



Eclética Química

ISSN: 0100-4670

atadorno@iq.unesp.br

Universidade Estadual Paulista Júlio de  
Mesquita Filho  
Brasil

Souza, Vinícius H.; V. Pacheco, Sabrina M.; Cruz Júnior, Américo; Furigo Júnior, Agenor  
ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO  
RESIDUAL

Eclética Química, vol. 39, 2014, pp. 200-2015  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Araraquara, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42955127018>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

### ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO RESIDUAL

Vinícius H. Souza<sup>a</sup>, Sabrina M. V. Pacheco<sup>b\*</sup>, Américo Cruz Júnior<sup>c</sup> e Agenor Furigo Júnior<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Instituto Federal de Santa Catarina, 88020-300 Florianópolis – SC, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Ensino, Instituto Federal de Santa Catarina, 88495-000 Garopaba – SC, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus

**Resumo:** Neste trabalho, a viabilidade da produção de biodiesel foi estudada utilizando como matéria-prima óleo de fritura residual. Os ensaios foram realizados com enzimas: Novozym 435, Lipozym TL IM e RM Lipozym IM em diferentes condições de temperatura, razão molar (etanol / óleo) e percentagem do catalisador. Os resultados mostraram que a Novozym 435 foi mais eficiente para a produção de biodiesel a uma temperatura de 47,5 °C, numa proporção molar de 6:1 e a percentagem de enzima de 5,5%. A caracterização do biodiesel mostra que ele apresentou a maioria dos parâmetros do regulamento da ANP para a sua utilização e comercialização.

**Palavras-chave:** biodiesel; lipases; óleo residual.

**Abstract:** In this work the feasibility of biodiesel production was studied using as raw material waste frying oil. Assays were performed with enzymes: Novozym 435, Lipozym TL IM and RM IM Lipozym in different conditions of temperature, molar ratio (ethanol / oil) and percentage of the catalyst. The results showed that Novozym 435 was most efficient for production of biodiesel at a temperature of 47.5 °C, a molar ratio of 6:1 and the percentage of enzyme of 5.5%. The characterization of biodiesel show that he presented most of the parameters of the Regulation of ANP for their use and marketing.

**Keywords:** biodiesel; lipases; waste oil.

### INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a crise planetária ambiental associada ao uso de combustíveis fósseis, impulsionou a pesquisa por novas fontes de energia. Uma interessante alternativa para a substituição dos combustíveis fósseis são os biocombustíveis. O termo biocombustível refere-se ao combustível líquido ou gasoso que é predominantemente produzido a partir de biomassa. Dessa forma, o biodiesel é um

biocombustível constituído de uma mistura de ésteres de ácidos graxos que podem ser obtidos de óleos vegetais ou gorduras animais. A obtenção deste biocombustível pode ser realizada através de uma reação de transesterificação ou de uma reação de esterificação. Das reações citadas, a mais utilizada para a produção de biodiesel é a reação de transesterificação, pois fornece um coproduto que possui diversas aplicações em vários segmentos industriais: o glicerol.<sup>1</sup>

Nas reações de transesterificação, a produção de biodiesel forma ésteres alquílicos e glicerol, sendo que a camada deste poliálcool, mais densa que os ésteres, se deposita no fundo do recipiente da reação. O processo se baseia na reação estequiométrica do álcool glicerol com álcool em presença de um catalisador.<sup>2</sup> As reações de transesterificação podem ser conduzidas através do uso de um catalisador ácido ou básico, catalisador enzimático ou fluidos supercríticos.<sup>1</sup> Embora a transesterificação usando catalisadores álcalis forneça elevadas taxas de conversão de triglicéridos para os seus correspondentes ésteres em curtos períodos de tempo, a reação possui inúmeros inconvenientes: o elevado custo para a recuperação do glicerol; a necessidade do catalisador ser removido do produto; a produção de resíduos alcalinos que precisam de tratamento; o fato dos ácidos graxos livres e a água prejudicarem a reação. Tais inconvenientes conduziram as pesquisas por novos catalisadores. Nesse contexto, a produção de biodiesel catalisada pelas enzimas lipases vem recebendo atenção especial por eliminar ou reduzir os problemas citados acima, tornando-se uma promissora rota alternativa às tradicionais rotas químicas.<sup>3,4</sup>

As lipases (E.C. 3.1.1.3) constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas, pois apresentam a capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado por sua capacidade de utilização de uma ampla faixa de substratos, sua estabilidade frente a diferentes temperaturas, pH(s), com solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantioselectividade.<sup>5</sup> Atualmente, as lipases são largamente utilizadas no processamento de óleos e gorduras, detergentes, formulação de desengraxantes, processamento de alimentos, síntese de produtos para a química fina e fármacos, manufatura de papel, produção de cosméticos e na degradação de efluentes gordurosos. Apenas na área de detergentes, aproximadamente 1000 toneladas de lipases foram comercializadas em 2004.<sup>6</sup>

