantidade de catalisador adicionada.

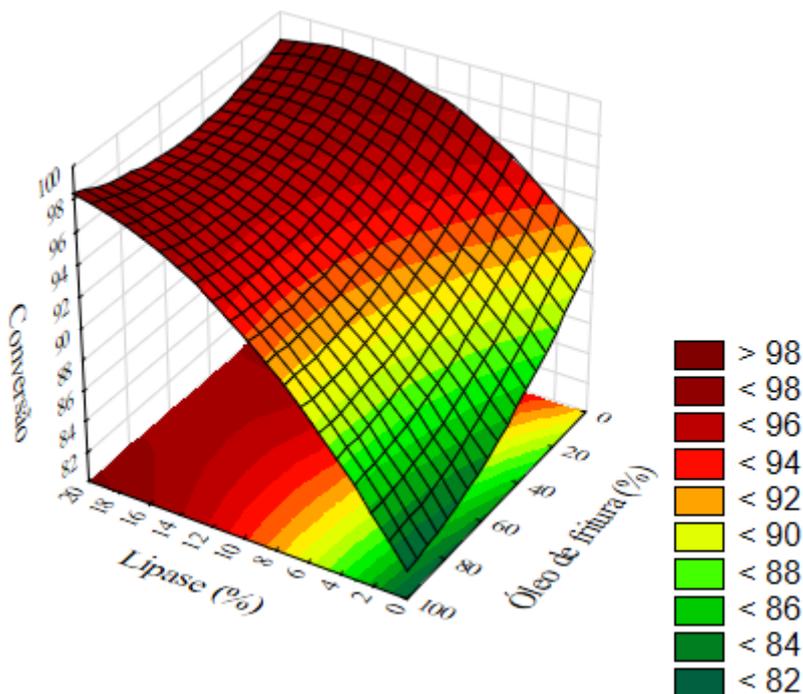


Figura 12. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura.

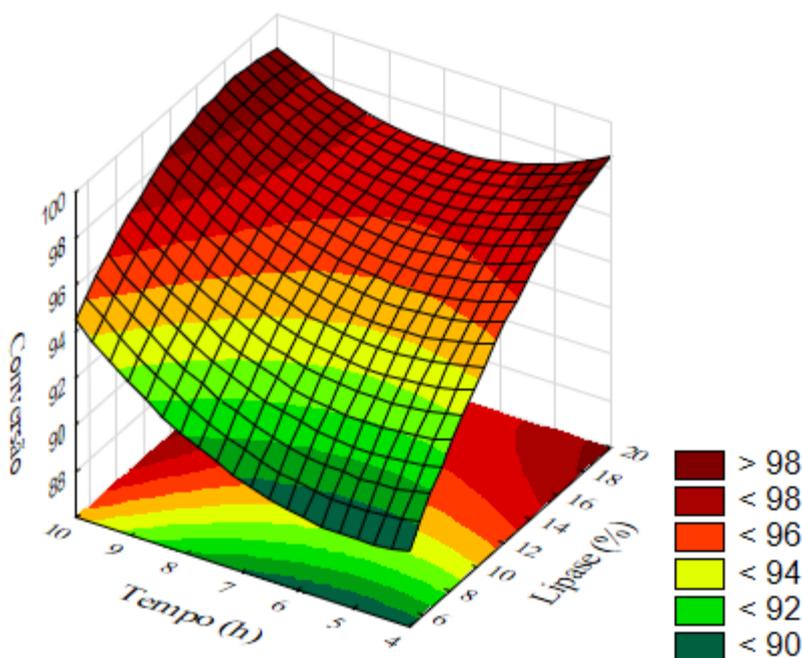


Figura 13. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do tempo e do teor de lipase.

Ambas as figuras reforçam o resultado obtido de que a lipase é o fator mais significativo e que exerce mais influência na conversão em ésteres metílicos. Além disso, o efeito sinérgico da quantidade de biocatalisador no meio já poderia ser esperado visto que, quanto maior a quantidade de lipase adicionada ao meio, maior o número de sítios ativos disponíveis no meio (RAZACK & DURAIARASAN, 2016; POPPE *et al.*, 2015).

A partir da superfície de resposta apresentada na Figura 14, é possível observar que o tempo tem um efeito positivo na conversão, enquanto que a adição de óleo de fritura na mistura causa um efeito negativo. Também é possível observar que, para misturas contendo maior teor de óleo de fritura, maiores tempos de reação são necessários para se obter uma conversão razoável.

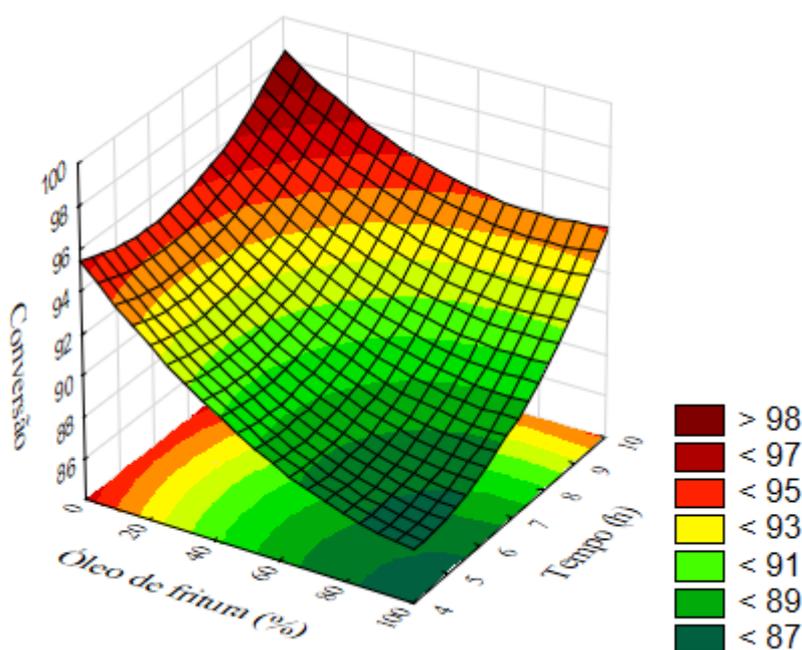


Figura 14. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de óleo de fritura e do tempo.

Após análise, foi observado que a região otimizada é localizada com a menor porcentagem de óleo de fritura na mistura e com maior tempo de reação e maior quantidade de lipase, apesar do tempo não ter se revelado uma variável significativa.

Buscando entender melhor a influência das variáveis significativas do processo e sua aplicabilidade industrialmente, gerou-se superfícies de resposta relacionando a conversão com o teor de lipase e teor de óleo de fritura em diferentes tempos de reação, 10, 7 e 4 h, que estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Em 10 h de reação, Figura 15, é possível obter uma conversão maior que 96,6% usando uma quantidade de catalisador acima de 8% para qualquer matéria prima, independente do teor de óleo de fritura na mistura.

Em 7 h, Figura 16, observa-se que quando apenas o óleo de soja é utilizado é possível obter conversões acima de 96,5% com teor de lipase acima de 8%. A quantidade mínima de biocatalisador para se obter conversões maiores que 96,5% aumenta conforme o teor de óleo de fritura na mistura é aumentado, até que essa mistura chegue a 50% de óleo de fritura. A partir desse ponto, o teor de lipase necessário para obter esta conversão diminui com o aumento do teor de óleo de fritura na mistura, chegando a 15% quando apenas óleo de fritura é utilizado.

Fixando o tempo em 4 h, Figura 17, é necessária uma maior quantidade de lipase quanto maior for o teor de óleo de fritura na mistura. Porém, quando 15% de lipase é adicionado, é possível obter conversões maiores que 96,5% independente da mistura utilizada.

