

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE
PÓSGRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA QUÍMICA –
NÍVEL MESTRADO**

**HIDROESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE CRAMBE EMPREGANDO CATÁLISE
ENZIMÁTICA**

FERNANDA TAVARES

Toledo – PR

2014

FERNANDA TAVARES

**HIDROESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE CRAMBE EMPREGANDO
CATÁLISE ENZIMÁTICA**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química em cumprimento
parcial aos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.**

**Orientador: Professor Dr. Carlos
Eduardo Borba.**

**Coorientador: Professor Dr. Edson
Antônio da Silva**

TOLEDO – PR

2014

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

T231h 1. Tavares, Fernanda
Hidroesterificação do óleo de Crambe empregando catálise enzimática
/ Fernanda Tavares. -- Toledo, PR : [s. n.], 2014.
xiv; 94 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba
Coorientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Estadual
do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências
Exatas.

1. Engenharia química - Dissertações 2. Biodiesel - Produção 3.
Extração do óleo – Crambe (*Crambe abyssinica*) 4. Óleos vegetais como
combustível 5. Catálise enzimática 6. Hidroesterificação 7. Enzimas –
Aplicações industriais 8. Energia – Fontes alternativas I. Borba, Carlos
Eduardo, Orient. II. Silva, Edson Antônio da, Orient. III. T.

CDD 20. ed. 660.634
665.3

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Fernanda Tavares
a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 28 de
fevereiro de 2014

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba

Orientador



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Coorientador



Prof. Dr. Fernando Palú

Membro



Prof. Dr. Helton José Alves

Membro

Dedicatória

Dedico esse trabalho a Deus, pois a fé é um sentimento intenso que move e renova as esperanças.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me colocado nesse caminho e me dado disposição e força para continuar sempre e porque sem a força da fé não seria capaz de realizar nada em minha vida.

Aos meus pais, Angela e Milton, que estiveram ao meu lado com apoio incondicional por toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Silvia e Milton Júnior, pelo apoio e momentos de diversão.

Ao meu orientador Carlos Eduardo Borba por ter me recebido tão bem como orientada e ser uma pessoa de fácil interação e descontraída, pelas horas de dedicação e por toda a contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu coorientador Edson Antônio da Silva pela orientação de tantos anos, pela humildade e amizade com que trata seus alunos e por sempre ter arrumado tempo para mim em meio a tantas ocupações.

À Daniele e Franciny pela amizade, pelos muitos cafés e horas descontração na faculdade.

À Camila e Maiara por sua amizade e apoio e à Beatriz, mesmo distante, agradeço pela sua amizade sincera ao longo de tantos anos.

À aluna de iniciação científica, Fernanda Pinzan, pela ajuda no trabalho, por sua dedicação e simpatia.

A todos os colegas do laboratório LPS pelas conversas e ajuda mútua.

A todos os colegas de grupo de pesquisa, em especial ao Adair Gallo Júnior e Cláudio Rodrigues pela colaboração, amizade e descontração durante o trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Engenharia Química da UNIOESTE pela ajuda e suporte técnico.

À Fundação MS pelo fornecimento do óleo de Crambe e em especial ao Engenheiro Agrônomo Carlos Pitol pelas informações concedidas.

À LNF Latino Americana pelo fornecimento da enzima utilizada nesse trabalho.

À professora Camila da Silva pela análise cromatográfica de ácidos graxos e pelo suporte na análise cromatográfica de ésteres.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Devido às condições climáticas e escassez de combustíveis derivados do petróleo, é notória a busca por novas fontes que visem solucionar tais problemas. O biodiesel é um combustível que ao longo dos anos vem sendo amplamente estudado, porém existem ainda muitos gargalos envolvendo os processos de produção e também as matérias primas empregadas. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo estudar um processo que apesar de ainda pouco investigado apresenta características interessantes no ponto de vista energético e econômico, além disso, busca-se empregar o óleo de crambe, um óleo que não é usado na cadeia alimentar e que possui consideráveis vantagens para seu emprego na produção de biocombustíveis. A hidroesterificação é um processo que envolve duas etapas, sendo uma de hidrólise do óleo e outra de esterificação do óleo hidrolisado. Neste trabalho um planejamento DCCR completo 2^3 foi empregado para estudar as variáveis temperatura, razão molar água/óleo e teor de catalisador no rendimento do teor de ácidos graxos a partir da reação de hidrólise enzimática do óleo de crambe. A enzima utilizada nesse estudo foi a lipase comercial Lypozyme RM IM. Os resultados do planejamento mostraram que as condições ótimas foram atingidas nos limites estudados e, portanto fizeram-se necessários experimentos extras para chegar-se a conclusão que a temperatura ideal para a reação ocorrer é de 60°C. A razão molar entre água e óleo não mostrou significância para o planejamento, o que provavelmente se deve ao fato de que as condições estudadas foram de excesso de água. O teor de catalisador foi o fator mais significativo e, para otimizar o uso de catalisador na reação um novo planejamento 2^2 foi realizado para avaliar os efeitos de rotação e teor de catalisador. A rotação foi o efeito mais significativo demonstrando, dessa forma, que a transferência de massa externa é um importante fator na hidrólise enzimática do óleo de crambe. Dados experimentais da cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe foram obtidos nas condições de 2,2%, em massa total de substrato, razão molar água/óleo 10, nível de rotação de 790 rpm e temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C. Um modelo matemático, disponível na literatura, foi utilizado para descrever estes dados. A reação de hidrólise enzimática atingiu um bom rendimento em ácidos graxos livres, chegando a 77%.

A reação de esterificação foi realizada a partir dos ácidos graxos livres obtidos a partir da condição ótima de hidrólise do óleo nas condições de 5% em massa de catalisador Amberlyst 15®, razão molar metanol/óleo de 30:1 nas temperaturas de 65°C e 80°C durante 4 horas de reação, sendo que o melhor resultado obtido foi de 49% em conversão de ésteres metílicos. Apesar de o resultado final do trabalho não ter obtido alta conversão em ésteres, os resultados demonstraram as tendências a serem utilizadas em trabalhos futuros já que se observa que o processo de hidroesterificação é promissor, pois possibilita o uso de matérias-primas não refinadas e condições brandas, resultando em baixo custo de produção para o biodiesel.

ABSTRACT

Due to climatic conditions and shortage of petroleum-based fuels, the search for new sources aimed to solve such problems is notorious. Biodiesel is a fuel which has been extensively studied over the years, but there are still many problems involving the production processes and also the raw materials used. Thus, the present work aims to study a process that has presented interesting features in terms of energy and cost, even though it has still been understudied, and in addition, seeks to employ the crambe oil, an oil that is not used in the food chain and has considerable advantages in the biofuel production. The hydroesterification is a process which involves two steps, first being a hydrolysis process and the second an oil esterification of the hydrolyzed oil. In this work a central composite rotational design (DCCR) 2^3 was employed to study the following variables: temperature, water/oil molar ratio content and yield of catalyst in the content of fatty acids through the enzymatic hydrolysis of crambe oil. The enzyme used in this study was the commercial lipase Lypozyme RM IM. The planning results showed that the optimum conditions were achieved in the studied limits and thus additional experiments were made necessary to reach the conclusion that the ideal reaction temperature is 60°C. The molar ratio between water and oil was not significant for the planning, which is probably due to the fact that the conditions studied were of excess water, to ensure that the reaction occurred until the end. The content of the catalyst was the most significant factor and to optimize the use of catalyst in the reaction a new 2^2 design was conducted to evaluate the effects of rotation level and catalyst content. Rotation level was the most significant effect, demonstrating thereby that the external mass transfer is an important factor in the enzymatic hydrolysis reaction of crambe oil. Experimental data of the kinetic study of the enzymatic hydrolysis of crambe oil was obtained under conditions of 2.2 mass percentage of total substrate, water/oil molar ratio of 10:1, level of rotation of 790 rpm at temperatures of 50°C, 55°C and 60°C. A mathematical model found in available literature was used to describe the data. The enzymatic hydrolysis reaction reached a good conversion into free fatty acids, reaching 77%. The esterification reaction was carried out using free fatty acids obtained from the hydrolysis optimum condition, under 5% mass percentage of

Amberlyst 15® catalyst, methanol/oil molar ratio of 30:1, at temperatures of 65 °C and 80 °C during 4 hours of reaction, and the best result obtained was a 49% of conversion of methyl esters. Although the end result of the work did not achieved a high conversion into esters, the results established trends to be used in future works as it was observed that the process of hydroesterification is promising since it enables the use of unrefined raw materials and mild conditions, resulting in lower production costs for biodiesel.

NOMENCLATURA

A/O – Razão molar Água/óleo;

Ac – Acidez (%);

AGL – Ácido Graxo Livre;

C_{AGL} – Concentração de ácidos graxos;

C_{DG} – Concentração de diacilgliceróis;

C_{GL} – Concentração de glicerol;

C_{H₂O} – Concentração de água;

C_{MG} – Concentração de monoacilgliceróis;

C_{TG} – Concentração de triacilgliceróis;

DG –Diacilglicerol;

E= Enzima

GL – Glicerol;

GL – Graus de Liberdade;

m- massa de enzima (mg);

MG –Monoacilglicerol;

MGAT - MonoacilglicerolAciltransferase

M - Molaridade da solução de NaOH;

pa-peso da amostra de óleo (g);

PM -Massa molar média dos ácidos graxos presentes no óleo de crambe;

QM – Quadrado Médio;

R² - Coeficiente de determinação;

SQ – Soma Quadrática;

t – Tempo de reação (h)

TG – Triacilglicerol;

ton– Tonelada;

Vol - volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

x_i - Valor real da variável i;

X_i - Valor codificado da variável i;

Y- Função resposta;

Z - Valor real da variável i no ponto central;

(L) – Linear;

(Q) – Quadrático;

Símbolos gregos

α – nível axial codificado

ΔX_i - Valor do intervalo de variação da variável i;

β_0 - Coeficiente relativo à intercepção do plano com o eixo de resposta;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ - Coeficientes lineares estimados;

$\beta_{22}, \beta_{11}, \beta_{33}$ - Coeficientes quadráticos estimados;

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ - Coeficiente de interação entre as variáveis;

Subscritos

calc – Calculado

tab – Tabelado

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Craqueamento de um triglicerídeo – adaptado de SUAREZ (2006).	11
Figura 3.2 - Reação de transesterificação via rota metílica.....	13
Figura 3.3 - Reações de hidrólise de triglicerídeos e de esterificação de ácidos graxos – Adaptado de Melo, 2008.....	15
Figura 3.4 - Esquema geral da hidrólise completa de triglicerídeos catalisada pela RML para produzir ácidos graxos livres. Fonte: Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010b).....	22
Figura 3.5 - Lavoura de crambe em Maracaju MS. Fonte: Fundação MS.....	31
Figura 5.1 - Diagrama de pareto para a produção de AGL, sob um intervalo de 95% de confiança.....	53
Figura 5.2 - Distribuição dos valores observados versus valores preditos.	55
Figura 5.3 - Influência da Temperatura e da razão mássica de catalisador sobre a acidez.....	56
Figura 5.4 - Influência da Temperatura e da Razão molar água/óleo sobre a acidez.....	56
Figura 5.5 - Influência da Razão mássica de catalisador/substrato e da Razão molar água/óleo sobre a acidez.	57
Figura 5.6 - Diagrama de pareto para a produção de AGL, sob um intervalo de 95% de confiança.....	61
Figura 5.7 - Distribuição dos valores observados versus valores preditos.	62
Figura 5.8 - Influencia da rotação e razão mássica de catalisador/substrato na acidez.....	63
Figura 5.9 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (T = 60°C, rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%).....	66
Figura 5.10 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (T = 55°C, rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%).....	67
Figura 5.11 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (T = 50°C, rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%).....	68
Figura 5.12 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (Rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%, ■ = 60°C, ● =55°C e ▲=50°C).	69

Figura 5.13 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (T = 60°C, rotação= 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato= 2,2%).• Experimental — Simulado.....	71
Figura 5.14 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (T = 55°C, rotação= 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato= 2,2%).• Experimental — Simulado.....	72
Figura 5.15 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (T = 50°C, rotação= 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato= 2,2%).• Experimental — Simulado.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Nome e fórmulas de ácidos graxos (SCRIMGEOUR, 2005).	25
Tabela 3.2 - Teores médios de óleo e produtividade de óleo por hectare para oleaginosas.	32
Tabela 4.1 - Níveis de variáveis no planejamento experimental.	41
Tabela 4.2 - DCCR com três variáveis com pontos centrais e axiais.	42
Tabela 4.3 - Níveis de variáveis no planejamento experimental padrão.	42
Tabela 4.4 - Valores reais e codificados para o planejamento de duas variáveis.	43
Tabela 5.1 - Análise dos ácidos graxos presentes no óleo de crambe.	51
Tabela 5.2 - Valores de acidez para os experimentos do planejamento experimental DCCR.	52
Tabela 5.3 - Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez, para um intervalo de confiança de 95%.	54
Tabela 5.4 - Análise da variância para o DCCR para o AGL.....	54
Tabela 5.5 - Valores de acidez para os experimentos do planejamento experimental 2 ²	60
Tabela 5.6 - Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez, para um intervalo de confiança de 90%.	61
Tabela 5.7 - Análise da variância para o DCCR para o AGL.....	62
Tabela 5.8 – Resultados de acidez e desvio padrão do teste cinético a 60°C.	66
Tabela 5.9 – Resultados de acidez e desvio padrão do teste cinético a 55°C.	67
Tabela 5.10 – Resultados de acidez e desvio padrão do teste cinético a 50°C. ...	68
Tabela 5.11 - Valores dos parâmetros do modelo estimados para as cinéticas de 60°C, 55°C e 50°C.	73

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. BIODIESEL	4
3.1.1. Definição	4
3.1.2. Contexto histórico	5
3.1.3. Contexto Brasileiro	6
3.1.4. Vantagens e dificuldades	8
3.1.5. Processos de produção de biodiesel	10
3.2. CATÁLISE	17
3.2.1. Catálise química.....	18
3.2.2. Catálise enzimática	19
3.3. ÓLEOS E GORDURAS	23
3.3.1. Ácidos graxos livres	24
3.4. CRAMBE ABYSSINIAN.....	25
3.4.1. Utilizações.....	28
3.4.2. Contexto histórico	29
3.4.3. Contexto Brasileiro	30
3.4.4. Extração	32
3.4.5. Estabilidade do óleo.....	33
3.4.6. Torta e Farelo.....	33
3.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
3.6. MODELAGEM CINÉTICA	35
3.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
4. METOLOGIA	38

4.1.	REAGENTES	38
4.2.	MÉTODOS ANALÍTICOS	38
4.2.1.	Quantificação Ácidos Graxos Livres	38
4.2.2.	Composição de Ácidos Graxos do óleo de crambe	39
4.2.3.	Composição de ésteres	40
4.3.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	40
4.3.1.	Hidrólise enzimática	40
4.3.2.	Reação de esterificação.....	44
4.4.	MODELAGEM MATEMÁTICA.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE CRAMBE	50
5.2.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	51
5.2.1.	Planejamento fatorial completo 2^3	52
5.2.2.	Planejamento fatorial 2^2	59
5.2.3.	Cinético da hidrólise enzimática do óleo de crambe	65
5.2.4.	Modelagem matemática.....	70
5.3.	ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO HIDROLISADO.....	74
6.	CONCLUSÃO	76
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

2. INTRODUÇÃO

As crises internacionais do petróleo, nos anos 1970 e 1990, bem como uma crescente preocupação com o esgotamento dos recursos não renováveis e consciência ambiental, deu entusiasmo para a busca de fontes de combustíveis renováveis (HILL, 2001; SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001).

Assim como o diesel de petróleo, o biodiesel opera em motores de ignição por compressão com pouca ou nenhuma modificação (MEHER *et al.*, 2006). O biodiesel oferece vantagens em relação ao desgaste do motor, custo e disponibilidade. Quando queimado, o biodiesel produz poluentes que são menos prejudiciais para a saúde humana (LINE LIN, 2006; DORADO *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2009). Além disso, fornece um melhor poder lubrificante, em comparação com o óleo diesel (KNOTHE *et al.*, 2005).

No Brasil, a definição é estabelecida pela lei nº 11.097, de 2005, na qual o biodiesel é o biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil.

O processo mais comumente utilizado para a produção de biodiesel é a transesterificação homogênea, geralmente empregando hidróxido de sódio ou de potássio como catalisador. Porém, tal processo apresenta alguns problemas e desvantagens.

Óleos e gorduras vegetais podem conter pequenas quantidades de água e ácidos graxos livres (AGL). Em uma reação catalisada por um álcali, o catalisador usado irá reagir com o AGL de modo a formar sabão. Essa reação é indesejada porque o sabão diminui o rendimento do biodiesel e prejudica a separação dos ésteres e do glicerol. Além disso, esse sabão liga-se com o catalisador o que significa que será necessário maior quantidade de catalisador e, portanto, o processo envolve um custo mais elevado (VAN GERPEN *et al.*, 2004).

O processo de hidroesterificação aparece como alternativa interessante para a produção de biodiesel. Esse processo é feito em duas etapas, envolvendo

primeiramente uma etapa de hidrólise seguida pela esterificação. Por conter uma etapa na qual a água é reagente, não há a necessidade de que essa matéria prima seja refinada, ou seja, que contenha o percentual abaixo de 1% de acidez, o que deve ser feito pelo processo de transesterificação para evitar a formação de sabões. Como cerca de 80% do custo de produção do biodiesel é proveniente do custo da matéria prima, a hidroesterificação permite um significativo salto na viabilidade da produção de biodiesel (ARANDA, 2005).

O Crambe (*Crambe Abyssinian*) é uma oleaginosa pertencente à família das crucíferas, originária da região de transição entre temperada e quente, com precipitação moderada, da Etiópia. Ultimamente, os agricultores brasileiros que produzem soja mostraram grande interesse em crambe por causa de seus baixos custos de cultivo, colheita mecanizada e porque pode ser semeada como cultura de inverno em março ou abril, depois da soja. (FALASCA *et al.*, 2010).

No Brasil, é notória a adaptabilidade ao clima, rusticidade, precocidade, tolerância ao déficit hídrico e, a sua principal característica, ter ciclo de produção reduzido, cerca de 90 dias. Logo, o crambe apresenta-se como uma excelente alternativa para a rotação de culturas com grande potencial de expansão como alternativa de safrinha em boa parte do cerrado brasileiro, não competindo com as culturas principais e as alimentares, e tendo seu cultivo totalmente mecanizado com equipamentos utilizados em outros cultivos, como na soja, utilizando as mesmas estruturas (semeadoras, colhedoras, armazéns) (ROSCOE & DELMONTES, 2008).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o processo de hidrosterificação do óleo de crambe via catálise enzimática.

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de algumas variáveis nos processos de hidrólise enzimática, além de utilizar o óleo hidrolisado para uma reação de esterificação, completando assim o processo de hidroesterificação do óleo de crambe para produção de biodiesel.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudo do efeito das condições operacionais na hidrólise enzimática do óleo de crambe, avaliando os efeitos de temperatura, razão mássica de catalisador/substrato (em relação a massa total de substrato: água e óleo), razão molar água/óleo e rotação;
- Obtenção de dados experimentais da cinética da reação enzimática bem como a modelagem matemática;
- Obtenção de ésteres a partir da esterificação do óleo previamente hidrolisado pelo processo de hidrólise enzimática do óleo de crambe.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. BIODIESEL

4.1.1. Definição

No Brasil, a definição é estabelecida pela lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, na qual o biodiesel é o biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil.

É uma definição ampla, e abre a possibilidade do uso de diferentes matérias-primas para a produção do biocombustível, já que a intenção do plano é a diversificação das oleaginosas utilizadas na transformação do óleo nas usinas, aproveitando uma vantagem natural apresentada pelo Brasil. Além disso, não determina a rota do álcool a ser utilizado na produção (metanol ou etanol) que resultará no biodiesel.

Diferentemente do Brasil, a União Europeia define o biodiesel como um éster metílico produzido com base em óleos vegetais ou animais (Diretiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu). Dessa forma, o biodiesel produzido e comercializado na Europa tem uma definição restritiva, podendo ser obtido somente pela rota metílica, ou seja, deve-se utilizar o metanol no processo de produção, além de ser favorável à utilização do óleo de canola (colza) na produção em detrimento de outros (EMBRAPA, 2013).

Segundo a norma, ASTM D 6751, 2008 (ASTM – American Society of Testing and Materials), nos Estados Unidos, o biodiesel é definido como sendo mono-alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, produzidos a partir de óleos vegetais ou animais, para ser utilizado em motores de ciclo diesel. Esta norma também delimita as especificações para este produto.

Quimicamente, é definido como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural e pode ser produzido, juntamente com

a glicerina, através da reação de triacilgliceróis (ou triglicerídeos) com etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido ou básico (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; ZAGONEL e RAMOS, 2001; RAMOS, 1999).

Knothe *et al.* (2006) definiram biodiesel como produto derivado a partir de muitas matérias-primas distintas, entre elas, óleos vegetais, gorduras animais, óleos usados em frituras e matérias graxas de alta acidez. Fatores como a geografia, o clima e a economia determinam quais matérias-primas apresentam maior interesse e melhor potencial para produção de biodiesel. Nos Estados Unidos o óleo de soja é a principal matéria-prima, na Europa é o óleo de colza (canola) e o óleo de palma é muito utilizado em países tropicais.

Assim como o diesel de petróleo, o biodiesel opera em motores de ignição por compressão com pouca ou nenhuma modificação (MEHER *et al.*, 2006). O biodiesel oferece vantagens em relação ao desgaste do motor, custo e disponibilidade. Quando queimado, o biodiesel produz poluentes que são menos prejudiciais para a saúde humana (LINE LIN, 2006; DORADO *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2009). Além disso, ele fornece um melhor poder lubrificante, em comparação com o óleo diesel (KNOTHE *et al.*, 2005). Porém, cabe-se ressaltar que devido às moléculas insaturadas, o biodiesel apresenta maior poder oxidativo provocando corrosão aos materiais.

4.1.2. Contexto histórico

O primeiro registro do uso de óleos vegetais como combustíveis líquidos em motores a combustão interna é de 1900, quando Rudolf Diesel usou óleo de amendoim (SHAY, 1993). No entanto, por causa de seu baixo custo e facilidade de acesso, o petróleo tornou-se a fonte de energia dominante e diesel de petróleo se desenvolveu como o principal combustível para motores a diesel.

Para Gazzoni (2009), o combustível especificado como "diesel" só surgiu com o advento dos motores diesel de injeção direta, sem pré-câmara. A propagação destes motores foi efetuada nos anos 50, com a forte motivação de rendimento muito maior, resultando em menor consumo de combustível. Historicamente, o uso direto de óleos vegetais como combustível foi rapidamente

superado pelo uso de óleo diesel derivado de petróleo por conta de ambos os fatores econômicos e técnicos. Naquele tempo, as questões ambientais, que atualmente favorecem os combustíveis renováveis, não foram consideradas importantes.

Assim, nos anos de 1930 e 1940, os óleos vegetais puros foram usados em motores a diesel sob uma situação de emergência (MA E HANNA, 1999). Nessa altura, a pirólise de diferentes triglicerídeos foi também usada para o abastecimento de combustível líquido em diferentes países. Por exemplo, os hidrocarbonetos foram produzidos na China a partir de um sistema de pirólise de óleo de tung e utilizados como combustíveis líquidos (CHANG; WAN, 1947). Outra abordagem proposta neste momento foi a utilização de etil ou metil ésteres, obtidos por transesterificação ou de alcoólise de óleos vegetais (CHAVANNE, 1937 E CHAVANNE, 1942) ou a esterificação dos ácidos graxos combinados com transesterificação de triglicerídeos (KEIM, 1945).

Porém, com o fim da II Guerra Mundial e a normalização do mercado mundial de petróleo, o biodiesel foi temporariamente abandonado.

Com o passar dos tempos, porém as fontes de petróleo e seus derivados tornaram mais escassas, o que incentivou a busca por fontes alternativas de energia.

Além disso, as crises internacionais do petróleo, nos anos 1970 e 1990, bem como uma crescente preocupação com o esgotamento dos recursos não renováveis e consciência ambiental, deu novo entusiasmo para a busca de fontes de combustíveis renováveis (HILL, 2001; SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001).

4.1.3. Contexto Brasileiro

No Brasil, durante a década de 1940 ocorreram as primeiras tentativas de exploração de energia a partir de óleos e gorduras em motores de combustão interna. De fato, há relatos de muitos estudos sobre o uso de óleos vegetais puros, como o babaçu, coco, mamona e sementes de algodão (por exemplo,

BORGES, 1944), ou hidrocarbonetos produzidos por craqueamento térmico-catalítico (OTTO, 1945). Vale ressaltar que durante a Segunda Guerra Mundial, a exportação de óleo de algodão, que foi o principal óleo vegetal produzido no Brasil naquela época, era proibida, a fim de forçar uma queda no seu preço e, portanto, para tornar possível a sua utilização como combustível em trens, o que é provavelmente o primeiro programa governamental sobre o uso de biocombustíveis (POUSA *et al.*, 2007).

