

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE AMÊNDOAS DE TUCUMÃ  
NA SÍNTESE DE BIODIESEL ETÍLICO VIA PROCESSO HIDRÓLISE-  
ESTERIFICAÇÃO**

**Kethellin Miranda Galeno de Carvalho**

**Manaus - Amazonas**

**Junho – 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Kethellin Miranda Galeno de Carvalho**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE AMÊNDOAS DE TUCUMÃ  
NA SÍNTESE DE BIODIESEL ETÍLICO VIA PROCESSO HIDRÓLISE-  
ESTERIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

**Orientador: Dr. Sergio Massayoshi Nunomura**

**Manaus - Amazonas**

**Junho– 2014**

Ficha Catalográfica  
Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação realizada pela

	Carvalho, Kethellin Miranda Galeno de Carvalho
C331h	Hidrólise enzimática do óleo de amêndoas de tucumã na síntese de biodiesel etílico via processo hidrólise-esterificação / Kethellin Miranda - Manaus, 2014.
	130f. il. color.
	Dissertação (mestrado em Química) –Universidade Federal do Amazonas.
	Orientador: Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura
	1. Ácidos graxos 2. Óleos e gorduras vegetais 3. Óleos vegetais I. Nunomura, Sergio Massayoshi (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
	CDU 2007 665.325(043.3)

**Kethellin Miranda Galeno de Carvalho**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE AMÊNDOAS DE TUCUMÃ  
NA SÍNTESE DE BIODIESEL ETÍLICO VIA PROCESSO HIDRÓLISE-  
ESTERIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura  
Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Adrian Martins Pohlit  
Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Dr. André Luis Willerding  
Centro de Biotecnologia da Amazônia

*Dedico este trabalho aos meus pais, Galeno e Márcia quem dignamente me apresentaram à importância da família e o caminho da persistência.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço profundamente a presença de Deus em minha vida. “A minha sorte eu confio no Senhor”.

Ao meu grande amor, Francisco Carvalho por seu companheirismo, amor e dedicação. A vida nem sempre é indolor ou fácil, mas juntos nossos dias são mais suáveis.

À minha mãe, que representa um exemplo de mulher, é a minha essência, minha alegria, por ela tenho uma enorme admiração e orgulho. Te amo.

Ao meu pai Galeno, que muitas vezes não se fez presente nas minhas conquistas, no entanto sempre me aconselhou e incentivou quanto à necessidade de estudar, sendo ele junto com minha mãe verdadeiros companheiros, que hoje sorriem orgulhosos ou choram emocionados, que muitas vezes, na tentativa de acertar, cometeram falhas, mas que inúmeras vezes foram vitoriosos.

Aos amores da minha vida, João Victor e Kellen, meus irmãos lindos que Deus me permitiu cuidar com muito carinho, amo vocês!

À minha vó, que com muito amor e carinho dedicou seu tempo para fazer sempre nossos agrados e ao meu avô que infelizmente não se encontra mais aqui, mais deixo meu eterno agradecimento por tudo e a certeza que foi uma pessoa com um coração maravilhoso.

Em especial ao meu orientador Sergio Massayoshi Nunomura pela sua disponibilidade e acompanhamento durante a execução do trabalho, assim como o conhecimento adquirido durante todos esses anos. Agradecer é uma forma bonita de reconhecer o bem que alguém nos faz. Por isso, agradeço-lhe por tudo que fez por mim, muito obrigada!

Ao pesquisador Roberto Figliuolo por ter cedido às amostras utilizadas na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Andreia, Magno, Thiago, Andreza, Rita Cynara, Berna, Paula Suelen que com muito carinho e alegria tornaram meus dias mais agradáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, onde foram realizadas todas as atividades experimentais.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Astrocaryum aculeatum* G. F. W. Meyer é conhecido popularmente como tucumã do Amazonas e pertence à família Arecaceae. Uma palmeira, cujas amêndoas dos seus frutos possuem grande potencial de óleo, podendo ser utilizado como matéria-prima na produção de biodiesel. O biodiesel apresenta grandes vantagens frente aos combustíveis fósseis, como a ciclagem de carbono, baixa toxicidade e o seu uso contribui para a diminuição do efeito estufa, proporcionando um ganho ambiental para todo o planeta pela diminuição da poluição atmosférica entre outras características que justificam sua utilização. Comercialmente é produzido pela reação de transesterificação por catálise básica com álcoois de cadeia curta. Contudo para que esse processo seja utilizado com rendimentos satisfatórios é fundamental que os óleos possuam baixos teores de ácidos graxos livres, o que para a maior parte dos óleos e gorduras, extraídos de espécies amazônicas, não é possível. Este trabalho teve como objetivo estudar o processo alternativo à transesterificação, dehidrólise seguida de esterificação, com especial ênfase a etapa de hidrólise, que foi realizada pela catálise enzimática. Foram utilizados dois lotes de óleos extraídos das amêndoas de tucumã. Inicialmente realizou-se a caracterização físico-química do óleo, onde o lote 01 apresentou índice de acidez de 55,06 mg NaOH/g e o lote 02 de 11,09 mg NaOH/g. Foi realizada também a determinação da composição da cadeia graxa por CG-FID. De acordo com essa análise os ácidos graxos majoritários foram: ácido láurico, mirístico e palmítico. Foi realizada uma triagem com 11 lipases comerciais livres para definir a atividade catalítica de cada enzima utilizando o mesmo substrato, a tricaprilina (C8:0). Considerando a atividade observada e o custo de aquisição das enzimas, foram selecionadas para as reações de hidrólise a lipase de *Candida rugosa* (livre) e a lipase *Thermomyces lanuginosus* (imobilizada). Os ácidos graxos produzidos nas reações de hidrólise foram quantificados por um método desenvolvido por CCD-densitometria. Os ácidos graxos também foram quantificados por CLAE em fase reversa para comparar os resultados e validar os resultados. A técnica de CCD-densitometria mostrou ser rápida, eficaz e precisa na quantificação de lipídios. Todas as reações foram monitoradas e quantificadas por essa técnica, com o intuito de estabelecer as melhores condições da atividade catalítica e o melhor resultado foi obtido utilizando a lipase de *Candida rugosa* nas seguintes: 0,3% do biocatalisador, tensoativo 1%, tampão fosfato de sódio pH 7,50; 0,1M, proporção óleo:tampão 1:1, temperatura de 40 °C, agitação 700 rpm em 10 horas de reação. Os dois lotes de óleo foram hidrolisados enzimaticamente em quantidades maiores num reator de vidro com as duas enzimas e em seguida foram esterificados empregando o catalisador heterogêneo de sulfato férrico, tanto pela via metílica como etílica. Pelas análises realizadas, o biodiesel etílico apresentou melhores conversões frente ao biodiesel metílico. As amostras de biodiesel foram analisadas também por CG-EM para confirmar a formação do produto etílico. O processo de hidrólise enzimática associada à esterificação por catálise heterogênea apresentou resultados bastante promissores, que podem permitir o uso de matérias-primas com elevado índice de acidez, que é um dos principais desafios atuais na produção desse biocombustível.

Palavras-chaves: *Astrocaryum aculeatum*, lipases, hidrólise, biodiesel

## ABSTRACTS

*Astrocaryum aculeatum* G. F. W. Meyer popularly known as tucumã (do Amazonas) is an Arecaceae species, an Amazon palm tree, which is considered an oilseed species with high potential for the production of biofuels. Biofuels have many advantages over fossil fuels such as the reduced toxicity and lower emission of greenhouse gases, due to the carbon cycling. This has stimulated its use and study so far. In large scale, is normally produced from vegetable oils or animal fats and methanol through the transesterification process by the homogenous alkalis catalysis. However this process is possible only to oils of fats with low contents of free fatty acids, which is not observed for most of oil sources available in the Amazon. This work aimed to study the production of biodiesel by an alternative process based on two-steps process of hydrolysis-esterification, with focus on the hydrolysis step performed by enzyme catalysis. Two lots of tucumã kernel oil were studied. The physical-chemical parameters from both lots were determined. Lot 01 has acid value of 55.06 mg NaOH/g and lot 02 11.09 mg NaOH/g. The fatty acid composition was determined by FAME (Fatty Acid Methyl Ester) conversion and GC-FID analysis and showed that tucumã oil has lauric, myristic and palmitic acid as major constituents. The use of lipases was initially studied by the determination of hydrolytic capacity of 11 different commercial lipases using tricaprilyn as substrate. Considering the observed results and the costs of acquisition of each enzyme, two enzymes were selected for further studies, *Candida rugosa* (free enzyme) and *Thermomyces lanuginosus* (immobilized). The quantification of enzyme conversion of oil into free fatty acids was determined by two methods. The first, was developed in this work, and was based on TLC-densitometry and the other RP-HPLC was used to validate the results obtained by TLC-densitometry. This analytical method showed accuracy, precision and linearity to quantify the lipid conversion and was used to determine the enzyme activity in different experiments performed to determine the best catalytic conditions. The best conditions observed for de *Candida rugosa* lipase were 0.3 % of enzyme, 1 % of surfactant, phosphate buffer at pH 7.50, oil:buffer ratio of 1:1 (V:V), temperature of 40 °C, stirring at 700 rpm for 10 hours. Then, the hydrolysis was performed in larger scale in a glass reactor and the products of both lots were converted into biodiesel by heterogeneous catalysis with ferric sulfate, in separate experiments using methanol and ethanol. Overall the best conversion was observed for the ethylic biodiesel, whose composition showed high purity that was confirmed by GC-MS analysis. The studied process based on enzymatic hydrolysis followed by esterification by heterogeneous catalysis showed very promising results that could, in theory, be applied in the conversion of any oil source with high free fatty acid content, which is one of the most important challenges in the production of biodiesel.

Keyword: *Astrocaryum aculeatum*, lipases, hydrolysis, biodiesel

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação de renováveis na matriz energética. ....	16
Figura 2. Hábito de crescimento do tucumanzeiro ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> ). (a) em pastagens; (b) em área de capoeira e (c) altura máxima atingida por uma palmeira típica. ....	20
Figura 3. Fruto e sementes de <i>Astrocaryum aculeatum</i> . (a) infrutescência; (b) Fruto para comercialização; (c) frutos descerrados; (d) sementes inteiras e descerradas; (e) biojoias das sementes. ....	22
Figura 4. Reação de transesterificação simplificada dos triacilglicerídeos. ....	32
Figura 5. Reação de transesterificação dos triacilglicerídeos em etapas. ....	33
Figura 6. Reações catalisadas por lipases. ....	39
Figura 7. Mecanismo de catálise enzimática por lipases [adaptado de JAEGER <i>et al.</i> , 1999].	42
Figura 8. Esquema geral para a reação catalisada por uma lipase 1,3-específica. ....	43
Figura 9. Esquema geral para a reação catalisada por lipases não-específica. ....	44
Figura 10. Perfil cromatográfico em coluna apolar e polar dos FAME's obtidos por análise do lote 01 por CG-DIC. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 11. Perfil cromatográfico em coluna apolar e polar dos FAME's obtidos por análise do lote 02 por CG-DIC. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 12. Quantificação de FFA (C14:0) através da demarcação das manchas por intensidade. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 13. Sistema utilizado para definir as melhores condições de hidrólise.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 14. Sistema empregado nas reações de hidrólise enzimática e síntese de biodiesel. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 15. Análise por CCD da conversão de TG em AG onde (O) é o óleo, (PH) é o produto ao término de 10 h para lote 01. A placa foi eluída em hexano:éter:ácido acético (7,0:30:0,1) e revelada em ácido fosfomolibdico 20 % em etanol a 150 °C....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 16. Perfil cromatográfico a 210 nm obtido por CLAE em modo reverso, da amostra de hidrólise enzimática referente ao lote 01. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 17. Análise por CCD da conversão de TG em AG onde (O) é o óleo, (PH) é o produto de hidrólise ao término de 10 h para lote 02. Placa eluída em hexano:éter:ácido acético (7,0:30:0,1) e revelada em ácido fosfomolibdico 20 % em etanol a 150 °C.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

