

BIODIESEL

Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais

Gabriela Alves Macedo

Dra. em Ciência de Alimentos
Professora da Faculdade de Eng. de Alimentos
UNICAMP

gmacedo@fea.unicamp.br

Juliana Alves Macedo

Graduanda em Engenharia de Alimentos
UNICAMP
macedo@fea.unicamp.br

Resumo

O biodiesel (ésteres de ácidos graxos), que é derivado de triglicerídeos por transesterificação com metanol ou etanol, tem atraído considerável atenção como combustível renovável, biodegradável e não-tóxico. Muitos processos têm sido desenvolvidos para produção de biodiesel, mas a transesterificação usando álcali como catalisador tem gerado altos níveis de conversão de triglicerídeos em ésteres metílicos em curto tempo de reação. Por essa razão, este processo tem sido adotado para produção de biodiesel em muitos países da Europa e América do Norte. Recentemente, a tran-

sesterificação enzimática, empregando lipases, tornou-se mais atrativa para a produção de biodiesel, uma vez que o glicerol produzido como subproduto pode ser facilmente recuperado e a purificação dos ésteres é completa. A maior dificuldade da comercialização deste sistema ainda é o custo da produção de lipases. O custo de produção das lipases pode ser reduzido através da aplicação de genética molecular produzindo lipases de alta produtividade, seletividade e estabilidade e da imobilização das mesmas, viabilizando a reutilização seguida em reações.

Introdução

Combustíveis alternativos para motores a diesel são cada vez mais importantes devido à escassez das reservas de petróleo e aos problemas de poluição ambiental. Um grande número de estudos tem mostrado que os triglicerídeos são uma alternativa promissora ao diesel (Bartholomeu, 1981-Ziejewski and Kaufman, 1983). Contudo, o uso direto de óleos vegetais e/ou misturas de óleos são considerados insatisfatórios e não práticos tanto para motores de injeção direta como indireta, movidos a diesel. Dentre os principais problemas apresentados estão: a composição de ácidos graxos dos óleos vegetais, a alta viscosidade, a acidez, a presença de gomas formadas por oxidação e polimerização durante a estocagem e a deposição de carbonos, entre outros (Ma and Hanna, 1999). Conseqüentemente, um grande número de estudos têm sido conduzidos a fim de desenvolver derivados de óleos vegetais, cujas propriedades e performance se aproxima-

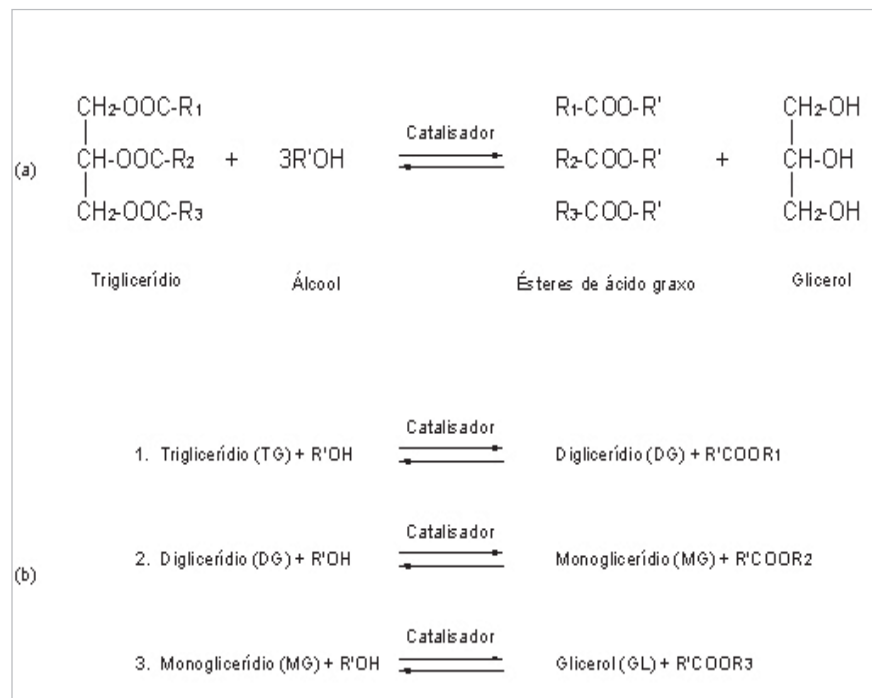


Figura 01. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (a) Equação geral; (b) Três reações consecutivas e reversíveis. R₁, R₂, R₃ e R' representam os grupos alquila.

mem do tridiocarboneto óleo diesel. Os principais problemas encontrados são a viscosidade muito alta, baixa volatilidade e caráter polinsaturado dos óleos vegetais (Srivastava and Heyes, 1962).

São três os processos mais investigados a fim de sobrepor os problemas encontrados na substituição do diesel por óleos vegetais: a pirólise, a micro-emulsificação e a transesterificação.

Pirólise é a conversão química causada pela aplicação de energia térmica, na presença de nitrogênio. Muitos estudos foram realizados com a pirólise de triglicerídeos com o objetivo de obter produtos adequados aos motores a diesel (Grossley et al., 1962- Billaud et al., 1995). A decomposição térmica dos triglicerídeos produz diferentes tipos de compostos, incluindo alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos carbonílicos e aromáticos, dependendo da fonte do óleo vegetal decomposto. A pirólise do óleo de soja, por exemplo, contém 79% de carbonos e 12% de hidrogênio (Schwab et al., 1988), apresentando baixa viscosidade e alto número de cetano comparado ao óleo puro. Contudo, apesar de os óleos vegetais pirolisados pos-

suírem concentrações de enxofre, água, sedimentos e cobre satisfatórios, são inaceitáveis os níveis de cinzas, resíduos de carbono e o ponto de ignição alcançado. Embora o produto da pirólise seja quimicamente similar ao diesel proveniente do petróleo, a remoção do oxigênio durante o processo térmico elimina qualquer benefício ambiental do produto (Ma and Hanna, 1999).