Em resposta à escassez de petróleo durante as décadas de 1970 e 1980, o Governo Federal Brasileiro criou, em 1980, um programa chamado PROALCOOL (Goldemberg *et al.*, 2004), que implementou e regulamentou o uso do etanol hidratado como combustível (adaptações de motor foram necessários para a utilização deste combustível) e etanol anidro que pode ser misturado com o gasolina do petróleo. É importante mencionar que desde 1980 nenhuma gasolina pura é usada, apenas as misturas de etanol/gasolina estão sendo usadas como combustível no Brasil. O teor de etanol nestas misturas começou como 5%, e foi aumentada durante as três décadas de PROALCOOL e varia de 20% a 25% (POUSA *et al.*, 2007).

No final do século 20, o Governo Federal reiniciou a discussão sobre o uso de biodiesel, e muitos estudos foram feitos por comissões interministeriais em parceria com universidades e centros de pesquisa. Em 2002, a etanolise de óleos vegetais foi considerada como a principal rota de produção de combustível substituto ao diesel de petróleo chamado PROBIODIESEL. Este programa foi apresentado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e pelo Decreto nº 702 de 30 de outubro de 2002 (VIGLIANO, 2003). Embora a rota etílica tenha limitações tecnológicas quando comparadas com a rota metílica, essa rota foi favorecida devido a grande produção de etanol do Brasil. Nesse período, o biodiesel deixou de ser um combustível experimental e assim começaram as fases iniciais de produção industrial, quando a primeira indústria de ésteres de ácidos graxos foi instalada em Mato Grosso em novembro de 2000, a partir de uma produção de 1.400 ton/mês de éster etílico a partir de óleo de soja (SANT'ANNA, 2003).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) tem o papel regulador de mercado de biodiesel no Brasil.

Ela impõe regras e avalia as construções das plantas produtivas das usinas de biodiesel, além de conceder autorizações para o seu funcionamento, regulamentada pela Resolução ANP nº 25, de 02/09/2008. Determina o percentual da mistura com o diesel mineral a ser comercializado e promove a comercialização do produto por meio de leilões de compras de biodiesel.

No início do PNPB, havia uma recomendação da adição voluntária de 2% de biodiesel no óleo diesel mineral, tornando-se obrigatória em janeiro de 2008. Em janeiro de 2013, ficou obrigatório o aumento percentual da mistura para 5%.

No entanto, os prazos de atendimento do percentual mínimo obrigatório poderiam ser diminuídos por resolução do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) de acordo com os seguintes critérios:

- a disponibilidade de oferta de matéria-prima e a capacidade industrial para produção de biodiesel;
- a participação da agricultura familiar na oferta de matérias-primas;
- a redução das desigualdades regionais;
- o desempenho dos motores com a utilização do combustível;
- as políticas industriais e de inovação tecnológica.

Em 01/07/2008, o CNPE aumentou o percentual da mistura de 2% para 3%. A Resolução ANP nº07, de 19/03/2008, aumentou a proporção, em volume, da mistura do biodiesel com o óleo diesel para 5% a partir de 01/01/2010.

A comercialização ocorre por meio de leilões públicos realizados pela própria ANP. A instituição dos leilões foi resultado da falta de demanda no início do PNPB, quando potenciais compradores tinham desconfiança da regularidade da entrega e da qualidade do produto.

A partir dos leilões, a ANP pôde identificar interessados na compra do biodiesel em bases competitivas, o que impulsionou o começo do mercado de biodiesel a partir de preço-teto nas compras elevadas nos leilões.

4.1.4. Vantagens e dificuldades

É importante destacar que o uso de biocombustíveis não é apenas uma alternativa econômica e segura para os combustíveis fósseis, mas também tem muitos aspectos ambientais e sociais favoráveis:

- (i) O biodiesel é biodegradável e inofensivo;
- (ii) Pode ser produzido a partir de materiais renováveis,
- (iii) Metil ou etil ésteres de ácidos graxos não contêm enxofre,
- (iv) O biodiesel diminui consideravelmente a emissão de fuligem (até 50%),
- (v) O biodiesel emite aproximadamente a mesma quantidade de CO₂ que é absorvida durante o cultivo da semente oleaginosa;
- (vi) Não contém qualquer um dos agentes cancerígenos encontrados no óleo diesel;
- (vii) O biodiesel não é considerado um material perigoso;
- (viii) Existem inúmeras vantagens sociais e econômicas de seu uso particularmente em países em desenvolvimento como o Brasil;
- (ix) O biodiesel representa uma saída adequada para a indústria de óleo vegetal, servindo como uma ferramenta importante para a regulação do mercado, e
- (x) aumenta a vida útil do motor, devido a uma capacidade de lubrificação superior (SCHUCHARDT *et al.*, 1998;. RAMOS *et al.* . de 2003).

De acordo com Hass e Foglia (2006) e Wassell e Dittmer (2006), os custos atuais de produção de biocombustíveis, quando comparado à energia mineral, não são tão competitivos. No Brasil, há algumas exceções, como por exemplo, o etanol de cana e combustíveis derivados de óleo residual (PETERS E THIELMANN, 2008). Os custos de produção de biodiesel são os principais obstáculos à sua comercialização (DEMIRBAS, 2007). De acordo com LENSINK E LONDO (2009), a redução de custos depende da experiência acumulada em tecnologias emergentes que irão superar os obstáculos iniciais dessa cadeia produtiva.

Espera-se que a falta de competitividade de custos possa ser compensada pela redução da emissão de gases de efeito estufa (DUER E CHRISTENSEN, 2009). Isso poderia explicar por que a produção desse combustível está sob a proteção da legislação e regulamentos específicos e ainda os subsídios na forma de redução fiscal (KNOTHE, 2006, PETERS E THIELMANN, 2008 E CHARLES *et al.*, 2007).

O Brasil, como outros países, criou um conjunto de incentivos políticos para o biodiesel, a fim de compensar a falta de competitividade nesta cadeia produtiva. O que diferencia as iniciativas PNPB de outros países é o uso da produção de biodiesel para a inclusão de pequenos agricultores. No entanto, a iniciativa PNPB tem encontrado obstáculos no que diz respeito aos altos custos de transação sobre a gestão de um grande número de pequenas propriedades. Os custos de transação são importantes para esses programas. Os menores custos de transação no programa do álcool brasileiro explicam, embora parcialmente, o seu sucesso (NEVES *et al.*, 2009).

Uma vantagem importante do Brasil na produção de biodiesel é a disponibilidade de áreas agrícolas que podem ser usados para atividades agroenergéticas, o que não é uma realidade na maioria dos países produtores, especialmente os países europeus (FRONDEL E PETERS, 2007).

4.1.5. Processos de produção de biodiesel

Existem vários métodos para a produção de biodiesel, alguns deles são: microemulsões, craqueamento térmico (pirólise) e transesterificação (HELWANI *et al.*, 2009). O biodiesel obtido a partir de microemulsão e os métodos de craqueamento térmico conduzem a combustão incompleta devido a um menor número de cetano. A transesterificação é o método mais comum para a produção de biodiesel, devido à sua simplicidade e tem sido amplamente estudada e industrialmente utilizada para converter o óleo vegetal em biodiesel (JUAN *et al.*, 2011). Além desses processos, existem ainda estudos para a produção de biodiesel a partir de rotas supercríticas (CAO *et al.*, 2005; SAKA & ISAYAMA, 2009; GOEMBIRA *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012; KELLOWAY *et al.*, 2013) e

também pelo processo de hidroesterificação (GOMES, 2009; CAVALCANTI-OLIVEIRA *et al.*, 2011; DÍAZ *et al.*, 2013).

4.1.5.1. Pirólise

A pirólise é a conversão de uma substância em outra por meio de calor, com o auxílio de um catalisador. Envolve o aquecimento na ausência de ar ou de oxigênio (SONNTAG, 1979) e a quebra de ligações químicas para produzir pequenas moléculas (WEISZ *et al.*, 1979). Quimicamente a pirólise é difícil de ser caracterizada devido a grande variedade de caminhos de reação e a variedade de produtos que podem ser obtidos a partir das reações que ocorrem. Os materiais pirolisados podem ser óleos vegetais, gorduras animais, ácidos graxos naturais e ésteres metílicos de ácidos graxos (MA e HANNA, 1999).

Apesar da simplicidade do uso de altas temperaturas para realizar o craqueamento, a grande desvantagem é a obtenção de compostos oxigenados no produto final, que o tornam levemente ácido (SUAREZ *et al.*, 2007).

A Figura 3.1 apresenta o esquema de uma reação genérica envolvendo a pirólise de uma molécula de triglicerídeo, porém, como foi dito, tal reação pode envolver grande variedade de caminhos de reação e variedade de produtos.

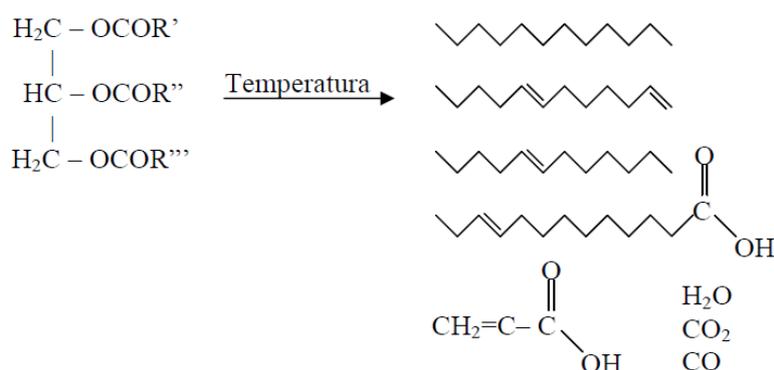


Figura 4.1 - Craqueamento de um triglicerídeo – adaptado de SUAREZ (2006).

O óleo pirolisado apresenta níveis aceitáveis de enxofre, água e material particulado, porém possui níveis inaceitáveis de cinzas, depósitos de carbono e

alto ponto de névoa (SHARMA *et al.*, 2001). Além disso, o equipamento para pirólise possui elevado custo e a remoção do oxigênio pelo uso de gás hidrogênio, diminui seus benefícios (PINTO *et al.*, 2005).

4.1.5.2. Microemulsificação

Para resolver o problema da elevada viscosidade dos óleos vegetais, as microemulsões com solventes tais como metanol, etanol e butanol vêm sendo investigadas (SUBRAMANIAM *et al.*, 2013).

Uma microemulsão é definida como uma dispersão isotrópica coloidal de microestrutura fluida termodinamicamente estável, com dimensões entre 1-150 nm, formadas espontaneamente, a partir de dois líquidos normalmente imiscíveis (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000).

Tem sido relatado que as microemulsões são formadas instantaneamente quando todos os componentes são colocados juntos nas proporções requeridas (FERNANDO & HANNA, 2005). As microemulsões podem ser preparadas a partir de óleos vegetais, ésteres e co-solventes (agente de dispersão), ou a partir de óleos vegetais, álcool e agentes tensoativos, misturado ou não com diesel fóssil (PINTO *et al.*, 2005).

Segundo MA e HANNA (1999) os componentes de uma microemulsão de biodiesel podem incluir o combustível diesel, óleo vegetal, álcool, agente tensoativo além de substâncias utilizadas para aumentar o índice de cetano (quanto maior o número de cetano, menor o tempo entre injeção do combustível e início da combustão, resultando em melhor qualidade de combustão), em proporções adequadas. Alcoois, tais como metanol, etanol e propanol são utilizados como aditivos de redução da viscosidade, alcoois superiores são utilizados como agentes surfactantes e os nitratos de alquila são usualmente utilizados como melhoradores do índice de cetano.

4.1.5.3. Transesterificação

O Biodiesel é mais comumente produzido em todo o mundo por alcoólise, também chamada de reação de transesterificação. A transesterificação é o processo de troca do grupo alcóxi de um composto de éster por álcool e a reação geralmente é catalisada por um ácido ou uma base. A transesterificação de óleos vegetais envolve a reação dos triglicerídeos (gordura / óleo) com álcool para formar ésteres e glicerol (MURUGESAN *et al.*, 2012).

Por ser uma reação reversível, utiliza-se álcool em excesso para deslocar o equilíbrio para obter o máximo de éster. Entre os álcoois, o metanol e o etanol são os mais usados principalmente o metanol por apresentar cadeia polar e curta (MA e HANNA, 1999). O Esquema de reação de transesterificação da produção de biodiesel está ilustrado na Figura 3.2, onde metanol é utilizado.

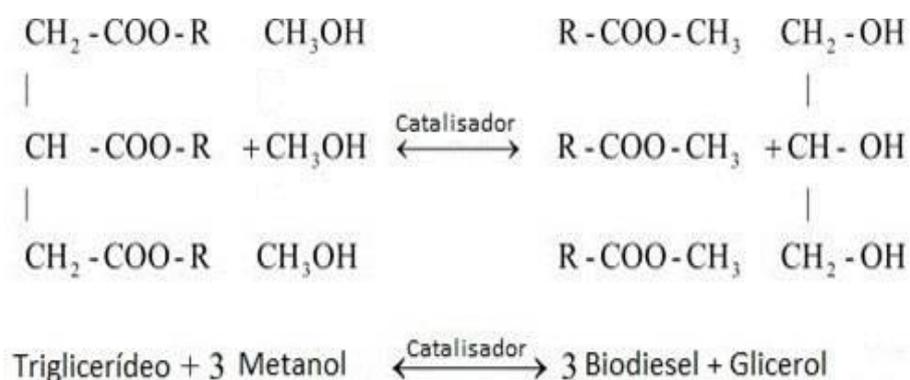


Figura 4.2 – Esquema da reação de transesterificação via rota metílica.

Após a transesterificação, tem-se no meio reacional uma mistura de ésteres, glicerol, álcool, catalisador, tri-, di- e mono glicerídeos. O coproduto, glicerol, deve ser recuperado devido ao seu valor como insumo para indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MA e HANNA, 1999).

Quando essa reação é realizada com etanol aumenta-se a sua complexidade, pois é necessário um maior tempo reacional, há maior dificuldade de separação de fases, pois o etanol possui menor polaridade que o metanol, além da necessidade de um etanol isento de água (o etanol anidro possui cerca de 7000 ppm de água, muito mais que o metanol, que possui 100ppm) e de uma

matéria prima também isenta de umidade (VIEIRA, 2005). De maneira geral, a razão molar entre álcool e óleo é maior quando etanol é utilizado.

Óleos e gorduras vegetais podem conter pequenas quantidades de água e ácidos graxos livres (AGL). Em uma reação catalisada por um álcali, o catalisador poderá reagir com o AGL de modo a formar sabão. Essa reação é indesejada porque o sabão diminui o rendimento do biodiesel e prejudica a separação dos ésteres e do glicerol. Além disso, esse sabão liga-se com o catalisador o que significa que será necessário mais catalisador e, portanto, o processo envolve um custo superior (VAN GERPEN *et al.*, 2004). Outro problema é que a água, originada a partir do próprio óleo ou gordura ou formada durante a reação de saponificação, retarda a reação de transesterificação, por meio da reação de hidrólise. Ela pode hidrolisar os triglicerídeos e diglicerídeos de forma a formar mais ácidos graxos livres.

A reação pode ser catalisada por bases (KOH, NaOH, carbonatos ou alcóxidos), ácidos (H_2SO_4 e HCl) ou enzimas (lipases). A catálise alcalina ocorre mais rapidamente além de apresentar maior rendimento, seletividade e menores problemas relacionados à corrosão dos equipamentos. Os catalisadores mais eficientes para esse propósito e, que são amplamente utilizados comercialmente, são KOH e NaOH (KHAN *et al.*, 2002).

A utilização de lipases isoladas e lipases imobilizadas como catalisadores enzimáticos vêm sendo uma das alternativas propostas na literatura para a obtenção de altas conversões em ésteres, porém o alto custo destes catalisadores aliado à sua rápida desativação na presença de álcool tem inviabilizado o seu uso comercial (VIEIRA, 2005).

4.1.5.4. Hidroesterificação

Tendo em vista os processos apresentados, e as dificuldades encontradas em cada um, o processo de hidroesterificação aparece como alternativa interessante para a produção de biodiesel. Esse processo é feito em duas etapas, envolvendo primeiramente uma etapa de hidrólise seguida pela esterificação. Sob condições favoráveis, os triacilgliceróis componentes das gorduras sofrem

hidrólise, com formação de glicerol e ácidos graxos. A reação é reversível; na prática, a hidrólise é favorecida por uso excessivo de água, altas temperaturas, pressão e ação de enzimas lipolíticas ou catalisadores químicos (GUNSTONE & NORRIS, 1983; SWERN, 1964).

Por conter uma etapa que hidrolisa a matéria prima, não há a necessidade de que essa matéria prima seja refinada, ou seja, que contenha o percentual de ácidos graxos livres abaixo de 2,5% em massa total, o que deve ser feito pelo processo de transesterificação para evitar a formação de sabões. Sendo assim, uma ampla variedade de matérias-primas podem ser utilizadas no processo de hidroesterificação, desde óleos e gorduras contendo naturalmente alto teor de acidez, a resíduos industriais e domésticos de óleos e gorduras.

Como cerca de 80% do custo de produção do biodiesel é proveniente do custo da matéria prima, a hidroesterificação permite um significativo salto na viabilidade da produção de biodiesel (ARANDA, 2005). A Figura 3.3 apresenta as reações envolvidas no processo de hidroesterificação – hidrólise e esterificação de triglicerídeos e ácidos graxos, respectivamente.

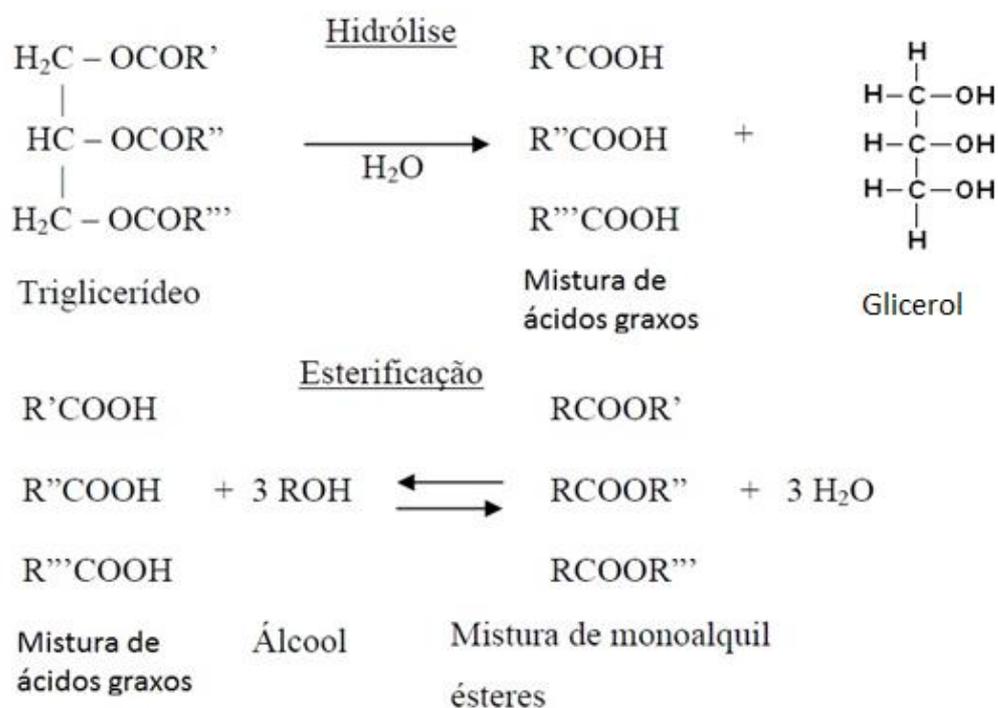


Figura 4.3 - Reações de hidrólise de triglicerídeos e de esterificação de ácidos graxos – Adaptado de Melo, 2008.

A hidrólise é uma reação química que ocorre entre um triglicerídeo e a água produzindo ácidos graxos e como coproduto o glicerol. Esta reação pode ocorrer na presença de catalisadores ácidos ou básicos.

Após a hidrólise, os ácidos graxos gerados, são esterificados utilizando metanol ou etanol, obtendo-se assim metil ou etil ésteres. É importante destacar que o glicerol não sofre qualquer alteração por parte de interação com o metanol ou com o biodiesel, uma vez que é removido ao final do processo de hidrólise. Dessa forma, esse coproduto que apresenta grande importância industrial, é obtido de forma mais pura do que o advindo do processo de transesterificação.

A esterificação gera então o biodiesel e como subproduto a água, que pode ser reutilizada no processo de hidrólise, fechando o ciclo. Isso facilita o processo de separação entre biodiesel e a glicerina livre e total. Dessa forma, o biodiesel produzido é mais puro e etapas de lavagem podem ser evitadas gerando-se menos efluentes e, menor consumo de compostos químicos.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos envolvendo o processo de hidroesterificação. De Sousa *et al.* (2010), empregaram lipase obtida de sementes de pinhão manso para a hidrólise de óleo de soja em pH controlado de 8.0 a 40°C durante 2 horas de reação alcançando até 97% em conversão e utilizando o óleo hidrolisado para a etapa de esterificação feita empregando ácido de nióbio como catalisador, razão molar de 1:3 AGL/álcool e 20% de massa do catalisador em relação a massa de AGL e realizada em reator auto-clave a 500 psi e 200°C por 2 horas com agitação constante (500 rpm) alcançando 97,1% em ésteres metílicos. Já Cavalcanti-Oliveira *et al.* (2010), empregaram lipase obtida a partir de *Thermomyces lanuginosus* em condições reacionais de 50% (v/v) de óleo de soja e 2,3% (v/v) de lipase em água destilada a 60°C obtendo 89% de conversão em AGL após 48 horas de reação. A partir do óleo hidrolisado e também empregando ácido de nióbio, empregaram razão molar de AGL/álcool de 1:3, concentração mássica de catalisador de 20% e 200°C, atingindo uma conversão de 92% em ésteres metílicos após 1 hora de reação.

Além destes autores, outros trabalhos também estudaram a hidroesterificação por rotas não enzimáticas, tais como Freitas *et al.* (2008) que

realizaram a hidrólise de óleo de macaúba em um reator a 300°C seguida por esterificação com metanol catalisada por ácido de nióbio e feita a 190°C. Almarales *et al.* (2012) empregaram óleo advindo da microalga *Nannochloropsis oculata* e obtiveram 92% em conversão em ácidos graxos livres a partir da hidrólise do óleo a 300°C com 20% de massa de catalisador ácido de nióbio. Para a esterificação o óleo hidrolisado foi submetido a 200°C, razão molar de metanol/AGL de 3 e 20% de ácido de nióbio como catalisador. Diaz *et al.* (2013) avaliaram a produção de biodiesel por meio da hidroesterificação de óleo de microalga advinda de *Monoraphidium contortum* e o óxido de nióbio suportado em alumina e impregnado com ácido fosfórico como catalisador para as duas etapas que foram realizadas em reator a 300°C para a reação de hidrólise para a qual foi alcançada conversão de até 95% em ácidos graxos livres e a 200°C para a reação de esterificação onde também uma conversão em ésteres de 95% foi atingida em condições de razão molar metanol/AGL de 3:1 e concentração de 20% de catalisador.

O óleo de Crambe apresenta uma acidez um pouco mais elevada do que outras oleaginosas tradicionais na produção de biodiesel, o que representaria um custo maior de neutralização, dessa forma, a hidroesterificação apresenta uma alternativa interessante para produção de biodiesel dessa fonte.

4.2. CATÁLISE

Os processos químicos consistem na transformação de matérias-primas em produtos por meio de reações químicas. Reações com interesse industrial têm que ser rápidas, o que se consegue frequentemente à custa de um catalisador. Por outro lado, a escolha criteriosa do catalisador permite muitas vezes obter produtos intermediários, menos estáveis termodinamicamente. Isto quer dizer que, o uso de catalisadores pode ser considerado como uma das variáveis (além da temperatura, pressão, composição e cinética) que permite controlar a velocidade e direção de uma reação química (FIGUEIREDO E RIBEIRO, 1987).

4.2.1. Catálise química

O desenvolvimento de estudos com o uso de catalisadores heterogêneos para promoção da reação de hidrólise ainda se encontra em fase inicial, Ngaosuwan *et al.* (2009), realizou a hidrólise da tricaprilina usando a zircônia tungstênio (WZ) e o ácido sólido SAC-13 (resina de nano partículas de Nafion em sílica mesoporosa) como catalisadores, com uma temperatura variando entre 110-150°C, em um reator semi batelada com adição contínua de água a baixas taxas de fluxo, obtendo-se conversões baixas (<40%).