Figura 18. Perfil cromatográfico a 210 nm obtido por CLAE em modo reverso, da amostra de hidrólise enzimática referente ao lote 02. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19. Análise por CCD da conversão de TG em AG para o lote 01, onde (O) é o óleo, (I), (II), (III) é o ciclo de cada reação. Placa eluída em hexano:éter:ácido acético (7,0:3,0:0,1) e revelada em 2,7 diclorofluoresceína a 60 °C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20. . Análise por CCD da conversão de TG em AG onde (O) é o óleo, (PH) é o produto de ao término de 15 h. Placa eluída em hexano:éter:ácido acético (7,0:30:0,1) e revelada em ácido fosfomolibdico 20 % em etanol a 150 °C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21. Análise por CCD da conversão em ésteres metílicos para o lote 01, onde (O) é o óleo, (PH) produto de hidrólise e (PE) é o produto de esterificação a cada hora. Placa eluída em hexano:éter:ácido acético (7,0:30:0,1) e revelada 2,7 diclorofluoresceína a 60 °C..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22. Análise por CCD da conversão em ésteres metílicos para o lote 02, onde (O) é o óleo, (PH) produto de hidrólise e (PE) é o produto de esterificação a cada hora. Placa eluída em hexano:éter:ácido acético (7,0:30:0,1) e revelada 2,7 diclorofluoresceína a 60 °C..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23. Análise por CCD da conversão em ésteres etílicos para o lote 01, onde (PH) é produto de hidrólise e (PE<sub>5</sub>) é produto de esterificação em 5 h. Placas eluídas em hexano:éter:ácido acético (7:3:0,1). Placa revelada em ácido fosfomolibdico 20% em etanol a 150 ° C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24. Análise por CCD da conversão em ésteres etílicos para o lote 02, onde (PH) é produto de hidrólise e (PE) é produto de esterificação. Sistema de eluição em hexano:éter:ácido acético (7:3:0,1). Placa revelada em ácido fosfomolibdico 20% em etanol a 150 ° C. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25. Perfil cromatográfico de íons totais da amostra de biodiesel metílico lote 01... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26. Perfil cromatográfico de íons totais da amostra de biodiesel metílico lote 02. **Erro! Indicador não definido.**



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes especificações de qualidade do biodiesel.....	27
Tabela 2. Estrutura molecular de triacilglicerídeos, diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos. .	28
Tabela 3. Principais ácidos graxos saturados e insaturados. ....	29
Tabela 4. Padrões de ácidos graxos e triacilglicerídeos. ....	
Tabela 5. Principais materiais utilizados. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabela 6. Condições de análise da cadeia graxa.....	
Tabela 7. Valores médios da caracterização físico-química do óleo da amêndoa comparado com óleo de soja .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabela 8. Tempo de retenções dos padrões de FAME analisados dor CG-DIC. ....	
Tabela 9. Composição da cadeia graxa do óleo das amêndoas de tucumã – Lote 01. ....	
Tabela 10. Composição da cadeia graxa do óleo das amêndoas de tucumã - Lote 02.....	
Tabela 11. Atividade hidrolítica das lipases de diferentes fontes.....	
Tabela 12. Atividade específica das lipases comerciais. ....	
Tabela 13. Condição reacional para determinar a melhor concentração de enzima e tensoativo.	
Tabela 14. Condição reacional para determinar o pH ótimo de atividade catalítica. ....	
Tabela 15. Condição reacional para determinar a temperatura ótima de atividade catalítica	
Tabela 16. Condição reacional para avaliar melhor interface óleo/tampão. ....	
Tabela 17. Conversão em AG por 5 horas de reação. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabela 18. Tempos de retenção e áreas médias dos padrões de FFA injetados em modo reverso.....	
Tabela 19. Quantificação por CLAE dos ácidos graxos obtido na reação de hidrólise referente ao lote 01. ....	
Tabela 20. Quantificação dos TG e AG por CCD-Densitometria referente ao lote 02.....	
Tabela 21. Quantificação por CLAE dos ácidos graxos obtidos na reação de hidrólise do lote02.....	
Tabela 22. Quantificação por CLAE dos ácidos graxos referente ao ciclo II do lote 02.....	
Tabela 23. Quantificação por CLAE dos ácidos graxos referente ao ciclo III do lote 02. ....	
Tabela 24. Comparação entre dos rendimentos das rotas metílicas e etílicas aplicadas aos lotes 01 e 02.	
Tabela 25. Identificação dos picos majoritários da amostra de biodiesel metílico. ....	
Tabela 26. Identificação dos picos majoritários da amostra de biodiesel etílico.....	

## GRÁFICOS

Gráfico 2. Curva analítica de quantificação de ácidos graxos (AG) por CCD-Densitometria. .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 3. Curva analítica de quantificação dos triacilglicerídeos (TG) por CCD-Densitometria. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 4. Hidrólise enzimática utilizando 0,40 % de tensoativo e diferentes concentrações de enzima.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 5. Hidrólise enzimática utilizando 0,80 % de tensoativo e diferentes concentrações de enzima.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 6. Taxa de hidrólise na faixa de pH entre 6,50 - 8,50. .	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 7. Taxa de hidrólise em diferentes temperaturas.....	
Gráfico 8. Influência da interface óleo/tampão na taxa de hidrólise.....	
Gráfico 9. Efeito da concentração de tensoativo na taxa de hidrólise dos AG.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 10. Decaimento da concentração de TG obtido por CCD-Densitometria.....	
Gráfico 11. Aumento da concentração dos AG obtida por CCD-Densitometria.....	
Gráfico 12. Decaimento na concentração de TG em função do aumento na concentração de ... AG por CCD-Densitometria.....	
Gráfico 13. Curva analítica do AGL C10:0 por CLAE.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Gráfico 14. Curva analítica do AGL C12:0 por CLAE.....	
Gráfico 15. Curva analítica do AGL C14:0 por CLAE.....	
Gráfico 16. Curva analítica do AGL C16:0 por CLAE.....	
Gráfico 17. Curva analítica do AGL C18:0 por CLAE.....	
Gráfico 18. Curva analítica do AGL C18:1 por CLAE.....	
Gráfico 19. Curva analítica do AGL C18:2 por CLAE.....	
Gráfico 20. Decaimento da concentração de TG e aumento da concentração de AG em função do tempo determinado por CCD-Densitometria.....	
Gráfico 21. Reações de hidrólise consecutivas com o lote 02.....	
Gráfico 22. Quantificação dos TG e AG obtido na reação de hidrólise.....	

**ABREVIATURAS**

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Associação Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	American Oil Chemists' Society
APROBIO	Associação de Produtores de Biodiesel do Brasil
ASTM	American Society for Testing and Materials
CEN	Comitê Europeu de Normalização
ANVISA	Associação Nacional de Vigilância Sanitária
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CCD-FN	Cromatografia em Camada Delgada em Fase Normal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DG	Diacilgliceróis
EtOH	Etanol
FFA	Free Fatty Acid (ácidos graxos livres)
FAEE	Fatty Acid Ethyl Ester (éster etílico de ácidos graxos)
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (éster metílico de ácido graxo)
g	Aceleração da Gravidade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
IA	Índice de acidez
II	Índice de Iodo
IP	Índice de Peróxido
IS	Índice de Saponificação
MG	Monoacilgliceróis
MeOH	Metanol
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
TG	Triacilgliceróis
USDA	United States Department of Agriculture

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Fornecimentos de energia.....	15
2.2	Utilização sustentável dos recursos renováveis na Amazônia .....	18
2.2.1	Palmeiras oleaginosas .....	18
2.2.2	Óleo da amêndoa de tucumã ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> G. F. W. Meyer) ...	19
2.3	Biodiesel.....	22
2.3.2	Característica do biodiesel frente ao petrodiesel.....	24
2.3.3	Especificação e técnicas de monitoramento de conversões de biodiesel ....	25
2.4	Óleos e gorduras .....	28
2.4.1	Composição de óleos e gorduras .....	28
2.4.2	Característica da matéria-prima empregada na produção de biodiesel .....	30
2.5	O papel da química verde na produção de combustíveis .....	31
2.6	Principais processos empregados para produção de biodiesel .....	32
2.6.1	Transesterificação.....	32
2.6.1.1	Transesterificação por catálise básica homogênea.....	34
2.6.1.2	Transesterificação por catálise ácida homogênea .....	35
2.6.1.3	Transesterificação enzimática .....	35
2.6.1.4	Esterificação seguida da transesterificação .....	36
2.6.1.5	Hidroesterificação (Hidrólise seguida da Esterificação).....	37
2.7	Enzimas .....	38
2.7.1	Lipases.....	38
2.7.1.1	Mecanismo de catálise enzimática .....	40
2.7.1.2	Regioespecificidade .....	42
I.	Lipases 1,3- específica .....	43
II.	Lipases não-específicas .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

O panorama mundial está mudando rapidamente, por motivos ligados a três das grandes preocupações da humanidade: meio-ambiente, energia e economia. Embora à primeira vista possam parecer distintas, estas três áreas estão completamente interligadas. As duas primeiras estão há mais tempo na percepção do cidadão comum, devido ao efeito estufa e aquecimento global associado ao uso de combustíveis fósseis (VICHI e MANSOR, 2009).

O aquecimento global está diretamente relacionado à emissão excessiva de gases do efeito estufa na atmosfera, principalmente o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Assuntos associados ao meio ambiente são um dos temas mais abordados atualmente em diversas áreas do conhecimento. Desde o início da era industrial, os níveis de dióxido de carbono na atmosfera aumentaram em aproximadamente 40%, determinando com que rapidez e até que ponto esses níveis continuarão a aumentar (FAPESP, 2010). Desta forma, há cada vez menos dúvida de que os riscos são grandes e provas de que o aquecimento global induzido pelo homem já está em curso.

Em outro contexto, aproximadamente 1,6 bilhões de pessoas em todo o mundo vivem sem eletricidade (FAPESP, 2010). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste concentram a maior parte das comunidades brasileiras que não tem acesso à rede de distribuição de energia elétrica. Coincidentemente, são essas localidades que possuem os menores Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) do país. Sabe-se que o acesso à energia elétrica é fator essencial ao desenvolvimento social e econômico de uma região ou país. A qualidade de vida que dela resulta impossibilita a realização das tarefas mais simples e essenciais ao cotidiano de qualquer pessoa (PNUD, 2011).

O programa do Governo Federal, Luz para Todos, lançado em 2003, completou dez anos e ainda é possível verificar comunidades brasileiras, a maior parte localizada na região amazônica, sem acesso à rede de distribuição de energia elétrica, atual modelo de fornecimento de eletricidade no Brasil. Entretanto, existem diversos problemas relacionados aos desequilíbrios sócio-espaciais, como o alto custo da geração, transmissão e distribuição de energia hidrelétrica que inviabilizam tais iniciativas para atender necessidades energéticas de pequena escala, deixando desprovidas de abastecimento populações rurais e/ou extrativistas geograficamente isoladas dos grandes centros urbanos (GREENTEC, 2003).

As regiões de baixa densidade populacional apresentam baixos índices de eletrificação em razão deste modelo, pois a extensão da rede para atendimento de poucos consumidores é, geralmente, econômica e ambientalmente inviável (VELÁZQUEZ *et al.*, 2010).

Abrangendo quase 60% do território nacional, a Amazônia abriga inúmeras comunidades ribeirinhas que não dispõem de recursos básicos à sobrevivência, dentre eles a energia elétrica. Assim, o programa do Governo Federal, Luz para Todos tem como desafio minimizar a exclusão elétrica no país, tem na região Amazônica, um dos seus maiores desafios. As dificuldades em levar a eletrificação rural a essas comunidades, e a necessidade de limitar o uso de combustíveis fósseis, substituindo-os por alternativas energéticas não poluidoras e renováveis, justificam investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fontes alternativas de energia.

A produção centralizada de energia elétrica e sua posterior distribuição, através de redes de transmissão, são praticamente inviáveis em um cenário onde os consumidores estão espalhados em pequenas comunidades distantes entre si por grandes distâncias (DI LASCIO e BARRETO, 2009). Consequentemente os sistemas descentralizados de geração e distribuição vêm sendo largamente instalados na região Amazônica. A maioria dos sistemas de geração de energia elétrica nessas localidades baseia-se em motores a ciclo diesel. Desta forma, o emprego de unidades de geração de energia elétrica de pequeno porte utilizando biocombustíveis, por exemplo, biodiesel, obtidos a partir de espécies vegetais nativas; pode vir a ser uma alternativa economicamente viável para estas localidades (DI LASCIO e BARRETO, 2009).