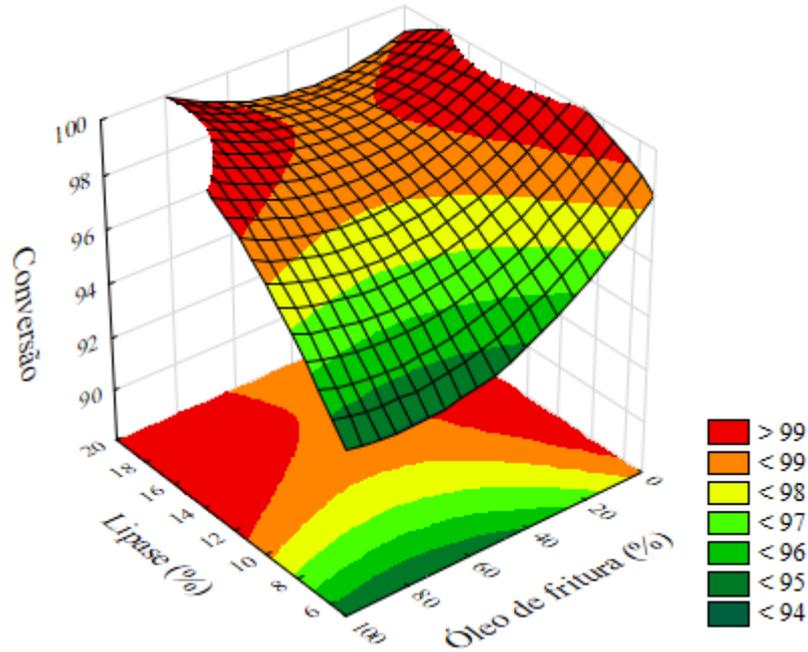


Figura 15. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura para um tempo fixo de 10 h

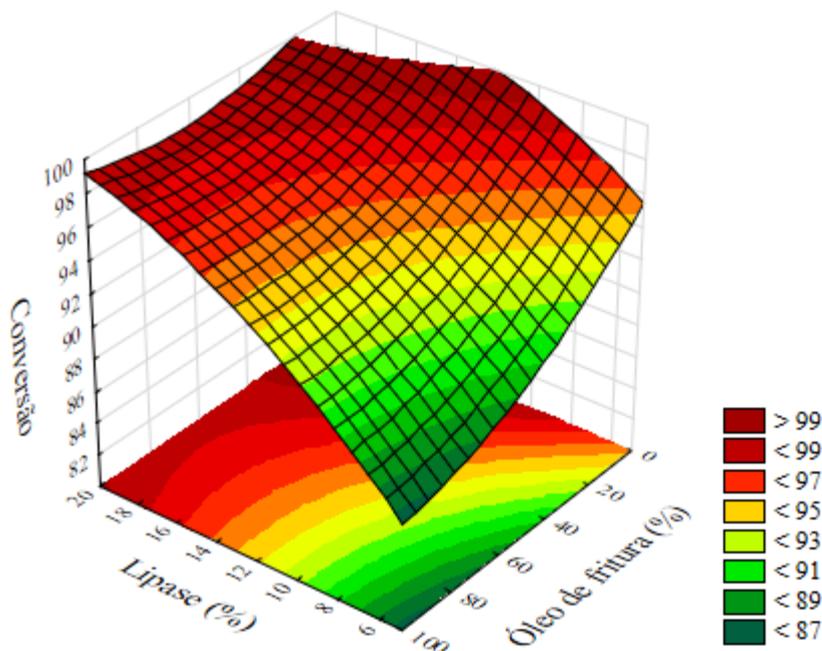


Figura 16. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura para um tempo fixo de 7 h

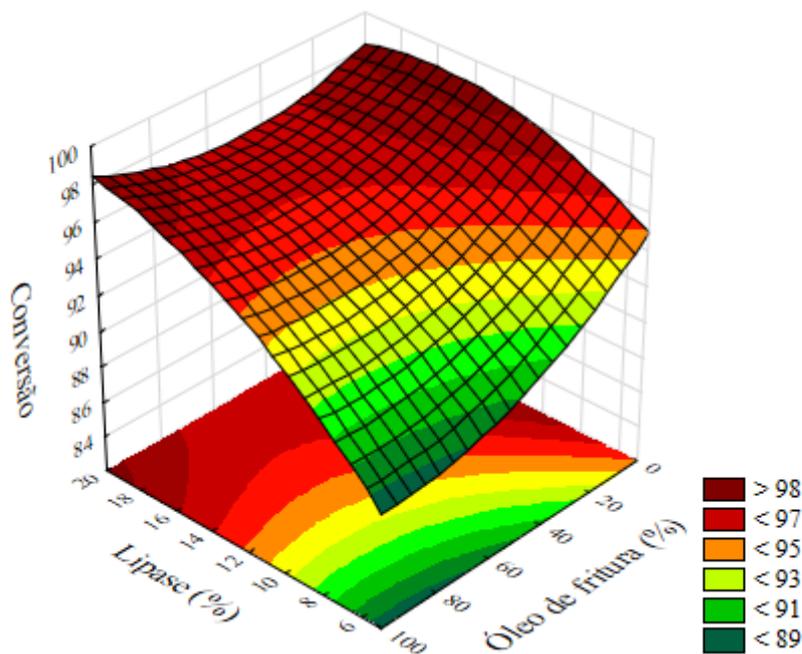


Figura 17. Superfície de resposta relacionando a conversão em ésteres em função do teor de lipase e do teor de óleo de fritura para um tempo fixo de 4 h

Foi possível observar então que, independentemente do tempo de reação, altas quantidades de biocatalisadores no meio fazem com que a característica da mistura não interfira tanto na conversão em metil ésteres. Após realizada essa análise e pensando no ponto de vista da aplicação industrial desse processo, busca-se um menor tempo de reação, maior teor de óleo de fritura e menor quantidade de lipase. Contudo, deve-se levar em consideração que as lipases podem ser reutilizadas em processos em batelada ou podem ser utilizadas em reatores contínuos de leito recheado. Sendo assim, fixando o tempo de reação em 4 h, focando na utilização de uma mistura contendo 50% de óleo de fritura e utilizando o modelo representativo gerado, observa-se que é necessário que 14% de lipase seja adicionado para que as conversões estejam dentro do mínimo estabelecido pela ANP. Observa-se também que, para esse sistema, é possível chegar a uma conversão de até 98,5% utilizando 20% de lipase. Por outro lado, quando é utilizado apenas óleo de fritura em 4 h de reação, que são as condições de maior interesse para aplicação industrial, observou-se que o teor mínimo de lipase para se obter uma conversão de 96,5% é de 15%. Também foi possível observar que a partir dos 15%, a cada 2% a mais de lipase adicionada, tem-se um ganho de 2% em conversão, podendo chegar a 99,20% de conversão utilizando 12,5% de lipase e 100% de óleo de fritura em 4 h.

A partir dos resultados promissores obtidos no planejamento experimental, foi feito então um estudo da reutilização do biocatalisador, a fim de verificar sua atividade em outras bateladas.