Alguns dos catalisadores ácidos sólidos que têm sido investigados como potenciais substitutos para os ácidos minerais em reações de esterificação e transesterificação são: óxidos de tungstênio (FURUTA *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 2006), zircônia sulfatada (KANSEDO *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013), resina Amberlyst® 15 (REIS *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2013), sacarídeos sulfonados (MO *et al.*, 2008; SHU *et al.*, 2010; DESHMANE *et al.*, 2013). Os catalisadores ácidos sólidos foram efetivamente consolidados na esterificação de ácidos carboxílicos, porém a utilização destes catalisadores para obter uma elevada conversão de triglicerídeos para biodiesel exige temperaturas de reação muito maiores do que os catalisadores básicos devido à sua menor atividade para transesterificação (FURUTA *et al.*, 2004). Algumas resinas, tal como Amberlyst® 15, podem ser consideradas uma exceção, uma vez que estes catalisadores apresentam boas conversões tanto em reações de esterificação como em transesterificação sob condições suaves de reação, devido às suas elevadas concentrações de sítios ácidos (LÓPEZ *et al.*, 2005)e(REIS *et al.*, 2005). No entanto, a estabilidade térmica torna-se um problema quando os catalisadores tipo resina são utilizados em altas temperaturas, além disso, cabe ressaltar o elevado preço das resinas que em geral podem custar cerca de 1000 reais o quilograma.

Agropalma, um fabricante brasileiro que produz ácidos graxos, desenvolveu um método de esterificação para produzir biodiesel a partir de ácidos graxos usando um catalisador ácido heterogêneo baseado em nióbio (ANTUNES, 2005). KISS *et al.* (2006) estudaram vários ácidos sólidos (zeólitos, resinas de troca iônica, e misturas de óxidos de metal) como catalisadores para a esterificação de

ácido dodecanóico com 2-etil-hexanol, 1-propanol e metanol, a 130-180 °C, e zircônia sulfatada foi considerada o melhor catalisador. Zircônia sulfatada apresentou alta atividade e seletividade para a esterificação de ácidos graxos com uma variedade de álcoois. Este catalisador já é de interesse em vários processos industriais, tais como a isomerização de hidrocarbonetos, alquilação e esterificação (TANABEE HÖLDERICH, 1999). De acordo com o KISS *et al.* (2006), é um candidato interessante para a produção de biodiesel via catálise heterogênea ácida.

4.2.2. Catálise enzimática

Entre esses processos, a hidrólise enzimática apresenta vantagens econômicas e técnicas, pois pode ser realizada em condições amenas (20 a 40°C e pressão atmosférica), levando a um menor gasto energético em comparação aos processos físico-químicos (RITTNER, 1996).

Na hidrólise enzimática de óleos vegetais são utilizadas diferentes fontes de lipases como catalisador, podendo ser líquidas ou sólidas (catálise homogênea ou heterogênea), como por exemplo, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Rhizopusarrhizus*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomas sp.* e lipase pancreática (BUENO *et al.*, 2005).

4.2.2.1. Lipases

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (E.C.3.1.1.3), que são capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese de grupos ésteres de diversos compostos. As lipases são amplamente encontradas na natureza. Podem ser obtidas a partir de microrganismos naturais ou geneticamente modificados e também a partir de fontes animais e vegetais. A principal forma de produção de lipases tem sido a partir de culturas de micro-organismos, pois estes processos apresentam maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido (MONTEIRO *et al.*, 2001 e YASUKAWA *et al.*, 2004).

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade e propriedades químicas que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (VILLENEUVE *et al.*, 2000; HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

As lipases vêm sendo utilizadas em diversas áreas, algumas aplicações de destaque são: (KASAMATSU, 2005, CHENGELIS *et al.*, 2006 e BALCÃO *et al.*, 1996)

- Farmacêutica – síntese de intermediários de fármacos (ex. ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade antiinflamatória); resolução de misturas racêmicas (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo);
- Alimentos – síntese de aromas (ex. maturação de queijos); síntese de edulcorantes (ex. aspartame);
- Detergentes – remoção de manchas de gorduras dos tecidos;
- Agroquímica – síntese de inseticidas e pesticidas;
- Tratamento de efluentes – redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios;
- Oleoquímica – hidrólise e interesterificação de óleos e gorduras.

Lipases catalisam reações de substratos insolúveis em água (PANDEY *et al.*, 1999) e promovem a hidrólise de triacilgliceróis para ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (LEAL *et al.*, 2002). Sob certas condições, também catalisam reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificações em solventes orgânicos, sistemas bifásicos e em suspensões micelares. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (PANDEY *et al.*, 1999).

Os principais substratos das lipases são os triglicerídeos de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono), no entanto, estas enzimas atuam sobre uma gama de substratos não naturais (ésteres não lipídicos) de diversos

tamanhos. Essa versatilidade das lipases sugere que sua espinha dorsal polipeptídica seja flexível e que possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio, o que dificulta a modelagem e a previsão de interações estereo químicas entre enzima e substrato (BARON, 2003).

Em geral, a maior atividade catalítica de lipases ocorre na interface água/lipídeo, através do fenômeno chamado de ativação interfacial e tanto a qualidade quanto a área interfacial têm papel importante na atividade catalítica dessas enzimas (WAKABAYASHI, 2004 e BALCÃO *et al.*, 1996). A ocorrência da ativação interfacial juntamente com a existência de uma tampa polipeptídica (parte da proteína que recobre o sítio ativo) já foi utilizada como parâmetro de distinção entre lipases “verdadeiras” e esterases.

O fenômeno da ativação interfacial foi proposto por Sarda e Desnuelle (1958) após verificar diferença no comportamento das cinéticas entre enzimas. Os autores verificaram que a atividade de esterases era função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis e Menten, no qual a velocidade máxima ocorria antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e da formação de agregados e/ou interfaces. Já a atividade das lipases, se caracterizou por manter-se constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançada, e aumentando a partir desse ponto (DALLA-VECCHIA, 2004).

4.2.2.2. Lipozyme RM IM

A lipase comercial imobilizada Lipozyme RM IM empregada neste trabalho é obtida a partir do micro-organismo *Rhizomucor miehei* (RML) e possui alta atividade (275 IUN/g) boa estabilidade em diversas condições (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010a). Esta enzima extracelular foi descrita pela primeira vez em 1973 por Nagaoka e Yamada (1973). A enzima tem um peso molecular de 31.600 Da (Wu *et al.*, 1996) e é atualmente disponível comercialmente pela Novozymes na forma livre (Palatase 2000 L) ou na forma imobilizada (Lipozyme RM IM). O suporte da enzima imobilizada é Duolite ES 562, uma resina de troca

aniônica fraca com base em copolímeros de fenol-formaldeído (Huge-Jensen *et al.* 1987, Miller *et al.* 1988).

A hidrólise de triglicerídeos é uma reação fundamental para a produção de ácidos graxos ou glicerina. Embora a enzima provinda do micro-organismo *Rhizomuco miehei* é uma lipase *sn*-1,3 específica (hidrolisa os grupos 1 e 3 da molécula de triglicerídeo) a migração espontânea do grupo acilo a partir da posição 2 para as posições 1 ou 3 permite a hidrólise completa dos triglicerídeos como é mostrado pela Figura 3.4 (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010b).

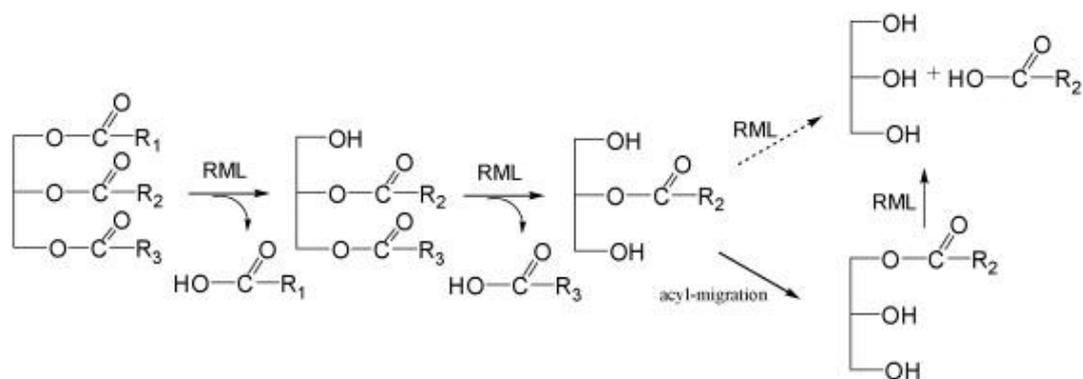


Figura 4.4 - Esquema geral da hidrólise completa de triglicerídeos catalisada pela RML para produzir ácidos graxos livres. Fonte: Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010b).

Alguns autores estudaram a hidrólise de triglicerídeos por via enzimática empregando a enzima lipase comercial Lipozyme RM IM obtida a partir do micro-organismo *Rhizomucor miehei* (RML), tais como Cheong *et al.* (2007) que avaliaram alguns efeitos na produção de diacilgliceróis a partir de óleo de palma utilizando condições de 50% em massa de teor de água, 10% em massa de teor de enzima em 12 horas de reação. Lo *et al.* (2004) também estudaram efeitos de variáveis no processo de hidrólise parcial do óleo de soja empregando, utilizando 10% de teor de catalisador e 10% de água presente no meio durante 4 horas de reação. Voll *et al.* (2012) estudaram a reação de hidrólise do óleo de palma realizando experimentos a 0,68%, 1,36% e 2,04% em relação à massa de substratos (água e óleo de palma) à temperatura de 55°C, com uma concentração inicial de água de 10% em relação ao óleo de palma e rotação de 400 rpm.

4.3. ÓLEOS E GORDURAS

Óleos e gorduras são substâncias pertencentes à classe dos lipídeos, podendo ter origem em diversas fontes, como no tecido adiposo de animais, em frutos e em sementes (AWADALLAK, 2012). Mais de 95% dos óleos e gorduras são constituídos de triacilglicerídeos, que são ésteres formados de glicerol e três ácidos graxos. Triacilglicerídeos são insolúveis em água e à temperatura ambiente varia em consistência de líquido a sólido. Em uso comum, quando eles são na maioria sólidos, são chamados de gorduras, e quando líquidos são chamados de óleos. Além de triacilglicerídeos, gorduras e óleos contém vários componentes menores como: mono e diglicerídeos (importantes como emulsionadores); ácidos graxos livres; tocoferol (importante antioxidante); esteróis e vitaminas de gorduras solúveis (FARIA *et al.*, 2002).

Gorduras animais são saturadas e em sua maioria sólidas à temperatura ambiente, como manteiga e sebo. Óleos vegetais por sua vez, tendem a ser líquidos e serem predominantemente insaturados, como os óleos de soja, oliva, milho, etc. Comumente também óleos provenientes de peixes podem ser predominantemente insaturados. Esses óleos podem ter a elevação do ponto de fusão através do processo de hidrogenação (BABICZ, 2009).

Os óleos vegetais são obtidos por meio do processo de extração de sementes ou frutos. Segundo PIGHINELLI *et al.* (2011), são três os métodos para extração de óleos: prensa hidráulica por batelada; prensa mecânica contínua (expeller); e extração por meio de solventes. Além disso, há a possibilidade de combinação dos métodos. O óleo extraído pode conter diversas impurezas, como gomas, ceras e ácidos graxos livres, os quais podem prejudicar sua qualidade e estabilidade. No caso de óleos comestíveis de baixa acidez efetua-se um processo químico de neutralização chamado de refino alcalino. Este processo é bastante simples e pode ser utilizado na maior parte das matérias-primas (BATISTA *et al.*, 1999), entretanto apresenta a desvantagem de gerar perda de uma parte do óleo neutro e vitaminas (PEIXOTO *et al.*, 2005).

4.3.1. Ácidos graxos livres

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos com cadeias de comprimento entre 4 e 36 carbonos (BOBBIO e BOBBIO, 1992). Em alguns ácidos graxos essa cadeia apresenta apenas ligações simples. Estes são conhecidos como saturados. Os que possuem ao menos uma dupla ligação na cadeia são chamados de insaturados, no caso de mais de uma são chamados de poliinsaturados. A posição da dupla ligação na cadeia difere ácidos graxos de igual número de carbonos (BABICZ, 2009). Há ainda a possibilidade de formação de isômeros “cis” e “trans”.

Para quesito de simplificação, usa-se nomear os ácidos graxos pelo comprimento da cadeia e o número de duplas ligações separadas por dois pontos. Dessa forma, um ácido graxo saturado com 16 carbonos é abreviado para 16:0, o ácido oléico, com 18 carbonos e uma dupla ligação entre o primeiro e o segundo carbono da cadeia é abreviado para 18:1 (BOBBIO e BOBBIO, 1992). As posições das duplas ligações são representadas por números seguidos da inicial do tipo de isomeria, assim, um ácido graxo de 20 carbonos, ligação dupla entre o nono e o décimo carbono (sendo o primeiro o carbono carboxílico), entre o décimo segundo e o décimo terceiro e entre o décimo quinto e o décimo sexto, com isomeria cis em todas as ligações, é designado por 20:3 9c12c15c. Vale ressaltar que é comum ocultar a posição das duplas ligações e o tipo de isomeria, uma vez que o mais usual é que a primeira ou única dupla ligação, normalmente cis se encontra no carbono “9” e as demais duplas ligações (quando ocorrem) se encontram com um espaçamento constante de 3 carbonos (LEHNINGER, NIELSON e COX, 1995). Na Tabela 3.1 estão relacionadas nomenclaturas e nomes usuais de diferentes ácidos graxos.

O ponto de fusão aumenta com o crescimento da cadeia e decresce com as insaturações. Isso se deve ao grau de empacotamento molecular. Moléculas totalmente saturadas, na conformação completamente estendida sofrem interferência estérica mínima dos átomos vizinhos e devido à morfologia da molécula átomos de cadeias vizinhas podem interagir por forças de Van der Waals, formando uma estrutura quase cristalina. A presença de ligações cis

provocam curvaturas na cadeia gerando interações mais fracas e resultando em menores pontos de fusão (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Tabela 4.1 - Nome e fórmulas de ácidos graxos (SCRIMGEOUR, 2005).

Ácido graxo	Nome comum	Fórmula
4:0	Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
6:0	Capróico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8:0	Caprílico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10:0	Cáprico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
12:0	Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Estearico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
18:1 9c	Oléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2 9c 12c	Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 9c 12c 15c	α -Linolênico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
22:1 13c	Erúcido	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

4.4. CRAMBE ABYSSINIAN

O Crambe (*Crambe Abyssinian*) é uma oleaginosa pertencente à família das crucíferas, originária da região de transição entre temperada e quente, com precipitação moderada, da Etiópia. Sua domesticação foi adaptada às regiões secas e frias do Mediterrâneo (LEPPIK E WHITE, 1975; WEISS, 1983). É uma planta que em muitos casos, cresce como erva daninha em campos cultivados, sob as árvores, e a beira de caminhos no campo, geralmente sozinhos e sem crescimento contínuo (CORNELIUS E SIMMONS, 1969). Como indicado pelos mesmos autores, o fruto (cerca de 530-1.840 frutos/planta) é de cor amarelo-

pálido, contendo uma única semente esférica, marrom-esverdeada na cor, e cerca de 0,8-2,55 mm de diâmetro.

São conhecidas 39 espécies deste gênero, distribuídas em quatro regiões geográficas: Macaronésia (12 espécies), mediterrâneo (4 espécies), Leste da África (3 espécies) e Eurosiberia - Suldeste da Ásia (20 espécies). O gênero *C. abyssinica* é endêmico do leste da África, na região da Etiópia (FRANCISO-ORTEGA *et al.*, 1999).

Ultimamente, os agricultores brasileiros que produzem soja mostraram grande interesse em crambe por causa de seus baixos custos de cultivo, colheita mecanizada e porque pode ser semeada como cultura de inverno em março ou abril, depois da soja. (FALASCA *et al.*, 2010).

No Brasil, é notória a adaptabilidade ao clima, rusticidade, precocidade, tolerância ao déficit hídrico e, a sua principal característica, ter ciclo de produção reduzido, cerca de 90 dias. Logo, o crambe apresenta-se como uma excelente alternativa para a rotação de culturas com grande potencial de expansão como alternativa de safrinha em boa parte do cerrado brasileiro, não competindo com as culturas principais e as alimentares, e tendo seu cultivo totalmente mecanizado com equipamentos utilizados em outros cultivos, como na soja, utilizando as mesmas estruturas (semeadoras, colhedoras, armazéns) (ROSCOE & DELMONTES, 2008).

O perfil de ácidos graxos desse óleo apresenta mais de 56% de ácido erúxico, tal ácido contém 22 átomos de carbono e apenas uma ligação dupla (WHITE *et al.*, 1972;. LEONARD, 1993; LAGHETTI *et al.*, 1995). Essa peculiaridade faz com que o óleo de crambe apresente boas características para lubrificantes, e também o torne matéria-prima adequada para as utilizações que não são abrangidas por outros óleos vegetais. O ácido erúxico pode, por exemplo, ser utilizado em processos de sintetização de vários derivados químicos, tais como erucamida (um aditivo para certos tipos de películas de plástico) e os derivados de enxofre (utilizados como aditivos de borracha), etc (LAZZARI *et al.*, 1994;HINMAN, 1986). Além disso, quando as sementes do crambe são processadas para o óleo, o subproduto é um alimento rico em proteínas com uma composição favorável de aminoácidos (LAGHETTI *et al.*, 1995). Porém, a sua

composição contém alcaloides e tioglucosídeos, o que o torna tóxico e, conseqüentemente, apenas adequado para incorporação restrita em rações (VAN ETTEN *et al*, 1965;. PETROSKI E TOOKEY, 1982).

A seguir são apresentados alguns pontos gerais de vantagens da cultura do crambe:

- Adaptabilidade ao clima;
- Rusticidade;
- Precocidade;
- Tolerância ao déficit hídrico;
- Ciclo de produção reduzido, cerca de 90 dias;
- Cobertura do solo;
- Rotação de culturas;
- Reciclagem de nutrientes;
- Redução de nematoides;
- A planta produz substâncias que repelem naturalmente os insetos.
- Não exige uso de maquinários específicos. Para o plantio e colheita, podem ser utilizadas as máquinas empregadas nas lavouras tradicionais como a soja e o milho.

Como desvantagens apresenta o fato de que o farelo e a torta possuem alguns componentes tóxicos e, portanto, apresentam limitação para a utilização em alimentação animal, destino para o qual normalmente seguem os resíduos das oleaginosas. Além disso, o crambe possui menor densidade em relação à soja, por exemplo, o que resulta no maior gasto com transporte. A colheita é feita a partir da cápsula inteira, que possui uma bolsa de ar entre a capa e o grão propriamente dito. A relação é de 60% em comparação com a soja, ou seja, um caminhão que tradicionalmente transportaria 36 toneladas desta oleaginosa consegue levar apenas 22 toneladas de crambe (FUNDAÇÃO MS, 2010).

4.4.1. Utilizações

Por apresentar majoritariamente ácidos graxos monoinsaturados é baixo o seu ponto de fusão, que segundo a Fundação MS (2010), é de -12°C. Essa propriedade é interessante tratando-se do ponto de vista de biocombustíveis e lubrificantes.

O óleo de crambe possui alta capacidade de remoção de calor, o que é importante para a utilização como lubrificante. Apresenta bom desempenho como fluido hidráulico. Pode ser empregado na fabricação de polímeros plásticos com boa capacidade deslizante, utilizados, por exemplo, em linhas de empacotamento rápido, sacolas plásticas e tampas de garrafas. No setor agrícola, pode substituir o óleo mineral como adjuvante em aplicações de herbicidas, fungicidas e inseticidas (AIR, 1997).

O óleo de crambe totalmente hidrogenado é um sólido branco que tem valor potencial como componente de composições de cera (SPENCER *et al.*, 1974).

Uma utilização em potencial está no campo industrial para produtos de ácido erúcido, tal ácido é obtido por saponificação do óleo de crambe. O ácido erúcido é utilizado pela indústria na produção de poliéster, resinas alquídicas, plastificantes, lubrificantes, aditivos de borracha, agentes tensoativos, nylon, entre outros polímeros (tintas, vernizes, esmaltes), além de também ser usado no fabrico de produtos farmacêuticos, aromas sintéticos e agentes de flotação (CORNELIUS E SIMMONS, 1969; VARGAS-LOPEZ *et al.*, 1999; EMBRAPA, 2013b).

O farelo de crambe pode ser utilizado como suplemento de proteínas para o gado, podendo conter de 25 a 58% de proteína. Por causa de sua equilibrada composição de aminoácidos, a incorporação à ração do gado foi aprovada nos EUA. (OPLINGER *et al.*, 1991). A ingestão do farelo por não ruminantes não é adequada, uma vez que contém glucosinolatos, que pode ser quebrado em partes pelo sistema digestivo, gerando compostos que podem causar danos ao fígado e rins e perda de apetite. No entanto, se a semente inteira é aquecida úmida antes de ser processada, as enzimas que liberam compostos tóxicos são desativados e os glucosinolatos permanecem intactos após a extração do óleo. (FALASCA *et al.*, 2010).

Chhikara *et al.* (2012) ainda destaca a boa propriedade agronômica do crambe, tendo potencial para fito-remediação de solos de metais pesados e sedimentos contaminados.

Mesmo para o mercado de biodiesel, menos especializado e de menor remuneração, o óleo de crambe apresenta grande competitividade, além e vantagens em relação aos outros óleos vegetais, com baixo custo de produção e aproveitando de áreas geralmente ociosas durante o outono/inverno, o crambe em menor risco pode representar uma importante fonte na diversificação da matriz de óleo para o biodiesel. Além disso, as características de alta estabilidade e baixo ponto de fusão do óleo de crambe representam uma importante vantagem para a cadeia produtiva de biodiesel, pois permite maior flexibilidade para o transporte e armazenamento do produto (FUNDAÇÃO MS, 2010).

4.4.2. Contexto histórico

Seu cultivo começou provavelmente na década de 1930 na ex-URSS (MASTEBROEK *et al.*, 1994). Desde então, a colheita se estendeu a Polónia, a Suécia, os EUA e Países Baixos. Ao mesmo tempo, novas variedades melhoradas foram introduzidas (MASTEBROEK *et al.*, 1994). Em 2000, *C. abyssinica* foi cultivada nos Estados Unidos, Canadá, vários países europeus, Paquistão e Índia, e foi introduzida na China (WANG *et al.*, 2000) e Itália (FONTANA *et al.*, 1998), com um rendimento de até 900 - 1130 kg de óleo por hectare (MASTEBROEK *et al.*, 1994, FONTANA *et al.*, 1998). No entanto, como indicado por Carlsson *et al.* (2007), o crambe, está ainda em desenvolvimento, como uma colheita agrícola, não é de grande dimensão, mas, devido às utilizações potenciais do óleo de semente para a produção de muitos produtos valiosos (produtos farmacêuticos, lubrificantes, plastificantes, surfactantes, cosméticos, etc), muitos novos países (Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Itália, Portugal, Reino Unido e Argentina) têm demonstrado um interesse científico nele.

4.4.3. Contexto Brasileiro

Com a criação do Programa Nacional Uso e Produção de Biodiesel, o Crambe foi logo identificado como oleaginosa com potencial de cultivo e os trabalhos de pesquisa, realizados principalmente pela Fundação MS, foram intensificados, com o objetivo de disponibilizar uma cultivar e desenvolver a tecnologia de produção para esta nova oleaginosa. Deste trabalho, em 2007, foi obtido o registro da primeira cultivar de crambe desenvolvida no Brasil, a FMS Brilhante.

A introdução de material genético que deu origem a cultivar FMS Brilhante foi feita pela Fundação MS em 1995. O objetivo inicial da introdução do crambe, juntamente com outras culturas outono/inverno, foi avaliá-lo como cultura de cobertura do solo para o plantio direto. Apesar da boa adaptação inicial, a tentativa de expansão da cultura não teve êxito, pois o nabo forrageiro se mostrava superior, produzindo muito mais massa para a cobertura do solo. Nesta época o crambe já demonstrou seu bom potencial de produção de grãos, mas não havia mercado. Mesmo assim, as pesquisas com a cultura foram direcionadas para a produção de grãos, iniciando-se o trabalho de seleção e multiplicação de sementes das linhagens obtidas. (FUNDAÇÃO MS, 2010).

A produtividade da FMS Brilhante durante a fase de sua criação esteve a 1.000 a 1.500 kg.ha⁻¹. Em parcelas experimentais da Fundação MS, já foram registradas produtividades de 2.300 kg.ha⁻¹ (MAI NETO, 2009; Fundação MS, 2010).