A busca por combustíveis alternativos tem tornado o cerne das projeções desejáveis, o biocombustível é capaz de substituir parcial ou totalmente o diesel, tanto para o transporte como para setores de energia, reduzindo a dependência dos combustíveis fósseis (COSTA *et al.*, 2013). No Brasil, os dois principais biocombustíveis usados são o etanol, extraído da cana-de-açúcar, e o biodiesel, produzidos a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais.

O biodiesel é uma mistura de ésteres mono-alquílicos produzida a partir de fontes biológicas renováveis, tais como óleos vegetais, gorduras animais, óleos residuais e óleos de algas (TALEBIAN-KIAKALAIEH *et al.*, 2013). A produção mundial de óleo tem crescido rapidamente, nos períodos entre 2012/13 e 2013/14, foram produzidas 160,32 e 166,91 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2013). Estes valores referem-se à produção de nove fontes oleaginosas: coco, algodão, oliva, palma (dendê), palmiste de dendê, amendoim, canola, soja e girassol (USDA, 2013; OIL WORLD, 2013). Contudo, estas oleaginosas são normalmente destinadas para fins alimentícios, o que tem tornado um fator limitante para a produção de biodiesel utilizando esse tipo de matéria-prima.

A economicidade do processo é um dos principais fatores na produção de biodiesel, onde o custo da fonte oleaginosa desempenha um papel central. A ideia principal é

transformar uma matéria-prima renovável num combustível alternativo semelhante aos derivados do petróleo, visando baixo custo de produção com alta eficiência e menor impacto ambiental (MARTINELLI *et al.*, 2008).

A geração de um combustível *in loco*, empregando os recursos naturais da própria biodiversidade amazônica, a partir de espécies oleaginosas nativas, de forma sustentada e manejada é uma das melhores alternativas para as comunidades localizadas no interior da Amazônia; e o biodiesel é a alternativa existente mais viável de ser implementada em curto prazo, pois apresenta vantagens econômicas, sociais e ambientais.

Dentre as espécies oleaginosas nativas amazônicas destaca-se o tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Meyer), uma palmeira encontrada com grande abundância em áreas abertas, cujos frutos possuem grande teor de óleo em suas amêndoas, que atualmente não são aproveitadas.

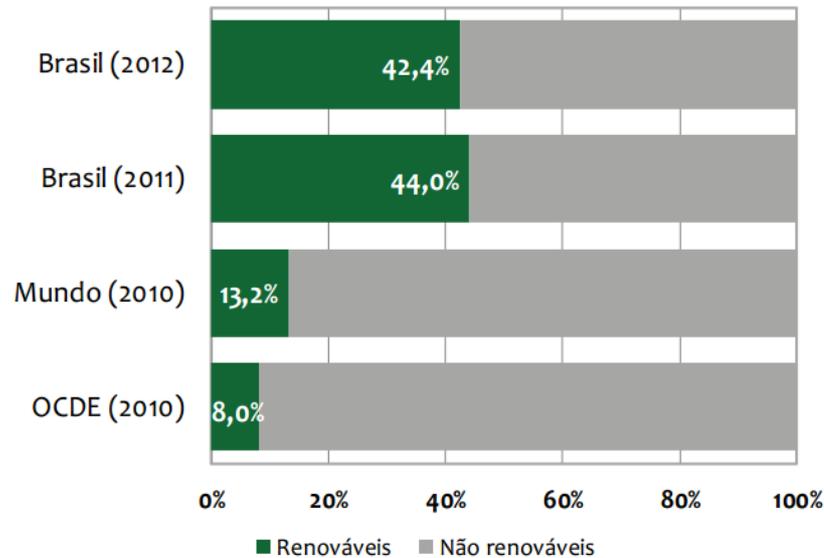
Considerando a importância de obter fontes de energia limpa e com baixo impacto ambiental o presente trabalho visa avaliar formas de gerar biodiesel utilizando óleo da amêndoa do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) com teores de acidez elevados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fornecimentos de energia**

A diversidade de oferta de energia mundial atualmente é dominada pelos combustíveis fósseis, como carvão, petróleo e gás natural que fornecem 80% da demanda de energia mundial primária. A biomassa tradicional e a energia hidroelétrica de larga escala são responsáveis por apenas 13,5%, e as modernas formas de energia renovável têm um papel relativamente pequeno atualmente (FAPESP, 2010; EPE/MME, 2013). O potencial de energia renovável inexplorada do planeta é enorme e está amplamente distribuído em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Dessa forma, explorar esse potencial oferece oportunidades únicas para apresentar soluções ambientais e desenvolvimento econômico.

No Brasil, o contexto energético é bastante diferente, o país possui a maior participação na sua matriz energética a partir de fontes renováveis (recursos hídricos, biomassa e etanol, além das energias eólica e solar) e mantém-se entre as mais elevadas do mundo. Em 2012, a participação de renováveis na matriz energética manteve-se entre as mais elevadas do mundo, com pequena redução devido à menor oferta de energia hidráulica e de etanol. A Figura 1 mostra a participação de renováveis na matriz energética.



**Fonte:** EPE; Agência Internacional de Energia. Elaboração: EPE

**Figura 1.** Participação de renováveis na matriz energética.

A oferta de energia não renovável correspondeu a 57,6% no ano de 2012, onde a maior parte, cerca de 39 % refere-se a utilização de petróleo e seus derivados.

Em relação à matriz elétrica brasileira é possível assegurar que 76,9 % correspondem à geração hidráulica, através de usinas hidroelétricas (EPE/MME, 2013). A hidroeletricidade é uma alternativa para obter energia elétrica a partir do fluxo da água de rios e lagos, normalmente asseguradas pela construção de barragens e conseqüentemente ocorre formação de um reservatório. Nenhuma outra fonte de energia é tão abundante e produtiva no Brasil quanto à hidráulica. Com 12% da água doce do planeta em seu território, o Brasil detém o quinto maior potencial de energia hidráulica do planeta. Desse total, 40,5% estão localizados na bacia do Amazonas, o que deveria restringir as possibilidades de exploração (ONS, 2014).

Empreendimentos hidrelétricos muitas vezes têm se tornado inviável por inúmeros fatores como a incerteza na capacidade e eficiência, o elevado custo de financiamento e os danos irreversíveis ao meio ambiente, como o desmatamento, alagamento de grandes áreas, as mudanças no ciclo hidrológico e o enorme impacto socioambiental. No Amazonas, o cenário é diferente. Até 2012, a matriz elétrica era baseada predominantemente através de usinas termelétricas; onde 85% da energia produzida no Estado vêm de termelétricas movidas a óleo diesel e 15% ocorre através de hidrelétrica, fornecida principalmente pela usina de Balbina, localizada no município de Presidente Figueiredo, a 107 km da capital (SOARES, 2009; SENAC, 2008). Os sete estados Amazônicos (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia,

Roraima e Tocantins) possuem juntos cerca de 260 usinas termelétricas em operação, a grande maioria movida a óleo diesel.

O parque gerador da empresa Amazonas Energia S.A (fusão da Manaus Energia S.A e CEAM) é composta pela usina de Balbina - Unidade Hidrelétrica, 170 unidades térmicas em Manaus e 426 pequenas unidades térmicas de campo (ANDRADE *et al.*, 2011). O sistema elétrico da empresa Amazonas Energia S.A beneficia uma população de 1.890.000 habitantes, o que é aproximadamente 63,4 % da população do estado. Entretanto, a população ainda não atendida por energia elétrica é muito alta, em torno de 1,1 milhões de habitantes, o que corresponde a aproximadamente 46,6 % do total (NEF, 2004). Sendo este o maior número de brasileiros que não possui serviços de distribuição de energia elétrica (MATOS *et al.*, 2011).

As usinas termelétricas possuem grandes desvantagens associadas aos custos de geração, que normalmente é baseada na utilização de combustíveis derivados de petróleo (frequentemente transportados por via fluvial, o que torna o processo caro e inviável), a baixa eficiência do sistema gera um serviço de baixa qualidade com constantes interrupções no abastecimento de energia com maior variação de 50% no valor da tensão nominal, com a ocorrência de transientes de energia, que é a causa da queima de vários aparelhos e dispositivos.

Várias comunidades remotas não possuem sistema isolado de abastecimento de energia elétrica, o que torna um fator limitante para desenvolvimento econômico e social dessas comunidades, isto é, uma vez que este recurso torna-se limitado em comunidades no interior de estado, o desenvolvimento da economia regional é prejudicado. Algumas comunidades não podem contar com um sistema íntegro de abastecimento de energia, isto é, não pode ser disponibilizada 24 horas/dia devido as dificuldades de manutenção do equipamento que é frequentemente pobre e como consequência, a eficiência do sistema é baixa e o consumo de combustível é alto (PEREIRA *et al.* , 2010). Entre os fatores que contribuem para esta situação é a grande extensão territorial do Estado, onde a população é dividida em pequenas comunidades em locais com difícil acesso. Habitantes distribuídos ao longo das margens dos rios, áreas alagadas ou até mesmo dentro da floresta, que dificulta o acesso e torna economicamente impossível a ampliação da rede elétrica nestas áreas.

Neste contexto faz-se necessário promover o desenvolvimento sustentável e econômico com a finalidade de gerar energia em comunidades remotas do Estado do Amazonas ocasionando menor impacto ambiental.

## **2.2 Utilização sustentável dos recursos renováveis na Amazônia**

### **2.2.1 Palmeiras oleaginosas**

As palmeiras estão entre as plantas mais antigas do globo, e seus vestígios remontam a mais de 120 milhões de anos. Pertencem a família das Arecaceae (Palmae), são representadas por cerca de 2.600 espécies reunidas em mais de 240 gêneros (LORENZI *et al.*, 2004), sendo que a Amazônia contém aproximadamente 50% dos gêneros e 30% das espécies (MIRANDA *et al.*, 2001). As espécies da família Arecaceae estão adaptadas em diversos tipos de habitats, como florestas de terra firme, floresta de campinarana, florestas periodicamente inundadas e ambientes degradados. Muitas palmeiras demonstram ser resistentes ao desmatamento e as queimadas, o que justifica sua ocorrência e normalmente em grande densidade (MIRANDA *et al.*, 2001; LORENZI *et al.*, 2006).

Algumas são conhecidas por nome vulgares que as identificam satisfatoriamente, mas muitas não os possuem ou se possuem dão origem a confusões por serem aplicados a plantas totalmente diferentes (LORENZI *et al.*, 2004).

A floresta amazônica, localizada no Norte do Brasil, é a maior floresta tropical da Terra, e é conhecida por sua rica biodiversidade (LIRA *et al.*, 2013). As palmeiras caracterizam essa paisagem, muitas delas são de grande importância econômica, ecológica, ornamental e alimentar. As palmeiras apresentam desenvolvimento perfeitamente individualizado, como a maioria das plantas, possuem raízes, caule, folhas e produzem flores, frutos e sementes (LORENZI *et al.*, 2004). Todas as partes de uma palmeira são aproveitadas, desde a alimentação até o uso medicinal (MIRANDA *et al.*, 2001).

Apesar de o Brasil possuir uma ampla diversidade de espécies oleaginosas (a partir da qual se extrai óleo vegetal) nativas, apenas um número reduzido delas é explorado. Dentre as razões está o pouco conhecimento científico existente sobre as mesmas. Esse panorama, entretanto, está mudando lentamente na medida em que algumas pesquisas são realizadas e novas informações sobre algumas espécies são publicadas e divulgadas. A região amazônica apresenta uma grande diversidade de espécies nativas tanto frutíferas quanto oleaginosas, que apresentam potencial econômico, tecnológico e nutricional. Isso tem despertado o interesse de cientistas em diversas áreas, tais como: alimentícia, farmacêutica, cosmética, aromatizante, essências e óleos/gorduras.

Entre as espécies mais exploradas na Amazônia para obtenção de óleos e gorduras podem ser citada as espécies nativas babaçu (*Orbygnia phalerata* Martius), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, murumuru (*Astrocaryum murumuru* Martius), pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), uricurí (*Sheelea phalerata* Martius Ex Spreng), pataúá (*Oenocarpus bataua* Martius) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Martius) (LORENZI *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2001).