O uso de microemulsões com solventes como metanol, etanol e 1-butanol é outro processo que vem sendo estudado com o objetivo de resolver o problema da viscosidade dos óleos vegetais (Schwab et al., 1987- Ziejewski et al., 1984).

Microemulsões são dispersões isotrópicas, termodinamicamente estáveis, de óleo, água, surfactante e geralmente uma molécula pequena anfifílica, chamada cosurfactante (Schwab et al., 1987). Ziejewski et al., 1984, prepararam uma emulsão de 53,3% (v/v) de óleo de girassol, 13,3% (v/v) de etanol e 33,4% (v/v) de 1-butanol. Esta emulsão não-iônica apresentou viscosidade de $6,31 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ a 40°C, número de cetano de 25, 0,01% de enxofre e 0,01% ácidos graxos livres e cinzas inferior a 0,01%. A

viscosidade obtida foi ainda menor quando se aumentou a concentração de 1-butanol.

Schwab et al, 1987, reportaram que o 2-octanol foi efetivo na solubilização micelar de metanol em trioleína e óleo de soja. Contudo, foram observados, em escala laboratorial, depósitos de carbono e aumento da viscosidade.

A transesterificação, também chamada alcóolise, é a troca de um álcool de um éster por outro álcool em um processo similar ao da hidrólise, exceto o fato de que não se trata de um álcool no lugar da água. Os álcoois que podem ser utilizados são o metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico. Metanol e etanol são utilizados mais frequentemente. Nos estudos publicados, o metanol tem sido o mais empregado devido a seu baixo custo e grande disponibilidade na Europa, Japão e EUA. O etanol pode também ser utilizado e visto que, no Brasil existe grande disponibilidade deste produto a baixo custo, provavelmente será este o substrato para o biodiesel brasileiro.

A transesterificação tem sido largamente utilizada para diminuição da viscosidade dos triglicerídeos, me-

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do biodiesel.

Óleo vegetal metil éster	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Número de cetano	Poder calorífico inferior (MJ/l)	Ponto de névoa (°C)	Ponto de flash (°C)	Densidade (g/l)	Sulfur. (wt%)
Amendoim ^a	4.9(37.8°C)	54	33.6	5	176	0.883	-
Soja ^a	4.5(37.8 °C)	45	33.5	1	178	0.885	-
Soja ^b	4.0(40°)	45.7-56	32.7	-	-	0.880 (15°C)	-
Babaçu ^a	3.6(37.8°C)	63	31.8	4	127	0.879	-
Palma ^a	5.7(37.8°C)	62	33.5	13	164	0.880	-
Palma ^b	4.3-4.5(40°C)	64.3-70	32.4	-	-	0.872-0.877 (15°C)	-
Girassol ^a	4.6(37.8°C)	49	33.5	1	183	0.860	-
Gordura vegetal ^a	-	-	-	12	96	-	-
Semente de colza ^b	4.2(40°C)	51-59.7	32.8	-	-	0.882 (15°C)	-
Óleo de colza usado ^c	9.48(30°C)	53	36.7	-	192	0.895	0.002
Óleo de milho usado ^c	6.23(30°C)	63.9	42.3	-	166	0.884	0.0013
Óleo diesel ^b	12-3.5(40°C)	51	35.5	-	-	0.830-0.840 (15°C)	-
JIS-2D ^c	2.8 (30°C)	58	42.7	-	59	0.833	0.05
(gasolina)							

^a Clark et al., 1984

^b Smith, 1949.

^c Sprules and Price, 1950.



lhorando as propriedades físicas dos combustíveis para o motor a diesel (Clark et al., 1984). Assim, ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos (conhecidos por biodiesel) obtidos por alcóolise de óleos vegetais podem ser usados como combustíveis alternativos para os motores a diesel.

As propriedades do biodiesel e diesel são comparadas na tabela 1 (Srivastava and Prasad, 2000; Yamane et al., 2001; Varese and Varese, 1996).

O biodiesel produzido a partir de vários óleos vegetais possui viscosidade próxima ao do diesel convencional. Os valores de poder calorífico inferior são menores, mas possuem número de cetano e ponto de flash altos. Uma vez que as características do biodiesel são geralmente similares às do diesel, teoricamente, este é um forte candidato a substituir parcialmente o diesel, caso sua produção a se viabilizar economicamente.

Dentre as vantagens da utilização do biodiesel podem ser citadas:

- (I) É um combustível não-derivado do petróleo, mas proveniente de plantas, portanto sua combustão não aumenta o nível atual de CO_2 na atmosfera,
- (II) Pode ser produzido localmente e em pequenas escalas, reduzindo importação de petróleo,
- (III) É biodegradável,
- (IV) Comparativamente, sua combustão produz reduzidos níveis de CO, NO e material particulado.

Trata-se de um fato estabelecido que a queima de biodiesel reduz substancialmente a emissão de SO_x óxidos de enxofre e hidrocarbonetos. Existe um pequeno aumento atribuído à adaptação dos motores a diesel (Yamane et al., 2001-Sams, 1998).

