

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
CEARÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIAS RENOVÁVEIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FRANCISCA ÍTALA DA SILVA PAIVA

REDUÇÃO DA VISCOSIDADE DO BIODIESEL DE
Ricinus communis L. (MAMONA) **ATRAVÉS DE ACETILAÇÃO**
CATALISADA POR ENZIMAS COMERCIAIS

MARACANAÚ/CE

2016

FRANCISCA ÍTALA DA SILVA PAIVA

**REDUÇÃO DA VISCOSIDADE DO BIODIESEL DE *Ricinus communis* L. (MAMONA)
ATRAVÉS DE ACETILAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS COMERCIAIS**

Dissertação submetida ao programa de Mestrado Acadêmico em Energias Renováveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) - Campus Maracanaú, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Energias Renováveis.

Orientador: Dr. João Carlos da Costa
Assunção

MARACANAÚ/CE

2016

Catálogo na Fonte

- P149 Paiva, Francisca Itala da Silva.
Redução da viscosidade do biodiesel de *Ricinus Communis L.* (mamona) através de acetilação catalisada por enzimas comerciais / Francisca Itala da Silva Paiva -- 2016.
62 f.
- Dissertação (Mestrado em Energias Renováveis) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Maracanaú, 2016.
Orientador: Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção.
- 1.BIODIESEL - PROPRIEDADES. 2.MAMONA (*RICINUS COMMUNIS L.*). 3.BIODIESEL DE MAMONA. I.Título.
- CDD 543.081

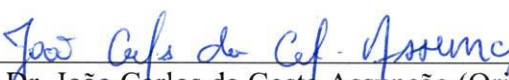
FRANCISCA ÍTALA DA SILVA PAIVA VALDEVINO

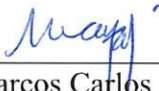
REDUÇÃO DA VISCOSIDADE DO BIODIESEL DE *Ricinus communis* L. (MAMONA)
ATRAVÉS DE ACETILAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS COMERCIAIS

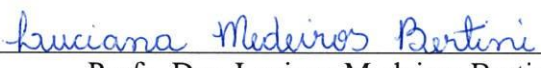
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Energias Renováveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Energias Renováveis, área de concentração Energias Renováveis.

Aprovada em 16 / 12 / 2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção (Orientador)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE


Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará - UFC


Profa. Dra. Luciana Medeiros Bertini
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte - IFRN

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pelo dom da vida, por colocar pessoas incríveis em meu caminho e que hoje se tornam essenciais à minha felicidade, pelas oportunidades e livramentos, paz, serenidade, força e sabedoria para enfrentar os obstáculos e dificuldades ao longo do caminho. Pela capacitação, sem a qual não seria possível a elaboração deste trabalho.

A minha perfeita família, em especial meu pai Enilson (em memória), a minha mãe Idalci, meu irmão Vinícius e minha avó/mãe Socorro, pelo amor, dedicação mostrar-me o caminho certo a seguir, sempre me apoiando nas horas mais difíceis. Ao meu companheiro Alexandre, pelo amor, apoio, força e por ser compreensivo nos momentos de ausência. Sem vocês este trabalho não tinha nenhum sentido.

Aos meus amigos Marcelo, Jaíres, Paloma pela humanidade com que me ouviu e me auxiliou e um agradecimento muito especial a Hilária por todo o apoio e estímulo que me prestou, por toda a energia, motivação que me transmitiu e também por me ter contagiado com a sua boa disposição para eu conseguir este trabalho, isto é, por ter sido meu porto seguro.

A todos da minha turma de mestrado em Energias Renováveis que nos períodos de dificuldade estiveram juntos e pela disponibilidade de tempo mesmo quando este era tão curto. Em especial, ao meu amigo Marcus e Luciano e as minhas amigas: Reullyanne em especial a Belkise pela força e ajudas nas temporadas de angústia.

A todos os professores e funcionários do Mestrado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE): Pedrosa (coordenador do curso), Danúbia e Iassodara (secretárias do programa), Bruno (coordenador do laboratório na qual quase toda a minha pesquisa foi desenvolvida), e principalmente ao meu orientador João Carlos por todo o apoio prestado, por ter sido sempre acessível e, ainda, por várias vezes ter intercedido para que este trabalho fosse possível.

Aos meus professores da Graduação que me ajudaram a chegar até aqui, Luciana, Leonardo e Felipe, pela formidável orientação para que eu ingressasse no mestrado, incentivo, dedicação, paciência, amizade e respeito.

Ao órgão pelo apoio financeiro CAPES, pela concessão de bolsa ao longo do meu curso.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concretizado, acreditaram em meu potencial e torceram pelo meu sucesso. Muito obrigada!

RESUMO

A presente pesquisa objetivou a redução da viscosidade do biodiesel da mamona (*Ricinus communis* L.) através de acetilação enzimática. Para o desenvolvimento do trabalho foram testadas seis variedades de enzimas comerciais, sendo elas: Amano Lípase OS de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea, lipase de *Candida rugosa*, lipase do pâncreas de porco (PPL), Amano PS, Lipozyme RM e a Novozyme. As enzimas foram testadas na acetilação do ricinoleato de metila, para verificar aquela com maior potencial catalítico. A enzima selecionada foi a Amano Lipase OS imobilizada. Em seguida, um planejamento experimental fatorial completo 2^4 , com o intuito de encontrar as melhores condições reacionais, foi elaborado com as variáveis: massa de enzima, temperatura, tipo de solvente e doador de grupo acila. Os fatores de maior impacto foram a massa de enzima e o tipo de solvente, sendo uma proporção a massa de 10 mg de enzima e hexano como solvente os que resultaram em rendimento mais elevados (>99%). A alta temperatura influenciou negativamente. O estudo cinético revelou que a reação enzimática se ajustou a um modelo de pseudo-primeira ordem. Para o estudo das propriedades físico-químicas do óleo de mamona, do biodiesel e biodiesel acetilado foram avaliados o teor de umidade, acidez, ácidos graxos livres, viscosidade, saponificação, iodo, massa específica, metais (cálcio, magnésio, potássio e sódio), fósforo e enxofre para verificar se os mesmos se encontram dentro dos padrões da ANP. As medidas das propriedades físico-químicas revelaram bons resultados e condizentes com os limites estabelecidos pela literatura para o óleo, biodiesel e seu acetilado, dentre elas estão o teor de umidade, índice de acidez, iodo e massa específica, e para alguns metais, enxofre e fósforo. O principal objetivo da pesquisa foi alcançado, conseguiu-se reduzir a viscosidade do biodiesel da mamona em cerca de 50% após acetilação do grupo hidroxila (OH), diminuindo dessa forma a sua polaridade, e melhorando suas propriedades.