### 2.2.2 Óleo da amêndoa de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. F. W. Meyer)

O nome *Astrocaryum* é composto de dois vocábulos latinos “astros” que corresponde a estrela e “caryum” refere-se ao fruto, com o significado de “fruto estrela” (LORENZI *et al.*, 2006). O gênero *Astrocaryum* apresenta diversas variações de espécies, tais como: *A. huaimi* Mart., *A. murumuru* Mart., *A. ulei* Burret., *A. gynacanthum* Mart., *A. chambira* Burret., *A. jauari* Mart., *A. aculeatum* Meyer (tucumã do Amazonas). O tucumã do Amazonas ou tucumanzeiro, *Astrocaryum aculeatum* G. F. W. Meyer; uma espécie que pertence à família Arecaceae das palmeiras (CAVALCANTE *et al.*, 1996) e que tem como sinônimas *A. princeps* Barb. Rodr., *A. tucuma* Mart., e *A. aureum* Griseb., *A. caudescens* Barb. Rodr., *A. macrocarpum* Huber (LORENZI *et al.*, 2004; LORENZI *et al.*, 2006; RABELO, 2012).

O tucumã do Amazonas (*A. aculeatum*) é considerado nativo do Norte da América do Sul, onde tem seu centro de dispersão até a Guiana Francesa e o Suriname. No Brasil, é frequentemente encontrado nos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia e Acre (LORENZI *et al.*, 1996; LORENZI *et al.*, 2004).

Essa espécie pode alcançar 25 metros de altura, 15 a 20 cm de diâmetro (CLEMENTE *et al.*, 2005; RABELO, 2012). A espécie é encontrada esporadicamente em pequenas densidades no interior da floresta e com grande abundância em áreas abertas: como capoeiras, savanas, pastagens abandonadas, margens de estradas, solos compactados, degradados e com baixa fertilidade, seguindo a ocupação humana (MIRANDA *et al.*, 2001). A palmeira *Astrocaryum aculeatum* está representada na Figura 2.



**Fonte:** Rabelo, 2012.

**Figura 2.** Hábito de crescimento do tucumazeiro (*Astrocaryum aculeatum*). (a) em pastagens; (b) em área de capoeira e (c) altura máxima atingida por uma palmeira típica.

Normalmente crescem aproximadamente 50 árvores por hectare, em média, as árvores produzem 2-3 cachos por ano, mas pode produzir mais de cinco por ano, onde cada cacho pesa entre 10 e 30 kg e contém 200-400 frutos. Uma típica palmeira produz cerca de 50 kg de frutas por ano, mesmo em solos pobres (FAO, 1986). A frutificação ocorre durante todo o ano, porém o pico de produção ocorre no primeiro semestre do ano.

Em Manaus, os frutos chegam principalmente de pequenos municípios do estado como Autaz Mirim, Autazes, Barreirinha, Cacau Pereira, Coari, Fonte Boa, Iranduba, Itacoatiara, Lago do Limão, Manacapuru, Manicoré, Novo Remanso, Paraná da Eva, Parintins, Presidente Figueiredo, Rio Madeira, Rio Preto da Eva, Tefé, Terra Preta e Urucará (VIANA *et al.*, 2010).

Os frutos apresentam coloração amarelo-alaranjado, tamanho oscilando de 3,2- 5,6 cm de comprimento a 2,5-5,4 cm de diâmetro e formas variando entre globosas, subglobosas e

ovoides (RABELO, 2012). O mesocarpo (polpa) é considerado um alimento especial por conter consideráveis quantidades de  $\beta$ -caroteno, proteínas minerais, lipídeos, carboidratos, óleos e fibras. A polpa alaranjada de 2 a 4 mm de espessura, de consistência mais oleosa e menos fibrosa (CAVALCANTE, 1996; CLEMENTE *et al.*, 2005; YUYAMA *et al.*, 2005). Os frutos estão representados na Figura 3.

Atualmente os frutos de tucumã figuram entre os principais alimentos das populações tradicionais da região Norte do Brasil, sobretudo no Estado do Amazonas, onde possuem grande valor econômico e potencial para utilização em agroindústria na preparação de bolos, cremes, pães, pizza macarronadas, sorvetes, sucos, entre outros. O óleo extraído do mesocarpo é considerado comestível, de cor amarela, possui características organolépticas e nutritivas de alto valor para a indústria de alimentos e cosmética (YUYAMA *et al.*, 2005). O endocarpo (tegumento das sementes) possui grande potencial para confecção de biojoias e outros diversos artefatos de valor (MIRANDA *et al.*, 2001).

O endosperma (amêndoa) é espesso e possui coloração branca e uma pequena cavidade no centro contendo água. O endosperma quando verde serve de alimento, porém aqueles provenientes de frutos maduros possuem potencial para extração de óleo, o qual pode ser empregado na indústria de alimentos, cosméticos ou extração de óleo para combustível alternativo ao diesel, o biodiesel (CAVALCANTE *et al.*, 1996; RABELO, 2012). Figura 3c e 3d é mostrado o endocarpo do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*).

Da amêndoa, que representa entre 55- 65% do total do peso do fruto, extrai-se uma gordura, cujos ácidos graxos são 90% saturados, de cadeias carbônicas entre 8 e 14 carbonos. O contínuo e alto consumo de polpa tem gerado uma grande quantidade de matéria-prima (semente/amêndoa) que normalmente constitui um resíduo, pois não há grande valor agregado. Com a finalidade de obter o gerenciamento de resíduo devido à quantidade de amêndoa gerada (descartada), estudos estão sendo desenvolvidos para produzir biodiesel a partir da amêndoa do tucumã (LIRA *et al.*, 2013).

O biodiesel é um produto para o setor de energia, o óleo para produzir biodiesel necessariamente precisar ser barato e disponível em grandes quantidades. O Brasil é um país com enormes diferenças regionais tanto no clima quanto no solo, o que se torna totalmente viável utilizar os recursos regionais.



Fonte: Rabelo, 2012

**Figura 3.** Fruto e sementes de *Astrocaryum aculeatum*. (a) infrutescência; (b) Fruto para comercialização; (c) frutos descerrados; (d) sementes inteiras e descerradas; (e) bijoias das sementes.

## 2.3 Biodiesel

### 2.3.1 Contextualização

A história do biodiesel é tão longa quanto dos motores a diesel, quando o uso de óleos vegetais foi investigado no mesmo período em que motor diesel foi desenvolvido por Rudolf Diesel (1858-1913). Na época, Diesel testou o óleo de amendoim *in natura* como combustível. Em seguida, muitos outros óleos vegetais foram investigados como óleo de palma (dendê), de soja, de semente de algodão, de mamona, entre outros (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014). Os principais problemas associados ao uso de óleos vegetais *in natura* nos motores a diesel são: a dificuldade de partida a frio, em razão da elevada viscosidade dos óleos vegetais; a formação de gomas nos bicos injetores; o desgaste de componentes da bomba injetora, devido à acidez do óleo; e a formação de depósitos de carvão na câmara de

combustão, nos cilindros e nas válvulas (FUKUDA *et al.*, 2001; KALTNER, 2004; ISSARIYAKUL e DALAI, 2014). Estas publicações iniciais mostraram um desempenho satisfatório ao utilizar óleo vegetal como combustível para os motores diesel. Porém, a utilização de óleos vegetais em substituição ao óleo diesel tem sido realizada de forma satisfatória, após a derivatização dos óleos vegetais, em especial como biodiesel. Visando reduzir a viscosidade e solucionar outros inconvenientes, algumas formas alternativas de combustível obtidos a partir de óleos vegetais estão sendo estudadas tais como os processos de transesterificação, esterificação–transesterificação, hidrólise–esterificação, que levam a produção de biodiesel; e os processos de craqueamento térmico e hidrogenação, que levam a produção de bioóleo ou outros tipos de combustíveis.

A transformação de óleos/gorduras em biocombustíveis, em particular o biodiesel, tem-se tornado cada vez mais viável devido aos problemas ambientais e sociais do mundo. Metade das fontes de energia utilizadas atualmente provém de matéria-prima não renovável, como petróleo e gás natural. O óleo diesel é o combustível que apresenta a maior demanda mundial, sendo utilizado em vários setores da sociedade, principalmente no transporte doméstico e industrial. Em todo o mundo, o foco de pesquisadores, governos e empresas destina-se em aumentar a participação das fontes renováveis de energia na matriz energética do planeta (QUEIROZ *et al.*, 2012).

O biodiesel é uma das fontes renováveis que está em alta expansão na substituição do diesel de petróleo no Brasil (DORADO *et al.*, 2003), e normalmente é produzido a partir de óleos vegetais e/ou gorduras animais, pelo rota da transesterificação pela catálise básica homogênea pela via metálica. No Brasil, o governo federal criou em 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) com objetivo de implementar de forma sustentável, tecnológica e econômica a produção e utilização de biodiesel, inicialmente em proporções definidas ao óleo diesel (CASTANHEIRA *et al.*, 2014). Foi inserido na matriz energética a partir da aprovação da lei nº 11.097/2005, que instituiu o PNPB e fixou percentuais mínimos de biodiesel ao petrodiesel (diesel de origem não-renovável). O percentual inicial previa a adição de 2% de biodiesel no óleo diesel produzido no Brasil desde 2008. A partir de julho de 2008 a porcentagem foi alterado para 3% de biodiesel (B3) e 4% de biodiesel (B4) em julho de 2009. Em janeiro de 2010, a porcentagem foi aumentada para 5% de biodiesel (B5) o que resulta em uma demanda de cerca de 3 bilhões de litros/ano (CÉSAR *et al.*, 2013). Segundo APROBIO, a próxima etapa é aumentar a mistura de 5% para 7% de biodiesel ao óleo diesel e assim haveria um consumo adicional de 1,2 bilhão de litros de biodiesel por ano.

### 2.3.2 Característica do biodiesel frente ao petrodiesel

A busca incessante por uma fonte energética alternativa ao petróleo e a aplicação de regras mais severas em combate à poluição ambiental têm colocado em evidência o emprego de várias fontes renováveis de energia, como a biomassa (SILVA *et al.*, 2012).

A composição química do óleo diesel é complexa, consiste em hidrocarbonetos de cadeia linear como componente principal, possui moléculas com C12 a C25, além dos alcanos lineares, são encontrados alcanos ramificados, parafinas, naftenos, aromáticos nitrogênio e enxofre (KNOTHE *et al.*, 2010; ABBASZAADEH e GHOBADIAN, 2012).

Quimicamente, de acordo com ASTM, o biodiesel é definido como um combustível constituído de ésteres mono alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais e/ou gorduras animais. Essa mistura de ésteres monoalquílicos possui queima limpa, quando produzida a partir de matérias-primas renováveis. Normalmente o perfil de ésteres de ácidos graxos corresponde à matéria-prima de origem, o mais comum ocorre com cadeia carbônica composta dos ácidos graxos com 10 a 20 carbonos.

O biodiesel vem sendo estudado como fonte de energia alternativa, que pode vir a solucionar muitos problemas ambientais e energéticos, possui característica muito semelhante ao diesel de petróleo e pode ser misturado ao diesel em qualquer proporção (NASIR *et al.*, 2013). O biodiesel apresenta vantagens importantes em relação ao diesel;

- Possui teor médio de oxigênio 11%, e assim conduz a uma combustão mais completa e eficiente em relação ao diesel (ABBASZAADEH e GHOBADIAN, 2012).
- O número de cetano do biodiesel varia entre 45 e 70, em comparação com 40 e 52 para o diesel de petróleo e depende da distribuição de ácidos graxos do óleo de origem. O elevado número de cetano confere ao biodiesel elevado poder de autoignição e combustão
- Apresenta maior ponto de fugor quando comparado ao diesel de petróleo e gasolina, tornando-se assim que um dos combustíveis disponíveis mais seguras (KISS, 2009).
- Permite melhorar o fechamento do ciclo do carbono e, quando de origem vegetal, intensifica o sequestro de CO<sub>2</sub> da atmosfera (QUINTELLA *et al.*, 2009).
- Proporciona uma melhor lubrificação e uma combustão mais completa frente ao diesel de petróleo (KNOTHE, 2014).
- Possui muitas propriedades superiores em comparação ao diesel de petróleo, tais como baixas emissões de escape, biodegradável, não tóxico, renovável e livre de enxofre (LEUNG *et al.*, 2010; KNOTHE, 2010).