No que tange a aplicação das lipase para a produção de biodiesel, é possível dizer que a aquisição de elevados rendimentos deste biocombustível podem ser atingidos com o uso da catálise enzimática. Entretanto, os rendimentos estão relacionados a vários fatores, tais como o tipo do álcool utilizado, a fonte lipídica, a razão molar entre a fonte lipídica e o álcool, a temperatura, o tipo de solvente orgânico (se utilizado), a quantidade de água e a fonte de lipase.<sup>6</sup>

Um fator importante a ser considerado para a comercialização do biodiesel é o seu custo. O biodiesel possuía um custo aproximado de US\$ 0,5 por litro, enquanto o diesel de petróleo custava aproximadamente US\$ 0,35 por litro.<sup>7</sup> De acordo com os autores, o alto custo do biodiesel é vinculado principalmente a natureza da fonte lipídica. O uso de óleos vegetais de alta qualidade geram um biodiesel com interessantes

características energéticas, porém, com elevado custo. Para reduzir os custos do biodiesel novos métodos e materiais de partida vem sendo estudados, tais como óleos vegetais não comestíveis.<sup>8</sup> Dessa forma, o presente estudo visa analisar a produção de biodiesel a partir de óleo de soja usado em frituras com três catalisadores enzimáticos comerciais.

## PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O óleo vegetal usado em frituras foi coletado de diversos restaurantes do município de Garopaba SC. O óleo adquirido foi filtrado em papel de filtro qualitativo Whatman, n. 1 para remoção de sólidos grosseiros e finos. A amostra resultante foi submetida a caracterização físico-química com base nos seguintes parâmetros: Umidade e voláteis (Método: IAL, pg. 602); Índice de Acidez (Método: IAL pg. 591); Índice de Iodo (Método: IAL, pg. 597); Índice de Peróxido (Método: IAL, pg. 593); Umidade e voláteis (Método: IAL, pg. 602) e Perfil de Ácidos Graxos (Método: AOAC n. 996.06 e AOCS Ce IF 96).<sup>9,10</sup> As análises foram realizadas no Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

A partir dos resultados de caracterização físico-química foi possível realizar os cálculos estequiométricos para a realização das reações de transesterificação utilizando diferentes razões molares entre etanol e óleo residual que variaram de 3:1 a 9:1. As reações foram conduzidas com o uso de etanol anidro 99,5% (Merck) e os catalisadores enzimáticos adquiridos da Novozymes®: Novozym 435 (*Aspergillus niger*), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) e Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*).

As reações de transesterificação foram executadas seguindo um planejamento fatorial completo de 12 ensaios, os quais foram incluídos 4 pontos centrais. Os pontos centrais promoveram graus de liberdade adicionais para a estimativa do erro, que por sua vez, aumenta o poder da análise quando os efeitos são testados. Foram avaliados os seguintes fatores: temperatura, razão molar etanol/óleo e percentuais de biocatalisador. Os níveis utilizados para cada variável estão descritos na Tabela 1. As análises foram realizadas com o uso do software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., USA).

TABELA 1

As reações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 50 mL em shaker orbital com agitação de 200 rpm por 24 h. Aliquotas de 1 mL foram retiradas dos frascos após 12, 24 e 48 h de reação para a análise de ésteres obtidos. A análise dos ésteres foi realizada através de um cromatógrafo à gás com espectrofotômetro de massas (CG-EM) da marca Shimadzu, modelo 2010, coluna – restek - modelo RTX-5MS. As análises foram realizadas utilizando-se uma rampa de aquecimento iniciada em 100 °C, com aumento

de 8 °C por minuto até 300 °C, para a obtenção de uma isoterma de 10 minutos. A temperatura do injetor foi de 280 °C com interface e fonte de íons a 300 °C, divisor de fluxo (split) 1/50. A injeção de 1 µL de amostra foi feita de modo manual e o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio. Foram utilizados os seguintes padrões cromatográficos: laurato de etila, meristato de etila 99%, oleato de etila 98%, adquiridos da ALDRICH e palmitato de etila > 99%, estearato de etila 99%, linoleato de etila > 99% adquiridos da SIGMA. A identificação dos picos foi realizada através da comparação com tempo de retenção dos padrões citados. A quantificação dos picos foi realizada com base nas curvas de calibração obtidas com os padrões citados utilizando-se concentrações que variaram de 0,5 a 5 mg/mL.

A obtenção da concentração de cada composto foi realizada por meio dos cromatogramas, que permitiram calcular a conversão da reação de acordo com a equação química: 1 mol de óleo + 3 moles de etanol → 3 moles de ésteres + 1 mol de glicerol. Para a obtenção do valor da máxima massa de ésteres que pode ser obtida, foi utilizada a equação 1.

$$(1) \quad ne = 3 * no$$

Onde ne é o valor relacionado ao máximo número de moles de ésteres que podem ser obtidos na reação (mol/L) e no é o número de moles do óleo (mol/L).