Palavras chaves: mamona; lipase; acetilação; solvente

ABSTRACT

The present research aimed to reduce the viscosity of biodiesel from castor bean (*Ricinus communis L.*) through enzymatic acetylation. For the development of the work, six commercial enzyme varieties were tested: Amano Lipase OS of Burkholderia cepacia immobilized on diatomaceous earth, Candida rugosa lipase, porcine pancreas lipase (PPL), Amano PS, Lipozyme RM and Novozyme. The enzymes were tested for acetylation of methyl ricinoleate to verify the one with the highest catalytic potential. The enzyme selected was the immobilized Amano Lipase OS. Then, a complete experimental design 2⁴, with the purpose of finding the best reaction conditions, was elaborated with the variables: enzyme mass, temperature, solvent type and acyl group donor. The highest impact factors were enzyme mass and solvent type, with a mass ratio of 10 mg of enzyme and hexane as the solvent, which resulted in higher yields (> 99%). The high temperature influenced negatively. The kinetic study revealed that the enzymatic reaction conformed to a pseudo first order model. For the study of the physicochemical properties of castor oil, biodiesel and acetylated biodiesel, the content of moisture, acidity, free fatty acids, viscosity, saponification, iodine, specific mass, metals (calcium, magnesium, potassium and sodium), Phosphorus and sulfur to verify that they meet the ANP standards. The measurements of the physico-chemical properties showed good results and are in accordance with the limits established by the literature for oil, biodiesel and its acetylated, among them are moisture content, acidity index, iodine and specific mass, and for some metals, sulfur And phosphorus. The main objective of the research was achieved, it was possible to reduce the viscosity of biodiesel of castor bean by about 50% after acetylation of the hydroxyl group (OH), thus reducing its polarity, and improving its properties

Keywords: castor bean; Lipase; Acetylation; solvent

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da ricina	14
Figura 2 - Principal constituinte do óleo da mamona e seu respectivo biodiesel	15
Figura 3 - Interação intermolecular no biodiesel da mamona	16
Figura 4 - O vegetal mamona (<i>Ricinus communis L.</i>)	19
Figura 5 - Acetilação com enzimas <i>Pseudomonas capacita</i> Lipase	23
Figura 6 - Separação e lavagem do biodiesel de mamona	29
Figura 7 - Equipamento usado para medida da viscosidade	34
Figura 8 - Cromatograma obtido por CG-FID do padrão do ricinoleato de metila	38
Figura 9 - Cromatograma obtido por CG-FID do padrão do ricinoleato de metila acetilado	39
Figura 10 - Curva de calibração para o padrão ricinoleato de metila	39
Figura 11 - Curva de calibração para o padrão ricinoleato de metila acetilado	39
Figura 12 - Cromatograma CG-EM do produto de acetilação enzimática com Amano Lipase PS imobilizada	42
Figura 13 - Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas nos experimentos	45
Figura 14 - Gráfico de normalização dos efeitos padronizados nos experimentos	46
Figura 15 - Gráfico de interação entre as variáveis estudadas nos experimentos	46
Figura 16 - Relação entre os valores observados e os preditos pela Equação 5	47
Figura 17 - Gráfico de contorno para as variáveis massa de enzima e có-solvente	48
Figura 18 - Gráfico de contorno para as variáveis massa de enzima e temperatura	49
Figura 19 - Gráfico de superfície para as variáveis massa de enzima e temperatura	50
Figura 20 - Gráfico de superfície para as variáveis massa de enzima e doador acila	51
Figura 21 - Estudo cinético do biodiesel para conversão de seu acetilado	52
Figura 22 - Modelo cinético linearizado para pseudo-primeira ordem da reação de acetilação enzimática	
Figura 23 - Modelo cinético linearizado para pseudo-segunda ordem da reação de acetilação enzimática	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Algumas propriedades físicas de alguns alcoóis e seus respectivos ésteres	21
Tabela 2- Planejamento Fatorial das condições	32
Tabela 3 - Rendimento de conversão da acetilação do ricinoleato de metila 411	
Tabela 4 – planejamento Fatorial das condições e os resultados em rendimentos	43
Tabela 5 - Efeitos das variáveis estudadas nos experimentos	44
Tabela 6 - Propriedades Físico-Químicas do óleo, biodiesel e biodiesel acetilado	54

SIGLAS E ABREVIATURAS

PPL – Lipase do pâncreas do porco

AGL – Ácido graxo livre

ANP – Agência Nacional do Petróleo

ASTMD – American Society for Testing and Materials

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CG- DIC – Cromatografia gasosa acoplada ao detector de chama