Yamane et al., 2001; recentemente publicaram que um biodiesel com boa taxa de ignição, assim como alta concentração de metil oleato, gera menores níveis de NO, hidrocarbonetos, HCHO, CH_3CHO e HCOOH. Sheehan et al, 1998, publicaram um estudo mostrando que o benefício ambi-

ental de utilizar o biodiesel é proporcional ao nível de mistura com o diesel comum. A queima do biodiesel (100%) pode reduzir em 78,45% as emissões de CO_2 . Misturado na faixa de 20% ao diesel comum, reduz 15,66% a emissão de CO_2 .

As conseqüências disto podem ser vantajosas tanto do ponto de vista ambiental como do ponto de vista econômico, o que justifica o crescente interesse no desenvolvimento das tecnologias referentes à produção de biodiesel.

Este trabalho busca sintetizar os processos de transesterificação de óleos existentes para a produção de biodiesel, enfatizando a importância da transesterificação enzimática.

A reação de transesterificação

Como já foi mencionado, o biodiesel pode ser produzido por pirólise, microemulsões ou transesterificação.

A transesterificação (também chamada de alcóolise) é a reação de formação de ésteres a partir de óleos e álcoois, resultando em glicerol.

Dentre os álcoois que podem ser empregados neste tipo de reação o metanol e o etanol são os mais empregados, principalmente pelo custo e suas propriedades físico-químicas (menor cadeia carbônica). Estes podem reagir rapidamente com os triglicérides e o catalisador NaOH é facilmente dissolvido. Para completa transesterificação estequiométrica é necessário ter uma relação molar de 3:1, no mínimo, entre o álcool e triglicérides.

A reação de transesterificação pode ser catalisada por álcalis, ácidos ou enzimas, e é o processo usado para produção de biodiesel nos Estados Unidos e na Europa. Essa reação também é usada na produção de ésteres metílicos para outras aplicações como detergentes e cosméticos. Os parâmetros importantes na reação de transesterificação são:

- a) A concentração de ácidos graxos livres nos óleos é fator importante na reação quando catalisada por NaOH, pois será maior seu requerimento

para a neutralização. O conteúdo de água nos reagentes deve ser baixo, pois podem ser formados sabões no processo, o que aumenta a viscosidade final do produto e dificulta a separação do glicerol. (Bradshaw and Meuly, 1944; Freedman et al., 1984; Feuge and Grose, 1949).

- b) O efeito da relação molar entre os reagentes é outro fator importante no rendimento da reação. Este fator está associado ao tipo de catalisador utilizado, por exemplo: Na catálise ácida necessita de 30:1 de butanol e óleo de soja, enquanto na alcalina só foi requerido 6:1 para atingir a mesma taxa de esterificação, por exemplo (Freedman et al., 1986).
- c) Os tipos de catalisadores possíveis são os ácidos (H_2SO_4 , HCL, derivados H_2PO_4), alcalinos (KOH, NaOH) ou enzimas (lipases). A catálise alcalina é muito mais rápida do que a ácida, contudo, quando se utilizam óleos usados com alto teor de água e ácidos graxos livres, a catálise ácida é mais indicada (Sprules and Price, 1950- Freedman et al., 1986). Os estudos empregando lipases como biocatalisadores começaram a ser publicados no início da década de 90.
- d) O efeito do tempo de reação: normalmente o grau de esterificação aumenta com o tempo. As reações são rápidas se a dispersão é boa, duram até 15 minutos nas catálises químicas.
- e) O efeito da temperatura é variável em função dos tipos de óleos e do catalisador. A metanólise alcalina de óleo de mamona ocorreu bem entre 20-35°C (Smith, 1949).

Cinética das reações de transesterificação

Existem muitos estudos relacionados na literatura sobre a cinética da

	Catálise Alcalina	Catálise Enzimática
Temperatura de reação	60-70°C	30-40°C
Ácidos graxos livres no óleo não refinado	Produtos saponificados	Metil ésteres
Água na matéria-prima	Interferência na reação	Sem influência
Rendimento de metil ésteres	Normal	Alto
Recuperação do glicerol	difícil	Fácil
Purificação de metil ésteres	Lavagens consecutivas	Nenhuma

Tabela 2. Comparação entre catálise alcalina e catálise enzimática com lipases para a produção de biodiesel

catálise ácida (Freedman et al., 1986-Eckey, 1956) e básica (Freedman et al., 1986; Nouredini and Zhu, 1997) das reações de transesterificação. Dufek et al., 1972; estudaram a esterificação e transesterificação por catálise ácida do ácido 9(10)-carboniesterático e seus mono e di ésteres metílicos. Freedman et al., 1986; relatam a reação de transesterificação de óleo de soja e outros vegetais com álcoois, examinando o efeito do tipo de álcool, a relação molar entre os reagentes, tipo e concentração do catalisador e temperatura de reação na ordem e curso da reação. Tanto na presença de ácido, quanto na presença de base como catalisadores, a reação apresentou-se como sendo de pseudo-primeira ordem para o butanol e óleo de soja na proporção de 30:1. Na proporção de 6:1 de butanol e óleo de soja com catalisador alcalino, a reação apresentou cinética de segunda ordem. Para metanol e óleo de soja (6:1) com 0,5% de metóxido de sódio, a cinética foi combinada de segunda e quarta ordem. Serão discutidos brevemente a seguir os efeitos da presença de ácidos graxos livres, da relação molar entre os reagentes e do tipo de catalisador no processo de transesterificação.