Segundo a Fundação MS (2010), embora considerado de clima frio, o crambe tolera temperaturas mais elevadas do que a colza e a canola, por exemplo. Com isso, quando cultivado no inverno, o crambe vem apresentando bons resultados não somente em condições climáticas do sul do Brasil e sul do Mato Grosso do Sul, mas também de regiões mais quentes do Centro Oeste (norte do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás).

A Figura 3.5 apresenta uma imagem da lavoura de crambe em Maracaju, MS, pertencente à Fundação MS.



Figura 4.5 - Lavoura de crambe em Maracaju MS. Fonte: Fundação MS.

Segundo o pesquisador da Fundação MS, Renato Roscoe, Goiás conta com 3,5 mil hectares plantados (regiões de Itumbiara, Rio Verde, Jataí, Luziânia e Formosa) e o Mato Grosso do Sul, com 3 mil hectares (municípios de Ponta Porã, Maracaju, Dourados, São Gabriel e Chapadão do Sul). No MS o ciclo de produção é de março a maio enquanto em GO fica entre fevereiro e abril.

O crambe é uma cultura que apresenta pouco ataque de pragas. Tal fenômeno é atribuído a presença dos glucosinolatos em seus tecidos. O metabolismo desses compostos produz componentes tóxicos, funcionando com uma proteção natural contra ataques de pragas. Foi observado pela Fundação MS que por diversas vezes culturas como soja e sorgo foram atacadas por pragas sem que as plantas de crambe fossem atacadas, sugerindo que as pragas evitam essa cultura.

Com o objetivo de avaliar o potencial de produção do crambe e as características físico-químicas do óleo e do biodiesel obtidas desses grãos, Jasper (2009) concluiu, após análise, que o biodiesel do *Crambe abyssinica Hochst* se encontra de acordo com normas estabelecidas na Resolução nº 7 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

Os estudos no Brasil, relacionados à cultura e à produção de óleo do crambe iniciaram-se recentemente, quando os produtores e pesquisadores nacionais

passaram a ter acesso a cultivar FMS Brilhante, comercializada pela Fundação Mato Grosso do Sul.

4.4.4. Extração

Os grãos inteiros possuem entre 26 a 40% de óleo, variação essa relacionada com a região de produção e os diferentes materiais existentes. No Brasil, os valores da variedade FMS Brilhante tem ficado acima de 36%. Em média pode-se considerar que o teor de óleo extraível por solvente está em torno de 35%, sendo mais elevado que as duas principais oleaginosas cultivadas no Brasil, soja e algodão. A Tabela 3.2 apresenta dados de teores e produtividade de algumas culturas no Brasil.

Tabela 4.2 - Teores médios de óleo e produtividade de óleo por hectare para oleaginosas.

Oleaginosa	Teor de óleo (%)	Produtividade (kg óleo/ha)
Soja	18	600
Algodão	15	300
Crambe	35	420
Nabo forrageiro	35	150
Colza/Canola	38	700
Girassol	43	500 – 1000
Mamona	48	300 - 600

Fonte: Roscoe(2007)

Considerando a extração mecânica, a quantidade de óleo extraído cai sensivelmente. Testes utilizando equipamentos disponíveis no mercado têm extraído em torno de 70% do óleo total. Essa eficiência tem sido alcançada em prensas com sistemas de pré-aquecimento (cozinhadores ou sistemas de extrusão). Em ensaio realizado em parceria entre a Fundação MS e a Universidade Católica Dom Bosco, utilizando prensa mecânica sem pré-aquecimento e dupla prensagem, atingiu-se a eficiência de 79% na extração do óleo (SOUZA *et al.*, 2009).

4.4.5. Estabilidade do óleo

O principal mecanismo de deterioração dos óleos é a oxidação dos ácidos graxos. Esta reação envolve as chamadas insaturações que são ligações duplas entre os átomos de carbono que formam a molécula de ácido graxo. A intensidade da oxidação aumenta acentuadamente com o aumento do número de duplas ligações nos óleos. O óleo de crambe, por apresentar, majoritariamente, ácidos graxos monoinsaturados tem alta estabilidade oxidativa. Em estudo feito pela Fundação MS de estabilidade térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) o óleo de crambe FMS Brilhante, adicionando de antioxidante, manteve-se estável por 800 minutos a 140°C, enquanto o que o óleo de soja, também contendo antioxidante, iniciou o processo de degradação após 70 minutos. Este resultado é muito positivo, pois permite reduzir os gastos de armazenamento de óleo e permite estender o tempo para comercialização.

4.4.6. Torta e Farelo

Dependendo da tecnologia de extração do óleo, o coproduto apresenta características diferentes. Quando se faz a extração mecânica, o produto resultante é a torta, com um residual de óleo em torno de 20%. No processamento com solvente, a extração é mais eficiente e o residual de óleo é de cerca de 2% no coproduto denominado, então, de farelo. Assim, as tortas apresentam maior valor energético em relação ao farelo, porém, o último possui maior percentual de proteínas. (FUNDAÇÃO MS, 2010).

Normalmente o farelo é utilizado para alimentação animal. No entanto, apesar de apresentarem alto valor proteico, a torta do crambe possui substâncias tóxicas que dificulta o uso direto para esse fim. Por isso, recentemente, pesquisadores da Embrapa em parceria com a Fundação MS e pesquisadores da Unicamp, estão desenvolvendo pesquisas com o objetivo de reduzir ou eliminar esses compostos da torta, de modo a permitir o uso delas como componentes de rações, agregando valor às cadeias produtivas. Para tanto, os cientistas estão se valendo tanto do melhoramento genético, para obter cultivares não tóxicas,

quanto de processos físicos, químicos e biológicos para remover ou reduzir a concentração das substâncias indesejadas.

4.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento de experimentos é uma ferramenta de análise estatística que tem por objetivo desenvolver e aperfeiçoar processos, pois determinam quais variáveis exercem maior influência no desempenho deste. Dessa forma melhorias como o aumento de rendimento, redução do tempo de reação, redução da variação do processo e melhor concordância entre valores obtidos experimentalmente e os previstos podem ser aplicadas, possibilitando a redução do custo operacional. Esse método permite resolver, eficientemente, esses problemas durante os estágios iniciais do processamento do produto (MONTGOMERY, 2003).

Segundo Kalil *et al.* (2000) o planejamento fatorial e a análise de superfície de resposta são importantes ferramentas para determinar as condições ótimas de processos. O planejamento de um conjunto de variáveis é vantajoso em comparação com o método convencional, que lida com um único parâmetro por experimento, como tal, é uma abordagem frequentemente falha para localizar as melhores condições, devido à sua incapacidade de considerar os possíveis efeitos de interações entre os fatores.

O planejamento fatorial é usado para descrever um fenômeno através de um modelo matemático, realizando o mínimo de experimentos possíveis, permitindo eficiência e economia no processo experimental com a seleção do modelo plausível e estimação eficiente dos parâmetros do modelo selecionado (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

A escolha dos critérios, tais como, as variáveis independentes envolvidas (controladas no processo, também chamadas de fatores ou regressores), a faixa de variação destas (que delimita a quantidade de níveis) e a variável de resposta (grandeza medida), devem ser pré-definidas para dar objetividade à realização do planejamento (Calado & Montgomery, 2003).

4.6. MODELAGEM CINÉTICA

O desenvolvimento de modelos matemáticos e a simulação computacional de processos, tais como de hidrólise, apresentam-se como uma importante ferramenta, pois permite a transferência de tecnologia da escala laboratorial para industrial. Os modelos matemáticos e as técnicas computacionais, quando adequados, auxiliam na identificação dos mecanismos envolvidos no processo, na análise e interpretação de dados experimentais de um sistema multivariável, na predição de respostas a mudanças de condições de operação e na otimização dos processos (VOLESKY, 2001).

O estudo cinético das reações catalisadas por lipases geralmente é realizado para enzima e substratos considerando uma dissolução homogênea, onde a interação entre a enzima e o substrato insolúvel na interface deve ser considerada (FACCIO, 2004). Michaelis e Menten foram dois pesquisadores que propuseram um modelo de equilíbrio para reações enzimáticas envolvendo apenas um substrato, no qual a reação é considerada como um processo de duas etapas. (MARANGONI, 2003).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos envolvendo a cinética enzimática de óleos vegetais, Voll (2011) e Al-Zuhair *et al.* (2003) desenvolveram modelo cinético para os quais estimaram parâmetros para a reação de hidrólise enzimática do óleo de palma utilizando lipase Lipozyme RM IM e *Candida rugosa*, respectivamente. Fadiloğlu e Söylemez (1997) realizaram o estudo cinético da hidrólise enzimática do óleo de oliva também utilizando a lipase *C. rugosa*. Todos esses estudos desenvolveram modelos baseados na cinética de Michaelis-Menten. Kroumov *et al.* (2007) desenvolveram um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel e a partir de modificações tal trabalho foi utilizado como base para modelagem e obtenção de parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática do óleo de crambe no presente trabalho.

Para o desenvolvimento de um modelo cinético para a hidrólise enzimática do óleo de crambe, faz-se necessário a compreensão dos mecanismos reacionais e com base neles são desenvolvidas as taxas das reações para todos os compostos. Para completar o modelo um balanço molar deve ser feito, e condições iniciais estabelecidas, tendo dessa forma condições de resolver um sistema de equações e por intermédio de um programa que ajuste dados experimentais é possível simular o valor de parâmetros envolvidos no modelo.

4.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão da literatura revela o destaque do óleo de crambe devido a sua alta produtividade, baixo custo de plantio, ser uma cultura de entre safra, e ainda apresentar um alto teor de óleo. Como não pode ser utilizado pelo setor alimentício o crambe apresenta vantagens quando empregado na produção de biodiesel. Os métodos utilizados atualmente para a produção industrial do biodiesel utilizam catalisadores homogêneos, hidróxido de sódio ou de potássio, o que requer matérias primas refinadas, com baixo teor de ácidos graxos livres, tornando a produção desse biocombustível dispendiosa, já que a principal matéria-prima utilizada, óleo de soja refinado, tem um custo elevado. Dessa forma, o processo de hidroesterificação, por apresentar duas etapas, sendo elas hidrólise do óleo, que tem a finalidade de transformar os triglicerídeos em ácidos graxos livres, seguida pela esterificação representa uma alternativa em potencial, por possibilitar o uso de matérias-primas mais baratas.

Dentro desse contexto, o presente trabalho se dispõe a estudar um método alternativo para a produção de biodiesel, que possibilita o uso de uma matéria-prima com menor custo, o óleo de crambe bruto. Utilizando ferramentas como planejamento experimental e modelagem matemática o trabalho teve por objetivo estudar efeitos de variáveis presentes na etapa de hidrólise enzimática, além de concluir o processo de hidroesterificação realizando a reação de esterificação.

A literatura apresenta alguns trabalhos envolvendo a hidroesterificação de óleos vegetais, porém nenhum deles realizado com o óleo de crambe. O presente

trabalho dessa forma contribui de forma a avaliar condições de processamento para produção de biodiesel utilizando um óleo pouco estudado.

5. METOLOGIA

5.1. REAGENTES

O substrato da reação de hidrólise utilizado neste trabalho foi o óleo de crambe bruto, cedido gentilmente pela Fundação MS (Maracaju/MS). A lipase comercial Lipozyme RM IM, utilizada como catalisador foi cedida pela LNF Latino Americana, a enzima apresenta-se na forma granulada imobilizada em suporte de resina fenólica e gelatina de peixe, possui massa molecular de 36 kDa. Uma solução de fenolftaleína (Synth®) foi utilizada como indicador para medidas de acidez do óleo. Etanol (Chemco®) e Éter etílico (BIOTEC®) absolutos foram utilizados no processo de medição para diluição da amostra e NaOH (Synth®) foi utilizado como titulante na determinação de acidez. No preparo das amostras para análise em cromatografia gasosa foram utilizadas soluções metanólicas de BF3 13-15% e NaOH (Synth®) 0,5 N e heptano absoluto (Synth®) e o padrão interno metil heptadecanoato, pureza >99% (Sigma Adrich®) para a análise cromatográfica do teor de ésteres.

5.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

5.2.1. Quantificação Ácidos Graxos Livres

Para determinação do percentual de AGL utilizou-se o método de titulação ácido/base Cd3d-63, recomendado pela AOCS (1998). A titulação foi realizada com solução de NaOH. Aproximadamente 1 grama de óleo e duas gotas de solução de fenolftaleína foram diluídas em 50 ml de uma solução 1:1 Etanol/Éter. Esta solução foi titulada com uma solução de NaOH 0,05 M sob agitação vigorosa até mudança de coloração (mudança súbita de uma coloração branca para rosa). A porcentagem de acidez do óleo foi calculada pela Equação (01).

$$Ac = 100\% \times \frac{Vol M_{NaOH} PM_{AGL}}{pa} \quad (1)$$

Onde:

Vol = Volume de solução de NaOH gasto na titulação (L);

M_{NaOH} = Concentração molar da solução de NaOH (mol/L);

PM_{AGL} = Massa molar média dos ácidos graxos presentes no óleo de crambe;

pa = massa da amostra de óleo (g).

A massa molar média dos AGL foi calculada a partir da média ponderada das massas moleculares dos ácidos graxos constituintes do óleo de crambe, para isso foi feita a caracterização do perfil dos ácidos graxos do óleo de crambe utilizado nesse trabalho.

5.2.2. Composição de Ácidos Graxos do óleo de crambe

A análise de ácidos graxos totais foi realizada no laboratório pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá. A análise foi realizada em cromatografia gasosa seguindo a normativa EN 14103 (2003). Pesou-se 60 mg de amostra em um tubo falcon com tampa de rosca. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de solução metanólica de NaOH 0,5 N. O tubo foi fechado e colocado em um banho, com a água em ebulição. Após permanecer no banho por 10 minutos, os tubos foram então retirados e adicionaram-se 2,0 mL da solução metanólica de BF₃ 13-15% e, novamente foram colocados no banho por 5 minutos. Após o tempo determinado, os tubos foram retirados do banho e resfriados por 1 minuto sob temperatura ambiente. Foram adicionados 3mL de heptano e depois foi realizada uma agitação por 30 segundos. Deixou-se decantar para que as fases fossem separadas e com uma pipeta de Pasteur foi retirada a parte superior para análise.

Determinou-se o percentual de ácidos graxos totais utilizando um cromatógrafo gasoso (Agilent GC 7890 A), equipado com uma coluna capilar ZB-

WAX (Zebron), (30 m x 0,25 mm d.i.). As condições foram: injeção split, 1:50; temperatura da coluna: 120°C, programada até 180°C numa taxa de 15°C/min, a uma taxa de 5°C/min foi elevada até 210°C e novamente programada até 240°C numa taxa de 10 °C/min e foi mantida nesta temperatura por 5 minutos; gás de arraste: hélio, a 1,5 mL/min; temperatura do injetor: 250°C. As amostras foram então injetadas (2 µL) em duplicata.

5.2.3. Composição de ésteres

A determinação do teor de ésteres nas amostras foi realizada a fim de determinar a conversão da reação empregando sistema de cromatografia gasosa, mediante uso de padrão interno metil heptadecanoato, conforme a Normativa Europeia EN 14103 (2003). No preparo da amostra para injeção colocou-se em um balão volumétrico de 10 mL aproximadamente 0,30 g da amostra, completando o volume do balão volumétrico com heptano. Em seguida, adicionou-se em um vial 0,08 g da amostra contida no balão volumétrico e 0,10 g de solução de padrão interno (150 mg/mL). Injetou-se 2 µL da amostra no cromatógrafo gasoso, o qual forneceu as análises da composição de ésteres.

5.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.3.1. Hidrólise enzimática

As condições reacionais (temperatura e razão mássica de catalisador/substrato) utilizadas nos experimentos realizados neste trabalho foram baseadas nos estudos desenvolvidos por AWADALLAK (2012), VOLL (2011) e WATANABE *et al.* (2005), enquanto as condições de razão molar água/óleo foram escolhidas de maneira a ser usado um excesso de água. As reações de hidrólise enzimática do óleo de crambe foram realizadas em sistema fechado e batelada. Em frascos Erlenmeyer foram adicionados 20 gramas de óleo de crambe, e as determinadas quantidades de catalisador e água destilada. As suspensões foram

agitadas em uma incubadora refrigerada com agitação de 130 rpm. Após quatro horas de reação, as suspensões foram filtradas por meio de papel filtro para remover o catalisador heterogêneo que permaneceu na forma inicial, e os ácidos graxos livres presentes na fase líquida foram determinados pelo método de titulação.

As reações de hidrólise foram realizadas com base em dois planejamentos fatoriais. No primeiro, o efeito da temperatura, razão molar de água/óleo (M_a/M_o) e proporção de massa catalisadores/massa total (m_c/m_t) foram avaliados utilizando planejamento composto central rotativo (DCCR). Na Tabela 4.1, os níveis variáveis do DCCR são apresentados e na Tabela 4.2 os experimentos realizados. Visando otimizar o teor de catalisador necessário a reação de hidrólise enzimática, um novo planejamento com ponto central (2^2) foi realizado para avaliar os efeitos da razão massa de catalisador/massa total e do nível de rotação (R) da mistura. Estes experimentos foram conduzidos à temperatura constante (58,4°C) e razão molar de água/óleo (10,4). Os experimentos do segundo planejamento fatorial foram realizados utilizando um agitador magnético. Os níveis dos fatores assim como os valores reais e codificados das variáveis estudadas são apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4.

Reações adicionais também foram realizadas para estudar o efeito da temperatura na reação de hidrólise enzimática. Essas reações foram realizadas com nível de rotação de 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato de 2,2% e razão molar água/óleo de 10:1 utilizando-se a chapa agitadora magnética para agitação e aquecimento.

Tabela 5.1 - Níveis de variáveis no planejamento experimental.

Valores codificados	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	41,6	45	50	55	58,4
Razão molar água/óleo	3,64	5	7	9	10,36
Teor de enzima (%)	0,52	0,86	1,36	1,86	2,2

Tabela 5.2 - DCCR com três variáveis com pontos centrais e axiais.

Experimento	Valores codificados			Valores Reais		
	T	Água/óleo	m/m	T	Água/óleo	m/m
1	-1	-1	-1	45	5	0,86
2	1	-1	-1	55	5	0,86
3	-1	1	-1	45	9	0,86
4	1	1	-1	55	9	0,86
5	-1	-1	1	45	5	1,86
6	1	-1	1	55	5	1,86
7	-1	1	1	45	9	1,86
8	1	1	1	55	9	1,86
9	-1,682	0	0	41,6	7	1,36
10	1,682	0	0	58,4	7	1,36
11	0	-1,682	0	50	3,64	1,36
12	0	1,682	0	50	10,36	1,36
13	0	0	-1,682	50	7	0,52
14	0	0	1,682	50	7	2,2
PC1	0	0	0	50	7	1,36
PC2	0	0	0	50	7	1,36
PC3	0	0	0	50	7	1,36

Tabela 5.3 - Níveis de variáveis no planejamento experimental padrão.

Valores codificados	-1	0	1
Rotação (rpm)	450	620	790
Teor de enzima (%)	1,7	2,2	2,7

Tabela 5.4 - Valores reais e codificados para o planejamento de duas variáveis.

Experimento	Valores Codificados		Valores Reais	
	Rotação	Teor de enzima	Rotação (rpm)	Teor de enzima (%)
1	-1	-1	450	1,7
2	1	-1	790	1,7
3	-1	1	450	2,7
4	1	1	790	2,7
5	0	0	620	2,2
6	0	0	620	2,2
7	0	0	620	2,2

5.3.1.1. Testes preliminares

Inicialmente, duas enzimas lipases, cedidas pela empresa LNF Latino Americana, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, foram testadas a fim de se avaliar qual atingiria maior conversão. Os testes foram realizados utilizando-se 30 gramas de óleo, 3 gramas de água deionizada e 1,36% de enzima em massa total de substrato. A reação foi feita em reator de vidro (Erlenmeyer - 125 mL) dentro de uma incubadora refrigerada com agitação de 130 rpm e temperatura de 55°C, durante 2 horas.

5.3.1.2. Planejamento experimental

Os resultados dos planejamentos experimentais foram analisados estatisticamente por meio do teste *t-student*. O nível de significância foi de 95%. O gráfico de Pareto e a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foram utilizados para analisar a conversão de AGL como uma função das variáveis independentes. As equações RSM (Equação 2) levam em conta apenas os coeficientes significativos. O *f-teste* foi realizado para determinar a qualidade de ajuste do modelo obtido. Nas análises estatísticas o software Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., EUA) foi utilizado.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{33} \cdot X_3^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (2)$$

Em que:

Y = função resposta;

β_0 = coeficiente relativo à intercepção do plano com o eixo de resposta;

β_1, β_2 e β_3 = coeficientes lineares estimados;

β_{22}, β_{11} e β_{33} = coeficientes quadráticos estimados;

β_{12}, β_{13} e β_{23} = coeficiente de interação entre as variáveis;

5.3.1.3. Cinética

Testes cinéticos em diferentes temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) também foram realizados. Para tanto, 25 gramas de óleo de crambe foram pesadas em balança analítica diretamente em um reator de vidro (Erlenmeyer - 125 mL). Em seguida 2,2%, em massa total de substrato, de enzima e água destilada (razão molar água/óleo 10) foram pesadas e adicionadas ao reator. Essas reações foram realizadas com nível de rotação de 790 rpm, utilizando-se a chapa agitadora magnética para agitação e aquecimento. Passado o tempo determinado as amostras foram filtradas para análises de ácidos graxos livres. As reações foram realizadas nas condições ótimas encontradas, e experimentos foram feitos para cada determinado tempo de reação.

5.3.2. Reação de esterificação

A etapa de esterificação foi realizada a partir dos ácidos graxos livres obtidos a partir da condição ótima de hidrólise do óleo. Dez gramas de óleo hidrolisado e 2,17 gramas (5% em massa total de substrato) de catalisador (Amberlyst 15®) foram pesadas e adicionadas a um balão de três bocas, assim como 38 ml de metanol (razão molar 30:1 entre metanol/óleo), a alta razão molar foi escolhida de

maneira a existir excesso de metanol durante todo o tempo de reação, já que o metanol evapora e o volume do balão não era completamente preenchido. O balão foi conectado a um condensador a fim de condensar o metanol evaporado e a agitação e aquecimento foram feitos a partir de uma chapa de agitação magnética com controle de temperatura. Ao final de 4 horas de reação, o conteúdo do balão foi filtrado, por meio de papel filtro para retirada do catalisador, em seguida seco em estufa a 70°C por 12 horas para posterior análise de ésteres por meio de cromatografia gasosa.

5.4. MODELAGEM MATEMÁTICA

Neste trabalho, foi descrita, por meio de modelagem matemática, a cinética reacional da hidrólise enzimática do óleo de crambe em sistema fechado e batelada. A enzima utilizada para obtenção dos dados experimentais foi a lipase comercial Lipozyme RM IM, sem adição de solvente ou surfactante. Na elaboração do modelo matemático foram consideradas as seguintes hipóteses:

- (i) a Hipótese do Estado Pseudo-Estacionário (HEPE), a qual considera que, como um intermediário reativo reage tão rápido quanto é formado, a velocidade de formação do intermediário ativo resultante é nula (FOGLER, 2009);
- (ii) cinética de Michaelis-Menten;

O mecanismo proposto para a reação é apresentado pelas Equações (3) a (11).



Entretanto, as reações (3), (4) e (5) possuem reações intermediárias. A reação (3) é intermediada pelas reações (6) e (7), a reação (4) é intermediada pelas reações (8) e (9) e a reação (5) pelas reações (10) e (11), onde

$[TG.E]$, $[DG.E]$ e $[MG.E]$ representam os complexos formados por tri, di e monoacilglicerídeos, respectivamente, com a enzima.