CCD – Cromatografia de camada delgada

<LD – Menor limite de detecção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 MAMONA (<i>Ricinus communis</i> L.)	19
3.1.2 Propriedades do Óleo de Mamona (<i>Ricinus communis</i> L)	20
3.2 LIPASES	22
3.3 BIODIESEL	23
3.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIODIESEL	25
3.4.1 Viscosidade	26
3.4.2 Índice de Iodo	26
3.4.3 Massa Específica	26
3.4.4 Ácidos Graxos Livres	26
3.4.5 Índice de Saponificação	28
3.4.6 Teor de Umidade	28
3.4.7 Índice de Acidez	28
3.4.8 Metais, fósforo e enxofre em biodiesel	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA	30
4.2 BIODIESEL DE MAMONA	30
4.3 OBTENÇÃO DO PADRÃO RICINOLEATO DE METILA A PARTIR DO BIODIESEL DE MAMONA	31
4.4 OBTENÇÃO DO PADRÃO RICINOLEATO DE METILA ACETILADO	31
4.5 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	31
4.6 FONTES ENZIMÁTICAS	31
4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	31
4.8 DEFINIÇÃO DOS VALORES DOS NÍVEIS NO PLANEJAMENTO	34
4.9 ESTUDO CINÉTICO	34
5.0 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO, BIODIESEL E DO BIODIESEL ACETILADO DA MAMONA	35

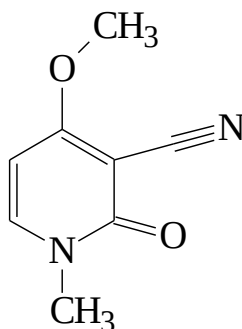
5.0.1 Determinação da viscosidade e massa específica	35
5.0.2 Determinação do Índice de Acidez e Ácidos Graxos Livres	36
5.0.3 Determinação do Índice de Iodo	36
5.0.4 Determinação do Índice de Saponificação	37
5.0.5 Determinação do Teor de umidade	38
5.0.6 Determinação de Metais e não-metais em Biodiesel	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 OBTENÇÃO CONVENCIONAL DO BIODIESEL DE MAMONA	39
6.2 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DO RICINOLEATO DE METILA E SEU ACETILADO	39
6.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS PADRÕES DE RICINOLEATO DE METILA E SEU ACETILADO	40
6.4 TRIAGEM DAS LIPASES	420
6.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	422
6.6 ESTUDO CINÉTICO	51
6.7 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO, BIODIESEL E BIODIESEL ACETILADO	533
6.7.1 Viscosidade Cinemática	56
6.7.2 Massa Específica	57
6.7.3 Índice de Acidez	57
6.7.4 Ácidos Graxos Livres	57
6.7.5 Índice de Saponificação	57
6.7.6 Índice de Iodo	57
6.7.6 Índice de Umidade	57
6.7.7 Teor de cálcio, magnésio, Sódio, Potássio, Fósforo e Enxofre	58
7. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia dos biocombustíveis se apresenta como uma alternativa sustentável para sanar, ou pelo menos minimizar, a grande dependência da sociedade contemporânea pelos combustíveis fósseis, uma vez que são combustíveis renováveis que podem ser produzidos a partir de várias matérias-primas, minimizando a necessidade do uso de combustíveis não renováveis e ao mesmo tempo diminuindo a taxa de emissão de dióxido de carbono (CO₂) para a atmosfera. Dentre os biocombustíveis mais utilizados no Brasil destacam-se o etanol e o biodiesel. O primeiro, já possui sua produção e consumo consolidado no Brasil e no mundo, e é adicionado à gasolina comercializada neste país. O segundo vem ganhando espaço no mercado brasileiro nos últimos anos e é adicionado ao diesel de petróleo, sendo que sua grande maioria é produzida a partir do óleo de soja, sendo o Brasil é um dos maiores produtores mundiais (LEITE; LEAL, 2007).

Entretanto, a produção de soja no Brasil fica concentrada em poucas regiões, pois muitos estados não possuem clima e/ou tecnologia agrícola para sua produção em larga escala, especialmente os estados nordestinos que frequentemente sofrem com longas estiagens, dificultando o ingresso de muitas culturas de oleaginosas. Contudo, existem algumas culturas capazes de serem cultivadas neste clima semiárido com produção bastante promissora, destacando-se a mamona (*Ricinus communis* L.), que apresenta boa produtividade de óleo em suas sementes (até 50%) e é, consideravelmente, resistente a estiagem, tornando sua adaptação ao clima nordestino mais fácil, além de poder ser utilizada como ração animal após a retirada da ricina (Figura 1), disponibilizando assim mais uma fonte de alimentação para os rebanhos em períodos de secas (SILVA, et al 2010).