Para a obtenção da conversão da reação em porcentagem foi utilizada a equação 1.

$$(2) \quad X = \frac{C}{Me}$$

Onde X é a conversão da reação em etil ésteres; C é a massa em etil ésteres (g), Me é a massa máxima de ésteres que pode ser obtida na reação entre o óleo e o etanol (g).

As amostras de biodiesel obtidas foram caracterizadas físico-quimicamente conforme a Resolução nº4 da ANP de 22/02/2010 na Bioagri Laboratórios Ltda – Piracicaba SP.<sup>11</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização do óleo residual usado em frituras

Para a utilização do óleo residual como material de partida para a produção de biodiesel tornou-se interessante realizar a determinação de parâmetros físico-químicas que influenciam diretamente o rendimento das reações de transesterificação. Dessa forma, os resultados para a caracterização do óleo vegetal usado em frituras encontram-se ilustrados na Tabela 2.

TABELA 2

Os óleos vegetais usados em processos de fritura sofrem degradação por reações de natureza hidrolítica e oxidativas. As reações oxidativas são aceleradas pelas elevadas temperaturas do processo de fritura e caracterizam-se por serem as reações que mais influenciam nas características físico-químicas do óleo residual. Dessa forma, os valores obtidos para os parâmetros índice de peróxido e índice de acidez são mais elevados se comparados a um óleo de soja refinado. Por outro lado, o valor do índice de iodo é menor se comparado à um óleo refinado devido ao fato de possuir menor número de insaturações. Os resultados apresentados na Tabela 2 corroboram aos resultados de caracterização de óleos de soja residuais publicados por outros autores.<sup>8,14,15</sup> É interessante comentar que se o objetivo deste trabalho fosse utilizar um catalisador básico, possivelmente a reação para a produção de ésteres seria dificultada devido a umidade e conteúdo de ácidos graxos livres do material de partida. As reações que ocorrem com catalisadores alcalinos precisam ser processadas em materiais isentos de água devido às possíveis reações de saponificação. O sabão formado consome o catalisador e reduz a eficiência catalítica bem como causa um aumento na viscosidade, a formação de géis e a dificuldade de separar o glicerol. Alguns autores sugerem que o conteúdo de ácido graxos livres seja menor que 0,5%, enquanto outros sugerem que a matéria-prima usada seja totalmente isenta de ácidos graxos livres e umidade.<sup>16</sup>

### **Produção de biodiesel**

As condições experimentais e os resultados para a obtenção de ésteres etílicos estão ilustrados na Tabela 2. Os efeitos estimados para cada variável, bem como as interações entre elas foram determinadas para um tempo de reação de 48 h. Após este período de tempo de reação, não houve aumento significativo na produção de ésteres. O perfil de produção de ésteres etílicos obtidos para os três biocatalisadores pode ser visualizado na Figura 1.

FIGURA 1

Foi verificado que os fatores isoladamente influenciam de forma significativa na resposta adotando-se um nível de significância de 0,05 (Tabela 3).

TABELA 3

Neste caso, a variável que apresentou o maior efeito sobre o fator resposta foi o percentual de enzima. Além disso, também foi possível verificar a existência de uma curvatura na região obtida e que a mesma é muito significativa para o nível de significância usado.

As faixas de temperaturas estudadas foram adotadas baseando-se em trabalhos publicados realizados por outros autores, conforme ilustrado na Tabela 4, e de forma que não ultrapassasse o ponto de ebulição do tipo de álcool utilizado nas reações de transesterificação.

TABELA 4

Através dos resultados foi observado que, com o aumento de temperatura até o ponto central, houve aumento na produção de ésteres. Por outro lado, quando a reação foi conduzida em temperaturas de 60 °C houve queda na produção de ésteres. Dessa forma, é possível dizer que existe um efeito linear da temperatura sobre o fator resposta, sendo que este comportamento pode ser explicado pelo fato da enzima começar a sofrer desnaturação em temperaturas acima de 60 °C.

As variações promovidas sobre o fator resposta (percentual de conversão em ésteres) podem ser ilustradas nos diagramas de contorno da Figura 2, onde também é possível observar que a razão molar etanol/óleo também possui influencia sobre a produção de ésteres.