Aplicando o balanço molar para cada espécie e considerando a produtividade com base na estequiometria, obtém-se o modelo da cinética enzimática para as diversas espécies envolvidas no mecanismo de produção de ácidos graxos, conforme as equações (12) a (25), onde r_{TG} , r_{DG} , e r_{MG} representam as velocidades de reação para cada componente.

$$\frac{d(C_{TG}(t))}{dt} = r_{TG}(t) \quad (12)$$

$$\frac{d(C_{DG}(t))}{dt} = r_{DG}(t) - r_{TG}(t) \quad (13)$$

$$\frac{d(C_{MG}(t))}{dt} = r_{MG}(t) - r_{DG}(t) \quad (14)$$

$$\frac{d(C_{H_2O}(t))}{dt} = r_{DG}(t) + r_{TG}(t) + r_{MG}(t) \quad (15)$$

$$\frac{d(C_{GL}(t))}{dt} = -r_{MG}(t) \quad (16)$$

$$\frac{d(C_{AGL}(t))}{dt} = -r_{DG}(t) - r_{TG}(t) - r_{MG}(t) \quad (17)$$

E pela consideração de HEPE, tem-se que:

$$\frac{d(C_{TG.E}(t))}{dt} = r_{[TG.E]}(t) = 0 \quad (18)$$

$$\frac{d(C_{DG.E}(t))}{dt} = r_{[DG.E]}(t) = 0 \quad (19)$$

$$\frac{d(C_{MG.E}(t))}{dt} = r_{[MG.E]}(t) = 0 \quad (20)$$

As taxas dos complexos enzimáticos $r_{[TG.E]}$, $r_{[DG.E]}$ e $r_{[MG.E]}$ foram representadas pelas Equações (21), (22) e (23). Estas equações foram utilizadas para calcular as concentrações dos complexos enzimáticos.

$$r_{[TG.E]}(t) = K_1 \cdot C_{TG}(t) \cdot C_E(t) - K_2 \cdot C_{[TG.E]}(t) - K_3 \cdot C_{H_2O}(t) \cdot C_{[TG.E]}(t) = 0 \quad (21)$$

$$r_{[DG.E]}(t) = K_4 \cdot C_{DG}(t) \cdot C_E(t) - K_5 \cdot C_{[DG.E]}(t) - K_6 \cdot C_{H_2O}(t) \cdot C_{[DG.E]}(t) = 0 \quad (22)$$

$$r_{[MG.E]}(t) = K_7 \cdot C_{MG}(t) \cdot C_E(t) - K_8 \cdot C_{[MG.E]}(t) - K_9 \cdot C_{H_2O}(t) \cdot C_{[MG.E]}(t) = 0 \quad (23)$$

As taxas das reações para triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos foram representadas pelas Equações (24), (25) e (26).

$$r_{[TG]}(t) = -K_1 \cdot C_{TG}(t) \cdot C_E(t) + K_2 \cdot C_{[TG.E]}(t) \quad (24)$$

$$r_{[DG]}(t) = -K_4 \cdot C_{DG}(t) \cdot C_E(t) + K_5 \cdot C_{[DG.E]}(t) + K_3 \cdot C_{[TG.E]}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (25)$$

$$r_{[MG]}(t) = -K_7 \cdot C_{MG}(t) \cdot C_E(t) + K_8 \cdot C_{[MG.E]}(t) + K_6 \cdot C_{[DG.E]}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (26)$$

Dessa forma, a partir da manipulação matemática, foi possível chegar-se as seguintes taxas de reações:

$$r_{[TG]}(t) = \frac{-K m_b(t) \cdot K m_c(t) \cdot Vmax_a \cdot C_{TG}(t)}{K m_a(t) \cdot K m_b(t) \cdot K m_c(t) + C_{TG}(t) K m_b(t) \cdot K m_c(t) + C_{DG}(t) K m_a(t) \cdot K m_c(t) + C_{MG}(t) K m_a(t) \cdot K m_b(t)} \quad (27)$$

$$r_{[DG]}(t) = \frac{-K m_a(t) \cdot K m_c(t) \cdot Vmax_b \cdot C_{DG}(t)}{K m_a(t) \cdot K m_b(t) \cdot K m_c(t) + C_{TG}(t) K m_b(t) \cdot K m_c(t) + C_{DG}(t) K m_a(t) \cdot K m_c(t) + C_{MG}(t) K m_a(t) \cdot K m_b(t)} \quad (28)$$

$$r_{[MG]}(t) = \frac{-K m_c(t) \cdot K m_b(t) \cdot Vmax_c \cdot C_{MG}(t)}{K m_a(t) \cdot K m_b(t) \cdot K m_c(t) + C_{TG}(t) K m_b(t) \cdot K m_c(t) + C_{DG}(t) K m_a(t) \cdot K m_c(t) + C_{MG}(t) K m_a(t) \cdot K m_b(t)} \quad (29)$$

Em que a concentração enzimática é dada pela Equação (30) e os parâmetros de Michaelis-Mentens são dados pelas reações de (31) a (36).

$$C_E^t = C_E(t) + C_{[TG.E]}(t) + C_{[MG.E]}(t) + C_{[DG.E]}(t) \quad (30)$$

$$Vmax_a = K_3 \cdot C_{H_2O}(t) \cdot C_E^t \quad (31)$$

$$Vmax_b = K_6 \cdot C_{H_2O}(t) \cdot C_E^t \quad (32)$$

$$Vmax_c = K_9 \cdot C_{H_2O}(t) \cdot C_E^t \quad (33)$$

$$Km_a = \frac{K_2 + K_3 \cdot C_{H_2O}(t)}{K_1} \quad (34)$$

$$Km_b = \frac{K_5 + K_6 \cdot C_{H_2O}(t)}{K_4} \quad (35)$$

$$Km_c = \frac{K_8 + K_9 \cdot C_{H_2O}(t)}{K_7} \quad (36)$$

As condições iniciais são apresentadas pelas equações de (37) a (42). Os valores foram calculados com base na massa total de substratos água e óleo:

$$C_{TG}(0) = 0,85 \frac{mol}{Kg} \quad (37)$$

$$C_{DG}(0) = 0 \quad (38)$$

$$C_{MG}(0) = 0 \quad (39)$$

$$C_{GL}(0) = 0 \quad (40)$$

$$C_{AGL}(0) = 0,18 \frac{mol}{Kg} \quad (41)$$

$$C_{H_2O}(0) = 8,53 \frac{mol}{Kg} \quad (42)$$

Os parâmetros do modelo matemáticos (K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , K_5 , K_6 , K_7 , K_8 e K_9) foram estimados a partir dos dados experimentais da cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (teor de acidez do óleo) e da minimização da função objetivo representada pela Equação (43). O método de otimização simplexDowhill desenvolvido por Nelder e Mead (1965) foi utilizada na busca do mínimo da função objetivo.

$$ob = \sum_{k=1}^N \left(\frac{Ac[k] - C_{AGL}(t[k])}{Ac[N]} \right)^2 \quad (43)$$

Em que:

k = parâmetro de variação de 1 a N;

Ac = Acidez experimental;

$C_{AGL}(t)$ =Concentração de ácidos graxos livres em relação ao tempo;

N = numero de experimentos;

Dessa forma, a partir do modelo proposto, equações de (6) a (11), as equações de (12) a (43) puderam ser utilizadas para modelar o comportamento e determinar os parâmetros cinéticos das reações de hidrólise do óleo de crambe. Para a solução do modelo matemático foi utilizado o método numérico de Rosenbrock, utilizando o software Maple®.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE CRAMBE

O óleo vegetal utilizado nesse trabalho foi o óleo de crambe bruto, o qual foi extraído pelo processo de prensagem a frio. A acidez do óleo foi medida a partir do método de titulação, sendo obtido um valor de $6,83 \pm 0,12\%$.

Além da medida da acidez, por meio de cromatografia gasosa, foi determinado o perfil de ácidos graxos do óleo de crambe empregado neste trabalho. Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados das porcentagens de cada ácido graxo presente no óleo de crambe, assim como sua respectiva massa molecular, as quais foram obtidas na literatura (Moller, 2011). Com base nos resultados apresentados na Tabela 5.1 foi possível calcular a massa molecular média dos ácidos graxos presentes no óleo de crambe, a qual foi utilizado para calcular a acidez do óleo. O valor da massa molecular média calculada foi de 317,98 g/mol.

A alta concentração de ácido erúico (~58%) é o que distingue o óleo de crambe dos demais óleos vegetais. Resultados obtidos por White *et al.* (1972), Leonard (1993) e Laghetti *et al.* (1995), confirmam que o perfil de ácidos graxos desse óleo apresenta mais de 56% de ácido erúico, ácido esse que contém 22 átomos de carbono e apenas uma ligação dupla.

A partir da análise do perfil de ácidos graxos observa-se que estão presentes os três tipos principais de ácidos graxos em triglicerídeos, os saturados (Cn:0), monoinsaturados (Cn:1) e poli-insaturados (Cn:2,3), sendo que percentuais foram de 6,75%, 80,55% e 12,78%, respectivamente para cada tipo de ácido graxo. De acordo com Ramos *et al.* (2009), o biodiesel sintetizado a partir de óleos vegetais ricos em ácidos graxos monoinsaturados apresentaram melhores propriedades globais, como o número cetona, índice de iodo e estabilidade à oxidação. Assim, o óleo de crambe é uma potencial matéria-prima para produção de biodiesel.

Tabela 6.1 - Análise dos ácidos graxos presentes no óleo de crambe.

Ácido graxo	Nome comum	Porcentagem (%)	Massa molecular ¹ (g/mol)
C16:0	Palmítico	1,9 ± 0,098	256,432
C16:1n-7	Palmitoléico	0,2 ± 0,009	254,432
C18:0	Estearico	1,0 ± 0,027	284,486
C18:1n9	Oléico	17,4 ± 0,427	282,486
C18:1n7	cis-vacênico	0,5 ± 0,029	282,486
C18:2n-6	Linoléico	7,5 ± 0,184	280,486
C18:3n-3	Linolênico	4,2 ± 0,419	278,486
C20:0	Araquídico	1,2 ± 0,002	326,567
C20:1n-9	Gadoléico	4,1 ± 0,010	310,540
C20:2n-6	Eicosadienóico	1,1 ± 0,008	308,540
C22:0	Behênico	2,2 ± 0,063	340,594
C22:1n-9	Erúcico	58,4 ± 0,825	338,594
C24:0	Lignocérico	0,4 ± 0,026	368,648

¹Fonte: Anders Moller, Danish Food Information, 2011.

6.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Duas diferentes enzimas lipases foram testadas a fim de se avaliar qual delas promove a maior taxa de conversão do óleo de crambe à ácidos graxos livres. Os resultados indicaram que a lipase RM IM é mais ativa na reação, sendo que a conversão do óleo em ácidos graxos livres, em duas horas de reação, 130 rpm, 10% em massa de água e 1,36% (em massa total) de enzima foi de 16,2%, enquanto a reação com a lipase TL IM nas mesmas condições apresentou 10,4% em conversão. Dessa forma, a lipase lipozyme RM IM foi selecionada para realizar os demais ensaios.

6.2.1. Planejamento fatorial completo 2³

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas avaliando-se os efeitos de temperatura (41,6°C; 45°C; 50°C; 55°C e 58,4°C), razão mássica de catalisador/substrato (0,52%; 0,86%; 1,36%; 1,86% e 2,2%) e razão molar água/óleo (3,64:1; 5:1; 7:1; 9:1; 10,36:1). Tais condições de temperatura e razão mássica de catalisador foram definidas com base no trabalho desenvolvido por Voll *et al.* (2012) e as condições de razão molar água/óleo foram definidas de maneira a garantir excesso de água na reação. Os resultados do planejamentos são mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 6.2 - Valores de acidez para os experimentos do planejamento experimental DCCR.

Experimento	T (°C)	A/O	m/m (%)	Acidez (%)
1	45	5	0,9	17,7
2	55	5	0,9	19,1
3	45	9	0,9	18,3
4	55	9	0,9	19,9
5	45	5	1,9	27,4
6	55	5	1,9	34,4
7	45	9	1,9	29,1
8	55	9	1,9	33,3
9	41,6	7	1,4	22,9
10	58,4	7	1,4	30,1
11	50	3,6	1,4	24,4
12	50	10,4	1,4	27,7
13	50	7	0,5	14,4
14	50	7	2,2	35,1
PC1	50	7	1,4	25,7
PC2	50	7	1,4	27,6
PC3	50	7	1,4	25,7

Baseado nos resultados da acidez, apresentados na Tabela 5.2 observa-se um rendimento de até 35% em acidez na condição e maior razão mássica de catalisador/substrato (2,2%) e pontos centrais de temperatura (50°C) e razão molar água/óleo (7), o que apesar de não ser uma conversão alta, foi um

resultado considerável para o tempo de 4 horas de reação. Para avaliar os efeitos das variáveis e de suas interações foi construído, a partir do *software* Statistica, o gráfico de pareto, por meio do qual foi possível observar que a nível de significância de 95% a temperatura linear e razão mássica de catalisador linear se mostraram relevantes ($p\text{-valor} < 0,05$), sendo que a razão mássica de catalisador/substrato foi a variável que apresentou o maior efeito. A Figura 5.1 mostra os efeitos na forma padronizada, com a linha vertical representando o nível de significância de 95%.

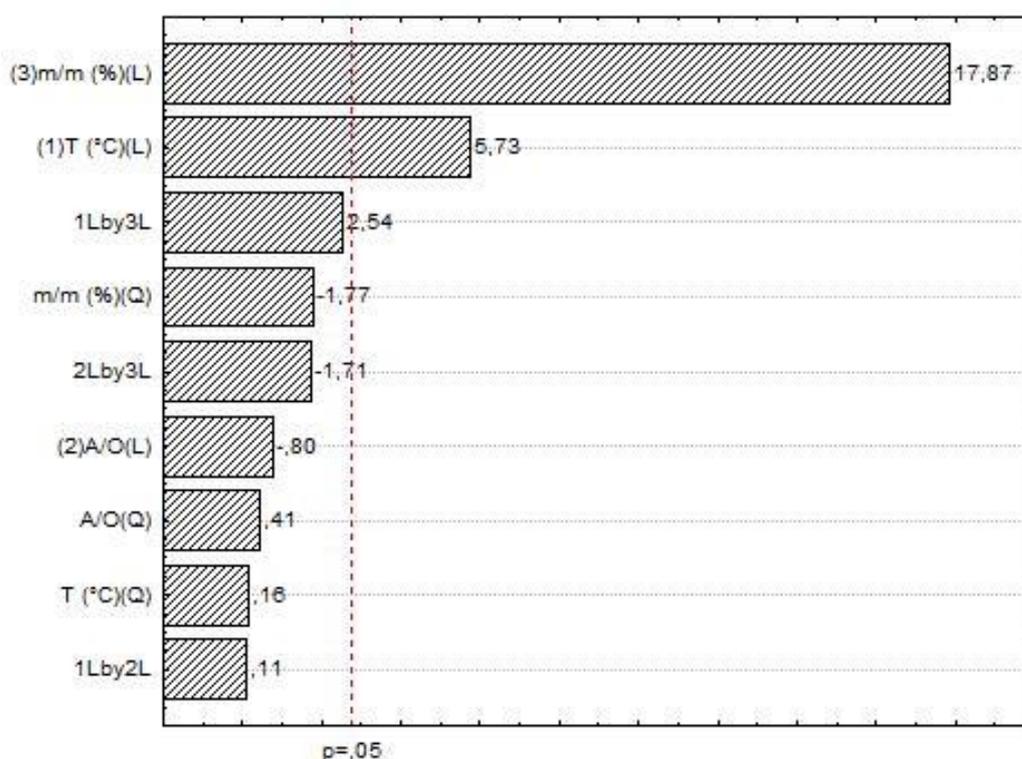


Figura 6.1 - Diagrama de pareto para a produção de AGL, sob um intervalo de 95% de confiança.

A partir do *software* Statistica e levando em conta somente as variáveis significativas uma tabela de efeitos e coeficiente de regressão foi feita, com nível de significância de 95%, para posterior construção do modelo que represente a acidez do processo (Equação 43). Na Tabela 5.3 estão apresentados os valores dos efeitos, assim como p-valores, erro-padrão e coeficientes de regressão para cada variável significativa do processo.

A verificação da validade do modelo foi realizada pela análise do teste de Fisher. Quando $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ o modelo é válido e se ajusta bem aos dados experimentais. A Tabela 5.4 mostra a análise da variância para o delineamento, bem como, o valor de F_{tab} e F_{calc} . O coeficiente de regressão encontrado foi de 0,955, o que significa que a conversão em ácidos graxos como função do teor de catalisador e temperatura pode ser bem explicada pelo modelo apresentado pela Equação (43).

Tabela 6.3 - Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez, para um intervalo de confiança de 95%.

Variável	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Coeficiente
Média/Intercepto.	25,53090	0,281564	0,000000	25,53090
(1)Temperatura(L)	3,85436	0,628508	0,003583	1,92718
(3)m / m(L)	12,25307	0,625017	0,000040	6,12653

$R^2=0,955$

$$\text{Acidez} = 25,53 + 1,93. (T) + 6,13. (m/m) \quad (43)$$

Tabela 6.4 - Análise da variância para o DCCR para o AGL.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	568,56	2	284,28	148,19	3,74
Resíduos	26,86	14	1,92		
Total	595,42	16			

A Figura 5.2 mostra a distribuição dos valores preditos em relação aos valores observados. A distribuição aleatória dos resíduos em torno da linha do modelo indica que o modelo não é tendencioso nem evidencia a necessidade de um ajuste de maior ordem.

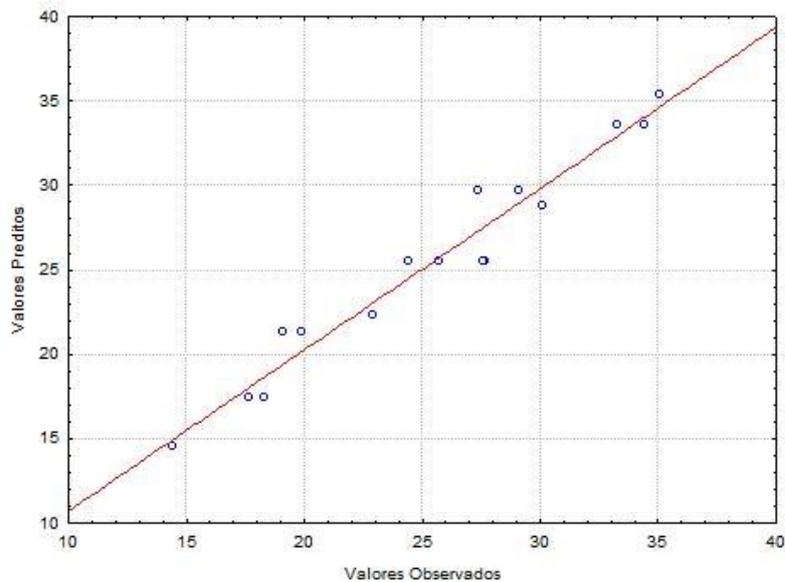


Figura 6.2 - Distribuição dos valores observados versus valores preditos.

A partir do modelo foram construídas superfícies de resposta para acidez em função da temperatura versus razão mássica de catalisador/substrato, temperatura versus razão molar água/óleo e razão mássica de catalisador/substrato versus razão molar água/óleo. As superfícies de resposta são apresentadas nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5. Observa-se que os pontos de maiores conversões obtidos nas superfícies de respostas são atingidos nas condições extremas, com exceção da razão molar água/óleo cujas superfícies, que permanecem constantes ao longo das faixas de tal efeito, evidenciam a falta de significância nas condições estudadas.

Observa-se na Figura 5.3 que uma acidez de aproximadamente 45% seria alcançada no ponto ótimo do estudo a 60°C de temperatura e razão m/m de 2,4%, no ponto central da razão A/O. Já a Figura 5.4 indica que no máximo 28% em acidez seria atingida nas condições ótimas de temperatura e no ponto central da razão m/m. Considerando o ponto central de temperatura e nas condições ótimas das razões A/O e m/m uma acidez de aproximadamente 35% seria atingida.

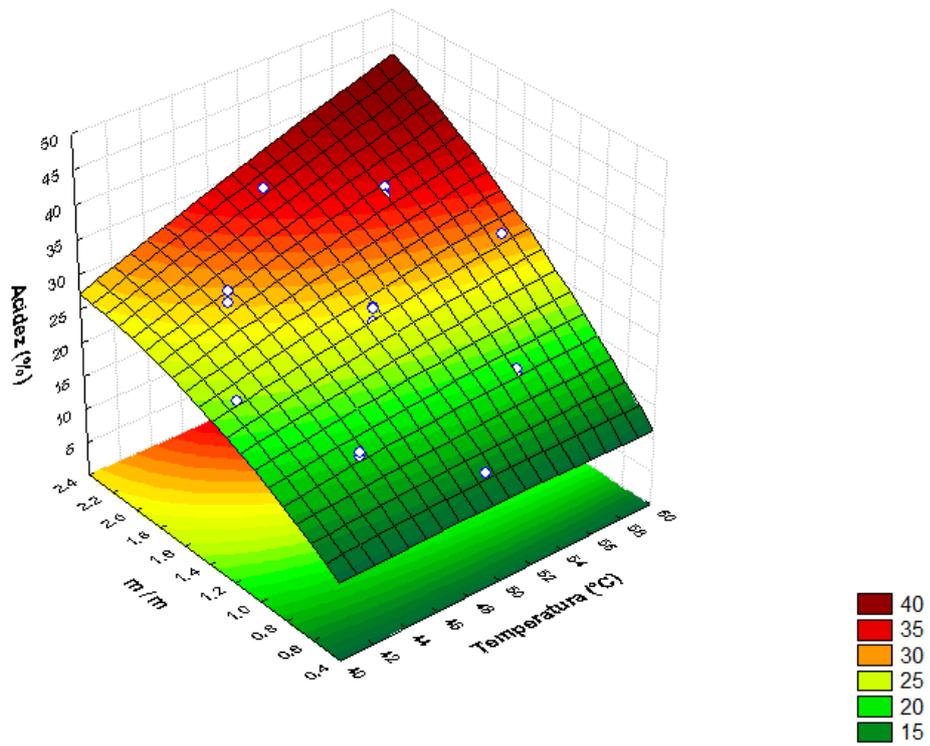


Figura 6.3 - Influência da Temperatura e da razão mássica de catalisador sobre a acidez.

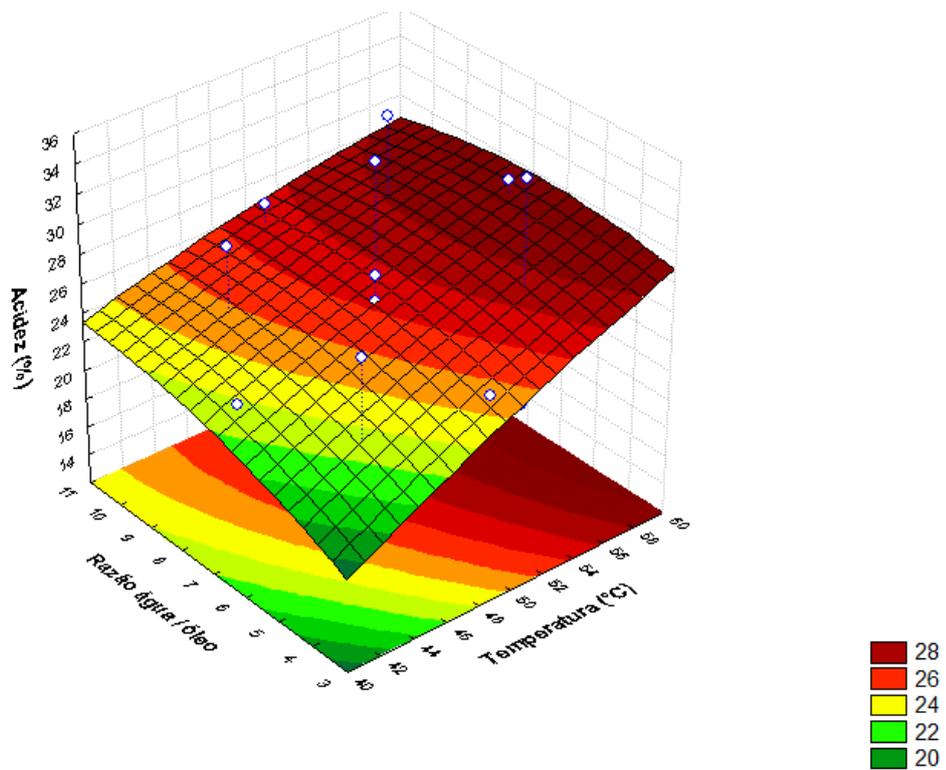


Figura 6.4 - Influência da Temperatura e da Razão molar água/óleo sobre a acidez.