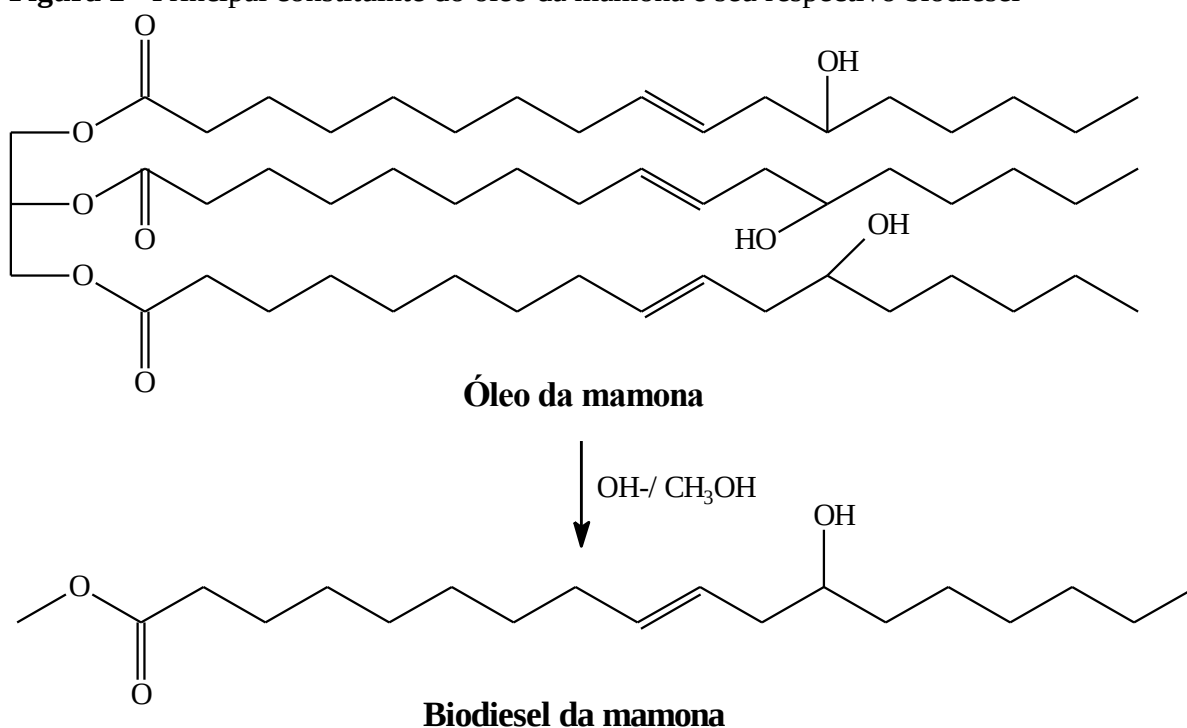
Figura 1 - Fórmula estrutural da ricina



Fonte: adaptada de RONSSEN, (2011).

O óleo da mamona é constituído, predominantemente, de ésteres do ácido ricinoléico (Figura 2), que possui uma hidroxila em sua cadeia acila que faz com que este óleo possua propriedades bastante peculiares com relação à grande maioria dos demais óleos vegetais. Dentre as propriedades pode-se destacar sua alta viscosidade, muitas vezes requerida pela indústria de lubrificantes e cosméticos. Esta viscosidade diferenciada é mantida mesmo após o óleo de mamona ser transesterificado para produção de biodiesel, pois mesmo o biodiesel possuindo uma viscosidade bem menor que o óleo vegetal quando este é produzido a partir da mamona a viscosidade resultante ainda é consideravelmente maior, e fora dos padrões da Agência Nacional de Petróleo (ANP), que do biodiesel produzido a partir de outras oleaginosas, como por exemplo, a soja (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2007).

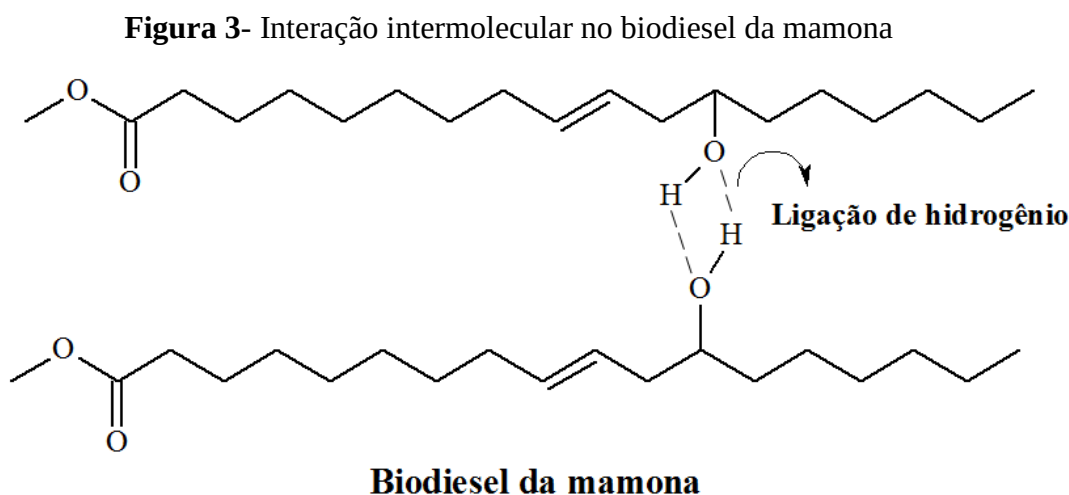
Figura 2 - Principal constituinte do óleo da mamona e seu respectivo biodiesel



Fonte: adaptado de SILVA, (2012).

Como os triglicerídeos apresentam em torno de 50 átomos de carbono, por si, já se tem uma alta viscosidade. Entretanto, com o ricinoleato de metila, a presença da hidroxila no carbono 12, faz com que esta molécula demonstre propriedades muito diferenciadas, pois as

interações no biodiesel da mamona são de natureza diferente e de maior magnitude que os demais ésteres alquílicos. Esta atração (Figura 3) resulta em uma maior força de coesão do líquido, mantendo as moléculas mais próximas umas das outras e fazendo com que o mesmo tenha maior dificuldade de escoamento, em outras palavras, apresentando uma maior viscosidade (SILVA^b, 2012).



FONTE: adaptado de BROWN et al., (2005)

Buscando diminuir a viscosidade do biodiesel da mamona, tem-se utilizado a combinação deste com biodiesel de outras oleaginosas (a soja principalmente), para que sua fluidez no sistema de injeção dos motores seja aceitável, pois a alta viscosidade do mesmo tem grande potencial de provocar danos aos motores, devido à maior resistência ao escoamento, resultando em um menor tempo de vida dos componentes de injeção e um maior gasto energético quando utilizado puro. Esta alternativa de se utilizar misturas binárias, apesar de possuir certa eficiência, ainda mantém a dependência de produção de biodiesel a partir de outras oleaginosas (SILVA, et al, 2010).

Estudos para tentar diminuir a viscosidade do biodiesel da mamona são escassos na literatura, sendo a combinação do mesmo com diesel e outros biodieseis a mais utilizada. Sabendo que a acetilação química convencional dificultaria devido a presença de uma ligação olefínica no carbono 9, pois, possivelmente a ligação dupla também reagiria formando uma diversidade de subprodutos (éster e cetona).

Desta forma, a utilização de catalisadores dotados de maior especificidade e seletividade é uma alternativa para evitar a diversidade de subprodutos. A primeira relaciona-

se a capacidade do catalisador ser específico para este determinado tipo de reação, tendo em vista a dificuldade da mesma acontecer utilizando-se de catalisadores químicos convencionais. A seletividade é a capacidade que o catalisador tem de reagir com somente um tipo de função, de maneira que permita fazer acetilação do grupo hidroxila do biodiesel da mamona para um grupo éster, resultando em um grupo orgânico que possibilite uma menor interação entre as moléculas quando comparado com o grupo $-OH$ (CONTI; RODRIGUES; MOURAN, 2001).