Efeito da relação molar entre os reagentes: Uma variável importante na taxa de esterificação é a relação molar entre o álcool e o óleo. A estequiometria da reação de transesterificação requer 3 moles de álcool por mol de triglicerídeos, para render 3 moles de éster e um mol de

glicerol (veja a Fig.1a). Alta relação molar resulta em maior obtenção de ésteres em menor tempo de reação. Na reação de alcóolise de óleo de amendoim com etanol, na proporção de (6:1), foi liberada maior quantidade de glicerol do que na proporção (3:1). Freedman et al.1984, estudaram ainda, o efeito da relação molar (de 1:1 para 6:1) na conversão de óleos vegetais em ésteres metílicos. Os óleos de soja, girassol, amendoim e algodão apresentaram comportamento similar, com maior taxa de conversão atingida na proporção 6:1. Krisnangkura e Simamaharunop, 1992, estudaram a transesterificação de óleo de palma a 70°C em presença de solvente orgânico com metóxido de sódio como catalisador. Observaram que a taxa de conversão aumentou com o aumento da relação molar entre o metanol e o óleo de palma. Assim, a relação molar de 6:1 é geralmente a mais empregada em processos industriais para obter ésteres metílicos em taxas de 98% de conversão (Feuge and Grose, 1949; Fillieres and Delmas, 1995).

Efeito do tipo de catalisador: O metóxido de sódio tem se mostrado mais efetivo do que o hidróxido de sódio, provavelmente por produzir menor concentração de água durante a reação, do que NaOH e MeOH (Freedman et al., 1984; Hartman, 1956). Alcântara et al., 2000; reagiram três óleos – óleo de soja, óleo de fritura, e gordura de porco - com metóxido de sódio em dois tipos diferentes de reação: a transesterificação e a amidação, com metanol e

dietilamina, respectivamente. As amidas aumentam as propriedades de ignição do óleo diesel. Como, tanto o hidróxido de sódio, quanto o de potássio são capazes de catalisar a transesterificação, e sendo ambos muito baratos, são extensivamente aplicados na produção de biodiesel industrialmente.

Catalisador químico: A reação de transesterificação com álcool pode ser representada pela equação geral ilustrada na Figura 1a. A Figura 1b mostra as reações consecutivas e reversíveis que sofrem os triglicerídeos na transesterificação. O primeiro passo é a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos, que é seguida pela conversão dos últimos em monoglicerídeos e finalmente em glicerol, rendendo uma molécula de éster etílico em cada passo (Freedman et al., 1986; Nouredini and Zhu, 1997).

Catalisador enzimático: A cinética de transesterificação de triglicerídeos com metanol (metanólise) catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* parece estar de acordo com o modelo teórico proposto (Kaieda et al.,2001), ou seja, inicialmente os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase em glicerídeos parciais e ácidos graxos livres, e depois são sintetizados os ésteres metílicos com metanol e os ácidos graxos livres (veja Fig. 1b). Isso sugere que, diferentemente da catálise alcalina, ácidos graxos livres contidos em óleos usados podem ser convertidos facilmente em ésteres na catálise enzimática.

Transesterificação catalisada por ácidos *in situ*

Os ácidos utilizados para transesterificação incluem sulfúrico, fosfórico, hidrolórico e ácidos sulfônicos orgânicos. Embora a transesterificação por catálise ácida seja mais lenta que a alcalina (Ma and Hanna, 1999; Srivastava and Prasad, 2000; Freedman et al., 1984), a transesterificação ácida é melhor quando o óleo usado tem alta concentração de ácidos graxos livres e água, como é o caso de óleos já utilizados para frituras e etc. (Freedman et al., 1984; Aksoy et al., 1988). Aksoy et al. 1988, relatam que foi necessário realizar a reação de transesterificação em catálise ácida quando o óleo utilizado foi de oliva com muitos compostos de enxofre. Em geral, os ésteres etílicos de ácidos graxos monossaturados ou de cadeia curta, com 2% de ácido sulfúrico podem ser bons combustíveis alternativos (Klopfenstein, 1983).

Transesterificação *in situ* difere do processo convencional porque se utiliza de óleo cru, diretamente com álcool acidificado, em vez de óleo e álcool purificados. Ou seja, a extração e transesterificação ocorrem no mesmo processo com o álcool atuando em dois papéis: o de solvente extrator e na esterificação. A transesterificação *in situ* do óleo de girassol com metanol acidificado produz ésteres metílicos com rendimento maior do que os obtidos com óleo pré-extraído (Harrington and D'Areya-Evans, 1985; Harrington and D'Areya-Evans, 1985). Kildiran et al., 1996; propuseram a transesterificação *in situ* do óleo de soja, enquanto Özgül e Türkay, 1993, relataram a esterificação *in situ* de óleo de arroz com diferentes álcoois monohidratados, explorando a vantagem de extração simultânea dos lipídeos neutros de sementes, quando a transesterificação *in situ* é empregada.

Transesterificação catalisada por alcalina.

As bases empregadas na catálise do processo de transesterificação incluem NaOH, KOH, carbonatos e alcóxidos como metóxido de sódio e butóxido de sódio. A transesterifica-

ção alcalina ocorre, aproximadamente, 4000 vezes mais rápido do que a ácida (Formo, 1954), e é a mais empregada comercialmente.

No caso da transesterificação alcalina, os glicerídeos e o álcool devem ser anidros, pois a presença de água favorece a reação de saponificação dos ácidos com o sal, formando sabões (Wright et al., 1944). O sabão consome o catalisador reduzindo a eficiência catalítica e aumentando a viscosidade. As conseqüências são a formação de gel e a dificuldade de separação do glicerol.