5.3 Estudo da Reutilização

A lipase comercial Novozyme 435 já é conhecida como uma das mais efetivas para a reação de transesterificação (RODRIGUES *et al.*, 2008; TALUKDER *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2017). Diante dos resultados promissores em relação a conversão, decidiu-se estudar a estabilidade da enzima no sistema através de sua reutilização. Devido ao alto custo das lipases, sua utilização em escala industrial torna-se restrita e uma das formas de compensar esse problema é a reutilização da enzima. Desta forma, o estudo da reutilização da

enzima se torna um fator crítico para a viabilidade econômica do processo. A condição operacional escolhida para esta etapa do estudo foi a condição que levou a maior conversão obtida no planejamento experimental, sendo uma reação contendo como substrato uma mistura com 50% de óleo de fritura, 12,5% de lipase, a 40 °C, sob agitação de 350 rpm por 10 h. Ao fim de cada reação, a lipase foi lavada com hexano e filtrada, antes de seguir para o novo ciclo. Na Figura 18 pode-se observar a conversão em ésteres metílicos a cada novo ciclo em que a lipase foi utilizada. Vale a pena lembrar que todas as amostras obtidas com a lipase reutilizada foram analisadas por cromatografia nas mesmas condições já citadas no capítulo de materiais e métodos. A partir dos dados apresentados, pode-se observar a diminuição da conversão a cada ciclo de utilização, observou-se uma redução de 97,2% para 91,3% na conversão em ésteres do primeiro para o quinto ciclo. Considerando a conversão obtida na primeira utilização como 100% de sua atividade inicial, pode-se observar que a lipase estudada manteve 93,9% da atividade depois de 5 ciclos.

No trabalho de Hernández-Martín & Otero (2008), a Novozyme 435 manteve 84% da atividade inicial após 9 ciclos de utilização, catalisando a reação de óleo de soja e etanol em uma razão molar de 1:6, a 25 °C por 7 h. Já no trabalho de Zheng *et al.* (2009), a lipase manteve a conversão em éster em mais de 95%, mesmo depois de 150 usos na reação de transesterificação do óleo de soja e metanol (1:3) a 40 °C por 15 h utilizando 6 mL de álcool terc-amílico. Gharat & Rathod (2013) observaram uma redução de 6% na atividade inicial da Novozyme 435 após, 6 ciclos de utilização, sendo esta sido utilizada como catalisador da reação entre o óleo de fritura residual e dimetil carbonato em uma razão de 1:6, temperatura de 60 °C e por 24 h.

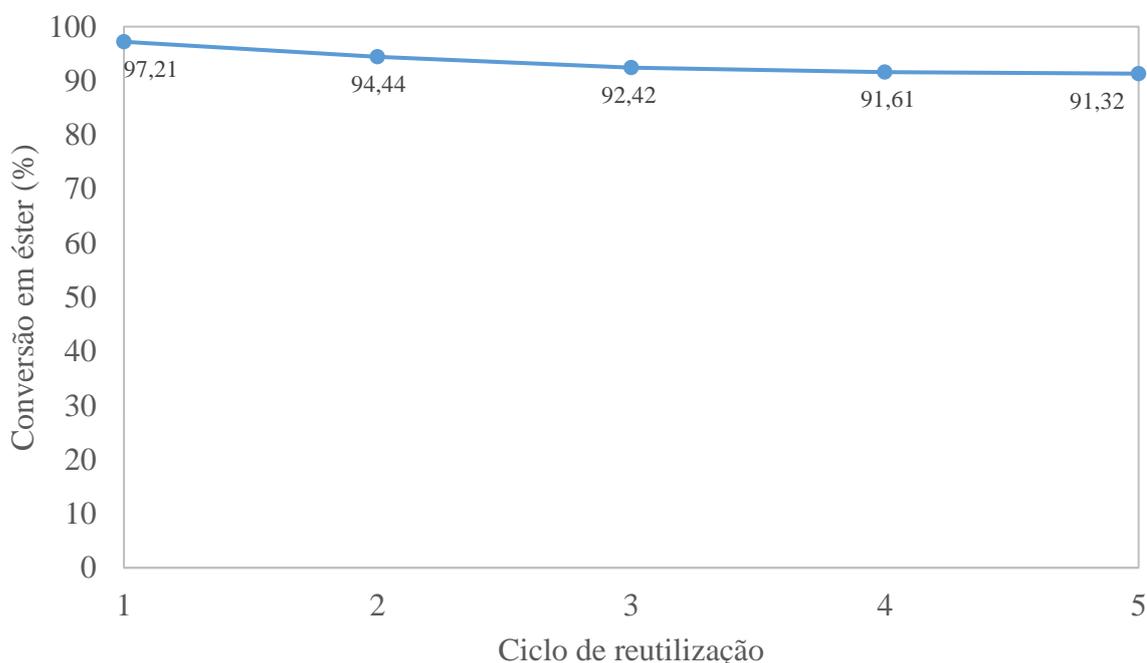


Figura 18. Estudo da reutilização da Novozyme 435 para a produção de biodiesel

Os estudos citados mostram a alta estabilidade da Novozyme 435 durante as reações de transesterificação corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Vale ressaltar que o estudo de Zheng *et al.* (2009) mostrou uma estabilidade maior da Novozyme 435 se comparados a este e os outros trabalhos citados. Porém, no trabalho de Zheng *et al.* (2009), álcool terc-amílico foi utilizado como solvente de forma a reduzir os impactos negativos causados

pelo metanol e glicerol a lipase. Apesar dos efeitos positivos causados pela adição desse solvente, isso implica na necessidade de etapas adicionais de remoção do solvente e purificação do produto levando a custos adicionais ao processo. Sendo assim, a estabilidade operacional da lipase obtida neste trabalho tem como fato importante a alta atividade residual mantida após 5 ciclos mesmo sem a adição de solventes.

5.4 Resultados da Modelagem Cinética do Processo

Os experimentos para o estudo da cinética foram realizados nas condições operacionais do experimento do planejamento que levaram a melhor conversão, usando razão molar de 3:1, 12,5% da Novozyme 435, temperatura de 40 °C e agitação de 350 rpm nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 10 h.

O principal objetivo desse estudo é obter uma expressão para a taxa de reação que possa descrever bem os dados experimentais e com isso, seja apropriada para a projeção de reatores para a produção de biodiesel. Logo, os dois modelos sugeridos foram ajustados aos dados experimentais, a fim de obter os parâmetros cinéticos. O ajuste foi realizado a partir da minimização da função objetivo, como a soma do quadrado dos erros. A partir disso, a confiabilidade destes modelos foi analisada através do coeficiente de determinação e estudo da soma do quadrado dos erros.

5.4.1 Lei das Potências

O ajuste do modelo da Lei das Potências aos dados experimentais é apresentado na Equação 27, sendo a constante da reação direta $2,1045 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ e o da reação inversa $0,0002 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$, demonstrando que a reação inversa afeta pouco a conversão da reação.

$$r = 2,1045 \times [\text{TG}] \times [\text{ROH}]^3 - 0,0002 \times [\text{BD}]^3 \times [\text{GL}] \quad (27)$$

Os dados experimentais de conversão e os dados preditos pelo modelo estão na Figura 19. É possível observar que o modelo apresentou uma boa correlação aos dados experimentais.