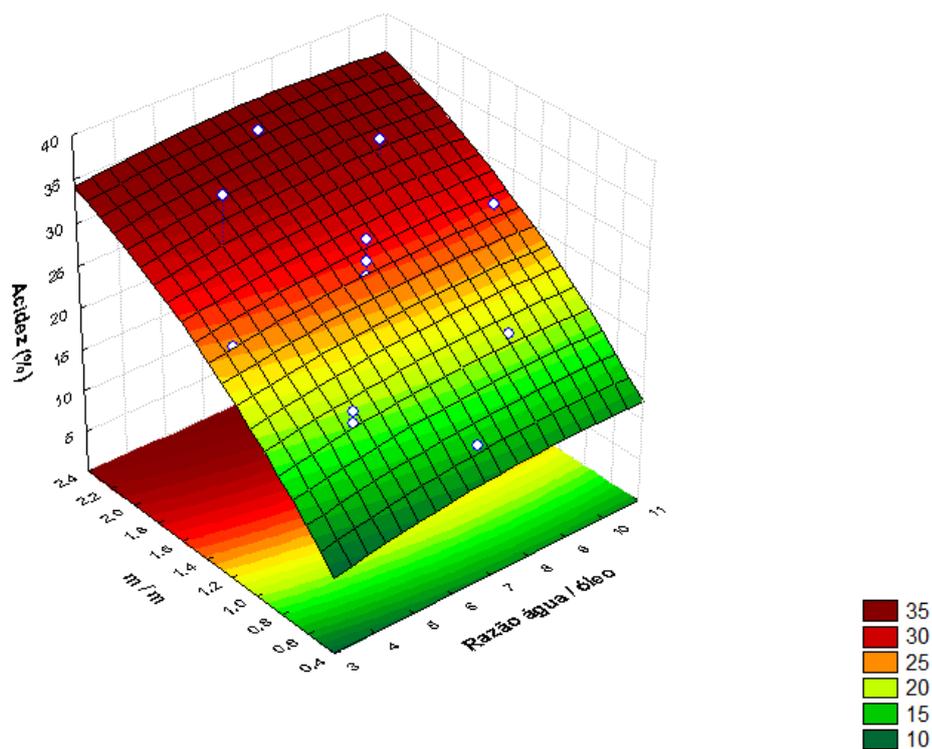


Figura 6.5 - Influência da Razão mássica de catalisador/substrato e da Razão molar água/óleo sobre a acidez.

Os resultados do planejamento indicaram que dentro das condições estudadas o ponto ótimo de temperatura é de aproximadamente 60°C, sendo que 58°C foi a temperatura limite utilizada. Para se certificar de tal resultado três testes foram feitos para avaliar o efeito de uma temperatura mais elevada na taxa de conversão da hidrólise enzimática do óleo de crambe. Esses testes foram realizados com nível de rotação de 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato de 2,2% e razão molar água/óleo de 10. Os resultados mostraram que à temperatura de 70°C a conversão atingiu 18,2%, um valor muito abaixo do esperado, demonstrando que a enzima é termo ativa, e a temperatura de 70°C faz com que a enzima perca atividade. O mesmo experimento feito à temperatura de 65°C atingiu boa conversão em 24 horas, 66,5%, porém passadas 48 horas a conversão aumentou somente para 67,2%, o que evidencia que a enzima pode ter desativado com a temperatura ao longo do tempo ou atingido a conversão de equilíbrio. À temperatura de 60°C a reação atingiu 65,4% em acidez em 24 horas e 75% após 48 horas. Dessa forma, conclui-se que a temperatura de

60°C é a indicada para realizar as reações de hidrólise enzimática do óleo de crambe.

Cheong *et al.* (2007) em seus estudos sobre produção de diacilgliceróis a partir de óleo de palma concluíram que a temperatura ótima para a reação de hidrólise utilizando Lipozyme RM IM é de 65°C. Lo *et al.* (2004) também verificaram a temperatura ótima de 65°C para a hidrólise parcial de óleo de soja empregando Lipozyme RM IM. Em geral a alta temperatura diminui a viscosidade do meio reacional e, portanto aumenta a interação entre as moléculas de enzima e substrato (Lo *et al.*, 2004). Segundo Malcata *et al.* (1992), para a maioria das lipases imobilizadas a faixa ótima de temperatura reacional é de 30°C a 62°C.

Por meio dos estudos estatísticos foi possível observar a maior importância da variável razão mássica de catalisador no processo. Isso se deve ao fato de que como as condições de rotação não estavam otimizadas, a maior massa de catalisador proporcionou maior superfície de contato para a reação ocorrer. Dessa forma, entende-se que a transferência de massa é um fator determinante. Além disso, devido ao custo elevado da enzima, deveria se fazer um estudo envolvendo a variável rotação para maximizar a hidrólise do óleo de crambe. Cheong *et al.* (2007) obtiveram resultados semelhantes demonstrando que o teor de enzima é o fator mais significativo na hidrólise enzimática envolvendo Lipozyme RM IM e óleo de palma, seguida pelo efeito da temperatura e por último a concentração de água é o fator menos importante.

Voll *et al.* (2012) estudaram o efeito da concentração de enzima na reação de hidrólise do óleo de palma realizando experimentos a 0,68%, 1,36% e 2,04% em relação à massa de substratos (água e óleo de palma). Observaram que um aumento na concentração de enzima de 0,68 para 1,36% provocou um aumento considerável na velocidade de reação da hidrólise do óleo de palma, porém o aumento da concentração de 1,36% para 2,04% apresentou um aumento sutil na velocidade da reação. Tal comportamento não foi identificado no presente trabalho, onde a concentração enzimática foi o fator que mais contribuiu para o aumento da conversão, o que pode ser devido ao menor nível rotacional empregado.

Outra observação que se faz é que a razão molar água/óleo não foi significativa para o processo, o que pode ter sido resultado da faixa de estudo determinada, a qual foi escolhida de modo a garantir em todas as reações excesso de água no meio reacional. Segundo Colombie *et al.* (1998), um microambiente eficiente para a hidrólise de óleos requer uma razão ótima entre água e óleo na reação. Alguns autores, tais como Colombie *et al.* (1998), Yan e Nagahama (2003) e Ting *et al.* (2006), estudaram o efeito da razão água/óleo na reação de hidrólise enzimática e verificaram que baixas concentrações de água podem alterar o equilíbrio termodinâmico da reação favorecendo a esterificação. Assim, altas concentrações de água são necessárias para favorecer a reação de hidrólise. Segundo Yan e Nagahama (2003) a atividade hidrolítica das lipases é conhecida por aumentar conforme o aumento da água. Como tal resultado não apresentou significância no estudo, conclui-se que toda a faixa estudada está adequada para que a reação ocorra.

6.2.2. Planejamento fatorial 2²

Para maximizar o rendimento da reação sem aumentar excessivamente a razão mássica de catalisador/substrato, já que a enzima representa um custo elevado para o processo, foi realizado um planejamento 2² para se avaliar o efeito de transferência de massa a partir das variáveis rotação e razão mássica de catalisador/substrato.

As reações de hidrólise para o planejamento 2² foram realizadas nas condições de 60°C e razão molar água/óleo 10:1 utilizando, para tanto, um agitador magnético. As amostras, resultantes da reação de hidrólise, foram tituladas com solução de NaOH para determinação da acidez. Os efeitos avaliados foram razão mássica de catalisador/substrato (1,7%, 2,2% e 2,7%) e nível de rotação (620 rpm, 790 rpm e 450 rpm). A condição ótima de razão mássica de catalisador/substrato foi definida como ponto central e os níveis de rotação foram definidos de acordo com a capacidade do equipamento utilizado.

Os resultados da acidez das amostras estão apresentados na Tabela 5.5. Observa-se que a reação atinge 46,3% em acidez nas condições máximas, o que representa um bom incremento considerando o estudo anterior no qual o valor máximo de 35% foi alcançado. Para avaliar os efeitos das variáveis e de suas interações foi construído, a partir do *software* Statistica, o gráfico de pareto, a partir do qual foi possível observar que a nível de significância de 95% ambos os efeitos rotação e razão mássica de catalisador se mostraram relevantes ($p\text{-valor} < 0,05$), sendo que a interação entre os dois fatores não foi significativa e o nível de rotação apresenta o maior efeito. A Figura 5.6 mostra os efeitos na forma padronizada, com a linha vertical representando o nível de significância de 95%.

A partir do *software* Statistica e levando em conta somente as variáveis significativas uma tabela de efeitos e coeficiente de regressão foi feita, com nível de significância de 95%, para posterior construção do modelo que represente a acidez do processo, equação (44). Na Tabela 5.6 estão apresentados os valores dos efeitos, assim como p-valores, erro-padrão e coeficientes de regressão para cada variável significativa do processo.

Tabela 6.5 - Valores de acidez para os experimentos do planejamento experimental 2²

Experimento	R (rpm)	m/m (%)	Acidez (%)
1	450	1,7	34,3
2	790	1,7	42,2
3	450	2,7	36,0
4	790	2,7	46,3
5	620	2,2	36,6
6	620	2,2	36,7
7	620	2,2	36,0

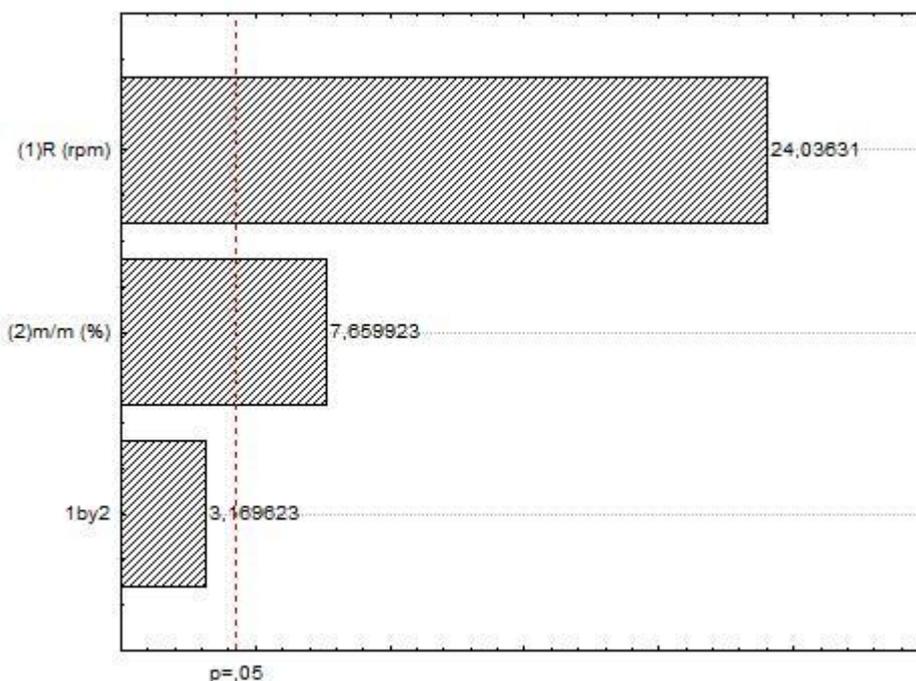


Figura 6.6 - Diagrama de pareto para a produção de AGL, sob um intervalo de 95% de confiança.

Com base nos coeficientes de regressão e nos p-valores (Tabela 5.6) foi proposto um modelo empírico ($R^2=0,82$) para descrever a acidez final em função das variáveis selecionadas. O modelo representado pela equação (44).

Tabela 6.6 - Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez, para um intervalo de confiança de 90%.

Variável	Efeito	Erro Padrão	p	Coeficiente
Média/Intercepto	38,30000	0,143095	0,000014	38,30000
(1)R	9,10000	0,378594	0,001726	4,55000
(2)m / m	2,90000	0,378594	0,016620	1,45000

$R^2=0,82$

$$Acidez = 38,3 + 4,55(R) + 1,45(m/m) \quad (44)$$

A verificação da validade do modelo foi realizada pela análise do teste de Fisher. Quando $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ o modelo é válido e se ajusta bem aos dados experimentais. A Tabela 5.4 mostra a análise da variância para o delineamento bem como o valor de F_{tab} e F_{calc} . O coeficiente de regressão encontrado foi de 0,955, o que significa que a conversão em ácidos graxos como função do teor de catalisador e temperatura pode ser bem explicada pelo modelo apresentado pela Equação (44). A Figura 5.7 mostra a distribuição dos valores preditos em relação aos valores observados. A distribuição aleatória dos resíduos em torno da linha do modelo indica que o modelo não é tendencioso nem evidencia a necessidade de um ajuste de maior ordem.

Tabela 6.7 - Análise da variância para o DCCR para o AGL.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	91,22	2	45,61	9,11	6,94
Resíduos	20,02	4	5,01		
Total	111,24	6			

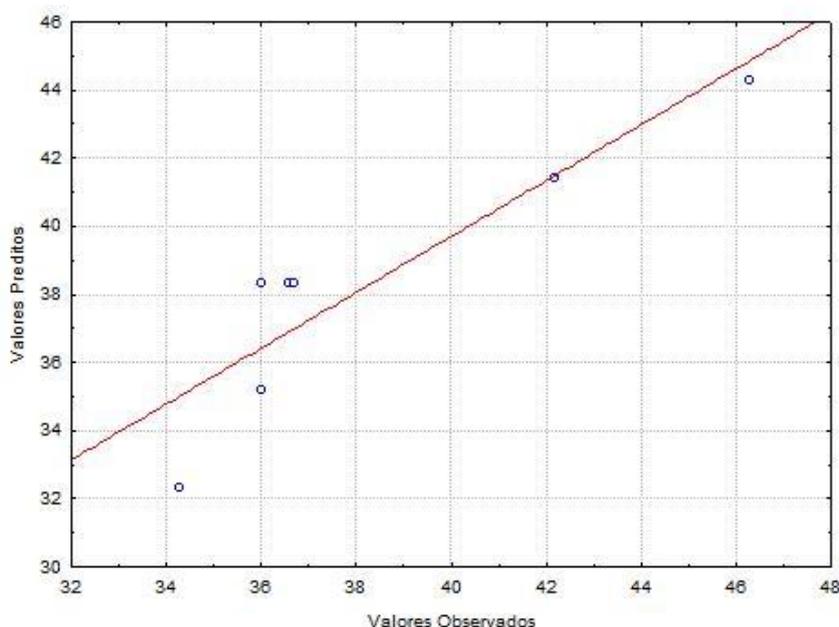


Figura 6.7 - Distribuição dos valores observados versus valores preditos.

A partir do modelo foi possível a construção de uma superfície de resposta, representada pela Figura 5.8, a partir da qual é possível observar a tendência do modelo ao se variar os efeitos abrangidos por esse estudo. O pico da superfície, condição ótima, foi atingido nas maiores condições estudadas, o que pode significar que um resultado melhor poderia ser obtido a partir do incremento de rotação e teor de catalisador, porém o estudo foi feito em condições limites de agitação pelo equipamento utilizado, além disso, um experimento foi realizado utilizando-se um agitador mecânico de hélice sob agitação de 360 rpm nas mesmas condições anteriores e razão mássica de catalisador/substrato de 2,2%, sendo que as enzimas perceptivelmente desativaram, fazendo com que os substratos adquirissem coloração esverdeada e não alcançasse uma conversão elevada (19% em acidez).

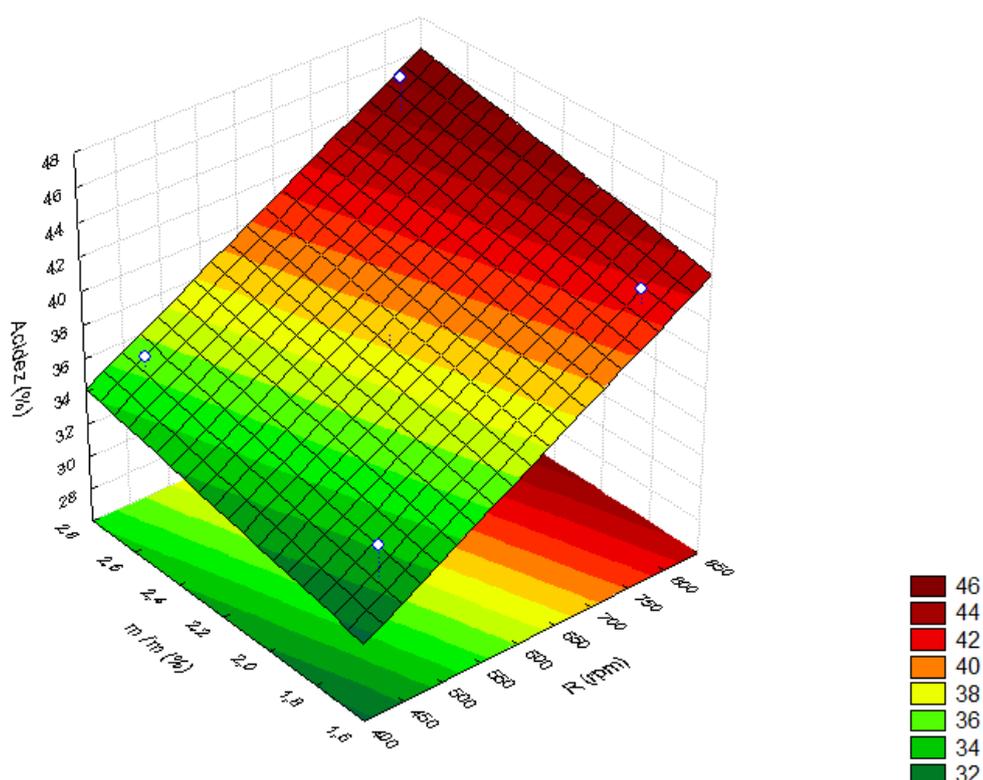


Figura 6.8 - Influência da rotação e razão mássica de catalisador/substrato na acidez.

Babicz *et al.* (2010) confirmaram a desativação das enzimas lipolíticas com o uso de agitação mecânica avaliando o efeito da agitação na hidrólise parcial do

óleo de soja com diferentes enzimas lipases (Lipozyme RM IM, TL IM e Novozyme 435) e verificando que todas apresentaram melhor conversão em DAG a baixas velocidades de rotação, pois taxas de agitação elevadas podem danificar o suporte da enzima comercial ou jogar a enzima suportada para a parede do recipiente de reação e fora da solução, diminuindo a capacidade catalítica. Gonçalves *et al.* (2012) estudaram o efeito da rotação na reação de hidrólise parcial do óleo de palma empregando um agitador mecânico e as enzimas PS IM Amano e Lipozyme TL IM obtendo também efeitos negativos para o fator rotação para ambas enzimas. Os autores concluíram que velocidades mais baixas de agitação devem ser usadas apenas para promover o efeito de mistura necessário em meios de alta viscosidade, como é o caso.

Noor *et al.* (2003) estudaram o efeito de algumas variáveis operacionais na velocidade inicial da reação de hidrólise do óleo de palma por uma lipase em solução líquida (lipase-SP398). Os autores avaliaram o efeito da velocidade de agitação, variando entre 250 e 2000 rpm em um agitador com pás de hélice, e observaram que a velocidade inicial de reação é maior para maiores velocidades de agitação. Esse comportamento foi atribuído ao aumento da área interfacial entre o óleo e a enzima presente na fase aquosa pela diminuição do tamanho das gotículas de óleo dispersas, o que também influencia no caso do uso da enzima sólida, Lipozyme RM IM, pois a maior agitação forneceu melhor emulsificação entre óleo e água facilitando a reação e o contato dos substratos com o catalisador. Entretanto, ressalta-se que os autores levaram em conta apenas as velocidades iniciais de reação e, portanto, a desativação por cisalhamento não foi considerada.

Os mesmos autores verificaram também que, para uma mesma rotação (1000 rpm), o uso de um agitador de dispersão promoveu maiores velocidades iniciais de reação quando comparado ao agitador com pás de hélice. Essa diferença se mostrava mais significativa quanto maior o valor da razão óleo-água (V/V) no sistema. Dessa forma, levando em conta os resultados obtidos no presente trabalho observa-se que a agitação magnética é mais adequada para a reação de hidrólise envolvendo enzimas lipolíticas.

Al-Zuhair *et al.* (2003) empregou um agitador magnético para avaliar o efeito da agitação na hidrólise enzimática de óleo de palma, estudando uma faixa de 800 rpm a 1300 rpm, e obteve o melhor resultado no maior valor de agitação concluindo que o aumento da agitação aumenta a área interfacial diminuindo as gotículas de óleo e causando uma melhor conversão.

Como é possível se observar o fator rotação apresenta o efeito mais significativo de todo o estudo envolvendo a hidrólise enzimática, dessa forma justifica-se um estudo aprofundado do fator rotação assim como a busca por um equipamento que permita maiores níveis rotacionais sem danos a enzima.

6.2.3. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe

Foram realizados experimentos em 3 diferentes temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) a fim de avaliar a cinética da reação de hidrólise enzimática do óleo de crambe. As condições utilizadas foram nível de rotação de 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato de 2,2% e razão molar água/óleo de 10:1. As condições foram definidas de acordo com o ponto ótimo para a agitação e razão molar água/óleo, porém levando em conta o fator econômico e como a enzima representa um alto custo, a quantidade da mesma foi definida de acordo com o ponto central do ultimo planejamento. Os resultados cinéticos dos experimentos de hidrólise do óleo de crambe estão apresentados pelas Tabelas 5.8, 5.9 e 5.10 e Figuras 5.8, 5.9 e 5.10.

Tabela 6.8 – Resultados de acidez e desvio padrão do teste cinético a 60°C.

Experimento	Tempo (horas)	Acidez (%)	Desvio Padrão
0	0	6,8	0,163
1	3	36,6	3,811
2	6	50,7	3,958
3	12	62,8	1,299
4	18	67,7	1,004
5	24	73,4	1,050
6	30	76,5	0,507
7	40	77,3	2,192
8	50	71,3	0,420
9	60	71,0	0,030
10	70	57,4	0,109

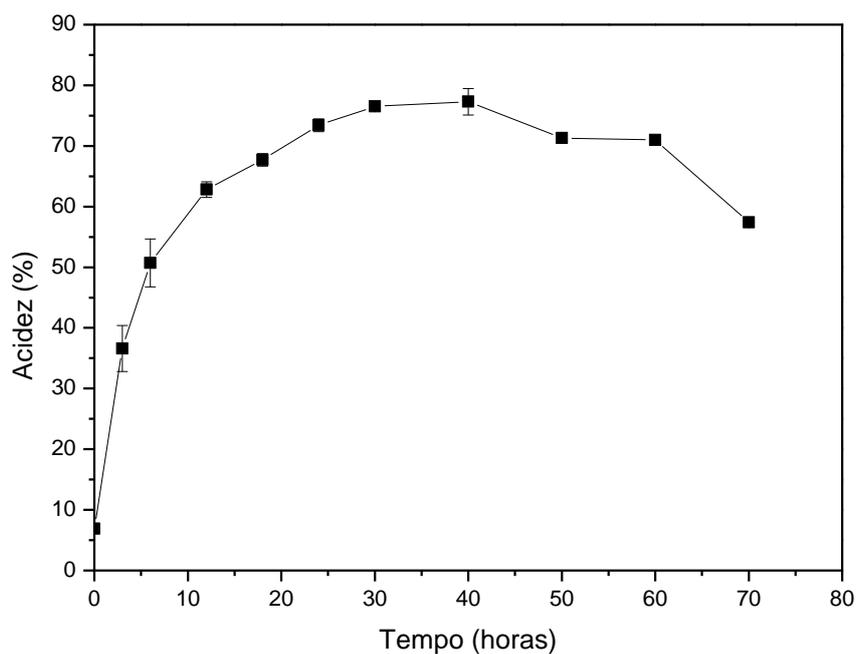


Figura 6.9 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (T = 60°C, rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%).

Tabela 6.9 – Resultados de acidez e desvio padrão do teste cinético a 55°C.

Experimento	Tempo (horas)	Acidez (%)	Desvio Padrão
0	0	6,8	0,163
1	3	37,5	2,201
2	6	49,3	1,430
3	12	57,6	3,427
4	18	65,7	1,015
5	24	67,1	2,846
6	30	73,2	2,407
7	40	70,4	1,070
8	50	66,6	1,653
9	60	65,4	1,212
10	70	64,4	1,123

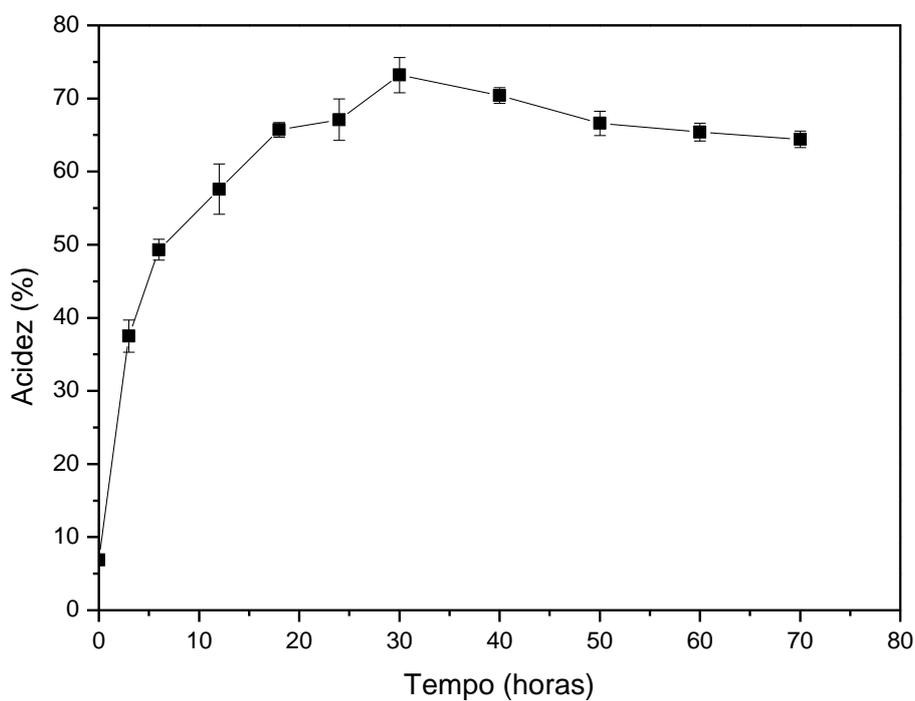


Figura 6.10 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (T = 55°C, rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%).