Ma et al. 1998, sugeriram que a concentração livre de ácidos graxos no óleo refinado deve ser a menor possível, abaixo de 0,5%. Feuge e Grose, 1949, também reforçaram a importância dos óleos estarem livres de água e de ácidos graxos. Freedman et al. 1984, reportam que as taxas de transesterificação são significativamente reduzidas se os reagentes não seguirem os requerimentos acima.

Transesterificação utilizando fluidos supercríticos

Com o objetivo de desenvolver um novo processo de metanólise de óleos sem qualquer catalisador, Saka e Kusdiana, 2001, fizeram um estudo fundamental para produção de biodiesel em metanol supercrítico. Demonstraram que o pré-aquecimento a 350°C por 240s em metanol supercrítico, foi suficiente para converter óleo de semente de colza em ésteres metílicos. Os ésteres metílicos produzidos em metanol supercrítico foram os mesmos obtidos em catálise alcalina, mas com taxa de conversão maior. As análises cinéticas das reações demonstraram que a conversão de ésteres metílicos é muito mais rápida em condições supercríticas. As melhores condições foram a 350°C e relação molar de 42:1 entre metanol e óleo (Kusdiana and Saka, 2001).

Uma hipótese para a aceleração da reação é que metanol supercrítico tenha natureza hidrofílica com baixa constante dielétrica, dessa forma, os triglicerídeos não polares podem ser bem solvatados pelo metanol supercrítico, formando um sistema unifásico de metanol/óleo. Além

disso, o metanol líquido é um solvente polar e apresenta pontes de hidrogênio entre o OH-oxigênio e OH-hidrogênio formando clusters de metanol, dificultando o acesso do triglicerídeo. Estas podem ser algumas razões para a transesterificação supercrítica apresentar maior velocidade de reação.

Assim como na transesterificação enzimática, e ao contrário da alcalina, os ácidos graxos livres contidos no óleo também podem ser esterificados em metanol supercrítico. Além deste aspecto positivo, adiciona-se o fato de não utilizar catalisadores químicos, o que torna mais fácil a separação dos produtos dessa reação em relação à catálise alcalina. Deve-se observar que neste novo processo são requeridas altas temperaturas (350°C) e pressões (45 MPa), além de grandes quantidades de metanol, e que, para aplicação industrial, são necessárias mais investigações do processo.

Transesterificação enzimática de óleos vegetais

Nelson et al., 1996; foram os primeiros a estudar a alcóólise enzimática de triglicerídeos com o objetivo de produzir biodiesel. Quando a alcóólise de vários óleos e gorduras com metanol e etanol foi conduzida usando lipase imobilizada de *R. michei* na presença de hexano, mais de 95% dos triglicerídeos foram convertidos em metil ou etil ésteres. A metanólise de gordura de carne atingiu 65% de conversão, sem adição de solventes orgânicos. Foi observado que, quanto maior a cadeia carbônica do álcool empregado, maior foi a conversão da gordura de carne.

Embora a transesterificação química, empregando catálise alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, quando se trata de curtos tempos de reação, existem alguns inconvenientes ou desvantagens:

- 1) tem altos gastos energéticos,
- 2) a recuperação do glicerol é difícil e demorada,
- 3) remoção do catalisador é necessária,

- 4) tratamento da água alcalina residual é requerida,
- 5) Os substratos/reagentes devem ter baixa concentração de água e ácidos graxos livres.

As lipases extracelulares e as intracelulares são também capazes de catalisar efetivamente a transesterificação de triglicerídeos em sistemas aquosos ou não-aquosos. Isto pode ser observado na Tabela 2, que compara qualitativamente a catálise alcalina e enzimática em relação às características do substrato e dos produtos obtidos. Em particular, deve ser observado que o subproduto glicerol pode ser facilmente recuperado, sem processos complexos, e que os ácidos graxos livres nos óleos também são convertidos em seus ésteres correspondentes. Por outro lado, o custo de produção das lipases é significativamente maior do que dos catalisadores químicos.

Transesterificação utilizando lipases extracelulares:

Vários tipos de álcoois podem ser empregados na transesterificação ca-

talizada por lipases. Linko et al., 1998, demonstraram a viabilidade da produção de diferentes ésteres biodegradáveis e poliésteres empregando lipase. Na transesterificação de óleo de colza com 2-etil-1-hexanol, foi obtida uma taxa de 97% de conversão com lipase de *Candida rugosa*. De et al., 1999, estudaram a conversão de álcoois graxos em ésteres (C4-C18:1) empregando lipase imobilizada de *Mucor miebei* (Lipozyme IM-20) em sistema livre de solventes orgânicos. A porcentagem de conversão molar foi entre 86,8-99,2%. Estes resultados, entre outros, estão sintetizados na Tabela 3.

Macedo et al., 2004; estudaram a esterificação direta de ácido acético, butírico e propiônico com álcool isoamílico para produção de ésteres de aroma. As lipases empregadas foram microbianas não-comerciais de *Geotrichum* e *Rhizopus sp.*, e atingiram até 90% de conversão após 48h em meio aquoso.

A transesterificação de triglicerídeos dos óleos de peixe, girassol e gordura vegetal com etanol, ou, etanolise, também foi estudada. Em todos os casos, foram observadas taxas de conversão acima de 80%, em-

pregando lipases de *M. miebei* (Selmi and Thomas, 1998), *Candida antartica* (Breivik and Kriatinsson, 1997), *Pseudomonas cepacia* (Wu et al., 1999) respectivamente.