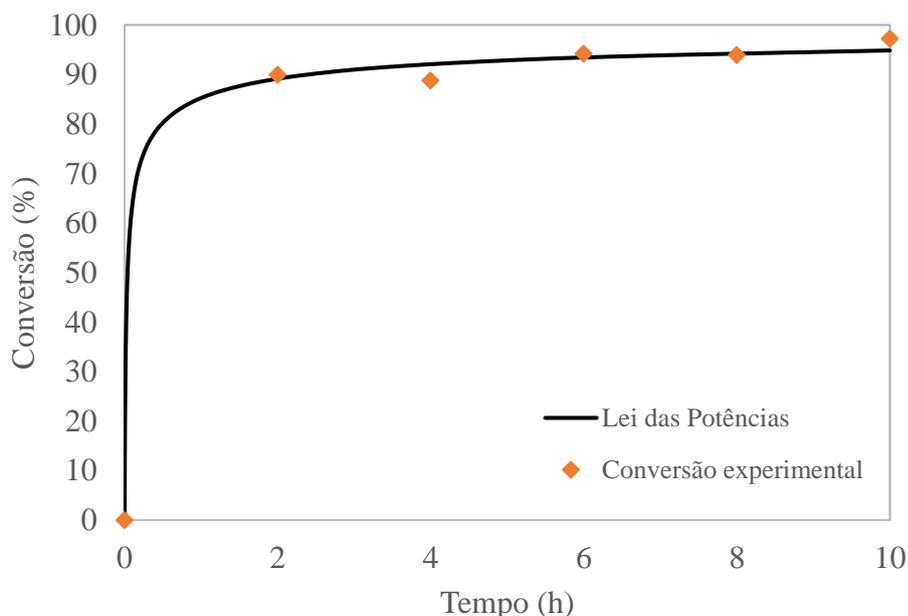


Figura 19. Conversões experimental e predita pelo modelo da Lei das Potências em função do tempo

5.4.2 Mecanismo de Eley-Rideal

A estimação dos parâmetros desse modelo cinético foi feita da mesma forma que a do modelo da Lei das Potências. Desta forma, a equação 26 é a que caracteriza a conversão e na Figura 20 observa-se o ajuste do modelo aos dados experimentais. Os parâmetros cinéticos estimados foram de $1,6040 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ para a reação superficial direta, $0,0008 \text{ mol}^{-3} \text{ L}^3 \text{ h}^{-1}$ para a reação superficial inversa, $0,1505 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para a adsorção do triglicerídeo e $7,5975 \text{ mol L}^{-1}$ para a dessorção de glicerol. Assim como no modelo da Lei das Potências, a reação direta apresentou um parâmetro de maior significância na conversão final. Já em relação as reações de adsorção e dessorção observou-se que o parâmetro relativo a dessorção é bem maior que o de adsorção, sendo a liberação do produto mais rápida.

$$r_s = \frac{1,6040 \times C_{TG} \times C_{ROH}^3 - 0,0008 \times C_{GL} \times C_{FAME}^3}{\left(1 + 0,1505 \times C_{TG} + \frac{1}{7,5975} \times C_{GL}\right)} \quad (28)$$

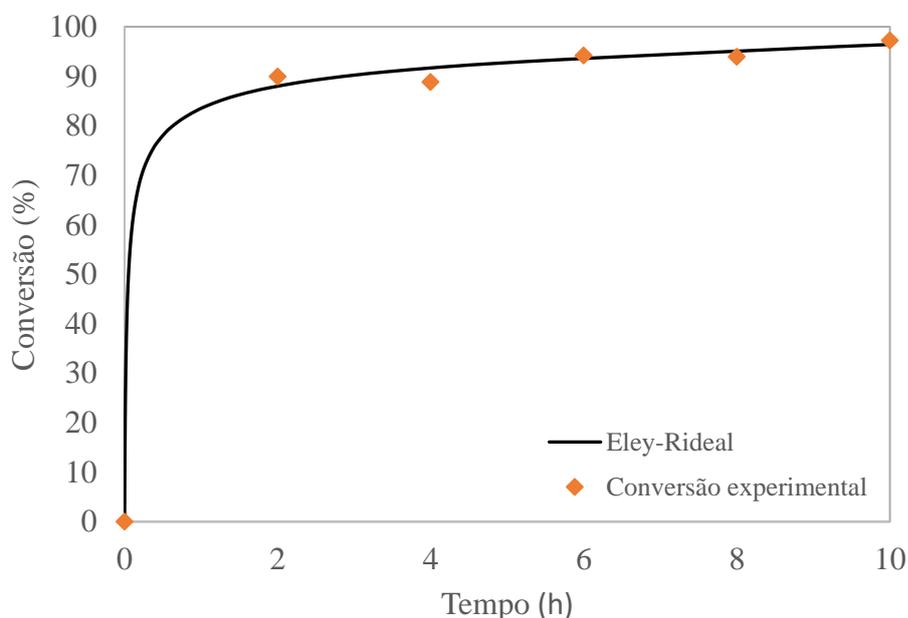


Figura 20. Conversões experimental e predita pelo modelo de Eley-Rideal em função do tempo

Como esses dois modelos ainda não tinham sido utilizados por outros trabalhos com experimentos envolvendo transesterificação enzimática, não foi possível comparar as constantes cinéticas obtidas. Porém, através dos dados obtidos, foi possível observar que ambos apresentaram bom ajuste aos dados. Uma forma de comparar esses modelos buscando o que apresentasse melhor ajuste seria através da comparação entre os coeficientes de determinação e a soma do quadrado dos erros. Então, na Tabela 12 são apresentados os dados relativo a essa análise. Foi possível observar que ambos apresentaram altos e similares coeficientes de determinação, porém quando analisado a soma dos quadrados dos erros, o modelo de Eley-Rideal foi o que apresentou a menor soma dos erros. Com isso, pode-se concluir que o modelo de Eley-Rideal é o mais indicado para descrever os dados experimentais da reação de transesterificação enzimática. Al-Sakkari *et al.* (2017) e Chantrasa *et al.* (2011), ambos utilizando catalisadores heterogêneos químicos, também compararam o modelo de Lei das

Potências com o mecanismo de Eley-Rideal, e ambos observaram que o mecanismo de Eley-Rideal descreveu melhor os dados experimentais.

Tabela 12. Soma do quadrado dos erros para os dados obtidos com os dois modelos sugeridos

Modelo	Coefficiente de determinação	Soma do quadrado dos erros
Lei das Potências	0,997	17,5
Eley-Rideal	0,998	14,5

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A produção de biodiesel a partir de catalise enzimática, utilizando a Novozyme 435, de uma mistura dos óleos de soja e de fritura, apresentou a melhor conversão de 98,05%. Essa conversão foi alcançada adicionando 12,5% de lipase no meio, utilizando uma mistura contendo 50% de óleo de fritura e com um tempo reacional de 10 h. As variáveis teor de lipase e teor de óleo de fritura na mistura foram as mais significativas no processo estudado, tendo maior influência o teor de lipase.

A partir das superfícies de resposta, observou-se que a região otimizada para a conversão de ésteres é aquela usando maiores teores de lipase, menores teores de óleo de fritura na mistura e maiores tempos de reação.

O estudo sobre a reutilização deste biocatalisador, após 5 ciclos, mostrou que a Novozyme 435 manteve boa parte de sua atividade catalítica. Foi observada apenas uma redução de 6% entre a conversão do primeiro e último ciclo, o que demonstra uma boa indicação para que esta seja utilizada em escala industrial.