No quesito seletividade e especificidade, as enzimas, ocupam lugar de destaque, pois são reconhecidas pela sua capacidade de catalisar uma diversidade de reações mantendo uma grande diferenciação quanto aos substratos sobre os quais operam, mostrando-se assim um catalisador adequado para minimizar reações laterais no biodiesel da mamona. Uma determinada classe de enzimas catalisa apenas um tipo de reação, atuando em regiões específicas das moléculas, podendo perfeitamente realizar uma acetilação de um grupo hidroxila, em presença de outro grupo funcional. As enzimas possuem a vantagem de serem catalisadores biológicos, dessa forma, são totalmente biodegradáveis, não gerando resíduos tóxicos ao meio ambiente. Ainda, as enzimas são encontradas em animais, vegetais e micro-organismos, ampliando com isso as possibilidades de obtenção e uso das mesmas. Sendo assim esta dissertação investigou a acetilação seletiva, com uso de enzimas comerciais, da hidroxila presente no biodiesel da mamona, como forma de diminuir a alta viscosidade decorrente da presença deste grupo funcional nesta molécula.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Óleos e gorduras são triacilglicerídeos majoritariamente constituídos de triésteres resultantes da esterificação de ácidos graxos com glicerol (1,2,3-triidroxiopropano). Esses ácidos graxos podem conter entre 4 a 30 átomos de carbono, podendo ainda ser saturados, ou mono-, di-, tri- e poli-insaturados, conforme o número de ligações duplas. Essas insaturações estão separadas por dois grupos metilenos (CH_2) sob configuração espacial *cis* (Z), impondo uma curva rígida à cadeia de carbono, reduzindo a superfície de atração de van der Waals desorganizando a estrutura cristalina dos ácidos e reduzindo seus pontos de fusão (SOLOMONS; FRYHLE 2006).

O considerável conteúdo energético desses triacilglicerídeos em relação à sua massa sugere a sua aplicação como combustível o que tem sido alvo de diversos estudos nas últimas décadas. Ficou demonstrado que o uso direto de óleos *in natura* ocasionava excessiva deposição de carbono no motor, obstrução nos filtros de óleo e bicos injetores, diluição parcial do combustível no lubrificante, comprometimento da durabilidade do motor e um aumento considerável em seus custos de manutenção (KNOTHE; CERMAK; EVANGELISTA, 2006). Desse modo, a utilização de óleos vegetais *in natura* como combustível alternativo ao diesel está condicionada às modificações físicas e químicas dos óleos ou adaptações especiais dos motores, devido à alta viscosidade e à baixa volatilidade dos óleos vegetais (MA; HANNA, 1999).

Nesse caso, a transformação química do óleo tornou-se uma solução mais viável. Assim, em meados da década de 70, surgiram as primeiras propostas de modificação de óleos vegetais através do processo químico de transesterificação, cujo objetivo era o de melhorar a sua qualidade de ignição, reduzir o seu ponto de fluidez e ajustar os seus índices de viscosidade e de densidade específica (KNOTHE; CERMAK; EVANGELISTA, 2006; MA; HANNA, 1999).

A produção de soja (*Glycine max*), conforme dados oficiais o Brasil ocupa segundo lugar como maior produtor de soja do mundo, com uma produção de aproximadamente 81,5 milhões de toneladas (safra 2012/2013), suprimindo plenamente o mercado interno e contribuindo para o balanço positivo nas exportações (CONAB, 2013).

Como o biodiesel é um combustível renovável, podendo ser produzidos a partir de diversas oleaginosas, a mamona destaca-se como uma das mais promissoras da região nordeste, pois é bastante resistente à estiagem (GAMA; GIL; LOCHTER, 2010).

3.1 MAMONA (*Ricinus communis* L.)

A mamona (*Ricinus communis* L.) (Figura 4) é uma planta da família das euforbiáceas, provavelmente de origem asiática, conhecida como carrapateira e introduzida no Brasil pelos portugueses. Graças à sua grande adaptabilidade, ela é encontrada em todo o território brasileiro (PINA et al, 2005). Como a maior parte das plantas tropicais, a cultura deste vegetal é bem adaptada às temperaturas compreendidas entre 20°C e 30°C, capaz de suportar longos períodos de seca (PINA et al, 2005).

Figura 4 - O vegetal mamona (*Ricinus communis* L.)



FONTE: próprio autor

Devido ao clima semiárido, o cultivo de alguns vegetais se torna inviável. Já outros se mostram facilmente adaptáveis a algumas regiões do Brasil, como é o caso da mamona (*Ricinus communis* L.). Essa oleaginosa tem sua produção concentrada no Nordeste do Brasil, com 80% da produção anual, cultivada principalmente na Índia, Brasil e China. Tem produção mundial de cerca de 0,5 milhões de toneladas de óleo. A mamoneira é xerófila,

heliófila e com potencial de produção de mais de 10 toneladas de hectare óleo (NÓBREGA; GERALDI; CARVALHO, 2010).

O vegetal *Ricinus communis* L. tem grande importância e contribuições a acrescentar na área de estudo dos biocombustíveis, entretanto suas características são bem peculiares. A planta tem grande potencial de produção de óleo, propícia para a produção de biocombustíveis, se desenvolve em lugares mais agressivos e ainda tem um baixo custo em sua plantação. No entanto apresenta algumas limitações em seu trabalho, no que diz respeito ao manuseio do mesmo para a produção de biodiesel, ou seja, em sua transesterificação. Uma das características que este óleo vegetal apresenta é a alta viscosidade, que aumenta devido a presença de hidroxilas, dificultando à manutenção em suspensão de produtos insolúveis, derivados da queima não completa de combustíveis (^bSILVA, 2012).