Nelson et al., 1996, investigaram as habilidades de lipases transesterificarem triglicerídeos com álcoois de cadeia curta. A lipase de *M. miebei* foi a mais eficiente na conversão de triglicerídeos em suas alquilas e ésteres com álcoois primários, enquanto a lipase de *C. antartica* foi a mais eficiente na transesterificação de triglicerídeos com álcoois secundários na produção de ésteres ramificados. As taxas máximas de conversão para os álcoois primários: metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol, foram de 94,8-98,5% e para os álcoois secundários: isopropanol e 2butanol, de 61,2-83,8%, sempre na presença de hexano. Nas reações livres de hexano, contudo, as taxas de conversão para etanol e metanol decresceram até 19,4%.

Mittelbach, 1990, reportou a transesterificação dos álcoois primários: metanol, etanol e 1butanol, com e sem éter de petróleo como solvente. Os resultados mostram que as taxas de conversão obtidas para

Tabela 3. Transesterificação enzimática utilizando diferentes tipos de álcoois e lipases

Óleo	Álcool	Lipase	Conversão(%)	Solvente	Ref.
Semente de colza	2-etil-1-hexanol	<i>C. rugosa</i>	97	nenhum	Linko, at al, 1998.
Mowrah, Manga, Kernel	álcoois C ₄ -C _{18:1}	<i>M. miebei</i> (Lipozyme IM-20)	86.8-99.2	Nenhum	De and Bandhu, 1999
Girassol	Etanol	<i>M. miebei</i> (Lipozyme)	83	Nenhum	Selmi and Thomas, 1998
Peixe	Etanol	<i>C. antartica</i>	100	Nenhum	Breivik at al, 1997
Gordura reciclada de restaurantes	Etanol	<i>P. cepacia</i> (Lipase OS-30)+ <i>C. antártica</i> (Lipase SP435)	85.4	Nenhum	Wu at al, 1999
Sebo, soja, óleo de semente de colza	Álcoois primários ^a álcoois secundários ^b metanol etanol	<i>M.miebei</i> (LipozymeIM60) <i>C. antartica</i> (SP435) <i>M.miebei</i> (LipozymeIM60) <i>M.miebei</i> (LipozymeIM60)	94.8-98.5 61.2-83.8 19.4 65.5	Hexano Hexano Nenhum Nenhum	Nelson at al, 1996
Girassol	Metanol Metanol Etanol	<i>P. fluorescens</i>	3 79 82	Nenhum Éter de petróleo Nenhum	Mittelbach, 1990
Palma	MetanolEtanol	<i>P. cepacia</i> (Lipase PS-30)	1572	NenhumNenhum	Abigor at al, 2000

^a Metanol, etanol, propanol, butanol e isobutanol.

^b Isopropanol e 2-butanol.

Tabela 4. Processos de metanólise efetivos tanto com lipases intracelulares quanto com lipases extracelulares.

Lipase	Regioespecificidade	Processo e operação	Metil éster	Tempo de reação(h)	Ref.
<i>C. antártica</i> ^a (Novozym 435)	Nenhuma	Processo semi-contínuo Operação contínua Processo em batelada	96-98 92-94 87	48 7 ^h 3,5	Shimada et al., 1999 Watanabe et al., 2000 Samukawa et al., 2000
<i>C. rugosa</i> ^b , <i>P. cepacia</i> ^b , <i>P. fluorescence</i> ^b	Nenhuma	Processo em batelada	80-100	80-90	Kaieda et al., 2001
<i>R. oryzae</i> (F-AP15) ^b	1(3)-regioespecificidade	Processo em batelada Processo em batelada	80-90 80-90	70 72	Kaieda et al., 1999 Ban et al., 2001
<i>R. oryzae</i> IFO4697 ^c	1(3)-regioespecificidade	Processo semi-contínuo	70-80	72	Ban et al., 2002

^a Lipase extracelular imobilizada em resina de troca iônica.

^b Lipase extracelular em pó.

^c Células de lipase intracelular imobilizada.

^d Adição de metanol em três passos; mistura de reagentes óleo/metanol (1:1, mol/mol) alimentada a cada passo.

^e Reação contínua com alimentação de metanol em três etapas.

^f Pré-tratamento da lipase imobilizada com metil oleato e óleo de soja.

^g Tratamento de células imobilizadas utilizando glutaraldeído.

^h Tempo de residência total.

etanol e 1butanol foram relativamente altas, tanto na presença, quanto na ausência de solvente orgânico. No entanto, na reação com metanol, somente traços de ésteres metílicos foram obtidos.

Abigor et al., 2000; também observou que na conversão de óleo de palma por lipase *P. cepacia*, o etanol atingiu melhores taxas de conversão (72%) que o metanol (15%).

As lipases são conhecidas por terem a propensão a agir mais efetivamente em moléculas de cadeia carbônica longa do que de cadeias carbônicas curtas (Shimada et al., 1997; Shimada et al., 1998). Assim, de modo geral, a eficiência da transesterificação dos triglicerídeos com metanol parece ser muito menos favorecida do que com etanol, tanto em sistemas com, como em sistemas sem solventes orgânicos.