Para a modelagem matemática da cinética, escolheu-se 2 modelos que ainda não tinham sido utilizados para representar a transesterificação enzimática. Contudo, os modelos baseados no mecanismo da Lei das Potências e Eley-Rideal puderam representar o processo de produção, ao se comparar as conversões experimentais e preditas.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se a aplicação da modelagem cinética utilizada verificando seu comportamento com outras lipases. Outra proposta é o estudo de uma mistura da Novozyme 435 com outra lipase que possa ter uma maior afinidade com óleos com altos teores de ácidos graxos livre, como é o caso do óleo de fritura. Também sugere-se fazer mais testes sobre a estabilidade operacional da Novozyme 435 no meio por um número maior de ciclos para, em seguida, realizar o estudo desse sistema em uma escala maior e em sistema contínuo, visto que este biocatalisador já mostrou uma boa estabilidade durante os ciclos realizados. Propõe-se ainda a simulação do processo com os modelos sugeridos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M. K.; ROSE, C.; KAMINI, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.
- ABIOVE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Pesquisa de Capacidade Instalada da Indústria de Óleos Vegetais – 2018. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br>>. Acessado em fevereiro de 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel*, v. 159, p. 52-67, 2015.
- ALMEIDA, V. F.; GARCÍA-MORENO, P. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Biodiesel production from mixtures of waste fish oil, palm oil and waste frying oil: Optimization of fuel properties. *Fuel Processing Technology*, v. 133, p. 152-160, 2015.
- AL-SAKKARI, E. G.; EL-SHELTAWY S. T.; ATTIA N. K.; MOSTAFA S. R. Kinetic study of soybean oil methanolysis using cement kiln dust as a heterogeneous catalyst for biodiesel production. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 206, p. 146-157, 2017.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.
- AMINI, Z.; ILHAM, Z.; ONG, H. C.; MAZAHERUM H.; CHEN, W.-H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, v. 141, p. 339-353, 2017.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis, 2017. Disponível em: <www.anp.gov.br/>. Acessado em novembro, 2018.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Biocombustíveis: Biodiesel. Disponível em: <www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acessado em novembro, 2018.
- ARAÚJO, C. D. M.; ANDRADE, C. C.; SILVA, E. S.; DUPAS, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 445-452, 2013.
- ARCHER, S. A.; MUROHY, R. J.; STEINBERGER-WILCKENS, R. Methodological analysis of palm oil biodiesel life cycle studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 94, p. 694-704, 2018.
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M.K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. The effects of catalysts in biodiesel production: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 14-26, 2013.

AVHAD, M.R.; MARCHETTI, J. M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50, p. 696-718, 2015.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H. J.; MUÑOZ, R.; NAVIA, R. Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109, n. 6, p. 609-614, 2010.

AZÓCAR, L.; NAVIA, R.; BEROIZ, L.; JEISON, D.; CIUDAD, G. Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. *New Biotechnology*, v. 31, n. 5, p. 422-429, 2014.

BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. *Renewable Energy*, v. 105, p. 466-472, 2017.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.

BALAMURUGAN, T.; ARUN, A.; SATHISHKUMAR, G. B. Biodiesel derived from corn oil – A fuel substitute for diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 94, p. 772-778, 2018.

BALL, D. W. *Physical Chemistry*. First Edition. Cengage Learning, 2002.

BARBOSA, D. C.; SERRA T. M.; MENEGHETTI S. M. P.; MENE M. R. Biodiesel production by ethanolysis of mixed castor and soybean oils. Grupo de Catálise e Reatividade Química. Instituto de Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2010.

BASRI, .; KASSIM, M. A.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Optimization and kinetic study on the synthesis of palm oil ester using Lipozyme TL IM. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 85-86, p. 214-219, 2013.

BEN – BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. Relatório síntese. Empresa de Pesquisa Energética (EPE), maio de 2018

BERGMANN, J.C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA; O. Y. A; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and Alternative biomass feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 21, p. 411-420, 2013.

BISEN, P. S.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; BAGHEL, R. K.; PRASAD, G. B. K. S. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*, v. 32, n.8, p. 1019-1030, 2010.

BRENDA – THE COMPREHENSIVE ENZYME INFORMATION SYSTEM. Disponível em: <<https://www.brenda-enzymes.org/>>. Acessado em dezembro de 2018.

CASTANHEIRA, E. G.; GRISOLI, R.; FREIRE, F.; PECORA, V.; COELHO, S. T. Environmental sustainability of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v. 65, p. 680-69, 2014.

CERVERÓ, J. M.; ÁLVAREZ, J. R.; LUQUE, S. Novozyme 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, v. 61, p. 131-137, 2014.

CHANTRASA, A.; PHLERNJAI, N.; GOODWIN JR., J. G. Kinetics of hydrotalcite catalyzed transesterification of tricaprylin and methanol for biodiesel synthesis. *Chemical Engineering Journal*, v. 168, n. 1, p. 333-340, 2011.

CHESTERFIELD, D. M.; ROGERS, P. L.; AL-ZAINI, E. O.; ADESINA, A. A. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilized lipase. *Chemical Engineering Journal*, v. 207-208, p. 701-710, 2012.

CHHETRI, A. B.; WATTS, K. C.; ISLAM, M. R. Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production. *Energies*, v. 1, p. 3-18, 2008. DOI: 10.3390/en1010003

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, v. 119, p. 497-520, 2014.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Boletim de Grãos – Maio 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acessado em dezembro de 2018.

CORRO, G.; SÁNCHEZ, N.; PAL, U.; BAÑUELOS, F. Biodiesel production from waste frying oil using waste animal bone and solar heat. *Waste Management*, v. 47, p. 105-113, 2016.

DANTAS, R. A. Análise técnica e econômica da produção de biodiesel utilizando óleo de fritura residual em unidade piloto. Dissertação – Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, v. 50, n. 1, p. 14-34, 2009.

EIA – U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. *International Energy Outlook*, 2017.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Análise de conjuntura dos biocombustíveis, 2017

ESONYE, C.; ONUKWULI, O. D.; OFOEFULE, A. U. Chemical kinetics of a two-step transesterification of dyacrodes edulis seed oil using acid-alkali catalyst. *Chemical Engineering Research and Design*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.03.010>

- FADHIL, A. B.; AL-TIKRITY, E. T. B.; ALBADREE, M. A. Biodiesel production from mixed non-edible oils, castor seed oil and waste fish oil. *Fuel*, v. 210, p. 721-728, 2017.
- FILHO, E. H. C. Estudo da produção enzimática de biodiesel utilizando óleo residual e etanol. Dissertação – Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- FIRDAUS, M. Y.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. N. Development of kinetic model for biodiesel production using liquid lipase as a biocatalyst, esterification step. *Biochemical Engineering Journal*, v. 105, p. 52-61, 2016.
- GARCILASSO, V. P. Análise entre processos e matérias-primas para a produção de biodiesel. Tese – Doutorado em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- GHARAT, N.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 88, p. 36-40, 2013.
- GO, A.-R.; LEE, Y.; KIM, Y. H.; PARK, S.; CHOI, J.; LEE, J.; HAN, S. O.; KIM, S. W.; PARK, C. Enzymatic coproduction of biodiesel and glycerol carbonate from soybean oil in solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 53, n. 3, p. 154-158, 2013.
- GOFFERJÉ, G.; STÄBLER, A.; HERFELLNER, T.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; FLÖTER, E. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude *Jatropha* oil by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 107, p. 1-7, 2014.
- GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, v. 39, n.1, p. 10-16, 2012.
- GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, v. 33, n. 11, p. 1646-1653, 2008.
- GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447-1464, 2015.
- GUPTA, J.; AGARWAL, M.; DALAI, A. K. Optimization of biodiesel production from mixture of edible and nonedible vegetable oils. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 8, p. 112-120, 2016.
- HAGEN, J. *Industrial Catalysis: A Practical Approach*. Second Edition. Weinheim, Germany, Wiley-Vich, 2006.
- HAIGH, K. F.; ABIDIN, S. Z.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; SAHA, B. Comparison of Novozyme 435 and Purolite D5081 as heterogeneous catalysts for the pretreatment of used cooking oil for biodiesel production. *Fuel*, v. 111, p. 186-193, 2013.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A.H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 12, p. 1436-1439, 2008.

HARRIS, P. V.; XU, F.; KREEL, N. E.; KANG, C.; FUKUYAMA, S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 19, p. 162-170, 2014.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergent: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n.31, p. 4836-4844, 2010.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.