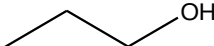
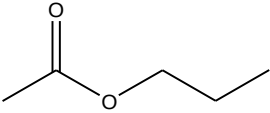
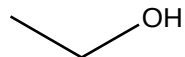
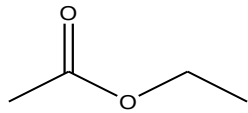
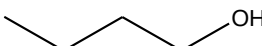
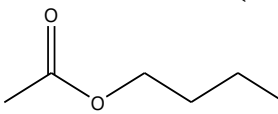
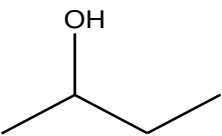
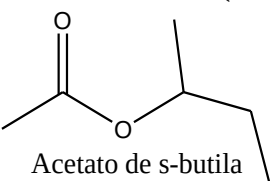
3.1.2 Propriedades do Óleo de Mamona (*Ricinus communis* L)

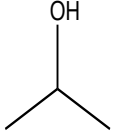
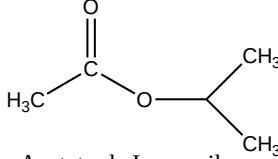
O óleo *Ricinus communis* L. é bastante viscoso, com coloração amarelo pálido e odor forte. A aplicabilidade do óleo é conhecida desde a era colonial, onde foi usado para lubrificar os engenhos de cana-de-açúcar (NUNES; PEDROSO; MARTINELLI, 2008 apud SCHNEIDER, 2006). O referido óleo pode ser utilizado na fabricação de tintas e isolantes, lubrificante na aeronáutica, na manufatura de cosméticos e de muitos tipos de drogas farmacêuticas, diversos processos industriais, fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas e aderentes, base para fungicidas e inseticidas, tintas de impressão e vernizes, além de nylon e matéria plástica, em que tem bastante importância (COSTA, 2006).

As alternativas de processamento químico dos triacilglicerídeos da mamona através da esterificação e hidrogenação (associadas às reações exclusivas do grupo OH, nitração, sulfonação e desidratação) permitem que as propriedades do óleo viscosidade, ação surfactante e umectante como afinidade com água, etanol e outros óleos melhorem (O'BRIEN, 2005). Trabalhos preliminares confirmaram que o ricinoleato de metila é significativamente menos estável do que ésteres monoinsaturados, porém, se o grupo OH do carbono 12 do mesmo for esterificado, este éster pode ser consideravelmente mais estável à oxidação (^aSILVA 2012 apud YAO et al., 2010).

Devido as propriedades que este óleo apresenta, bem como as dificuldades de se trabalhar com este material, existem métodos com a capacidade de proporcionar uma forma mais viável no seu tratamento. A mudança funcional em um grupo específico de uma molécula pode provocar alterações substanciais nas propriedades do novo composto. A acetilação de um álcool secundário para produção do seu respectivo éster, por exemplo, faz com que este último tenha propriedades físicas (ponto de ebulição, densidade, viscosidade, etc) bastante diferenciadas do primeiro (Tabela 1). Isso ocorre pois da presença da hidroxila (no álcool) maximizar as interações intermoleculares da substância (BRADY, 1998; KOTZ, TREICHEL JR., 2005; RUSSEL, 1994; CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004), tornando-a mais coesiva e, portanto viscosidades superiores ao do respectivo éster e em alguns casos com ponto de ebulição com valores superiores aos ésteres.

Tabela 1- Algumas propriedades físicas de alguns alcoóis e seus respectivos ésteres

 Propan-1-ol Ponto de ebulição: 97,1 °C Viscosidade: 2,26 cP (a 20°C)	 Acetato de Propila Ponto de ebulição: 56°C Viscosidade: 0,32 cP (a 20°C)
 Etanol Ponto de ebulição: 78,4 °C Viscosidade: 1200 cP (a 20°C)	 Acetato de Etila Ponto de ebulição: 77,1 °C Viscosidade: 0,426 cP (a 25°C)
 Butan-1-ol Ponto de ebulição: 118°C Viscosidade: 3 cP (a 25°C)	 Acetato de n-Butila Ponto de ebulição: 129°C Viscosidade: 0,63 cP (a 20°C)
 Butan-2-ol Ponto de ebulição: 82,3 °C Viscosidade: 1,96 cP (a 25°)	 Acetato de s-butila Ponto de ebulição: 126 °C Viscosidade: 0,01 cP (a 20°C).

 Propan-2-ol Ponto de ebulição: 82,3 °C Viscosidade: 2,86 cP à (a 15°C)	 Acetato de Isopropila Ponto de ebulição: 102 °C Viscosidade: 0,38 cP (a 15°C)
FONTE: BROWN et al., 2005.	

Como se observa na Tabela 1, a transformação de um grupo hidroxila em um grupo éster resulta em uma substância com propriedades físicas nitidamente diferentes, destacando-se a alteração da viscosidade, como no caso da acetilação do álcool isopropílico em que houve uma redução de 7,5 vezes de sua viscosidade quando o mesmo foi acetilado. Essa mudança funcional pode ser obtida com relativa facilidade utilizando-se reagentes capazes de realizar a acetilação de alcoóis, que são substâncias bastante comuns em um laboratório de química orgânica, tais como o anidrido acético e piridina.

A piridina é um composto orgânico com uso mais comum como catalisador. Contudo devido a toxicidade buscam-se meios de substituí-la, tendo as enzimas com grande potencial para essa função (MEIER, 2007). Assim a busca por catalisadores não tóxicos de baixo custo e de fácil manuseio constitui-se em um dos desafios atuais para desenvolvimento de métodos limpos de síntese.

Portanto, a acetilação de alcoóis aos respectivos ésteres, mediada por enzimas, que possuem grande seletividade quanto aos substratos que atuam, quando aplicados à acetilação da hidroxila presente no principal constituinte do biodiesel da mamona (ricinoleato) pode resultar em um produto com uma viscosidade consideravelmente menor. Solucionando um dos principais empecilhos do uso do óleo da mamona como biodiesel em larga escala, sem a necessidade de adição de outros combustíveis concomitantemente. Vale ressaltar, que o uso de lipases faz com que o processo como o todo demande menor gasto de energia e não gere resíduos tóxicos ao meio ambiente.