Tabela 6.10 – Resultados de acidez e desvio padrão do teste cinético a 50°C.

Experimento	Tempo (horas)	Acidez (%)	Desvio Padrão
0	0	6,8	0,163
1	3	36,5	2,469
2	6	48,7	2,6069
3	12	57,6	3,5209
4	18	65,1	2,8039
5	24	70,4	2,627
6	30	75,1	2,757
7	40	74,5	2,868
8	50	74,2	2,865
9	60	71,8	0,220
10	70	68,9	1,823

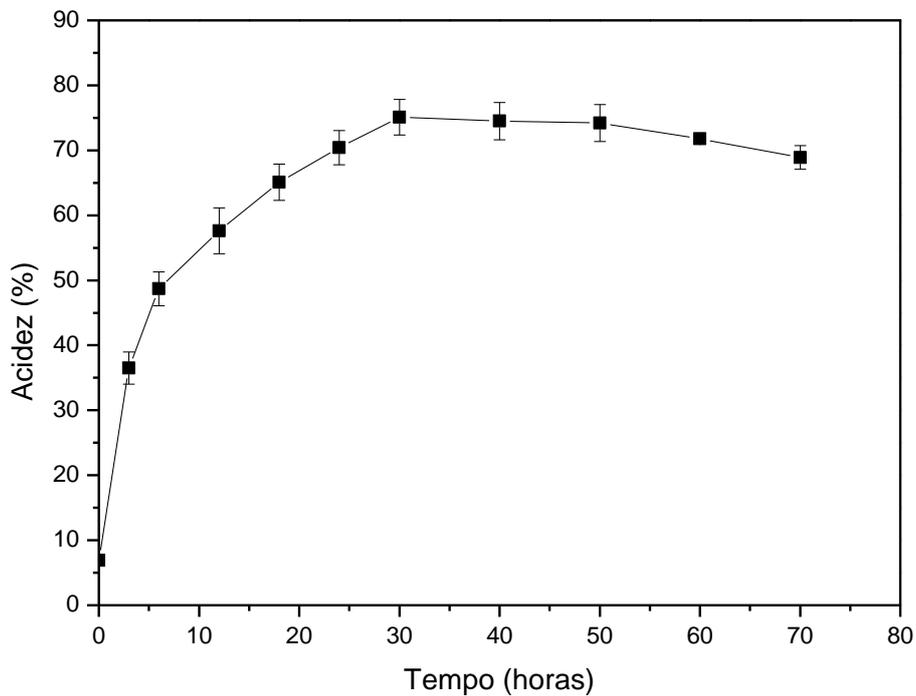


Figura 6.11 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (T = 50°C, rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%).

A Figura 5.12 reúne as três curvas de dados experimentais dos experimentos cinéticos realizados, podendo se observar que à temperatura de 55°C as conversões alcançadas foram as menores, enquanto as curvas de 60°C e 50°C estão mais próximas, sendo que à 60°C a queda no rendimento é maior com o passar do tempo.

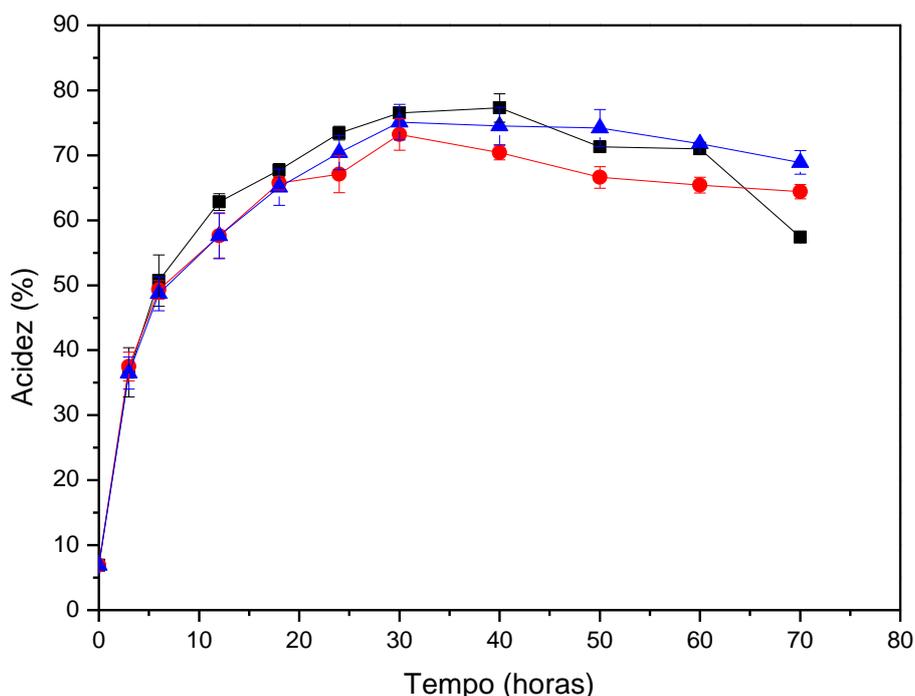


Figura 6.12 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe. (Rotação = 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato = 2,2%, ■ = 60°C, ● = 55°C e ▲ = 50°C).

Em todos os casos avaliados é possível observar que a acidez, a partir de um tempo de 40 horas, diminui. Isto pode ser devido a reversibilidade da reação. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é uma reação reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado a partir da variação da concentração de reagentes e/ou produtos (Macrae e Hammond, 1985). Segundo Jaeger e Reetz (1998) as lipases catalisam a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa ocorrer em ambientes pobres em água, o que sugere que o excesso de água utilizado na

reação pode não ter sido suficiente ou pode ter havido perda de água com o passar do tempo.

Nota-se que apesar da razão molar de água não ter apresentado significância no planejamento fatorial, tal fator pode ter sido determinante na reversibilidade da reação a partir dos maiores tempos (> 40 horas) onde a água mesmo não sendo totalmente consumida também evapora e condensa na parede do frasco onde a reação ocorre ficando fora da solução reacional, nesse caso é importante que a água seja utilizada em excesso. Porém, também se observa que a partir do tempo de 30 horas a velocidade da reação já decai consideravelmente em todos os casos, não sendo necessário o uso de tempos superiores a esse.

Tsai e Shaw (1998) avaliaram a hidrólise enzimática de óleo de oliva empregando a lipase *Candida Rugosa* em meio com solvente orgânico e observaram que em geral, a velocidade da reação diminui após 24 horas, a temperatura de 35°C. As possíveis explicações para este comportamento é a inibição por produtos, AGL, desativação da enzima, e adsorção de AGL na interface orgânico-aquosa para impedir a difusão do substrato e, por conseguinte, a taxa de reação (Tsai e Shaw, 1998).

A temperatura de 60°C foi a que possibilitou a maior conversão em AGL, porém nota-se que considerando os erros os resultados dos experimentos 6 e 7 das temperaturas de 60°C e 50°C são equivalentes de onde pode concluir-se que uma temperatura maior que 50°C não é necessária e da mesma forma o tempo de reação de até 30 horas é suficiente para atingir conversão máxima.

6.2.4. Modelagem matemática

A cinética enzimática do óleo de crambe foi descrita por meio de modelagem matemática. Nas Figuras 5.13, 5.14 e 5.15 são apresentados os valores experimentais da acidez em função do tempo, bem como os valores obtidos pelo modelo. Na Tabela 5.11 são apresentados os valores dos parâmetros obtidos a partir de um ajuste do modelo matemático aos dados experimentais cinéticos nas temperaturas de 60°C, 55°C e 50°C. Baseado nestes resultados verifica-se que o

modelo descrito pelas Equações (12) a (42) descreveu satisfatoriamente os dados experimentais.

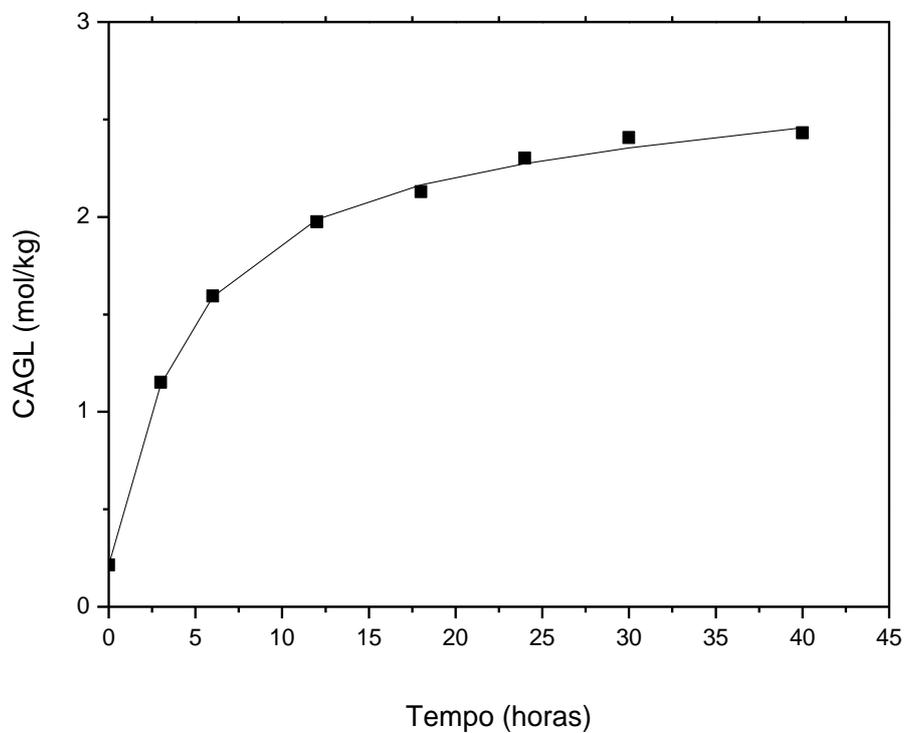


Figura 6.13 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (T = 60°C, rotação= 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato= 2,2%). ■ Experimental — Simulado

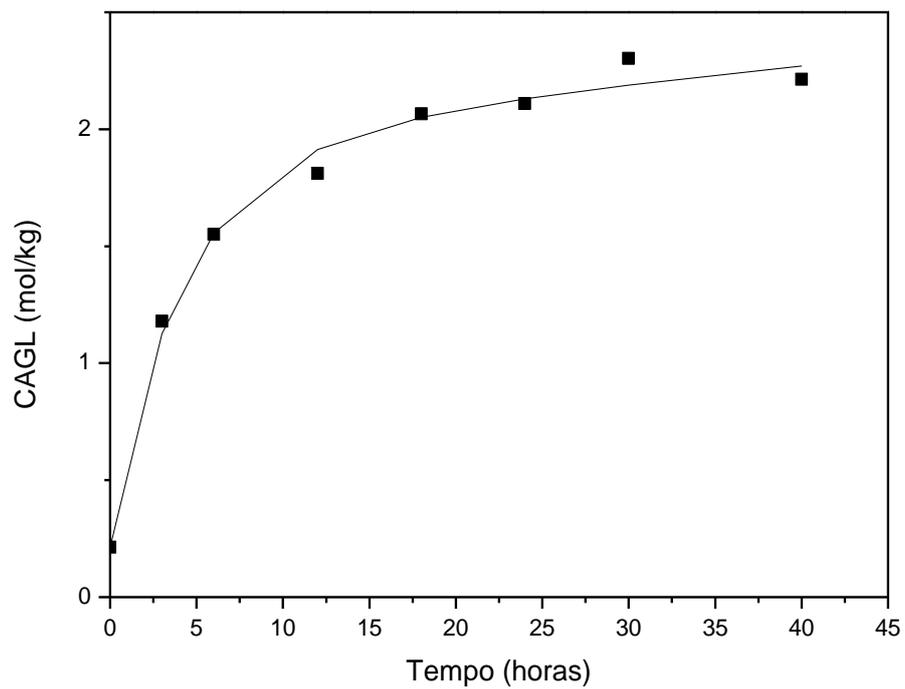


Figura 6.14 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (T = 55°C, rotação= 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato= 2,2%). ■ Experimental — Simulado

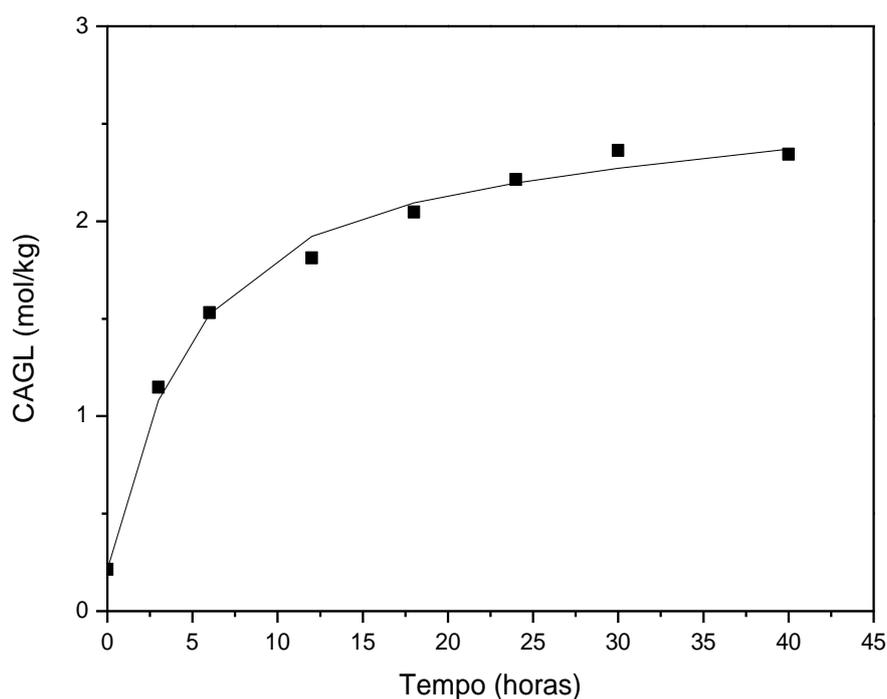


Figura 6.15 - Cinética da hidrólise enzimática do óleo de crambe (T = 50°C, rotação= 790 rpm, razão mássica de catalisador/substrato= 2,2%). ■ Experimental — Simulado

Tabela 6.11 - Valores dos parâmetros do modelo estimados para as cinéticas de 60°C, 55°C e 50°C.

Parâmetro	Temperatura 60°C	Temperatura 55°C	Temperatura 50°C
$K_1(\text{Kg.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	0,18210	0,10920	0,11480
$K_2(\text{mol.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	8,45200	4,96500	3,43500
$K_3(\text{Kg.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	0,07236	0,07335	0,04410
$K_4(\text{Kg.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	3,68700	6,30400	5,53500
$K_5(\text{mol.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	0,33070	0,47440	0,54980
$K_6(\text{Kg.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	2,34400	1,12700	1,12400
$K_7(\text{Kg.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	0,00126	0,00074	0,00110
$K_8(\text{mol.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	0,36430	2,12900	1,94200
$K_9(\text{Kg.g}_E^{-1}.\text{h}^{-1})$	6,35900	2,59500	1,83300

Observa-se que o parâmetro K_1 apresentou resultados semelhantes para as três temperaturas, já a constante K_2 apresenta os valores mais elevados e é maior na temperatura de 60°C, tal constante representa a velocidade da reação inversa

de triglicerídeos, essa temperatura também apresentou os maiores valores entre as constantes de formação direta de DG, MG e GL, K_3 , K_6 e K_9 , o que mostra que a temperatura exerce efeito positivo na velocidade da reação, porém esse efeito acontece nos dois sentidos da reação o que diminui a vantagem do uso da maior temperatura, reforçando a conclusão de que a temperatura ideal seja a de 50°C.

6.3. ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO HIDROLISADO

Foram realizados dois experimentos de esterificação empregando óleo hidrolisado (77% em acidez) obtido a partir da hidrólise enzimática do óleo de crambe (razão mássica de catalisador/substrato de 2,2%, razão molar água/óleo de 10:1, nível rotacional de 790 rpm, temperatura de 60°C durante 40 horas), um a 65°C (experimento 1) e outro a 80°C (experimento 2), ambos empregando 5% em massa de catalisador (Amberlyst 15®) metanol em excesso e 4 horas de reação sob agitação magnética. A análise dos ésteres metílicos foi feita por cromatografia gasosa e os resultados obtidos foram de 40,4% para o experimento 1 e 48,9% para o experimento 2 em ésteres metílicos.

Observa-se que a temperatura exerceu uma grande influência para os experimentos e um incremento de temperatura pode conduzir a uma melhor conversão em ésteres, sendo especificado, porém, para tal resina que a temperatura máxima de operação é de 120°C.

Park *et al.* (2010) realizaram a esterificação de ácido oleico empregando a resina Amberlyst15 sob condições de 60°C e 80°C e razão molar óleo/metanol de 1:3 reagindo por 6 horas e alcançaram conversões em ésteres metílicos de 87% e 91% respectivamente. Tal trabalho não especifica concentração de catalisador e agitação utilizadas no sistema. Talukder *et al.* (2009) realizaram estudo da esterificação de ácido graxo de palma destilado (AGPD) empregando 30% em massa de catalisador Amberlyst 15, 25% em massa de AGPD de metanol, temperatura de 60°C, velocidade de agitação de 250 rpm durante 7 horas chegando a 97% de conversão em ésteres metílicos. Tais resultados demonstram que altas conversões em ésteres podem ser obtidas empregando-se o catalisador

amberlyst 15 a temperaturas relativamente baixas, como as empregadas no presente trabalho, porém ressalta-se que os trabalhos citados empregaram matérias-primas puras em ácidos graxos livres, enquanto óleo de crambe hidrolisado com 77% em acidez foi empregado para as reações deste estudo.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos envolvendo o processo de hidroesterificação, sendo que a maioria deles utiliza como catalisador para a etapa de esterificação ácido ou óxido de nióbio, tais como De Sousa *et al.* (2010), Cavalcanti-Oliveira *et al.* (2010), Freitas *et al.* (2008), Manco (2008), Almarales *et al.* (2012) e Diaz *et al.* (2013).

Mesmo o trabalho não tendo atingido uma alta conversão em ésteres comparada a outros trabalhos, o resultado demonstra o potencial do processo, sendo que condições amenas de temperatura e pressão foram utilizadas. Além disso, a partir da análise dos resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática foi possível chegar a condições ótimas de operação nas condições avaliadas. Observou-se que as condições ideais obtidas foram de tempo reacional de 30 horas, temperatura de 50°C, sendo a diferença de conversão quando comparada com o uso de maior temperatura insignificante, razão molar água/óleo de 10:1, apesar de não ter sido fator significativo ao primeiro planejamento, nota-se que o excesso de água precisa ser mantido ao longo de todo o tempo de reação, teor de catalisador de 2,7% e nível rotacional de 790 rpm.

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho as condições ideais obtidas foram: tempo reacional de 30 horas, temperatura de 50°C, razão molar água/óleo de 10:1, teor de catalisador de 2,7% e nível rotacional de 790 rpm. Apesar da maior conversão em AGL ter se dado utilizando-se a temperatura de 60°C, 70,4% em conversão, observou-se que a diferença foi pequena para a conversão alcançada quando a temperatura de 50°C foi empregada, 68,2%, concluindo-se que o aumento acima de 50°C não seria economicamente viável. A partir do primeiro planejamento experimental conclui-se que o efeito da razão molar água/óleo não foi significativo, porém tal efeito pode ter sido determinante no fato de que para tempos superiores a 40 horas as conversões diminuíram sugerindo a reversibilidade da reação. Já o efeito de razão mássica de catalisador/substrato apresentou a maior significância ao primeiro planejamento fazendo-se concluir que a transferência de massa é de grande importância ao processo e dessa forma um segundo planejamento foi realizado a fim de se avaliar o efeito do nível rotacional além do teor de catalisador, sendo que o primeiro fator foi o mais significativo e a condição ótima foi alcançada no nível máximo de agitação avaliado.

O estudo da rotação desenvolvido no trabalho apresentou dificuldades devido as condições operacionais disponíveis para os experimentos, sendo que a rotação de 360 rpm em agitador mecânico já compromete a enzima, e em condições de até 790 rpm em um agitador magnético a reação atinge um máximo fazendo-se necessário níveis ainda maiores de rotação para atingir um nível crítico.

A partir do estudo cinético ainda foi utilizado um modelo da literatura para descrever o processo e a partir disso obterem-se os parâmetros cinéticos considerados nas equações do modelo.

O processo de hidroesterificação é um processo relativamente novo para a produção de biodiesel e apresenta a grande vantagem de viabilizar o uso de várias matérias-primas, e não somente o óleo refinado livre de ácidos graxos livres que é empregado no processo de transesterificação que é amplamente utilizado atualmente para a produção de biodiesel. Dentre os trabalhos

encontrados na literatura, muitos trabalham em condições semelhantes para o processo o que evidencia que há uma ampla faixa de variáveis e condições que ainda podem ser estudadas de maneira a otimizar um processo que apresenta futuro promissor.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Obtenção de dados cinéticos detalhados da reação de hidrólise enzimática analisando além dos ácidos graxos livres também a composição de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos, em três diferentes temperaturas.
- Obtenção de dados de estudo de variáveis, temperatura, razão volumétrica água e óleo e razão mássica de catalisador/substrato, a partir de um planejamento fatorial da reação de hidrólise química.
- Obtenção de dados de estudo de variáveis na conversão em ésteres do óleo hidrolisado obtido a partir da reação hidrolítica com maior rendimento.
- Investigação da reutilização da enzima empregada nas reações de hidrólise.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1155-1163, 2003.

ALMARALES, Á., CHENARD, G., ABDALA, R., GOMES, D. A., REYES, Y., & TAPANES, N. O. Hydroesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's biomass to biodiesel on Al₂O₃ supported Nb₂O₅ catalyst. **Natural Science**, 4(4), 204-210, 2012.

ANTUNES, O.A.C. Interfaces with the industry. **Quim. Nova**, 28, pp. S64–S75, 2005.

AIR. Crambeabyssinica, a comprehensive program – Workshop – Part 4 – Utilization. Summary information. AIR-CT 94-2480, 1997

ARANDA, D. Hidroesterificação tecnologia de segunda geração na produção de biodiesel. Disponível em: http://www.usda.com.br/downloads/hidroester_br.pdf. Acesso em: 02/08/2013.

AWADALLAK, J. A. Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: Síntese de diacilglicerol. Dissertação de mestrado em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, 2012.

AWADALLAK, J. A., VOLL, F., RIBAS, M. C., DA SILVA, C., & DA SILVA, E. A. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. **Ultrasonics sonochemistry**, 2013.

BABICZ, I. Produção de diacilglicerol via hidrólise enzimática do óleo de palma. Dissertação de mestrado em ciências e tecnologia de processos químicos e bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; XAVIER MALCATA, F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BARON, A.M., “Biocatálise em ambientes aquo-restrictos: comparação de diferentes sistemas reacionais”, tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BABICZ, I. Produção de diacilglicerol via hidrólise enzimática do óleo de palma. Dissertação de mestrado em ciências e tecnologia de processos químicos e bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

- BABICZ, I., LEITE, S. G., DE SOUZA, R. O., & ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 17(1), 4-6, 2010.
- BATISTA E.; MONNERAT, S.; KATO, K.; STRAGEVITCH, L.; MEIRELLES, A. J. A. Liquid-Liquid Equilibrium for Systems of Canola Oil, Oleic Acid, and Short-Chain Alcohols. **J. Chem. Eng.** Ed. 44, p.1360-1364. 1999.
- BOBBIO, F. O.; e BOBBIO, P. A. Introdução à Química dos Alimentos, 2^o.ed., São Paulo: Livraria Varela, 1992.
- BUENO, T.; FREITAS, L.; CASTRO, H. F. Seleção de preparações comerciais de lipase para a hidrólise enzimática do óleo de soja. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos. SINAFERM, Anais (CD ROM, p. 7). 2005.
- BORGES, G.P. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 3, pp. 206–209. 1944.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. Planejamento de experimentos usando o Statistica. E-papers. **Revista Biodiesel**, Rio de Janeiro - Brasil, 2003.
- CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and co-solvent. **Fuel**, v. 84, n. 4, p. 347-351, 2005.
- CARLSSON A. S., CLAYTON D., SALENTIJN E., TOONEN M.; Oil crop platforms for industrial uses. Newbury: Cpl Press, 2007.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. A. *et al.* Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-8, 2011.
- CHANG, C.-C.; WAN, S.-W. China's Motor Fuels from Tung Oil. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1543-1548, 1947.
- CHAVANNE, C.G., 1937. Procédé de Transformation d'Huiles Végétales en Vue de Leur Utilisation comme Carburants. Belgian Patent 422,877. **Chem. Abstr.** 32::4313. 1938.
- CHARLES, M. B. *et al.* Public policy and biofuels: The way forward? **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5737-5746, 2007.