HOSSEINI, S.; MORADI, G. R.; BAHRAMI, K. Synthesis of a novel stabilized basic ionic liquid through immobilization on boehmite nanoparticles: A robust nanocatalys for biodiesel production from soybean oil. *Renewable Energy*, v. 138, p. 70-78, 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estimativas de população. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html?=&t=resultados>. Acessado em novembro, 2018b.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9050-pesquisa-de-orcamentos-familiares.html?=&t=destaques>. Acessado em novembro, 2018a.

ILGEN, O; AKIN, A. N.. Determination of reaction orders for the transesterification of canola oil with methanol by using KOH/MgO as heterogeneous catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 126, p. 342-346, 2012.

JUNIOR, E. G. S.; SIMIONATTO, E.; PAREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; ZÁRATE, N. A. H.; VIEIRA, M. C. Potential of Virginia-type peanut (*Arachis hypogae L.*) as feedstock for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, v. 89, p. 448-454, 2016.

KARMAKAR, A.; KARMAKAR, S.; MUKHERJEE, S. Properties of various plants and animals feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 19, p. 7201-7210, 2010.

KEERA, S. T.; EL SABAGH, S. M.; TAMAN, A. R. Castor oil biodiesel production and optimization. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 27, p. 979-984, 2018.

KNOTHE, G.; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. *Process in Energy and Combustion Science*, v. 58, p. 36-59, 2017.

KORKUT, I.; BAYRAMOGLU, M. Selection of catalyst and reaction conditions for ultrasound assisted biodiesel production from canola oil. *Renewable Energy*, v. 116, p. 543-551, 2018.

KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; WENZEL, B. M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. *Acta Scientiarum Technology*, v. 29, n. 1, 2017. DOI: 10.4025/actascitechnol.v29i1.79

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMEND, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 4, p. 500-518, 2010.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LIN, J.-J.; CHEN, Y.-W. Production of biodiesel by transesterification of *Jatropha* oil with microwave heating. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 75, p. 43-50, 2017.

LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*, v. 88, n. 4, p. 1020-1031, 2011.

LIU, Y.; YAN, Y.; HU, F.; YAO, A.; WANG, Z.; WEI, F. Transesterification for biodiesel production catalyzed by combined lipases: optimization and kinetics. *American Institute of Chemical Engineers Journals*, v. 56, n. 6, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/aic.12090>

MACÊDO, L. S.; SILVA, J. G.; MELO, S. A. B. V.; TORRES, E. A. Produção de biodiesel a partir de misturas de óleo de mamona e óleo de babaçu com metanol via catálise alcalina. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. Uberlândia, Minas Gerais, 2009.

MACEIRAS, R.; VEJA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MÁRQUEZ, M. C. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. *Fuel*, v. 88, n. 11, p. 2130-2134, 2009.

MAGALHÃES, S. P. Estudo de modelos cinéticos para a reação de transesterificação enzimática de óleos vegetais. *Dissertação – Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MAHMUDUL, H. M.; HAGOS, F. Y.; MAMAT, R.; ADAM, A.A.; ISHAK, W. F. W.; ALENEZI, R. Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 72, p. 497-509, 2017.

MANOEL, E. A. Obtenção de biocatalisador para resolução cinética de derivados de mio-inositol. *Tese – Doutorado em Ciências*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

MARTÍNEZ, G.; SÁNCHEZ, N.; ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F. Fuel properties of biodiesel from vegetable oils and oil mixtures. Influence of methyl esters distribution. *Biomass & Bioenergy*, v. 63, p. 22-32, 2014.

- MAZANOV, S. V.; GABITOVA, A. R.; USMANOV, R. A.; GUMEROV, F. M.; LABIDI, S.; AMAR, M. B.; PASSARELLO J.-P.; KANAIEV, A.; VOLLE, F.; LE NEINDRE, B. Continuous production of biodiesel from rapeseed oil by ultrasonic assist transesterification in supercritical ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 118, p. 107-118, 2016
- MENDONÇA, D. R.; ANDRADE, H. M. C.; GUIMARÃES, P. R. B.; VIANNA, R. F.; MENEGHETTI, S. M. P.; PONTES, L. A. M.; TEIXEIRA, L. S. G. Application of full factorial design and Doehlert matrix for the optimization of beef tallow methanolysis via homogeneous catalysis. *Fuel Processing Technology*, v. 92, n. 3, p. 342-348, 2011.
- MERCURI, E.; MANCA, D.; ABDERAZAG, O.; PATEL, R.; MUJTABA, I. M. Biodiesel from sunflower oil: Development of process model via lab scale experiment and optimization. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 38, p. 1713-1718, 2016.
- MESSIAS, J. M.; da COSTA, B. Z.; de LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipase microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011. DOI: 10.5433/1679-0375.2011v32n2p213
- MILLI, B. B.; GRIPA, D. C.; SIMONELLI, G.; MARTINS, M. O. D. Produção de biodiesel a partir da mistura de sebo bovino com óleo vegetal. *Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v. 7, n. 12, p. 26, 2011.
- MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. *Resenha energética brasileira*, 2018.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MORENO-PÉREZ, O. M.; MARCOSSI, G. P. C.; ORTIZ-MIRANDA, D. Taking stock of the evolution of the biodiesel industry in Brazil: Business concentration and structural traits. *Energy Policy*, v. 110, p. 525-533, 2017.
- MOURA, R. R.; CALLEGARO, F. J. P.; GRANJÃO, V. de F.; DIAS, A. N.; PRIMEL, E. G.; D'OCA, M. G. M. Produção de ésteres metílicos da mistura mamona:soja pro transesterificação-esterificação e determinação dos teores de glicerol e glicerídeos. *Anais do 5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleo, Gorduras e Biodiesel*, v. 2, p. 1017-1018, 2012.
- NGUYEN, H. C.; LIANG, S.-H.; DOAN, T. T.; SU, C.-H.; YANG, P.-C. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from black soldier fly (*Hermetica illucens*): Optimization by using response surface methodology. *Energy Conversion and Management*, v. 145, p. 335-342, 2017.
- NIE, K.; WANG, M.; ZHANG, X. ; HU, W.; LIU, L.; WANG, F.; DENG, L.; TAN, T. Additives improve the enzymatic synthesis of biodiesel from waste oil in a solvent free system. *Fuel*, v. 146, p. 13-19, 2015.
- OLIVEIRA, F. C.; COELHO, S. T. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 75, p. 168-179, 2017.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Current Opinion in Food Science*, v. 7, p. 64-72, 2016.

PIGHINELLI, A. L. M. T. Extração mecânica de óleos de amendoim e de girassol para produção de biodiesel via catálise básica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1077-1082, 2003.

PONTE, F. A. F.; VASQUES, R. B.; ROCHA, N. C.; MALVEIRA, J. Q.; ALBUQUERQUE, M. C. G. Produção de biodiesel a partir de misturas de óleos vegetais. *Anais do 5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleo, Gorduras e Biodiesel*, v. 2, p. 929-930, 2012.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFLUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A.Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015.

QIU, F.; LI Y.; YANG, D.; LI, X.; SUN, P. Biodiesel production from mixed soybean oil and rapeseed oil. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, China, 2011.

RAMPIN, M. A. Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir de óleos de mamona e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM). Dissertação – Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

RAOUFI, Z.; GARGARI, S. L. M. Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface. *Biochemical Engineering Journal*, v. 140, p. 1-8, 2018.

RAZACK, S. A.; DURAIARASAN, S. Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme. *Waste Management*, v. 47, p. 98-104, 2016.