3.2 LIPASES

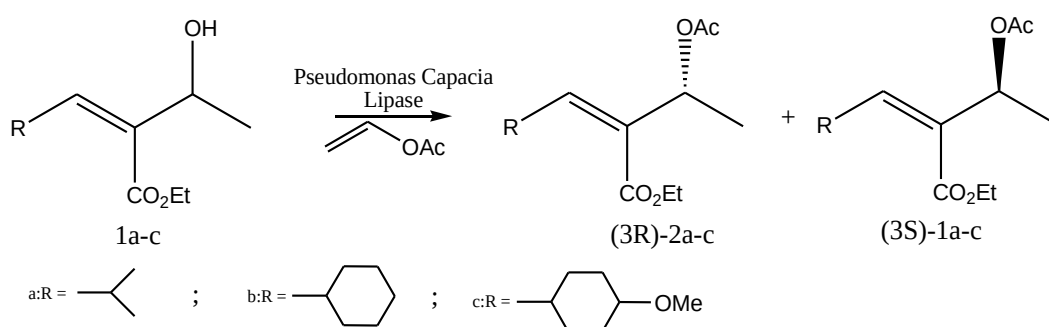
Muitos processos tecnológicos utilizam catalisadores biológicos nas sequências de conversão química. Estes biocatalisadores elevam consideravelmente a velocidade das reações, requerem condições brandas, são compatíveis com os substratos sintéticos e, em

alguns casos, catalisam reações de síntese e degradação, dotadas de uma especificidade pelo substrato que superando todas as enzimas conhecidas. Elas podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, modificações de couros, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos e de outros materiais orgânicos sintéticos (COSTA NETO, 2002).

As lipases se destacam por terem características bastante peculiares, dentre as quais se ressalta: atuação em condições brandas de temperatura e pressão, capacidade de catalisar reações específicas, atividade em meios não convencionais lipases (solventes orgânicos), baixa ou nenhuma produção de compostos tóxicos ao meio ambiente e alta quimio-, regio-, e enantiosseletividade devido à quiralidade inerente a estes catalisadores (³SILVA, 2012).

Segundo Benfatti, et al. (2007), utilizando enzimas *Pseudomonas cepacia* Lipase foi possível a acetilação de um álcool ao seu respectivo éster, como pode ser observado na reação apresentada na Figura 5.

Figura 5 - Acetilação com enzimas *Pseudomonas cepacia* Lipase



FONTE: adaptado de BENFATTI, et al., (2007).

3.3 BIODIESEL

O termo óleo se refere a uma ampla variedade de materiais líquidos com diferentes propriedades, utilizados atualmente na tecnologia de equipamentos. Entre estes líquidos se destaca-se o biodiesel (GAMA; GIL; LOCHTER, 2010).

O biodiesel é um biocombustível formado por ésteres de alquila, produzido por reação de transesterificação geralmente catalisada por ácido, base ou enzima (VERZIU et al., 2011).

Os catalisadores mais empregados são os catalisadores homogêneos alcalinos, que são mais eficientes, promovendo altos rendimentos (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). A reação de transesterificação de um triacilglicerol com álcool, geralmente ocorre com metanol ou etanol na presença de um catalisador homogêneo ou heterogêneo (GAMA; GIL; LOCHTER, 2010).

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento para o futuro, portanto, a busca por fontes alternativas de energia é de grande importância (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

Devido à crise que o país vem passando no que diz respeito ao petróleo, a procura por fontes alternativas e renováveis vem ganhando o mercado de trabalho e contribuindo para o melhor desenvolvimento sustentável do mundo.

O biodiesel vem se destacando não somente por ser uma fonte ilimitada, mas pelo fato de contribuir para o meio ambiente com a redução de poluição nos grandes centros urbanos. Além disso, a queima de combustíveis derivados do petróleo resulta no acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa (COSTA NETO, 2002). O combustível derivado do petróleo não é sustentável ou biodegradável. O biodiesel é combustível não fóssil, renovável, atóxico, o qual pode substituir total ou parcialmente o diesel de petróleo em motores de ciclo diesel, sem a necessidade de qualquer adaptação (GAMA; GIL; LOCHTER, 2010). Surge ainda com uma grande vantagem devido às oleaginosas adaptarem-se aos diversos lugares do Brasil mais especificamente à região Nordeste.

O biodiesel adentra ao mercado nacional de combustíveis depois de algumas particularidades, a regulação e fiscalização são de responsabilidade da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e biocombustíveis (ANP), passando mundialmente a adotar uma nomenclatura bastante apropriada para identificar a concentração do biodiesel na mistura biodiesel/diesel. Por exemplo, B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com concentrações de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente. O B100 representa uma concentração de 100% de biodiesel, ou seja, o biodiesel puro (AGUIAR, 2005 apud CAIXETA 2009).

Biodiesel é derivado de óleos vegetais, gorduras animais, óleo de cozinha residual ou outras matérias-primas como as algas ou microalgas (KNOTHE; CERMAK; EVANGELISTA, 2012). Os alcoóis mais empregados na transesterificação de óleos e gorduras são metanol e etanol. O metanol é amplamente aplicado na produção de biodiesel em

escala comercial por ser mais reativo, implica em menor temperatura e tempo de reação, além de outras razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade). O etanol, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico e gera maior número de cetano e lubricidade. Uma grande desvantagem do etanol está no fato deste promover uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação. Segundo Caixeta (2009), o processo mais utilizado para obtenção de biodiesel, a transesterificação, ocorre com a mistura do óleo vegetal (animal ou residual) ao etanol (rota etílica) ou metanol (rota metílica) juntamente com um catalisador de hidróxido (NaOH ou KOH), tendo como produtos o biodiesel e a glicerina.