O biodiesel proveniente de óleos vegetais cuja composição química da cadeia graxa seja curta e saturada (características de oleaginosas da Amazônia, como babaçu, tucumã, urucuri e murumuru), apresenta maior estabilidade oxidativa, devido o baixo teor de ácidos graxos insaturados (CORREIA *et al.*, 2006).

Segundo QUINTELLA *et al.*, 2009, a maior desvantagem tecnológica do biodiesel é a relação inversa entre a estabilidade oxidativa (favorecida pela maior concentração de ácidos graxos saturados) e as propriedades a baixa temperatura, como ponto de névoa. O ponto de névoa é a temperatura em que pequenos cristais são visualizados quando a substância é resfriada, ocasionando vários problemas operacionais como entupimento do filtro de combustível e dificuldade de bombeamento do combustível do tanque para o motor. Uma alternativa é a adição de aditivos, que auxiliam na redução do ponto de névoa do biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2014).

Diante de toda essa situação, inúmeros fatores denotam a importância de obter e manter programas de incentivos à produção de biodiesel, assim como a investigação de matérias-primas economicamente viáveis. Desta forma, para que o biodiesel tenha um papel ativo no mercado de energia, precisa ser produzido a um custo bem mais baixo e atender às especificações brasileiras e internacionais (QUINTELLA *et al.*, 2009).

### **2.3.3 Especificação e técnicas de monitoramento de conversões de biodiesel**

Para produção de biodiesel é fundamental conhecer a composição da cadeia graxa do óleo ou gordura, assim como outras propriedades físicas e químicas como, índice de acidez, iodo, peróxido, saponificação e porcentagem de ácidos graxos livres, que são características importantes para definir a utilização como matéria-prima para produção de biodiesel. No entanto, o produto final, no caso o biodiesel, necessariamente precisa possuir um controle de qualidade que garanta o bom desempenho no motor a diesel para que possa ser inserido com segurança no mercado. O padrão de qualidade americano, elaborado pela American Society for Testing and Materials (ASTM) através da norma D6751, e o estabelecido na União Européia através da norma EN 14214 do CEN representam os mais conhecidos parâmetros e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões (KNOTHE *et al.*, 2014). As especificações brasileiras são determinadas pela ANP, a resolução mais recente é 14/2012, baseada nas normas nacionais ABNT e internacionais ASTM e EN (ANP, 2014). Na Tabela 1 encontram-se listados os padrões de qualidade do biodiesel.

Diversas técnicas cromatográficas têm sido desenvolvidas e utilizadas com a finalidade de monitorar o progresso da reação assim como o produto final e oferecem uma percepção abrangente e informações necessárias para o controle de qualidade do biodiesel, porém as técnicas mais utilizadas para monitorar e quantificar os ésteres de ácidos graxos (biodiesel) é a Cromatografia Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE).

Para analisar a glicerina livre e total (glicerina livre + glicerina combinada) em biodiesel normalmente utiliza-se o CG. A glicerina combinada, mono-, di- e triacilglicerídeos é um grande inconveniente, através da determinação desses constituintes é possível avaliar eficiência de conversão de óleos e gorduras em biodiesel (LÔBO *et al.*, 2009; ISSARIYAKUL e DALAI, 2014).

As principais vantagens da CLAE sobre o GC são a baixa temperatura durante a análise, simplicidade na preparação da amostra, dispensa derivatização, o que reduz o tempo de análise, permite analisar e quantificar ésteres alquílicos, ácidos graxos livres, triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis (MEHER *et al.*, 2006; HOEKMAN *et al.*, 2012).

Tabela 1. Diferentes especificações de qualidade do biodiesel.

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	Brasil ANP 14/2012	UE EN 14214	EUA ASTM D6751
Aspecto	---	Límpido e isento de impureza	---	---
Massa específica *	kg/m <sup>3</sup>	850 - 900 a 20°C	860 - 900 a 15°C	---
Viscosidade cinemática a 40°C *	mm <sup>2</sup> /s	3,0 - 6,0	3,5 - 5,0	1,9 - 6,0
Água e sedimentos, máx.*	% volume	---	---	0,05
Ponto de fulgor, min. *	°C	100	120	130
Destilação, 90% vol. Recuperados, máx. *	°C	---	---	360
Resíduo de carbono dos, máx. *	% massa	Em 100% da amostra 0,050	10% residual da destilação 0,3	Em 100% da amostra 0,05
Cinzas sulfatadas, máx. *	% massa	0,020	0,02	---
Enxofre total, máx. *	mg/kg	50	10	15
Corrisividade ao cobre, 3h a 50°C, máx.*	-	1	1	3
Número de cetanos *	-	Anotar	51 (mín.)	47 (mín)
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx. *	°C	19	Por região	---
Ponto de fluidez (pour point - PP) *	°C	---	Por região	---
Ponto de nuvem (cloud point - CP) *	°C	---	---	Registrar
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	5	---
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	5	---
Fósforo, máx.	mg/kg	10	10	10
Contaminação total, máx.	mg/kg	24	24	---
Teor de éster, min.	% massa	96,5	96,5	---
Índice de Acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	0,5	0,5
Glicerina livre, máx.	% massa	0,02	0,02	0,02
Glicerina total, máx.	% massa	0,25	0,25	0,24
Monoglicérides	% massa	Anotar	0,8 (máx.)	---
Diglicérides	% massa	Anotar	0,2 (máx.)	---
Triglicérides	% massa	Anotar	0,2 (máx.)	---
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	Anotar	0,2 (máx.)	---
Índice de iodo	g I <sub>2</sub> /100g	Anotar	120 (máx.)	---
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	h	6	6	---
Água, máx.	mg/kg	500	500	500
Ácido linolênico	% massa	---	12 max	---
Metil ésteres com mais de 4 insaturações.	% massa	---	1 max.	---

\* Parâmetros típicos da normatização do diesel mineral

## 2.4 Óleos e gorduras

Para produção de biodiesel utiliza-se como matéria-prima lipídeos, que inclui óleos vegetais, gorduras animais, e, recentemente micro algas e cianobactérias (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014). Os lipídeos são grupos heterogêneo de compostos mais relacionados por suas propriedades físicas do que por suas propriedades químicas, possuem alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (MURRAY *et al.*, 2006).

Os lipídeos são classificados como simples ou complexo, os lipídeos simples são ésteres de ácidos graxos com vários álcoois e estão inclusos óleos, gorduras e ceras; os lipídeos complexos são ésteres de ácidos contendo outros grupos além de álcool e ácido e estão incluídas neste grupo fosfolipídeos, glicolipídeos, entre outros. Há também os precursores e derivados de lipídeos que incluem ácidos graxos, glicerol, outros álcoois, aldeídos graxos, corpos cetônicos esteroides, vitaminas lipossolúveis e hormônios (MURRAY *et al.*, 2006; LEHNINGER *et al.*, 1995).

### 2.4.1 Composição de óleos e gorduras

Os óleos vegetais normalmente são constituídos em maior quantidade de triacilglicerídeos (TG), uma molécula composta de três ésteres de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. Quando apenas um ou dois grupos hidroxila (-OH) estão esterificados com ácidos graxos são denominados respectivamente de diacilglicerol (DG) e monoacilglicerol (MG) (Tabela 2). O termo acilgliceróis se refere aos diferentes TG, DG, ou MG (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014) existentes.

**Tabela 2.** Estrutura molecular de triacilglicerídeos, diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos.

Triacilgliceróis (TG)	Diacilgliceróis (DG)	Monoacilgliceróis (MG)
$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_2 \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_3  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{HC}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_2 \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_3  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{HC}-\text{OH} \\    \\  \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_3  \end{array}  $

Os ácidos graxos das moléculas de triacil-, diacil-, e monoacilgliceróis, que compõem óleos e gorduras, podem diferir pelo comprimento da cadeia carbônica, número, orientação e posição de insaturações em suas cadeias e assim é utilizada uma notação abreviada para cada ácido (MEHER *et al.*, 2006).

Na Tabela 3 estão representados os principais ácidos, que ocorrem na natureza (saturados e insaturados), sendo que os ácidos insaturados normalmente ocorrem na forma *cis* e podem ser divididos em mono e poli-insaturados. Os ácidos graxos poli-insaturados podem ser identificados e representados através de uma simbologia diferenciada denominada ômega. Por exemplo, o ácido linoléico C 18:2 (9,12) será representado por C 18:2  $\omega$ -6. A nomenclatura ômega ( $\omega$ ) é utilizada contabilizando a primeira insaturação (ligação dupla) a partir do radical metila, ou seja, o carbono mais afastado do grupo carboxila e podem ser divididos entre ômegas das séries 3, 6 e 9 (STEHR e HELLER, 2006).

**Tabela 3.** Principais ácidos graxos saturados e insaturados.

Nomenclatura comum	Nomenclatura IUPAC	Ligações duplas	Símbolo	Fórmula
Butírico	Butanóico	-	4:0	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Capróico	Hexanóico	-	6:0	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Caprílico	Octanóico	-	8:0	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
Cáprico	Decanóico	-	10:0	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
Láurico	Dodecanóico	-	12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Mirístico	Tetradecanóico	-	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Palmítico	Hexadecanóico	-	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Esteárico	Octadecanóico	-	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Oléico	Octadecenóico	9	18:1 $\omega$ -9	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Linoléico	Octadecadienóico	9,12	18:2 $\omega$ -6	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Linolênico	Octadecatrienóico	9,12,15	18:3 $\omega$ -3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Araquídico	Eicosanóico	-	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Araquidônico	Eicosatetraenóico	5,8,11,14	20:4 $\omega$ -6	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
EPA	Eicosapentaenóico	5,8,11,14,17	20:5 $\omega$ -3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Behênico	Docosanóico	-	22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
DHA	Docosahexaenóico	4,7,10,13,16,19	22:6 $\omega$ -3	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>

**Fonte:** [Adaptado de GUNSTONE, 2008].

#### 2.4.2 Característica da matéria-prima empregada na produção de biodiesel

Para produção de biodiesel através da reação de transesterificação utilizando a catálise básica é fundamental que a matéria-prima não possua acidez, ou seja, ácidos graxos livres (AGLs). Óleos que possuem quantidades de AGLs superiores a 4% são considerados matérias-primas com alto índice de acidez, pois o elevado teor de ácidos graxos livres aumenta a acidez da amostra e assim prejudica o curso da reação de transesterificação, formando sabão com o catalisador alcalino (VÉRAS *et al.*, 2011).

O índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres refletem o grau de degradação de óleos e gorduras, desta forma a quantificação de ácidos graxos é fundamental para a determinação do grau de degradação da amostra (MORETTO e FEET, 1989), uma vez que, com o tempo, pode ocorrer o fenômeno da hidrólise com o aparecimento de ácidos graxos livres. Esses índices desempenham um papel fundamental na rota a ser empregada para produção de biodiesel.

Vários fatores alteram a qualidade do óleo, o mais comum é a acidez que ocorre devido ao processo de hidrólise, onde as moléculas de triacilglicerídeos são convertidas em ácidos graxos livres, mono e diacilglicerídeos, e glicerol, provocada pela presença de água, enzimas e outras substâncias catalisadoras envolvidas no processo de degradação (COSTA NETO *et al.*, 2000). A deterioração das sementes de espécies oleaginosas, por exemplo, constitui um parâmetro importante a ser avaliado, e as mesmas devem ser armazenadas em locais com baixa umidade, onde a atividade enzimática e o crescimento do mofo estão mais inibidos (MORETTO e FETT, 1989). O armazenamento inadequado influencia no rendimento e qualidade do produto final e assim possibilita o aumento da acidez de uma amêndoa de 3-4% para 30-35%, ou superior. Normalmente matérias-primas denominadas de baixo custo e consideradas de “baixa qualidade”, devido ao alto e variável conteúdo de AGLs como, por exemplo, óleos utilizados em processos de fritura, óleos vegetais brutos.

A viabilização do biodiesel como combustível envolve a redução do seu custo de produção e o principal fator é o valor da matéria-prima (PADULA *et al.*, 2012). O alto custo da matéria-prima para a produção de biocombustíveis representa até 95% do custo total da produção e funciona como um dos principais gargalos para a sua produção e consumo universal (KULKARNI e DALAI, 2006; ZHANG *et al.*, 2003). Com a finalidade de minimizar este problema pesquisas estão sendo desenvolvidas para encontrar novas matérias-primas, tais como microalgas, óleos vegetais residuais, óleos não comestíveis e gorduras de origem animal que possibilitem transformação em biocombustíveis. Atualmente um dos

principais obstáculos para o aumento do percentual de biodiesel ao combustível é o custo da produção do óleo. Apesar de liderar o mercado da indústria do biodiesel, a soja é uma matéria-prima cara e considerada um material nobre tanto na indústria alimentícia quanto no setor energético, colocando em debate o impacto do estímulo da produção de biocombustíveis, em detrimento da produção de alimentos.