CHAVANNE, C.G., 1942. Sur un Mode d'Utilisation Possible de l'Huile de Palme à la Fabrication d'un Carburant Lourd. Bull. Agric. Congo Belge. 10, 52–58. **Chem. Abstr.** 38:2183. 1944.

CHEN, G. *et al.* Well-dispersed sulfated zirconia nanoparticles as high-efficiency catalysts for the synthesis of bis(indolyl)methanes and biodiesel. **Catalysis Communications**, v. 41, p. 70-74, 2013.

CHENGELIS, C. P. *et al.* A chronic dietary toxicity study of DAG (diacylglycerol) in Beagle dogs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 81-97, 2006.

CHEONG, Ling-Zhi *et al.* Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1614-1622, 2007.

CHHIKARA S., DUTTAA I., PAULOSEA B., JAIWALB P. K., DHANKHERA O. P. Development of an Agrobacterium-mediated stable transformation method for industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* 'BelAnn'. **Ind. Crops Prod.** 37, 457–465, 2012.

COLOMBIE, S., TWEDDELL, R. J., CONDORET, J. S., MARTY, A. Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, n. 3, p. 362-368, 1998.

CORNELIUS, J. A.; SIMMONS, E. A. *Crambe abyssinica*—a new commercial oilseed. **Tropical Science**, n. 11, p.17-22, 1969.

DALLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, nº 4, p. 623-639, 2004.

DE SOUSA, J. S., CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. A., ARANDA, D. A. G., & FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 65(1), 133-137, 2010.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v. 35, n. 9, p. 4661-4670, 2007.

DESHMANE, C. A. *et al.* A comparative study of solid carbon acid catalysts for the esterification of free fatty acids for biodiesel production. Evidence for the leaching of colloidal carbon. **Bioresource Technology**, 2013.

DÍAZ, G. *et al.* Hydroesterification of Nannochloropsisisocolata Microalga's Biomass to Biodiesel Using as Catalyst Pure Niobium Oxide (Nb_2O_5), Niobium Oxide Supported on Alumina ($\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{Al}_2\text{O}_3$) and Niobium Oxide Impregnated with Phosphoric Acid ($\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{H}_3\text{PO}_4$). **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1350-1357, 2013.

DONG, T.; WANG, J.; CHAO, M.; ZHENG, Y., CHEN, S. Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 8-15, 2013.

DORADO, M. Exhaust emissions from a Diesel engine fueled with transesterified waste olive oil. **Fuel**, v. 82, n. 11, p. 1311-1315, 2003.

DUER, H.; CHRISTENSEN, P. O. Socio-economic aspects of different biofuel development pathways. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 2, p. 237-243, 2010.

a-EMBRAPA. Políticas e legislação. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1mqgo802wv802hvm3jndq07d1.html>. Acesso em: 02/08/2013.

b-EMBRAPA. Agricultores colhem crambe no DF. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/julho/5a-semana/agricultores-colhem-crambe-no-df#>>. Acesso em: 31 jul. 2013.

FACCIO, C., Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Rio Grande do Sul, 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, 2004

FADILUĞLU, S.; SÖYLEMEZ, Z. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. **Food Research International**, v. 30, n. 3-4, p. 171-175, 1997.

FALASCA S. L., FLORES N., LAMAS M. C., CARBALLO S. M., ANSCHAU A.; Crambeabyssinica: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. International **Journal of Hydrogen Energy**, vol. 35, n.11, p. 5808–5812. 2010.

FARIA, E. A. D. *et al.* Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v. 27, p. 00-00, 2002.

FERNANDO, S., HANNA, M. Phase behavior of the ethanol–biodiesel–diesel system. **Trans ASAE**, vol., 48, pp. 903–908, 2005.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etílicos, Caracterização Físico química e Consumo em Gerador de Energia. **Química Nova**, v. 28, n.1, p.19-23, 2005.

FERRARI, A.; SCABIO, A.; OLIVEIRA, R. V. S. PRODUÇÃO E USO DE BODIESEL ETÍLICO NA UEPG. 2004 [online] Disponível na Internet via [url](http://www.uepg.br/prosp/publicatio/exa/2004_2/06.pdf): http://www.uepg.br/prosp/publicatio/exa/2004_2/06.pdf acessado em 16 de setembro de 2006.

FIGUEIREDO, J. L.; RIBEIRO, F.R. Catálise Heterogênea. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987

FOGLER, H. S.. Elementos de Engenharia das Reações Químicas. 4. ed. Ann Arbor: Ltc, 2009.

FONTANA F., LAZZERI L., MALAGUTI L., GALLETTI S.; Agronomic characterization of some *Crambe abyssinica* genotypes in a locality of the Po Valley. **European Journal of Agronomy**, vol. 9, n. 2, p. 117–126. 1998

FRANCISCO-ORTEGA, J., FUERTES-AGUILAR, C. GOMEZ-CAMPO, A. SANTOS-GUERRA, AND R. K. JANSEN. Internal transcribed spacer sequence phylogeny of *Crambe* L. (Brassicaceae): molecular data reveal two old world disjunctions. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 11:361–380, 1999.

FREITAS, S. P., SILVA, C. C. C. M., MARIANO, R. G., ARANDA, D. A., & COURI, S. Potential for biodiesel synthesis from macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp oil with a high content of free fatty acids. In the Proceedings of 30 Symposium on th Biotechnology for Fuels and Chemicals (Vol. 68), 2008.

FRONDEL, M.; PETERS, J. Biodiesel: A new Oildorado? **Energy Policy**, v. 35, n. 3, p. 1675-1684, 2007.

FUNDAÇÃO MS. Tecnologia e produção: Soja e Milho. 2009/2010. Fundação MS para Pesquisa e Difusão de Tecnologias Agropecuárias. 1ª Edição, Maracaju/MS, 2010.

FURUTA, S.; MATSUHASHI, H.; ARATA, K. Biodiesel fuel production with solid superacid catalysis in fixed bed reactor under atmospheric pressure. **Catalysis Communications**, v. 5, n. 12, p. 721-723, 2004.

GAZZONI, D. L. Energia Panorama energético atual e perspectivas futuras. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/energia/agro-energia.htm>. Acesso em: 01/08/2013.

GOEMBIRA, F.; MATSUURA, K.; SAKA, S. Biodiesel production from rapeseed oil by various supercritical carboxylate esters. **Fuel**, v. 97, p. 373-378, 2012.

GOLDEMBERG, J; COELHO, S; NASTARI, P; and LUCON, O. Ethanol learning curve: the Brazilian experience. **Biomass and Bioenergy**, 26(3): 301-04, 2004.

GOMES, M. M. Da R. Produção de biodiesel a partir da Esterificação dos ácidos graxos Obtidos por hidrólise de óleo residual Tese (mestrado) submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro, RJ. 2002.

GONÇALVES, K. M., SUTILI, F. K., LEITE, S. G., DE SOUZA, R. O., & LEAL, I. C. R. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation–The use of experimental design as a tool for variable evaluation. **Ultrasonic sono chemistry**, 19(2), 232-236, 2012.

GRASHCHIENKOV A. E..Experimental investigations of Crambe abyssinica Hochst. **Botanical Journal USSR**, vol. 44, p. 536–543. 1959.

GUNSTONE, F.D. & NORRIS, F.A. Lipids in foods: chemistry, biochemistry and technology. **Pergamon Press**, Oxford, pp. 43-51, 1983.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASS, M.J.; FOGLIA, T.A. Matérias-primas alternativas e tecnologias para a produção de biodiesel. G. Knothe, J.V. Gerpen, J. Krahl, L.P. Ramos (Eds.), Manual do biodiesel, Edgard Blücher, São Paulo, pp. 46–66, 2006.

HELWANI, Z. *et al.* Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502-1514, 2009.

HILL, K. Fats and Oils as oleochemical raw materials. **Journal of Oleo Science**, v. 50, n. 5, p. 433-444, 2001.

HILL, K. Fats and oils as oleochemical raw materials. **Pure and Applied Chemistry**, 72, pp. 1255–1264, 2000.

HINMAN, 1986. C.W. Hinman Lo sviluppo di nuove colture. **Scienze**, 37, 217, pp. 11–16, 1986.

HUGE-JENSEN, B., GALLUZZO, D. R., & JENSEN, R. G. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. **Lipids**, 22(8), 559-565, 1987.

JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JASPER, S. P. Cultura do crambe (*Crambe abyssinica hochst*): avaliação energética, de custo de produção e produtividade em sistema de plantio direto. 103 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

JUAN, J. C. *et al.* Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 452-460, 2011.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000.

KANSEDO, J.; LEE, K. T.; BHATIA, S. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Fuel**, v. 88, n. 6, p. 1148-1150, 2009.

KASAMATSU, T. *et al.* Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 253-260, 2005.

KEIM, G.I. Fat acid alkyl esters from low-grade oils and fats. US patent 2,383-601. **ChemAbstr.** 40:4617, 1946.

KELLOWAY, A. *et al.* Process design and supply chain optimization of supercritical biodiesel synthesis from waste cooking oils. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 8, p. 1456-1466, 2013.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J. H.; KRAHL, J. *The biodiesel handbook*. Champaign, Ill.: **AOCS Press**, ix, p. 302, 2005

KHAN, A. K. Research into Biodiesel: Kinetics catalyst and development. Tese (Mestrado de Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Queensland. Brisbane, Queensland, Australia, 2002.

KHAN, S. A. *et al.* Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KISS, A. A.; DIMIAN, A. C.; ROTHENBERG, G. Solid Acid Catalysts for Biodiesel Production —Towards Sustainable Energy. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 1-2, p. 75-81, 2006.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. The Biodiesel Handbook, Champaign, Illinois: **AOCS Press**, p. 328, 2005.

KNOTHE, G. Introdução. G. Knothe, J.V. Gerpen, J. Krahl, L.P. Ramos (Eds.), Manual do biodiesel, Edgard Blücher, São Paulo, pp. 1–3, 2006.

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- DOI: 10.4025/actascitechnol.v29i1.79. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.

LAGHETTI, G., PIERGIOVANNI, A. R., PERRINO, P.. Yield and oil quality in selected lines of *Crambe abyssinica* grow in Italy. **Ind. Crop. Prod.** 4, 203–212. 1995.

LAZZERI L., LEONI O., CONTE L. S., PALMIERI S.; Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. **Industrial Crops and Products**, vol. 3, p.103–112. 1994.

LEAL, M. C. M. R. *et al.* Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

LEE, S.; POSARAC, D.; ELLIS, N. An experimental investigation of biodiesel synthesis from waste canola oil using supercritical methanol. **Fuel**, v. 91, n. 1, p. 229-237, 2012.

LEHNINGER, A.; NIELSON, D.L.; COX, M.M. Bioquímica, 3.ed. New York:Whoth Publisher, 1995.

LENSINK, S.; LONDO, M. Assessment of biofuels supporting policies using the BioTrans model. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 2, p. 218-226, 2010.

LEONARD, E. C. High-erucic vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 1, n. 2-4, p. 119-123, 1992.

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.

LEPPIK, E.E., WHITE, G.A. Preliminary assessment of Crambegermplasm resources. **Euphytica** 44: 681-689. 1975.

LIN, C.-Y.; LIN, H.-A. Diesel engine performance and emission characteristics of biodiesel produced by the peroxidation process. **Fuel**, v. 85, n. 3, p. 298-305, 2006.

LO, S. K., BAHARIN, B. S., TAN, C. P., & LAI, O. M. Lipase-catalysed production and chemical composition of diacylglycerols from soybean oil deodoriser distillate. **European journal of lipid science and technology**, 106(4), 218-224, 2004.

LÓPEZ, D. E. *et al.* Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 295, n. 2, p. 97-105, 2005.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, 70, pp. 1–15. 1999.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193-218, 1985.

MAI NETO, C.; PRIMIERI, C. Avaliação da produtividade e teor de óleo de crame através de diferentes tipos de adubações. Artigo referente ao Curso de Agronomia. Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, 2009.

MALCATA, F. X., REYES, H. R., GARCIA, H. S., HILL, C. G., & AMUNDSON, C. H. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and microbial technology**, 14(6), 426-446, 1992.

MANCO, Immacolata. Experimental evaluation of the hydroesterification process: production of biodiesel from Canola oil. **Scientifica Acta**, v. 2, n. 2, p. 8-11, 2009.

MARANGONI, A. G., *Enzyme Kinetics - A modern Approach*. 1. ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., p. 48-90, 2003.

MASTEBROEK H. D., WALLENBURG S. C., VAN SOEST L. J. M. Variation for agronomic characteristics in crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex Fries). **Industrial Crops and Products**, vol 2, n. 2, p. 129–136. 1994.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MELO, C. A. R. J. Esterificação catalítica e não-catalítica para síntese de biodiesel em reator microondas. Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em Engenharia De Processos, Universidade Tiradentes – Unit, Aracaju, 2008.

MILLER, C., AUSTIN, H., POSORSKE, L., & GONZLEZ, J. Characteristics of na immobilized lipase for the comercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(6), 927-931, 1988.

MO, X. *et al.* Activation and deactivation characteristics of sulfonated carbon catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 254, n. 2, p. 332-338, 2008.

MOLER, A. Danish Food Information, Adapted from A.J. Sheppard, *Lipid Manual*, U.S. Food and Drug Administration, 1992. Disponível em: <http://toolbox.foodcomp.info/References/FattyAcids/Anders%20M%C3%B8ller%20%20-%20FattyAcids%20Molecular%20Weights%20and%20Conversion%20Factors.pdf>, 2011. Acesso em: 15/08/2013.

MONTEIRO J.B.R., ROSADO E.L. Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 14, nº 2, Campinas, Maio/Agosto 2001.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. *Applied Statistics and Probability for Engineers*. 3ª Edição. Ed. John Wiley & Sons. Nova York – Estados Unidos da América. 2003.

MURUGESAN, A.*et al.* Analysis on performance, emission and combustion characteristics of diesel engine fueled with methyl–ethyl esters. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 4, n. 6, p. 063116, 2012.

NAGAOKA K., YAMADA Y. Purification of *Mucor* lipases and their properties. **Agricultural and Biological Chemistry**, 37 (12), pp. 2791-2796, 1973.

NEVES, M.F., PINTO, M.J.A., CONEJERO, M.A. Transnational Companies Investments in Brazilian Agribusiness and Agriculture: The Case of Sugar Cane - Part of UNCTAD

(United Nations Conference on Trade and Development). World Investment Report Geneva: UNCTAD. 2009.

NGAOSUWAN, K. *et al.* Hydrolysis of Triglycerides Using Solid Acid Catalysts. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 10, p. 4757-4767, 2009.

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

OPLINGER, E. S.; OELKE, E. A.; KAMINSKI, A. R.; PUTNAM, D. H.; TEYNOR, T. M.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. Crambe: alternative field crops manual. St. Paul: University of Minnesota, 1991.

OTTO, R.B. Gasolina derivada dos óleos vegetais. **Bol. Div. Inst. Óleos**, 3, p. 91–99, 1945.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PARK, J.-Y.; KIM, D.-K.; LEE, J.-S. Esterification of free fatty acids using water-tolerable Amberlyst as a heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S62-S65, 2010.

PARK, J. Y., WANG, Z. M., KIM, D. K., & LEE, J. S. Effects of water on the esterification of free fatty acids by acid catalysts. **Renewable Energy**, 35(3), 614-618, 2010.

PATEL, A.; BRAHMKHATRI, V.; SINGH, N. Biodiesel production by esterification of free fatty acid over sulfated zirconia. **Renewable Energy**, v. 51, p. 227-233, 2013.

PEIXOTO, E. C. D.; RODRIGUES, C. E. C.; MEIRELLES, A. J. A. Estudo Do Equilíbrio Líquido-Líquido do Sistema Óleo de Soja Refinado/Ácido Linoléico Comercial/ Etanol Hidratado, a 25°C. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Unicamp, Campinas, 2005.

PETERS, J.; THIELMANN, S. Promoting biofuels: implications for developing countries. **Energy Policy**, 36, pp. 1538–1544, 2008.

PETROSKI, R. J.; TOOKEY, H. L. Interactions of thioglucosideglucohydrolase and epithiospecifier protein of cruciferous plants to form 1-cyanoepithioalkanes. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 1903-1905, 1982.

PIGHINELLI, A. L. M. T.; PARK K. J.; RAUEN, A. M.; BEVILAQUA, G.; GUILLAUMON FILHO, J. A. Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 2011.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, A.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B., Biodiesel: an overview. **J. Braz. Chem. Soc.** V.16, p. 1313- 1330, 2005.

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.

RAMOS, L. P. Conversão de óleos vegetais em biocombustível alternativo ao diesel convencional. In: **congresso brasileiro de soja**, 1999, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa-Soja, p.233-236. 1999.

RAMOS, L.P.; KUCEK, K.; DOMINGOS, A.K.; WILHEM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Biotecnologia*, **Ciência e Desenvolvimento**, 31, p. 28–37, 2003.

RAMOS, María Jesús *et al.* Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

RAO, K. N. *et al.* Zirconium phosphate supported tungsten oxide solid acid catalysts for the esterification of palmitic acid. **Green Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 790, 2006.

REIS, S. C. M. *et al.* Transesterification of brazilian vegetable oils with methanol over ion-exchange resins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 9, p. 661-665, 2005.

Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº. 270, de 22 de setembro de 2005.

RITTNER, H. Óleo de palma: Processamento e utilização. São Paulo, 1ªed. P. 311-320, 1996.

a. RODRIGUES, R. C., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 64(1), 1-22, 2010.

b.RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1, p. 15-32, 2010.

ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHÃO, A.. Análise da viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **Revista de Política Agrícola**, p.48-59, 2007.

ROSCOE, R.; DELMONTES, A. M. A. Crambe é nova opção para biodiesel. *Agrianual* 2009. São Paulo: Instituto FNP, p. 40-41. 2008.

SANT'ANNA, J.P. Biodiesel alimenta motor da economia. **Química e Derivados**, 416, pp. 8–18, 2003.

SAKA, S.; ISAYAMA, Y. A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. **Fuel**, v. 88, n. 7, p. 1307-1313, 2009.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SCRIMGEOUR, C. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th edition, **John Wiley & Sons, Inc.** 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechol Adv**, v.19; p.627-662, 2001.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 1993.

SHU, Q. *et al.* Synthesis of biodiesel from waste vegetable oil with large amounts of free fatty acids using a carbon-based solid acid catalyst. **Applied Energy**, v. 87, n. 8, p. 2589-2596, 2010.

SPENCER, G. F.; NIESCHLAG, H. F.; ROTHFUS, J. A.. Secondary Products from High Pressure Hydrogenation of Crambe Oil. **Journal Of The American Oil Chemists**, Peoria, Illinois, p. 451-455. 1974.

SOUZA, D. V. DE; ZAPATA, J. F. F.; FREITAS, E. R.; SOUZA NETO, M. A.; PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; ABREU, V. K. G.; SILVA, E. M. C. DA, Fatty acid profile and proximal composition of meat from rabbits fed diets containing coconut meal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29 (4): 778-784, 2009.

SONNTAG, N.O.V. Reactions of fats and fatty acids. *Bailey's industrial oil and fat products*, vol. 1, 4th edition, ed. Swern, D., John Wiley & Sons, New York, p. 99, 1979.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, p. 111-133, 2000.

SUAREZ, P. A. Z. Produção de Biodiesel na Fazenda. CPT: Viçosa – MG, 220p, 2006.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. Transformação de Triglicerídeos em Combustíveis, Materiais Poliméricos e Insumos Químicos: Algumas Aplicações da Catálise na Oleoquímica. **Quim.Nova**, v. 30, n.3, p.667-676, 2007.

SUBRAMANIAM, D.*et al.* Bio-diesel production and its engine characteristics—An expatiate view. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, p. 361-370, 2013.

SWERN D. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Intersciences, New York. 3rd Edition, 1964.

TALUKDER, M. R., WU, J. C., LAU, S. K., CUI, L. C., SHIMIN, G., & LIM, A. Comparison of Novozym 435 and Amberlyst 15 as heterogeneous catalyst for production of biodiesel from palm fatty acid distillate. **Energy & Fuels**, 23(1), 1-4, 2008.

TANABE, K. HÖLDERICH. W.F. Industrial application of solid acid-base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, 181, p. 399–434, 1999.

TING, W. J., TUNG, K. Y., GIRIDHAR, R., & WU, W. T. Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(1), 32-38, 2006.

TSAI, SHAU-WEI; SHAW, SAN-SYAN. Selection of hydrophobic membranes in the lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. **Journal of membrane science**, v. 146, n. 1, p. 1-8, 1998.

VAN ETEN, C. H.; DAXENBICHLER, M. E. ; PETERS, J. E. ; WOLFF, I. A.; BOOTH, A. N., Seed meal detoxication, Seed meal from *Crambe abyssinica*. **J. Agric. Food Chem.**, 13 (1): 24-27, 1965.

VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel production technology. National **Renewable Energy Laboratory**, 1617 Cole Boulevard, Golden, CO, 2004.

VARGAS-LOPEZ J. M., WIESENBORN D., TOSTENSON K., CIHACEK L. Processing of crambe for oil and isolation of erucic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Vol 76, n. 7, p 801-809. 1999.

VIEIRA, A.P.A. Síntese de ésteres monoalquílicos de ácido palmítico utilizando lipase imobilizada e zeólitas. 13º Congresso Brasileiro de Catálise e 3º Congresso de Catálise do Mercosul. Foz de Iguaçu – Brasil, p.1-5, 2005.

VIGLIANO R. Combustível socialmente correto. **Brasil Energia**, 274, pp. 54–55, 2003.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular**, 2000.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 203-216, 2001.

VOLL, F. A. P., ZANETTE, A. F., CABRAL, V. F., DARIVA, C., DE SOUZA, R. O. M. A., CARDOZO FILHO, L., & CORAZZA, M. L. Kinetic Modeling of Solvent-Free Lipase-Catalyzed Partial Hydrolysis of Palm Oil. **Applied biochemistry and biotechnology**, 168(5), 1121-1142, 2012.

ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleos vegetais. **Revista de Química Industrial**, v.717, p.17-26, 2001.

ZANIN, G.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S.; JORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO NETO, C.C.; MACEDO, I.C.; LAHR FILHO, D.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J., Brazilian bioethanol program. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 84–86, pp. 1147–1161, 2000.

ZIMMERMANN H. G..Une nouvelle plante oleagine use de printemps *Crambe abyssinica* Hochst. **Oleagineux**, vol. 17, n. 6, p. 527–530. 1962.

WANG Y. P., TANG J. S., CHU C. Q., TIAN J.; A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, vol. 12, p. 47–52. 2000.

WAKABAYASHI, H, Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors. Doutor em Ciências Naturais. Dissertação aprovada, do Departamento Geral de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Técnica de Munique, Munique, 2004.

WASSELL, C. S.; DITTMER, T. P. Are subsidies for biodiesel economically efficient? **Energy Policy**, v. 34, n. 18, p. 3993-4001, 2006.

WEISS, E. A..Crambe, niger and jojoba.: Tropical agriculture series. In: **Oilseed Crops**. Longman Group Ltd, p. 463–85. Cap. 10. 1983.

WEISZ, P.B., HAAG, W.O., RODEWELD, P.G. Catalytic production of high-grade fuel (gasoline) from biomass compounds by shaped elective catalysis. **Science** 206, 57-58, 1979.

WHITE G. A., HIGGINS J. J..Culture of crambe a new industrial oilseed crop. ARS USDA **Production Research Report**, vol. 95, p. 1–20. 1966.

WHITE G F, BRADLEY D J, WHITE A U. Drawers of water: domestic water use in East Africa, **University of Chicago Press**, Chicago. 1972.

WU, XIAO YAN; JÄÄSKELÄINEN, SANNA; LINKO, WU-YEN. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. Applied biochemistry and biotechnology, v. 59, n. 2, p. 145-158, 1996.

YAN H., NAGAHAMA K. Activity of free *Candida rugosa* lipase in hydrolysis reaction of tuna oil under high pressure carbon dioxide. Journal of Chemical Engineering of Japan, 36 (5), pp. 557-562, 2003.

YASUKAWA, T.; KATSURAGI, Y.; MATSUO, N.; FLICKINGER, B. D.; TOKIMITSU, I., MATLOCK, M. G.In: **Diacylglycerol Oil**. 1ª Edição; Editora AOCS; Champaign, Illinois, p. 1-15, 2004.