FIGURA 2

O aumento concomitante da razão molar e da temperatura influenciam de forma negativa o fator resposta. Esse comportamento pode ser explicado devido ao fato da estabilidade térmica das lipases diminuir com o aumento da quantidade de solventes orgânicos. Dessa forma, solventes hidrofílicos, como por exemplo, o etanol, tendem a desnaturar as enzimas reduzindo sua estabilidade térmica. Possivelmente, a presença de etanol em excesso no meio reacional promove desnaturação enzimática com o aumento da temperatura.<sup>17</sup>

Avaliando-se individualmente o efeito da razão molar foi possível verificar que seu aumento até valores próximos do ponto central, promoveu aumento da produção de ésteres. Isso ocorre, pois na catálise enzimática em meios não aquosos, a natureza do solvente influencia na estabilidade e atividade das enzimas de forma significativa.<sup>17</sup> Solventes hidrofóbicos promovem um efeito diferente sobre a enzima se comparados aos solventes hidrofílicos.<sup>18</sup> Para estes autores, os solventes hidrofóbicos não prejudicam a atividade e podem até promover ativação enzimática, pois os mesmos não removem moléculas de água da superfície da enzima e podem interagir com a lipase mantendo a lid (tampa hidrofóbica) aberta. Por outro lado, esse argumento não pode ser utilizado em todos os casos, pois, em algumas enzimas a lid não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial.<sup>19</sup> Por outro lado, a lid não encontra-se presente em diversos tipos de lipases, sendo preciso atentar-se a quantidade de água na reação.<sup>17</sup>

A variável que promoveu maior efeito sobre o fator resposta foi o percentual de enzima. Dessa forma, com o aumento do percentual de enzima de 0,5 para 5,5, houve aumento significativo da produção de ésteres. A influencia do percentual de enzima sobre as reações de transesterificação foi estudada, utilizando ácido palmítico e álcool isopropílico e Novozym 435. Os resultados ilustraram que a produção de ésteres aumentam com o aumento do percentual de enzima. Uma média de aumento da produção de ésteres de 10% foi obtida quando a concentração foi elevada para 2%.<sup>20</sup>

A análise de variância foi utilizada para verificar a adequabilidade do modelo adotado, onde foi verificado que o coeficiente de determinação apresentou um valor muito próximo de 1, o que demonstra que o modelo quadrático adotado explica de forma satisfatória as variações nas respostas observadas. Através no modelo foi possível obter a superfície de resposta referente ao plote do percentual de conversão pelas variáveis que promoveram os maiores efeitos sobre o fator resposta: percentual de enzima e temperatura. Como é possível visualizar na Figura 3, de modo geral, foram obtidos valores mais altos para o fator resposta com o uso de maiores valores de percentual de enzima.

FIGURA 3

### **Caracterização do biodiesel obtido com a Novozym 435**

O biodiesel obtido com os melhores resultados em termos de percentual de conversão em ésteres foi selecionado para o processo de caracterização. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 5.

TABELA 5

Os resultados da caracterização do biodiesel revelaram que o mesmo obedece na maioria dos parâmetros regulamentados pela ANP, revelando a possibilidade real de uso dos óleos residuais como fontes para a obtenção de biodiesel. As exceções foram o índice de acidez e percentual de glicerina livre. A glicerina é um subproduto da produção do biodiesel e sua determinação é útil para verificar a pureza do biodiesel. Concentrações elevadas de glicerina no biodiesel promovem problema de armazenamento, devido ao fato da mesma não se solubilizar ao mesmo. Além disso, a sua presença provoca problemas de formação de depósitos, entupimentos de bicos injetores e emissões de produtos tóxicos, como por exemplo, a acroleína. No caso do índice de acidez, esse parâmetros possivelmente esta relacionado ao teor de ácidos graxos livres presentes no material de partida.<sup>31</sup>

### **CONCLUSÃO**



Os resultados revelaram que o uso da enzima comercial Novozym 435 foi a que acarretou nos melhores valores de percentual de conversão em ésteres. Além disso, esta enzima possibilitou a obtenção de grandes quantidades de ésteres em condições de relativa baixa temperatura (47 °C) e baixa valor de razão molar de 6:1. Esses dados são interessantes do ponto de vista industrial pois trata-se de um método que usa condições brandas de temperatura e baixas quantidades de álcool. O método também não utilizou solvente orgânico, o que diminui ainda mais os custos das etapas de “*scale up*”. Os resultados de caracterização do biodiesel demonstraram que, com exceção dos parâmetros de índice de acidez e glicerina, pode dizer que ele está dentro dos parâmetros exigidos pela ANP e poderia ser comercializado. Por fim, o trabalho ilustra que óleos de baixa qualidade podem ser utilizados para a fabricação de biodiesel, diminuindo os custos e contribuindo ainda mais para as questões ambientais uma vez que trata-se da valorização de um rejeito.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelo suporte financeiro e ao professor A. W. ZIBETTI pelo auxílio com as análises estatísticas.