## **2.5 O papel da química verde na produção de combustíveis**

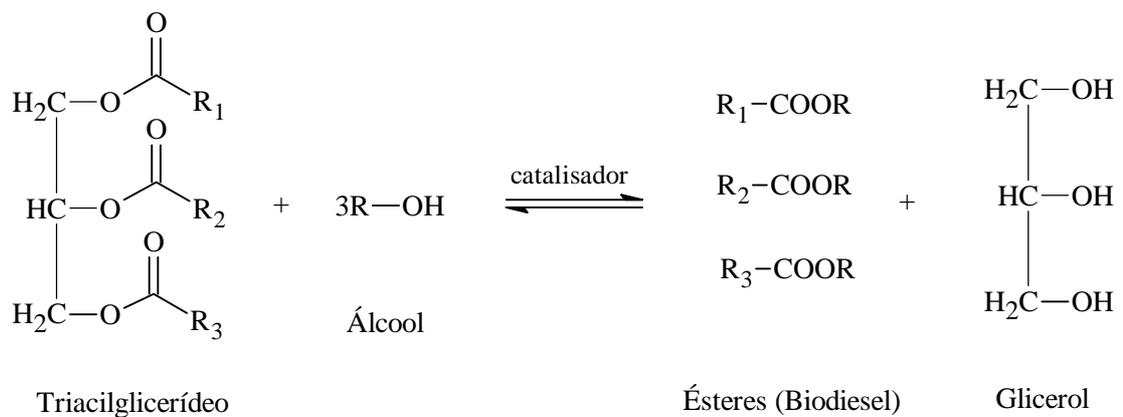
Mais recentemente a química verde vem sendo introduzida e visa o desenvolvimento de produtos e processos químicos que reduzam ou eliminem a geração de resíduos e efluentes tóxicos no meio ambiente. Neste sentido, a catálise tem um papel importantíssimo e é considerada como um dos seus pilares fundamentais.

O desenvolvimento e a aplicação de novos materiais e sistemas catalíticos homogêneos e heterogêneos devem atingir simultaneamente os objetivos específicos dessa nova tendência, isto é, trazer benefícios econômicos e proteção ambiental (SILVA *et al.*, 2010). Dentre os benefícios econômicos da catálise estão à diminuição de custos com energia, utilização de quantidades estequiométricas dos substratos, aumento da seletividade das reações, diminuição de processamento e separação de agentes, permitindo a diminuição do uso de substâncias tóxicas. Nesse cenário, o desenvolvimento de novos catalisadores deve estar ligado aos seguintes fatores: estabilidade, atividade, solubilidade e facilidade de separação do catalisador dos produtos. Modificações na composição e estruturação de catalisadores podem trazer resultados significativos na seletividade, consumo de energia e diminuição de utilização de solventes contribuindo positivamente para a preservação do meio ambiente. Em especial, as catálises enzimática e heterogênea têm sido apontadas como alternativas viáveis, principalmente pela redução de custos de separação entre o produto final e o catalisador, com menor geração de poluentes (SILVA *et al.*, 2010; PRADO, 2003).

## 2.6 Principais processos empregados para produção de biodiesel

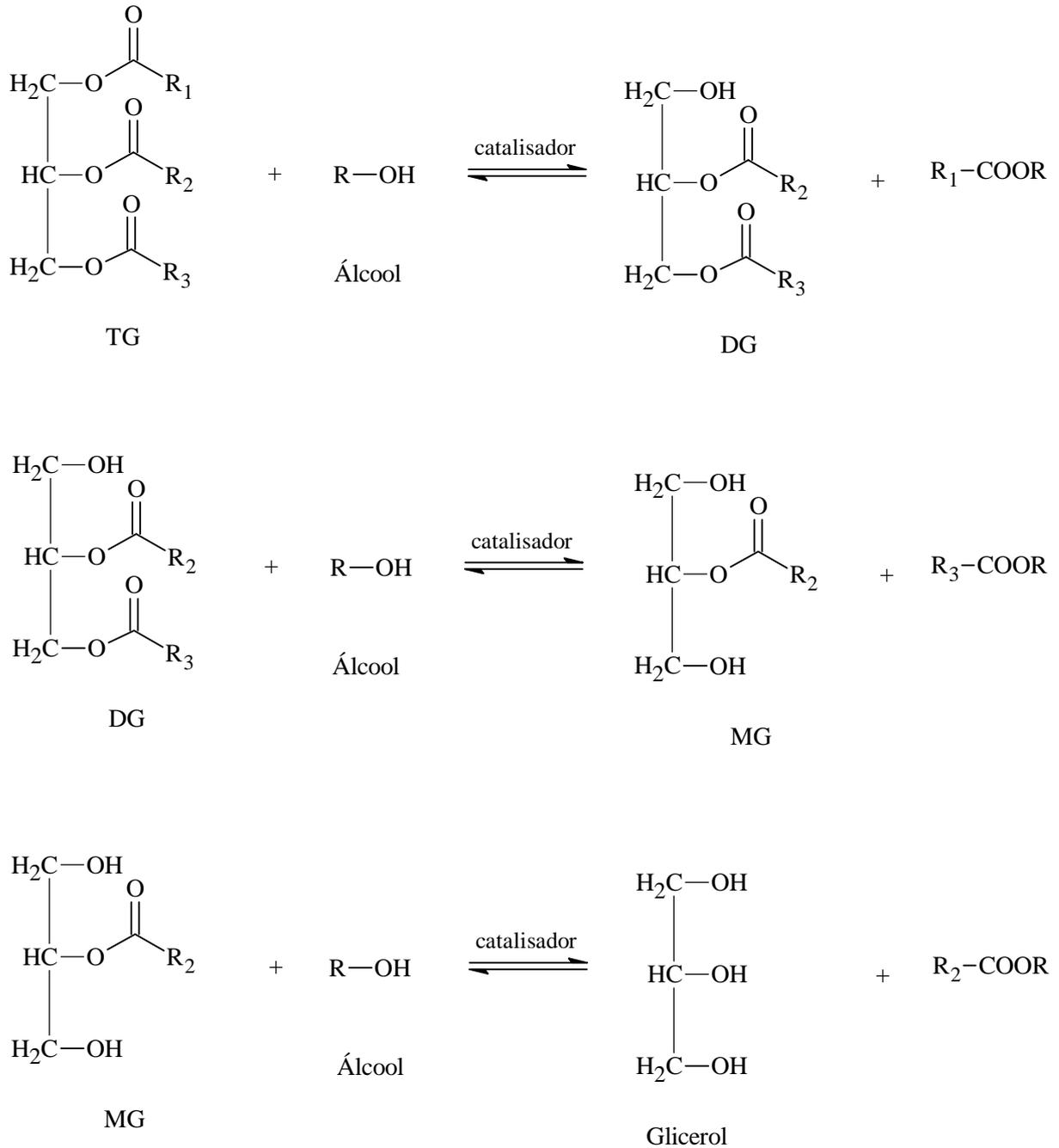
### 2.6.1 Transesterificação

A reação de transesterificação é a principal rota para produção de biodiesel utilizando óleos vegetais e álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol). A reação de transesterificação consiste em reagir triacilglicerídeos com um álcool de cadeia curta (metílico ou etílico), na presença de um catalisador, obtendo como produto uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, denominado biodiesel e glicerol, conforme ilustra a Figura 4.



**Figura 4.** Reação de transesterificação simplificada dos triacilglicerídeos.

O excesso de álcool é necessário para deslocar o equilíbrio da reação, e assim produzir maiores quantidades de ésteres alquílicos, que é o produto desejado (ARANSIOLA *et al.*, 2014). Nesse processo ocorrem sucessivas quebras, iniciando-se com a conversão de triacilglicerídeos em diacilglicerídeos, que é seguido pela conversão de diacilglicerídeos em monoacilglicerídeos e finalmente monoacilglicerídeos em glicerol, obtendo-se uma molécula de éster alquílico em cada etapa (ABBASZAADEH e GHOBADIAN, 2012). A reação em etapas está representada na Figura 5.



**Figura 5.** Reação de transesterificação dos triacilglicerídeos em etapas.

Somente álcoois de cadeia curta como metanol, etanol, propanol e butanol podem ser usados na reação transesterificação. Entre os álcoois citados, normalmente utiliza-se o metanol e etanol, entretanto o metanol é barato e mais frequentemente utilizado por razões de reatividade química e suas propriedades físicas. O metanol possui cadeia menor e maior polaridade, comparado a outros álcoois, características que torna mais fácil a separação dos ésteres e a glicerina. No entanto, a utilização do etanol em processos químicos tem se tornado

atrativo do ponto de vista ambiental, especialmente no Brasil, que é o seu maior produtor mundial, pois é renovável e menos tóxico que o metanol. Para obter rendimentos satisfatórios é necessário estar atento a fatores fundamentais que afetam o rendimento do produto final, tais como a temperatura, velocidade de agitação, o tempo de reação, a proporção óleo:álcool, concentração, o tipo de catalisador, e tipo de matéria-prima (MARCHETTI *et al.*, 2007).

A transesterificação de óleos pode ser realizada utilizando diferentes tipos de catalisadores tais como bases, ácidos e enzimas. No entanto, no caso de óleos residuais, de elevado teor de ácidos graxos livres, existem vários problemas da transesterificação com catalisadores químicos (ácido ou base), tais como a necessidade do pré-tratamento da matéria-prima, a dificuldade de recuperação de glicerol e da remoção do catalisador, além da quantidade de energia gasta no processo como a elevada velocidade de agitação, tempo reacional e as altas temperaturas necessárias para se observar boas conversões (CHARPE *et al.*, 2011).

#### **2.6.1.1 Transesterificação por catálise básica homogênea**

A catálise básica é a mais utilizada devido às condições reacionais serem mais brandas e ocorrerem mais rapidamente e com menor custo. No entanto, óleos/gorduras que possuem alto teor de ácidos graxos livres não são considerados adequados para a produção convencional de biodiesel pela catálise básica. Isso ocorre porque no emprego de catalisadores básicos, os ácidos graxos livres presentes sofrem a reação de saponificação resultando na perda de catalisador, e na formação de produtos saponificados, o que diminui a eficiência de conversão, aumenta a viscosidade do biodiesel e dificulta a etapa de purificação (FERRARI *et al.*, 2005).

Conseqüentemente, um dos maiores problemas encontrados na produção de biodiesel pela transesterificação por catálise básica, está na aquisição de matérias-primas apropriadas. Normalmente para que o rendimento do processo da transesterificação pela catálise básica seja satisfatória, é necessário que o óleo empregado tenha acidez inferior a 1% (BRUM *et al.*, 2011; MARCHETTI *et al.*, 2008). O óleo deve ainda possuir baixo teor de umidade, característica de óleos refinados, o que restringe o método a uma pequena gama de matérias-primas, sendo essas na sua maioria de custo mais elevado (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

### 2.6.1.2 Transesterificação por catálise ácida homogênea

Ao contrário da transesterificação básica, o desempenho da transesterificação ácida não é fortemente influenciado pela presença de ácidos graxos livres na matéria-prima, pois catalisador ácido é capaz de esterificar os ácidos graxos e de transesterificar os acilgliceróis. Na catálise ácida ocorrem alguns inconvenientes associados à cinética de reação, que é geralmente muito lenta, o que exige um maior tempo de reação e uma razão molar óleo:álcool bem mais elevada. Além disso, existem problemas associados à corrosão, principalmente porque o ácido sulfúrico é o catalisador mais comumente utilizado (LAM *et al.*, 2010).