RISSO, R.; FERRAZ, P.; MEIRELES, S.; FONSECA, I.; VITAL, J. Highly active CaO catalysts from waste shells of egg, oyster and clam for biodiesel production. *Applied Catalysis A: General*, v. 567, p. 56-64, 2018.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos, Campinas, SP, Cárita Editora, 2nd ed., 2009.

- RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. Tese – Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: a simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010.
- RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reaction of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, n. 10, p. 925-930, 2008.
- ROSENTHAL, K.; LÜTZ, S. Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 11, p. 58-64, 2018.
- ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of ethyl esters (biodiesel) produced. *Applied Catalysis A: General*, v. 392, n. 1-2, p. 136-142, 2011.
- SABESP – Companhia de saneamento básico do estado de São Paulo. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=82>>. Acessado em janeiro de 2019.
- SANTIN, C. M. T. Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Tese – Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.
- SCHOMBURG, I.; JESKE, L.; ULBRICH, M.; PLACZEK, S.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D. The BRENDA enzyme information System – From database to an expert system. *Journal of Biotechnology*, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.020>
- SCHRÖDER, O.; BÜNGER, J.; MUNACK, A.; KNOTHE, G.; KRAHL, J. Exhaust emissions and mutagenic effects of diesel fuel, biodiesel and biodiesel blends. *Fuel*, v. 103, p. 414-420, 2013.
- SEEG – Sistema de Estimativas de Emissões de Gases de Efeito Estufa. Coleção 5 – Observatório do Clima, 26 de outubro de 2017.
- SHANKAR, A. A.; PENTAPATI, P. R.; PRASAD, R. K. Biodiesel synthesis from cottonseed oil using homogeneous alkali catalyst and using heterogeneous multi walled carbon nanotubes: Characterization and blending studies. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 26, p. 125-133, 2017.
- SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, v. 87, n. 12, p. 2355-2373, 2008.

SHU, Q.; ZOU, W.; HE, J.; LESMANA, H.; ZHANG, C.; ZOU, L.; WANG, Y. Preparation of the F-SO₄²⁻/MWCNTs catalyst and kinetic studies of biodiesel production via esterification reaction of oleic acid and methanol. *Renewable Energy*, 2018. DOI: 10.1016/j.renene.2018.12.067

SILVA, W. C. Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora de glicerol formado como subproduto. Dissertação – Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, 2013.

SIMAS, A. S. L. Produção de Biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, comparando transesterificação básica e enzimática. Dissertação – Mestrado em Bioenergia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

SONARE, N. R.; RATHOD, V. K. Transesterification of used sunflower oil using immobilized enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, n. 1-2, p. 142-147, 2010.

SOUZA, L. T. A.; MENDES, A. A.; de CASTRO, H. F. Selection of lipases for the synthesis of biodiesel from *Jatropha* oil and the potential of microwave irradiation to enhance the reaction rate. *BioMed Research International*, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1404567>

TACIAS-PASCACIO, V. G.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, M.; YATES, M.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel*, v. 200, p. 1-10, 2017.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy*, v. 104, p. 683-710, 2013.

TALUKDER, M.M. R.; WU, J. C.; LAU, S. K.; CUI, L. C.; SHIMIN, G.; LIM, A. Comparison of Novozyme 435 and Amberlyst 15 as heterogeneous catalyst for production of biodiesel from palm fatty acid distillate. *Energy & Fuels*, v. 23, n. 1, p. 1-4, 2009.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TAVARES, D. C.; MACHADO JÚNIOR, H. F.; SANTOS, L. O.; MENDES, M. F. Optimization of biodiesel production from frying oil and bovine tallow. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, v. 11, n.2, p. 63-78, 2017.

THOAI, D. N.; TONGURAI, C.; PRASERTSIT, K.; KUMAR, A. Review on biodiesel production by two-step catalytic conversion. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 18, 2019.

VAN DE STEEN, E.; CLERCQ, J.; THYBAUT, J. W. Adsorption and reaction in the transesterification of ethyl acetate with methanol on Lewatit K1221. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 359, p. 57-68, 2012.

VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; FERRÃO-GONZALES, A. D.; MOREAU, V. H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 20, p. 9653-9658, 2011.

VERMA, P.; SHARMA, M. P. Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 62, p. 1063-1071, 2016.

WANG, M.; NIE, K.; YUN, F.; CAO, H.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Biodiesel with low temperature properties: Enzymatic synthesis of fusel alcohol fatty acid ester in a solvent free system. *Renewable Energy*, v. 83, p. 1020-1025, 2015.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHENG, Y.; QUAN, J.; NING, X.; ZHU, L. M.; JIANG, B.; HE, Z. Y. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 41-46, 2009.