## REFERÊNCIAS

- [1] Knothe, G; Van Gerpen, J.; Krahl, J.; Ramos, L. P. *Manual de Biodiesel*. 1 ed., Blucher: São Paulo, 2006.
- [2] Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F.; *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2007, 11, 1300.
- [3] Fjerbaek, L.; Christensen, K. V.; Norddahl, B.; *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102, 1298.
- [4] Antczak, M. S.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S.; *Renew Energ* 2009, 34, 1185.
- [5] Feltes, M. M. C.; Oliveira, D.; Ninow, J. L.; Oliveira, J. V. Em *Alternative Fuels*; Manzanera, M., eds.; Intech, 2011.
- [6] Trevisan, H. C. Em *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa, 2004, cap. 3.
- [7] Zhang, Y.; Dubé, M. A.; Mclean, D. D.; Kates, M.; *Bioresour. Technol.* 2003, 89, 1.
- [8] Banerjee, A.; Chakraborty, R.; *Resour Conserv Recy* 2009, 53, 490.
- [9] Lutz, I. A. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. MS: Brasília, 2005.
- [10] American Oil Chemist's Society. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society*, 5<sup>th</sup> ed., Champaign: Illinois, 1998.

- [11] ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP N° 4, DE 2.2.2010 - DOU 3.2.2010 – Retificada Dou 22.2.2010.  
[http://www.abdir.com.br/legislacao/legislacao\\_abdir\\_4\\_2\\_10\\_8.pdf](http://www.abdir.com.br/legislacao/legislacao_abdir_4_2_10_8.pdf), acessada em novembro 2013.
- [12] Codex Standard for Named Vegetable Oil Codex Stan 210-1999.  
[http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/336/CXS\\_210e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/336/CXS_210e.pdf), acessada em novembro 2013.
- [13] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 482, de 23 de setembro de 1999.  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a2190900474588939242d63fbc4c6735/RDC\\_482\\_1999.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a2190900474588939242d63fbc4c6735/RDC_482_1999.pdf?_af=1)>, acessada em novembro 2013.
- [14] Felizardo, P.; Correia, M. J. N.; Raposo, I.; Mendes, J. F.; Berkemeier, R.; Bordado, J. M.; *Waste Manag.* 2006, 26, 487.
- [15] Dizge, N.; Aydiner, C.; Imer, D. Y.; Bayramoglu, M.; Tanriseven, A.; Keskinler, B.; *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 1983.
- [16] Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H.; *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 92, 405.
- [17] Illanes, A. Em *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*; Illanes, A., eds.; Springer Science, 2008. cap. 2.
- [18] Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Biochem.* 1985, 82, 3192.
- [19] Verger, R.; *Trends Biotechnol.* 1997, 15, 32.
- [20] Garcia, T.; Sanchez, M.; Martinez, M.; Aracil, J.; *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 25, 591.
- [21] Li, N.; Zong, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, 66, 43.
- [22] De Paola, M. G.; Ricca, E.; Calabrò, V.; Curcio, S.; Iorio, G.; *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 5126.
- [23] Maceiras, R.; Vega, M.; Costa, C.; Ramos, P.; Márquez, M. C.; *Fuel* 2009, 88, 2130.
- [24] Oliveira, D.; Luccio, M.; Faccio, C.; Dalla Rosa, C.; Bender, J. P.; Lipke, N.; Menoncin N, S.L.; Amroginski, C.; Oliveira, J. V.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 113, 771.
- [25] Rosa, C. D.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2010, 30, 76.
- [26] Rodrigues, R. C.; Volpato, G.; Wada, K.; Ayub, M. A. Z.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008, 85, 925.
- [27] Mittelbach, M.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990, 67, 168.
- [28] Talukder, M. R.; Wu, J. C.; Nguyen, T. B. V.; Fen, N. M.; Melissa, Y. L.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2009, 60, 106.
- [29] Rosset, I. G.; Tavares, M. C.; Assaf, E. M.; Porto, A. L. M.; *Appl. Catal., A*, 2011, 392, 136.
- [30] Tongboriboon, K.; Cheirsilp, B.; H-Kittikun, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010, 67, 52.
- [31] Lôbo, I. P.; Ferreira, S. L.; Cruz, R. S.; *Quim. Nova* 2009, 32, 1596.



## LEGENDAS DE FIGURAS

**Figura 1.** Gráficos que representam o percentual de conversão em ésteres etílicos obtidos para os três biocatalisadores após 12, 24 e 48 h de reação

**Figura 2.** Diagramas de contorno obtidos para o fator resposta em função das variáveis temperatura, razão molar etanol/óleo e percentual do biocatalisador Novozym 435 após 48 h de reação

**Figura 3.** Superfície de resposta para o percentual de conversão em função da razão molar etanol/óleo e o percentual da Novozym 435, após 48 h de reação

## TABELAS

**Tabela 1.** Planejamento fatorial utilizando as enzimas: Novozym 435, Lipozym TL IM e Lipozym RM IM

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	35	47,5	60
Razão molar etanol/ óleo (m/m)	3:1	6:1	9:1
Percentual de enzima (%)	0,5	3,0	5,5