### 2.6.1.3 Transesterificação enzimática

A utilização de lipases isoladas ou imobilizadas como catalisadores enzimáticos tem se tornado uma alternativa promissora em relação aos processos convencionais, como a catálise química, nas conversões em ésteres alquílicos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

No processo envolvendo catalisadores químicos, ocorre uma enorme quantidade de efluentes gerados especialmente na etapa de purificação do produto final. Existe ainda a dificuldade na recuperação de glicerol, a impossibilidade de reutilizar o catalisador (no caso de catalisadores homogêneos) que são fatores que resultam num aumento do custo de produção de biodiesel, quando utilizado catalisadores químicos. Em contraste, a catálise enzimática ocorre sem geração de resíduo, condições de reação mais brandas e com fácil recuperação de produto, além da possibilidade de reutilização do catalisador (KULKARNI e DALAI, 2006). Essas vantagens demonstram que a produção de biodiesel catalisada por enzimas, apesar dos custos de implementação mais elevados, é considerada um processo ecologicamente viável, condizente com a química verde, portanto é uma alternativa promissora frente aos processos químicos.

Existem estudos que procuram viabilizar o emprego de lipases em processos de transesterificação de óleos na produção de biodiesel, contudo os rendimentos observados ainda são baixos e os tempos de reação elevados (DEMIRBAS *et al.*, 2008). Um dos fatores que dificulta o uso de lipases em processos de transesterificação é a desativação das lipases na presença de metanol ou etanol (LAM *et al.*, 2010).

#### 2.6.1.4 Esterificação seguida da transesterificação

O processo de esterificação-transesterificação possibilita a conversão de óleos com alto teor de ácidos graxos livres em biodiesel. A forma mais comumente empregada envolve catalisadores ácidos que atuam nas duas reações, como é o caso de ácidos minerais (catálise homogênea). Na catálise ácida, os ésteres monoalquílicos (biodiesel) podem ser obtidos tanto por reações de esterificação dos ácidos graxos, como por reações de transesterificação dos acilglicerídeos, possibilitando a utilização de matérias-primas de baixa qualidade, que possuem menor custo e assim contribuindo para a economicidade do processo. Esse processo ocorre em uma única etapa, de forma simultânea; portanto não é necessário que o produto seja tratado, possibilitando gerar menor quantidade de resíduo (LAM *et al.*, 2010). Contudo como processo produtivo em larga escala, a transesterificação catalisada por ácidos minerais tem sido desprezada pelas razões acima apresentadas.

É importante destacar que há a possibilidade de realizar a reação de esterificação-transesterificação em duas etapas, utilizando no primeiro momento catálise ácida seguida de catálise básica, contudo este processo não é economicamente viável quando são utilizados catalisadores homogêneos, devido à necessidade de realizar o tratamento entre as duas etapas, o que possibilita maior quantidade de resíduo gerado.

Como foi discutido anteriormente, a catálise ácida utilizando ácidos minerais é muito mais lenta, quando comparada à catálise básica, envolve o emprego de temperaturas mais elevadas e de ácidos bastante corrosivos, impossibilitando o uso na maior parte dos reatores existentes (LAM *et al.*, 2010). Os catalisadores heterogêneos destacam-se por não serem corrosivos e permitirem a sua fácil separação no final do processo, possibilitando a sua reutilização, minimizando os custos de produção.

A esterificação também pode ocorrer através da biocatálise (catalisadores enzimáticos), porém na reação de esterificação o subproduto é a água, e durante a reação, a água é considerada o parâmetro mais importante e precisa ser controlado, pois o excesso de água constitui uma barreira para o curso da reação. Além disso, muitas vezes o álcool utilizado desativa a enzima diminuindo a catálise (ANTCZAK *et al.*, 2009). A remoção de água por diversos métodos pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação, com conversões satisfatórias (CASTRO *et al.*, 1995).

### 2.6.1.5 Hidroesterificação (Hidrólise seguida da Esterificação)

Uma alternativa não tão convencional para a produção de biodiesel é a hidroesterificação, que consiste na hidrólise dos tri-, di-, e monoacilgliceróis seguida da esterificação dos ácidos graxos livres. A vantagem deste processo reside na possibilidade de aproveitar matérias-primas com baixo valor agregado, como os óleos comestíveis residuais, ou óleos não refinados como murumuru, ucuúba, tucumã, uricuri, babaçu, entre outros, para a produção de biodiesel. A hidrólise pode ocorrer na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos e a dificuldade na recuperação da glicerina é talvez a maior desvantagem desse processo, pois a glicerina é muito diluída na etapa de hidrólise (RAMOS *et al.*, 2011; LAM *et al.*, 2010).

A esterificação é uma reação química reversível, onde os ácidos graxos livres reagem com um álcool de cadeia curta produzindo éster e água. A esterificação a temperatura ambiente é lenta, no entanto os reagentes podem ser aquecidos na presença de um catalisador (ácido homogêneo ou heterogêneo) para acelerar o processo. A esterificação utilizando catalisadores ácidos heterogêneos conduz a uma melhor economicidade do processo através da redução dos custos associado reutilização do catalisador, facilidade de separação catalisador em relação ao produto final, menos corrosivo e poluente (SUPPES *et al.*, 2004; REIS, *et al.*, 2003) e para a maioria dos catalisadores heterogêneos, ocorrem aumento no rendimento e pureza do produto (SEMWAL *et al.*, 2011).

Na hidroesterificação, ainda que sejam otimizadas a etapa de esterificação utilizando catalisadores heterogêneos, o problema ocorre na etapa de hidrólise, onde normalmente ainda são utilizados catalisadores homogêneos. Nesse contexto, a hidrólise enzimática é uma alternativa promissora, pois oferece vantagens em relação à hidrólise química, proporcionando um produto final livre de resíduos químicos, com melhores propriedades funcionais e ambientais.

O emprego de processos enzimáticos tem crescido cada vez mais na indústria e apesar dos custos envolvidos, e há diversas vantagens associadas à utilização, o que têm incentivado pesquisas com biocatálise (CHARPE *et al.*, 2011). Estudos recentes de aplicação de processos enzimáticos na geração de biocombustíveis, em particular o biodiesel, apresentam resultados promissores (TALUKDER *et al.*, 2010; NOOR *et al.*, 2003). O emprego de enzimas para a produção de biodiesel apresenta aspectos relevantes, considerando-se o crescimento da utilização desse biocombustível em âmbito mundial, não somente pelo aspecto ambiental, mas principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável (CASTRO *et al.*, 2004).

## 2.7 Enzimas

As enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos, formada por longas cadeias de aminoácidos, denominada cadeia polipeptídicas. As enzimas são proteínas com extraordinária eficiência catalítica em diferentes tipos de reação, devido a sua capacidade de se ligar especificamente a grande variedade de moléculas (LEHNINGER *et al.*, 1995; ). As estruturas protéicas (secundária, terciária e quaternária) são essenciais para eficiência da atividade catalítica (LEHNINGER *et al.*, 1995; RODWELL e KENNELLY, 2006), logo se a enzima for desnaturada ou dissociada em subunidades, ocorre a perda da atividade catalítica, pois a integridade da sua conformação é fundamental na atividade catalítica.

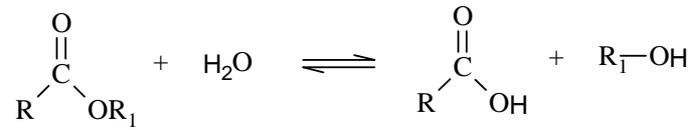
As enzimas podem ser altamente específicas tanto ao tipo de reação a ser catalisada quanto à escolha de seus reagentes, denominados de substrato (STRYER, 1995). Portanto, as enzimas catalisam reações específicas ou um conjunto de reações estreitamente relacionadas.

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) classifica as enzimas, através do tipo de reação que catalisam e são divididas em seis grandes grupos, oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (CORNISH-BOWDEN *et al.*, 2014).

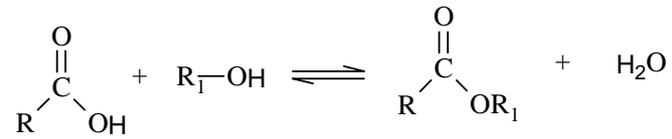
### 2.7.1 Lipases

As lipases são um grupo específico de enzimas classificadas pela IUBMB como hidrolases de ésteres de triacilgliceróis (EC 3.1.1.3), capaz de realizar diferentes reações, tais como: hidrólise, esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises) e aminólise, como podem ser observadas na Figura 6 (SOUZA *et al.*, 2010; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

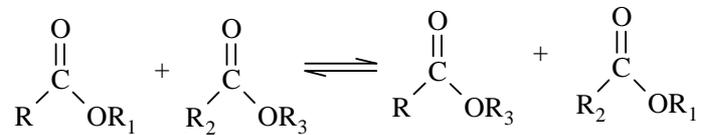
## Hidrólise



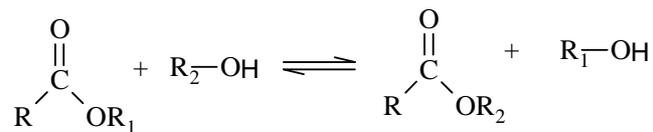
## Esterificação



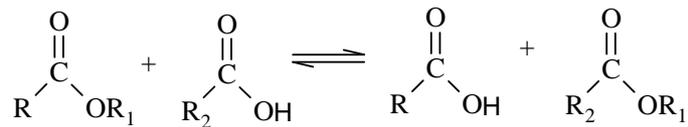
## Interesterificação



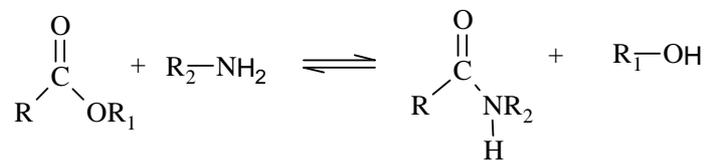
## Alcólise



## Acidólise



## Aminólise



**Figura 6.** Reações catalisadas por lipases.

Essas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), embora alguns biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais. Por exemplo, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de microrganismos. As lipases vegetais têm sido preparadas a partir de látex de mamão, canola, milho, amendoim aveia e mamona (SETH *et al.*, 2014; MUKHERJEE e HILLS, 2011), porém

as lipases vegetais não são comercialmente tão empregadas como as lipases de origem animal (pancreática, hepática e gástrica) e microbiana (PAQUES e MACED, 2006).

A maioria das lipases industriais são obtidas através de microrganismos e representam importante grupo enzimas para aplicações biotecnológicas, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades no que se refere à atuação enzimática, especificidade pelo substrato, facilidade de produção em grandes quantidades, maior estabilidade e disponibilidade de produção em grande escala a um custo menor em comparação com lipases de outras fontes (REIS *et al.*, 2009; VENTURA *et al.*, 2008; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

Por causa dessa ampla versatilidade das lipases, essa classe de enzimas constitui-se no grupo mais importante de biocatalisadores em biotecnologia, em geral, com especial atenção às lipases utilizadas em processos industriais, tais como, processamento de óleos e gorduras, detergentes, indústria alimentícia, farmacêutica, cosméticos, tratamento de efluentes industriais e processamento de papel, entre outros (REIS *et al.*, 2009; SHAMEL *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases possuem grande potencial biotecnológico, além dos diferentes tipos de reações que podem catalisar, elas possuem alta estabilidade, inclusive na presença de solventes orgânicos, apresentam facilidade de separação do catalisador (enzimas imobilizadas), obtenção de produtos com maior grau de pureza e exibem atividade muito elevada em condições experimentais brandas e/ou de baixo custo como meio aquoso, pressão atmosférica e temperaturas amenas. Por essa razão, a utilização de lipases nas indústrias tem tornado os processos tecnológicos eficientes e muito semelhantes aos processos executados pela natureza (HASAN *et al.*, 2006). A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas pelas biotecnológicas (RATHOD *et al.*, 2010).