Recentemente, uma série de trabalhos de pesquisa foram publicados a respeito da alcóolise de óleos por lipases, a síntese dos resultados principais destes trabalhos encontra-se na Tabela 4. Shimada et al., 1999; observaram que a lipase imobilizada de *C. antartica* (Novozym 435) mostrou-se mais efetiva na metanólise do que outras lipases testadas. O grupo desenvolveu um processo de adição do metanol em etapas, o que se mostrou necessário, uma vez que a enzima

foi inativada pela agitação em sistemas contendo mais de 1,5 moles de metanol por mol de óleo. Como resultado, foi mantida uma taxa de mais de 95% de conversão após 50 ciclos de reação, em processo de adição contínua de metanol.

Watanabe et al., 2000; demonstrou um processo de metanólise efetivo, utilizando um sistema em batelada, com 2 e 3 etapas e a Novozym 435. A taxa de conversão molar no final do último estágio foi de 90-93%, e a lipase pode ser reutilizada por 100 ciclos, sem perder atividade.

O efeito do pré-tratamento da lipase 435 em metanol para metanólise de óleos foi investigada por Samukaiva et al. 2000.

A metanólise progrediu muito mais rápido quando a Novozym 435 foi pré-incubada em metiloleato por 0,5 horas e subsequentemente em óleo soja por 12h. Como resultado, a taxa de conversão atingiu 97% em 3,5 horas de reação, com adição contínua de 0,33 moles de metanol após cada 0,25-0,4h de reação.

Kaieda et al., 2001; estudaram a metanólise de óleo de soja com lipases não regioesletiva e 1(3)-regioespecífica em sistema aquoso. As lipases não regioespecíficas de *C. rugosa*, *P. cepacia* e *P. fluorescens* mostraram alta atividade catalítica com presença de 4-30% de água no siste-

ma. A lipase de *R. oryzae*, que exibe 1(3)-regioesletividade (Okumura et al., 1976; Scheib et al., 1998) também foi efetiva na metanólise do óleo de soja atingindo 80% de conversão.

Os principais resultados dos estudos mencionados (entre outras publicações) podem ser sintetizados da seguinte forma (Shimada et al., 2002):

- as lipases catalisam a alcóolise de triglicerídeos e as reações ocorrem mais eficientemente se a cadeia carbônica for maior do que a do etanol e metanol;
- a alcóolise de metanol e etanol ocorre mais eficientemente na presença de solvente orgânico do que em meio aquoso;
- a não ser que a lipase seja imobilizada e permita a reutilização, o processo pode ser muito dispendioso;
- as vantagens ambientais do processo enzimático são evidentes: menor gasto energético com temperatura e pressão alta, mais fácil recuperação dos produtos e menor quantidade de glicerol como subproduto.

Conclusão

Os estudos de transesterificação enzimática ainda são muito recentes, mas já demonstram o potencial desta tecnologia na transesterificação de óleos vegetais. As vantagens da reação enzimática frente às tecnologias químicas são evidentes, e justificam o investimento em pesquisas e desenvolvimento de tecnologia nacional para implantação no Brasil.

Tomando como exemplo o que ocorreu com a indústria de gorduras e óleos na década de oitenta, tendo sido substituído o processo de hidrólise química pelo enzimático com aumento de qualidade e de produtividade, a indústria do biodiesel deve conhecer e testar as tecnologias enzimáticas para este processo.

Referências bibliográficas

- Abigor, R., Uadia, P., Foglia, T., Haas, M., Jones, K., Okpefa, E., Obibuzor, J., and Bafor, M.:** Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 979-981 (2000).
- Aksoy, H. A., Kahraman, I., Karaosmanoglu, F., and Civelekoglu, H.:** Evaluation of Turkish sulphur olive oil as an alternative diesel fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 936-938 (1988).
- Alcantara, R., Amores, J., Canoira, L., Fidalgo, E., Franco, M. J., and Navarro, A.:** Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil to diesel and tallow. *Biomass Bioenerg.*, **18**, 515-527 (2000).
- Ban, K., Hama, S., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Noda, H., Fukuda, H.:** Repeated use of whole cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for Biodiesel fuel production. *J. Mol. Catal. B: Enz*, 2002.
- Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., and Fukuda, H.:** Whole cell biocatalysts for Biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.*, **8**, 39-43, 2001.
- Bartholomew, D.:** Vegetable oil fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 286A-288A (1981).
- Billaud, F., Dominguez, V., Broutin, P., and Busson, C.:** Production of hydrocarbons by pyrolyses of methyl esters from rapeseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1149-1154 (1995).
- Bradshaw, G. B. and Meuly, W. C.:** Preparation of detergents. US Patent 2, 360-844, 1944.
- Breivik, H., Haraldsson, G. G., and Kristinsson, B.:** Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1425-1429 (1997).
- Clark, S. J., Wangner, L., Schrock, M. D., and Piennaar, P. G.:** Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1632-1638 (1984).
- De, B. K., Bhattacharyya, D. K., and Bandhu, C.:** Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 451-453 (1999).
- Dufek, E. J., Butterfield, R. O., and Frankel, E. N.:** Esterification and transesterification of 9(10)-carboxystearic acid and its methyl esters. *Kinetic studies. J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 302-319 (1972).
- Eckey, E. W.:** Esterification and interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **33**, 575-579 (1956).
- Feuge, R. O. and Grose, T.:** Modification of vegetable oils. VII. Alkali catalyzed interesterification of peanut oil with ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **26**, 97-102 (1949).
- Fillieres, R., Benjelloun-Mlayah, B., and Delmas, M.:** Ethanolsis of rapeseed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high performance size-exclusion chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 427-432 (1995).
- Formo, M. W.:** Ester reactions of fatty materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 548-559 (1954).
- Freedman, B., Butterfield, R. O., and Pryde, E. H.:** Transesterification kinetics of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 1375-1380 (1986).
- Freedman, B., Pryde, E. H., and Mounts, T. L.:** Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1638-1643 (1984).
- Grossley, T. D., Heyes, T. D., and Hudson, B. J. F.:** The effect of heat on pure triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 9-14 (1962).
- Harrington, K. J. and D'Arcy-Evans, C.:** A comparison of conventional and *in situ* methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1009-1013 (1985).
- Harrington, K. J. and D'Arcy-Evans, C.:** Transesterification *in situ* of sunflower seed oil. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **24**, 314-318 (1985).
- Hartman, L.:** Methanolysis of triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **33**, 129-132 (1956).
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., and Fukuda, H.:** Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 12-15 (2001).
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., and Fukuda, H.:** Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 627-631, 1999.
- Kildiran, G., Özgül, S., and Türkay, S.:** *In-situ* alcoholysis of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 225-228 (1996).
- Klopfenstein, W. E. and Walker, H. S.:** Efficiencies of various esters of fatty acids as diesel fuels. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 1595-1598 (1983).
- Krisnangkura, K. And Simamahanunop, R.:** Continuous transmethylation of palm oil in an organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 166-169 (1992).
- Kusdiana, D., and Saka, S.:** Kinet-