**Tabela 2.** Características físico-químicas do óleo de fritura usado adquirido em Restaurantes de Garopaba – SC após filtração

Parâmetro analisado	Unidades	Resultado	CODEX STAN 210-1999 (óleo refinado) <sup>12</sup>	ANVISA RESOLUÇÃO RDC N° 482 DE 1999 (óleo refinado) <sup>13</sup>
Umidade e voláteis	(g/100 g)	0.10	≅ 0.05	-
Índice de Acidez	(mg KOH/g)	1.4	≅ 0.6	máx. 0.3
Índice de iodo	(gL/1000 g)	113.0	124-139	120-143
Índice de peróxido	(mEq/Kg)	17.4	≅ 10	máx. 10

Perfil de ácidos graxos				
Ácido Araquídico (C20:0)	(g/100g)	0.92	0.1-0.6	< 1,0
Ácido Behênico (C22:0)	(g/100g)	0.60	ND-0.7	< 1,0
Ácido Caprílico (C8:0)	(g/100g)	0.18	ND	< 1,0
Ácido Eicosapentanóico (C20:5n3)	(g/100g)	0.10	ND	< 1,0
Ácido Eicosanóico (C20:1)	(g/100g)	0.31	ND-0.5	< 1.0
Ácido Linoléico (C18:2n 6c)	(g/100g)	45.82	48.0 -59.0	44.0 – 62.0
Ácido Oléico (C18:1n 9c)	(g/100g)	29.17	17-30	19.0 – 30.0
Ácido Palmítico (C16:0)	(g/100g)	11.88	8.0-13.5	7.0 – 14.0
Ácido Palmitolêico (C16:1)	(g/100g)	0.31	ND-0.2	< 0.5
Ácido Estearico (C18:0)	(g/100g)	5.50	2.0-5.4	1.4 – 5.5
Ácido Linolênico (C18:3n 3c)	(g/100g)	3.73	4.5-11.0	4.0 – 11.0

**Tabela 3.** Variáveis e seus valores codificados para o planejamento fatorial completo (2<sup>3</sup>) e resultados para os percentuais de conversão de ésteres após 12, 24 e 48 h de reação

En- saio	Variáveis			Conversão (%) (h)								
				Novozym 435			Lipozym TL IM			Lipozym RM IM		
	Tempo de reação (h)											
A	B	C	12	24	48	12	24	48	12	24	48	
1	-1	-1	-1	1,72	3,74	6,37	3,21	6,44	7,09	0,00	4,17	7,82
2	+1	-1	-1	0,63	4,76	12,6	1,23	8,07	12,9	0,00	0,00	1,03
3	-1	+1	-1	3,65	9,58	10,3	2,55	5,78	13,7	0,00	1,59	3,73
4	+1	+	-1	22,8	28,2	32,1	0,00	0,53	1,66	0,00	0,00	0,48
5	-1	-1	+1	35,8	48,5	62,8	9,56	15,5	28,8	2,88	5,60	10,8
6	+1	-1	+1	43,7	61,7	76,5	1,21	3,18	6,72	0,00	0,00	1,92

7	-1	+1	+1	42,9	68,7	77,3	0,00	0,00	0,61	0,00	3,22	9,39
8	+1	+1	+1	44,9	79,8	86,1	1,04	2,91	5,54	1,13	5,42	9,61
9	0	0	0	54,7	74,1	97,1	36,5	56,6	75,7	10,4	22,9	44,8
10	0	0	0	45,6	68,3	95,2	23,5	45,0	76,1	11,1	25,5	43,5
11	0	0	0	49,8	73,0	96,7	28,3	58,1	72,4	15,0	32,5	42,4
12	0	0	0	52,2	70,7	92,9	33,4	49,1	69,9	16,8	35,3	47,3

**Tabela 4.** Estimativa dos efeitos das variáveis sobre o fator resposta obtidos através do planejamento fatorial  $2^3 + 4$  pontos centrais após 48 h de reação com a Novozym 435

Fator codificado	Efeito	Erro padrão	t-valor	p-valor
Curvatura	100,4250	5,073045	19,79580	0,000038
(A) Temperatura (°C)	12,7250	2,928924	4,34460	0,012209
(B) Razão molar	12,1250	2,928924	4,13975	0,014379
(C) Enzima (%)	60,2250	2,928924	20,56216	0,000033
(A) x (B)	2,6250	2,928924	0,89623	0,420790
(A) x (C)	-0,9750	2,928924	-0,33289	0,755936
(B) x (C)	0,1250	2,928924	0,04268	0,968004