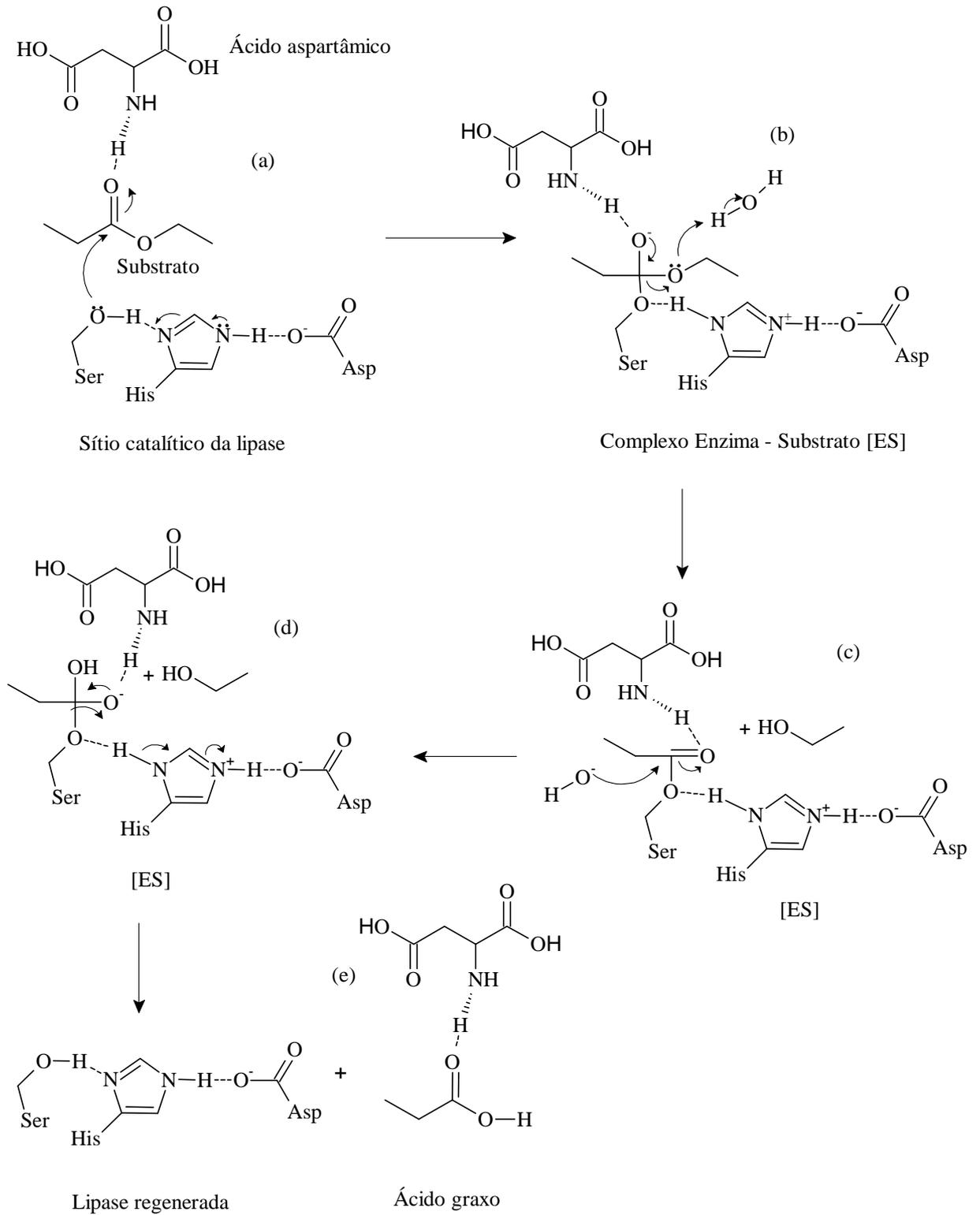
### **2.7.1.1 Mecanismo de catálise enzimática**

A estrutura tridimensional da lipase é determinada através de difração de raio-X, que permite compreender as características estruturais comuns entre as lipases, como a conformação  $\alpha/\beta$  hidrolase combinado com uma sequência de  $\alpha$  hélices e folhas  $\beta$  pregueadas, a uma sequência altamente conservada de pentapeptídeo e o sítio ativo composto por uma tríade catalítica (G-X1-S-X2-G), onde, G= glicina; S= serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico e a serina constitui o nucleófilo ativo na sequência de aminoácidos (JAEGER *et al.*, 1999; KAPOOR e GUPTA, 2012). O sítio ativo das lipases é

constituído por uma tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu e nas reações catalisadas por lipases comumente o nucleófilo constitui-se em um resíduo de serina, ao passo que o ácido catalítico é o aspartato ou glutamato.

Nas reações enzimáticas, necessariamente deve ocorrer a formação de um intermediário, denominado complexo enzima-substrato para que ocorra a reação, que acontece no sítio ativo das lipases que é coberto por uma cadeia peptídica denominada “tampa”, de característica hidrofóbica. Quando a tampa encontra a interface água-lipídeo, ocorre interação no sistema e a tampa sofre uma alteração conformacional e o sítio ativo da enzima fica exposto, permitindo a catálise (MESSIAS *et al.*, 2011).

Na Figura 7 está representado o mecanismo de hidrólise enzimática, onde a reação envolve a formação de dois intermediários tetraédricos. A reação tem início com o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila na unidade serínica ao carbono carbonílico da ligação éster do substrato (Figura 7a), que resulta na formação do primeiro intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelos resíduos catalíticos de histidina e ácido aspartâmico (Figura 7b). Em seguida ocorre um rearranjo e uma molécula de álcool é liberada (Figura 7b) e ocorre o segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila referente à água da etapa (b) (Figura 7c). Na Figura 7c ocorre um rearranjo na molécula, e o ácido graxo é liberado, em seguida a enzima é regenerada (Figura 7e) (KAPOOR e GUPTA, 2012; REIS *et al.*, 2009; JAEGER *et al.*, 1999).



**Figura 7.** Mecanismo de catálise enzimática por lipases [adaptado de JAEGER *et al.*, 1999].

### 2.7.1.2 Regioespecificidade

Nos mecanismos de reações, as lipases apresentam capacidade específica de catalisar uma determinada região do substrato de acilglicerídeo, e são divididas em três grupos:

### I. Lipases 1,3- específica

Permitem hidrolisar apenas ésteres primários, isto é, na posição 1 e 3. Portanto, o produto obtido será uma mistura de ácidos graxos e di- e/ou monoacilglicerídeos. A figura 8 representa o esquema geral da reação catalisada por lipase 1,3 específica.

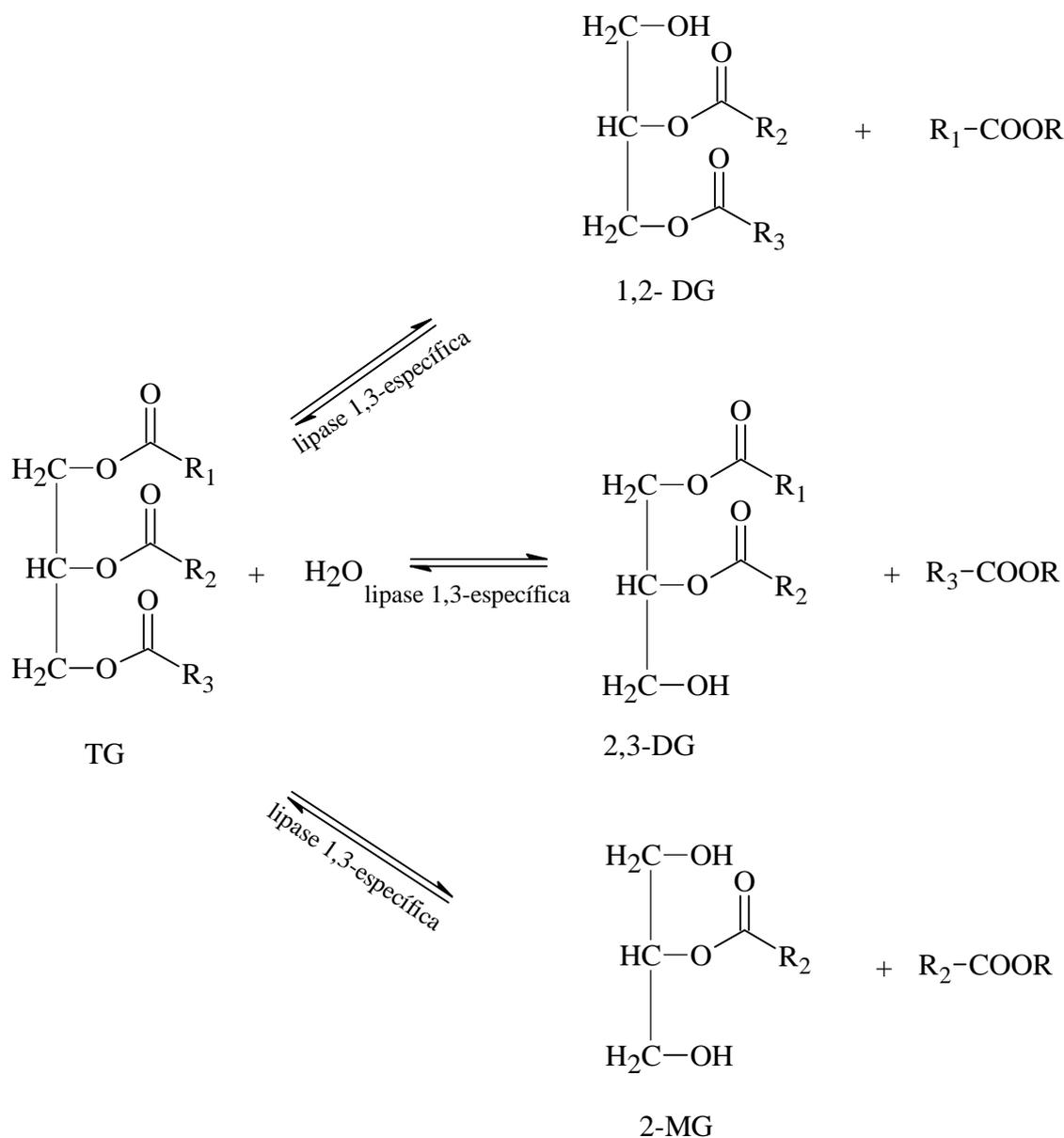
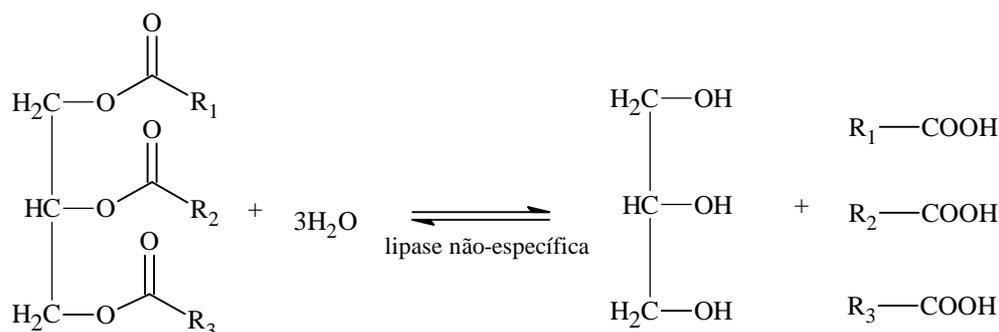


Figura 8. Esquema geral para a reação catalisada por uma lipase 1,3-específica.

### II. Lipases não-específicas

São capazes de hidrolisar ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, ou seja, catalisam a decomposição completa de triacilglicerídeos para glicerol e ácidos graxos livres, os di- e monoacilglicerídeos são misturas presentes no intermediário de reação (PAQUES e MACED, 2006; KAPOOR e GUPTA, 2012).



**Figura 9.** Esquema geral para a reação catalisada por lipases não-específica.

Nas reações catalisadas por enzimas são vários os fatores que podem influenciar na ação catalítica, tendo início na seletividade de substrato até as variáveis operacionais. Os principais fatores que podem influenciar na velocidade de uma reação enzimática são: concentração do substrato, temperatura, pH do meio, presença de efetores (moléculas de ligante que podem ser ativadores ou inibidores) (VENTURA, *et al.*, 2008). Para obter atividades catalíticas eficientes outras variáveis devem ser levadas em consideração e ajustadas, tais como, seletividade ao substrato, concentração da enzima, adição de tensoativo, emprego de solventes orgânicos, velocidade de agitação, entre outros. (NOOR *et al.*, 2003)

Uma vez identificados os fatores limitantes no processo biocatalítico, esse processo poderá ser uma alternativa viável na cadeia produtiva de biodiesel, pois as enzimas são catalisadores muito mais específicos que os catalisadores químicos (GUIEYSSE *et al.*, 2003; MOREAU *et al.*, 2008), além de não ser necessário o uso de equipamentos sofisticados ou formas purificadas de enzimas (VENTURA, *et al.*, 2008).