ANEXO 1 – Cromatogramas gasosos dos óleos de soja e de fritura

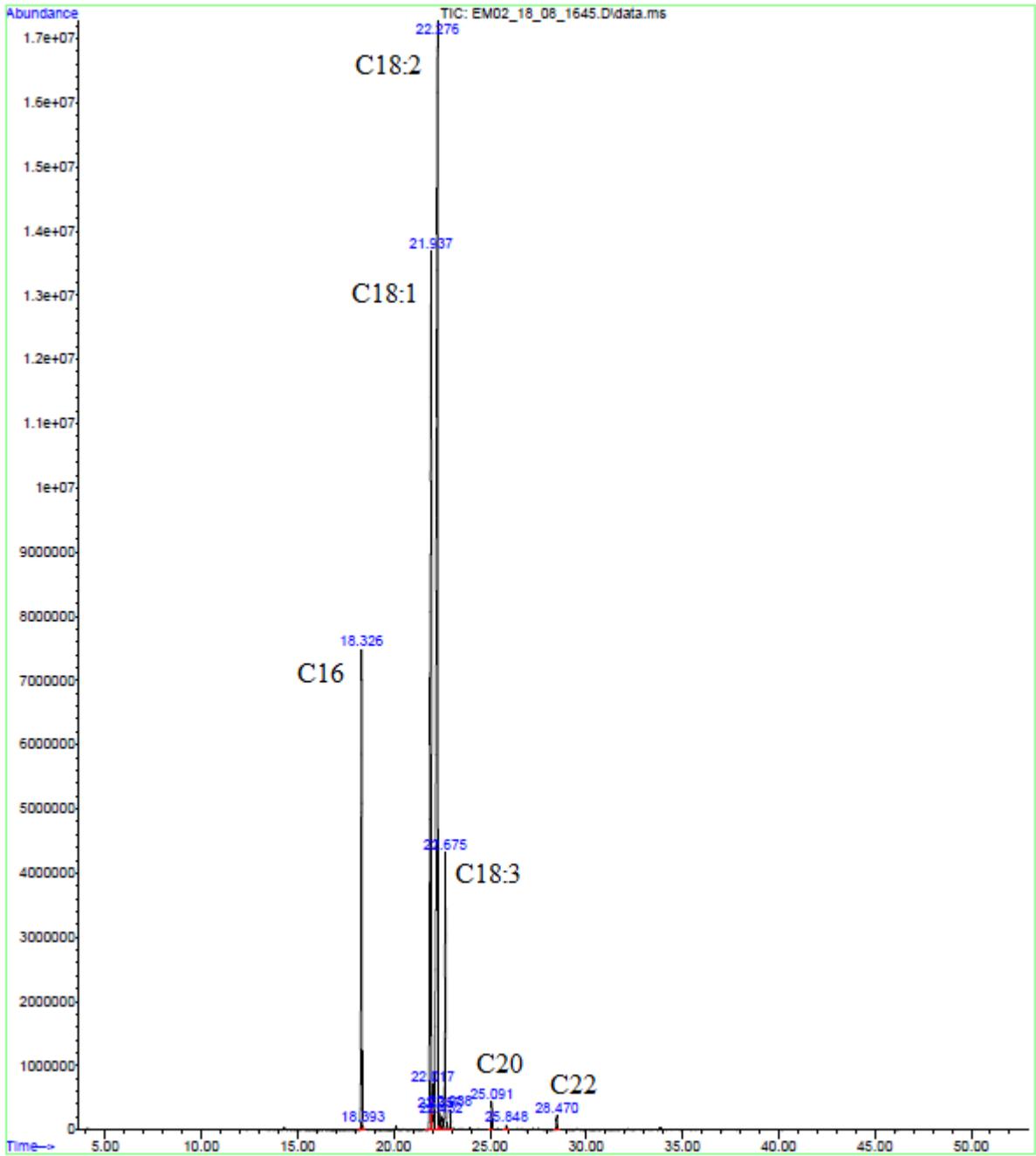


Figura A1. Cromatograma gasoso do óleo de soja comercial

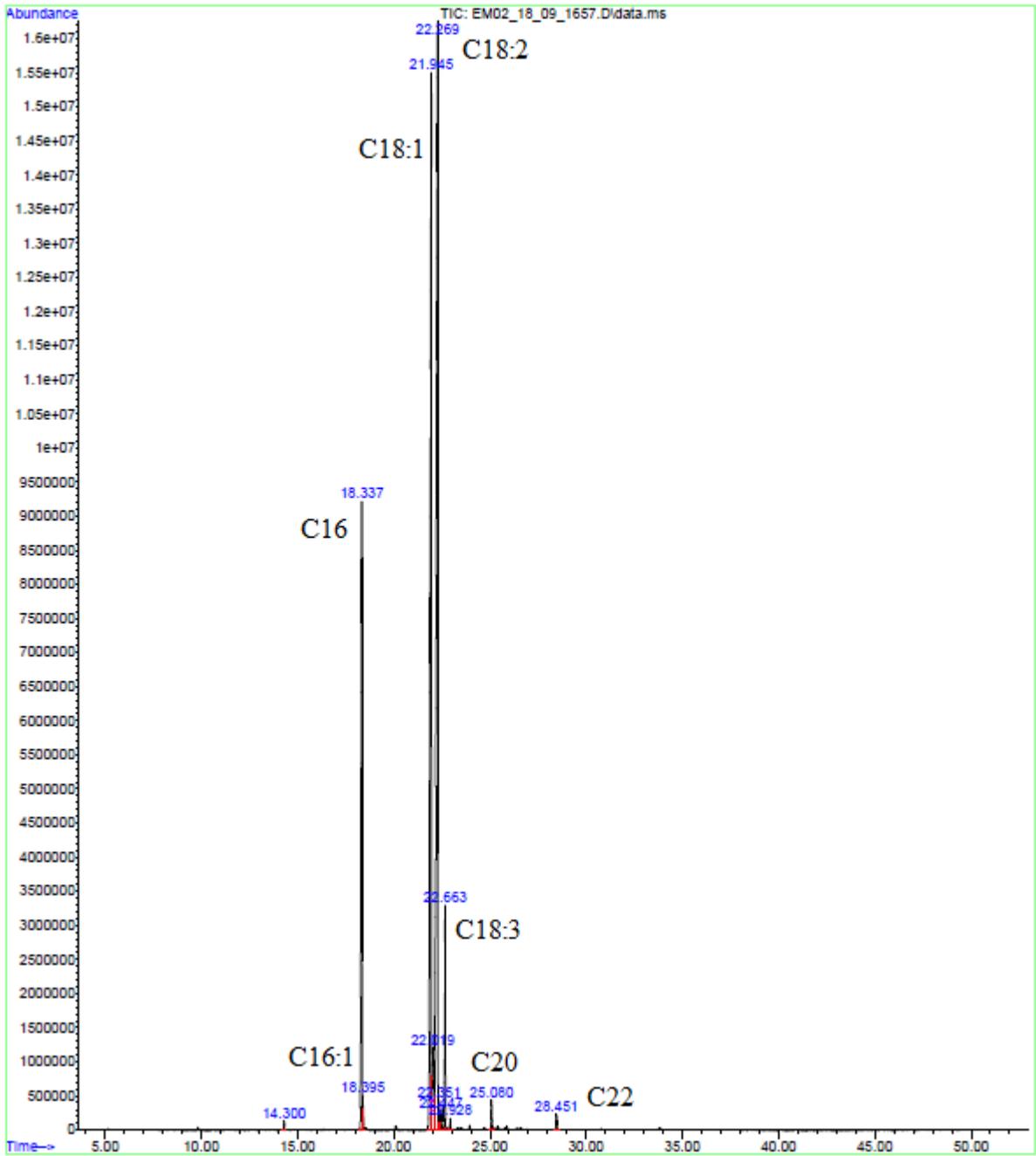


Figura A2. Cromatograma gasoso do óleo de fritura

ANEXO 2 – Cromatograma gasoso da amostra que apresentou a maior conversão

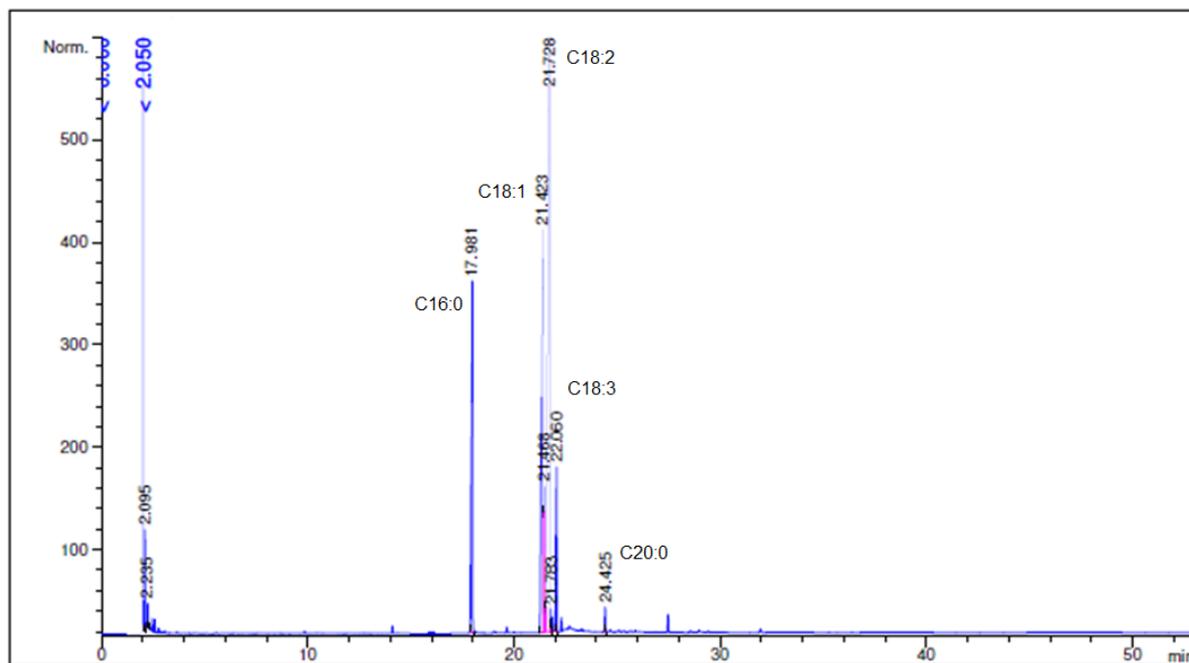


Figura B1. Cromatograma gasoso do produto obtido no ensaio 14