**Tabela 5.** Valores de temperatura e tempo para reações de esterificação enzimática escolhidos por outros autores

Tipo ou origem da lipase utilizada	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)	Referência
<i>Penicillium expansum</i>	35	24	21
Lipozyme® de <i>Rhizomucor miehei</i>	37	24	22
Novozym 435	50	8	23
Lipozyme® IM de <i>Mucor miehei</i>	35 - 65	8	24
Novozym 435	65	6	25
Novozym 435, Lipozyme® de <i>Rhizomucor</i>	30	6	26

<i>miehei</i> e <i>Mucor miehei</i>			
Lipase livre de <i>Pseudomonas fluorescens</i> lipase de <i>Mucor miehei</i> imobilizada em resina de troca iônica lipase de <i>Candida</i> sp imobilizada em esferas de resina acrílica	45	5	27
Novozym 435	40	0,5	28
Novozym 435	32	24	29
Lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , Lipase PS de <i>Pseudomonas cepacia</i> , Lipase de <i>Candida rugosa</i> , Lipozyme TL IM de <i>Thermomyces lanuginosa</i> e Novozym 435	45	12	30

**Tabela 6.** Ensaios de caracterização do biodiesel obtido com o uso da Novozym 435

Parâmetros	Unidades	Resultados	Regulamento ANP
Massa específica (20 °C)	kg/m <sup>3</sup>	883,0	850 à 900
Viscosidade cinemática (40 °C)	mm <sup>2</sup> /s	6,0	3,0 à 6,0
Ponto de fulgor	°C	30,6	limite 100,0
Índice de acidez	mg KOH/g	0,79*	0,50
Glicerina total	% massa	0,22	0,25
Glicerina livre	% massa	0,06*	0,02
Monoglicerídeos	% massa	0,35	0,80
Diglicerídeos	% massa	0,32*	0,20
Triglicerídeos	% massa	0,31*	0,20
Ponto de entupimento de filtro à frio	°C	-3	7
Teor de éster	% massa	80,1	96,5
Fósforo	mg/Kg	<1	10