- ics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel treated in supercritical methanol. *Fuel*, **80**, 693-698 (2001).
- Linko, Y.-Y., Lämsä, M., Wu, X., Uosukainen, W., Sappälä, J., and Linko, P.:** Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol.*, **66**, 41-50 (1998).
- Ma, F. and Hanna, M. A.:** Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, **70**, 1-15 (1999).
- Ma, F., Clements, L. D., and Hanna, M. A.:** Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow. *Ind. Eng. Chem. Soc.*, **37**, 3768-3771 (1998).
- Mittelbach, M.:** Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 168-170 (1990).
- Nelson, L.A., Foglia, A., and Marmer, W. N.:** Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1191-1195 (1996).
- Noureddini, H. and Zhu, D.:** Kinetics of transesterification of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1457-1463 (1997).
- Okumura, S., Iwai, M., and Tsujikawa, T.:** Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 655-660 (1976).
- Özgül, S., and Türkay, S.:** *In situ* esterification of rice bran oil with methanol and ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 145-147 (1993).
- Saka, S., and Kusdiana, D.:** Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel*, **80**, 225-231 (2001).
- Sams, T.:** Exhaust components of biofuels under real world engine conditions, p. 64-77. *In* Martini, N. and Schell, J. S. (ed.), *Plant oils as fuels*. Springer-Verlag, Heidelberg (1998).
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H.:** Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 180-183 (2000).
- Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F., and Schmid, R. D.:** Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified steleoselectivity toward triacylglycerols. *Protein Eng.*, **11**, 675-682 (1998).
- Schwab, A. W., Bagby, M. O., and Feedman, B.:** Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel*, **66**, 1372-1378 (1987).
- Schwab, A. W., Dykstra, G. J., Selke, E., Sorenson, S. C., and Pryde, E. H.:** Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1781-1786 (1988).
- Selmi, B. and Thomas, D.:** Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 691-695 (1998).
- Sheehan, J., Camobresco, V., Duffield, J., Graboski, M., and Shapouri, H.:** An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. Report of National Renewable Energy Laboratory (NREL) and US-Department of Energy (DOE). Task No. BF886002, May (1998).
- Shimada, Y., Sugihara, A., Minamigawa, Y., Higashiyama, K., Akimoto, K., Fujikawa, S., Komemushi, S., and Tominaga, Y.:** Enzymatic enrichment of arachidonic acid from *Mortierella* single-cell oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1213-1217 (1998).
- Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagno, T., Gemba, M., and Tominaga, Y.:** Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 97-101 (1997).
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., and Tominaga, Y.:** Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 789-793 (1999).
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y.:** Enzymatic alcoholysis for Biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **17**, 133-142, 2002.
- Smith, M.K.:** Process of producing esters. US Patent 2, 444-486, 1949.
- Sprules, F. J. and Price, D.:** Production of fatty esters. US Patent 2, 366-494, 1950.
- Srivastava, A. and Prasad, R.:** Triglycerides-based diesel fuels. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **4**, 111-133 (2000).
- Varese, R. and Varese, M.:** Methyl ester biodiesel: opportunity or necessity? *Inform*, **7**, 816-824 (1996).
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., and Tominaga, Y.:** Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 355-360 (2000).
- Wright, H. J., Segur, J. B., Clark, H. V., Cobura, S. K., Langdon, E. E., and DuPuis, R. N.:** A report on ester interchange. *Oil Soap*, **21**, 145-148 (1944).
- Wu, W. H., Foglin, T. A., Marmer, W. N., and Phillips, J. G.:** Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 517-521 (1999).
- Yamane, K., Ueta, A., and Shimamoto, Y.:** Influence of physical and chemical properties of biodiesel fuel on injection, combustion and exhaust emission characteristics in a DI-CI engine. *Proc. 5th Int. Symp. On Diagnostics and Modeling of Combustion in Internal Combustion Engines (COMODIA 2001)*. Nagoya, p. 402-409 (2001).
- Ziejewski, M. and Kaufman, K. R.:** Laboratory endurance test of a sunflower oil blend in a diesel engine. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 1567-1573 (1983).
- Ziejewski, M., Kaufman, K. R., Schwab, A. W., and Pryde, E. H.:** Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1620-1626 (1984).