## FIGURAS

Figura 1

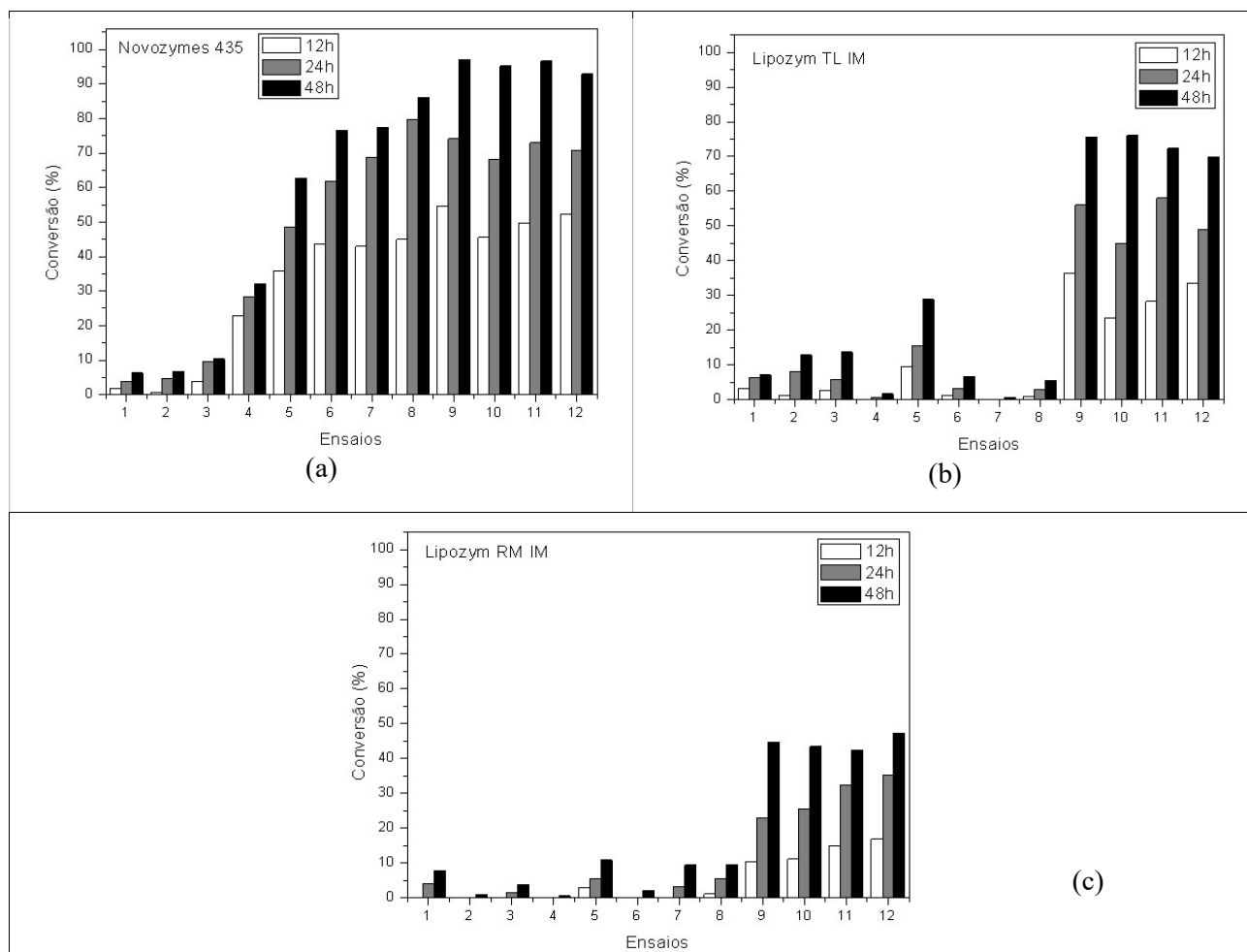
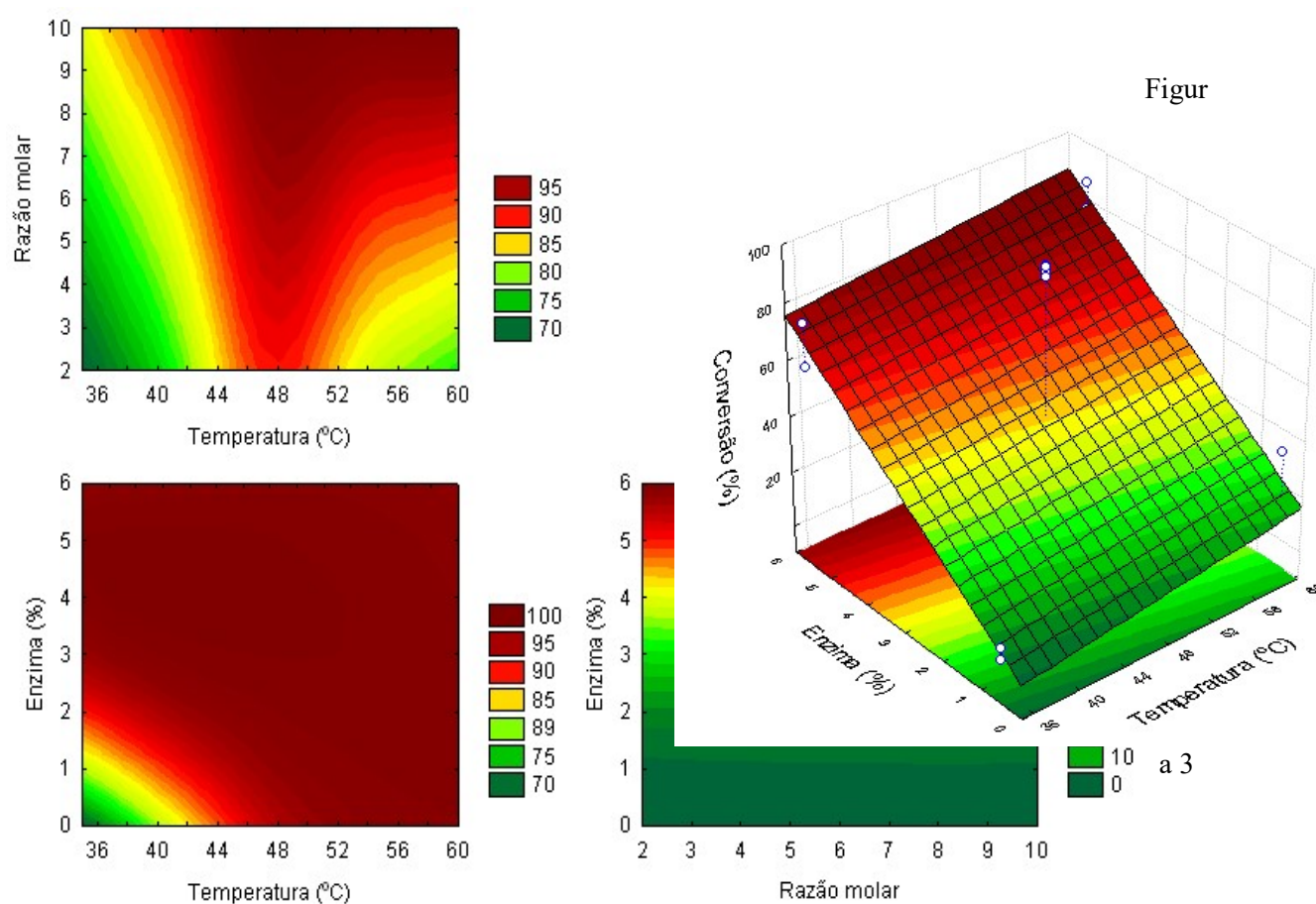




Figura 2



Figur

a 3