3.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIODIESEL

As propriedades Físico-Química são de fundamental importância para os combustíveis de motores a diesel e afetam diretamente as características de desempenho do motor. Estas propriedades são apresentadas de grande importância para a qualidade do biodiesel, tais como, viscosidade, densidade, teor de umidade, índice de iodo, acidez, saponificação, ácidos graxos livres, teor de metais e não metais presentes no biodiesel.

3.4.1 Viscosidade

A viscosidade está relacionada ao escoamento do fluido. Então o controle desta propriedade é de grande importância para um bom desenvolvimento dos sistemas de injeção e bombas de combustível. A viscosidade também influencia a etapa de combustão, cuja eficiência dependerá da potência máxima desenvolvida pelo motor. Quanto maior a viscosidade, menor a eficiência do sistema de injeção de combustível, já que o tamanho das gotículas aumentará levando à redução da área superficial para contato com os gases pressurizados no interior da câmara de combustão (ZUNIGA, et al., 2011; ^bSILVA, 2012).

De acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível, resolução N° 45/2014, o limite da viscosidade para biocombustíveis deve estar a 40°C entre 3,0 à 6,0 mm²/s.

3.4.2 Índice de Iodo

Para cada óleo existe um intervalo característico do valor do índice de iodo, cujo valor também está relacionado com o método empregado em sua determinação. Geralmente os métodos de Hubl e Wijs são os mais utilizados em laboratórios oficiais de vários países. O índice de iodo é medido pelo número de iodo absorvido por 100 g de óleo ou gorduras, representando a medida do grau de insaturação expresso em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra % de iodo absorvido (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.4.3 Massa Específica

A massa específica ou densidade é a razão entre a massa do combustível pelo volume que ocupa, portanto, quanto maior a densidade mais compacto este será. Valores de densidades acima das faixas de regulação da mistura de ar/combustível podem levar ao aumento das emissões de poluentes como hidrocarbonetos, monóxido de carbono e material particulado. Já valores baixos de densidade podem favorecer a formação de uma mistura ar/combustível pobre, levando à perda de potência do motor e ao aumento de consumo de combustível (ZUNIGA 2011).

A densidade do biodiesel está ligada diretamente com a estrutura de suas moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquiléster maior será a densidade. No entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula (DABDOUB; BRONZEL; RAMPINA, 2009).

3.4.4 Ácidos Graxos Livres

O índice de acidez indica a quantidade em massa de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os ácidos graxos livres (AGL) não-esterificados. Em meio básico, os AGL formam os sais de ácidos graxos (sabões) responsáveis pela formação de emulsão durante a lavagem do biodiesel, reduzindo assim o rendimento da reação (NASCIMENTO; VASCONCELO; AZEVEDO, 2009).

3.4.5 Índice de Saponificação

A saponificação apresenta-se como um problema no processo de transesterificação do biodiesel. O excesso de ácidos graxos livres reage com boa parte do catalisador impedindo que o processo ocorra como devido, o que implica em um aumento do consumo dos hidróxidos e formação de sabões, consecutivamente emulsificando os ésteres e o glicerol, dificultando a separação de ambos através da decantação. Muitas vezes se faz necessário um tratamento da matéria-prima antes de se iniciar o processo, reduzindo assim o teor de ésteres de ácidos graxos, para depois prosseguir a produção através da transesterificação alcalina (NASCIMENTO; VASCONCELO; AZEVEDO, 2009).

3.4.6 Teor de Umidade

A presença de água excessiva é altamente prejudicial ao biodiesel, pois acelera sua deterioração e prejudica a combustão, além de acelerar a saturação dos filtros e provocar danos ao sistema de combustível. Quando o biodiesel está estocado, a água pode hidrolisar os ésteres, aumentando o teor de ácidos graxos livres e podendo favorecer o crescimento de micro-organismos (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), órgão regulador da qualidade do biodiesel no Brasil, estipula valores limites de 200 mg/kg para essa propriedade.

3.4.7 Índice de Acidez

A determinação do índice de acidez é de grande importância para se avaliar a qualidade de óleos, pois demonstra dados a respeito de sua conservação. Um elevado índice de acidez dificulta a reação de produção do mesmo, podendo provocar diversos danos ao motor ou deterioração do biocombustível.

O índice de acidez corresponde à quantidade em miligramas (mg) de hidróxido de sódio (NaOH) necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1g de gordura, e quanto maior for o índice de acidez, maior o volume de base consumida (CHRISTOFF, 2006).

3.4.8 Metais, fósforo e enxofre em biodiesel

Alguns metais podem ser incorporados no biodiesel durante o armazenamento e produção fazendo parte da composição final do combustível. A presença de qualquer impureza desta natureza podendo promover a decomposição do combustível e corrosão de partes do motor (injetor, bomba de combustível, pistões, anéis, etc.). Usualmente, cálcio e magnésio são provenientes da água de lavagem e sódio e potássio do catalisador (RAPOSO, 2010).

Mesmo em baixas concentrações a quantificação destes elementos é relevante para avaliar a qualidade do combustível. O procedimento padrão para sódio e potássio (EN 14108 e EN14109) aplica espectrometria de absorção atômica e o de magnésio e cálcio usa a espectrometria de emissão ótica acoplada a plasma (EN 14538). No Brasil, o procedimento padrão para sódio, potássio, cálcio e magnésio segue o método de ensaio ABNT NBR 15556 aplicando-se a técnica espectrometria de absorção atômica. Além destes elementos, também é necessário a determinação do fósforo devido à presença deste dificultar a purificação e poder levar a formação de incrustações de fosfato no motor (JESUS, 2008). O enxofre é um elemento indesejável em qualquer combustível devido à ação corrosiva de seus compostos e a formação de gases tóxicos que ocorre durante a combustão do produto (AMAI, 2014).

4. METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA

A amostra de óleo de mamona foi cedida pela Usina de Biodiesel da Petrobras de Quixadá- CE.

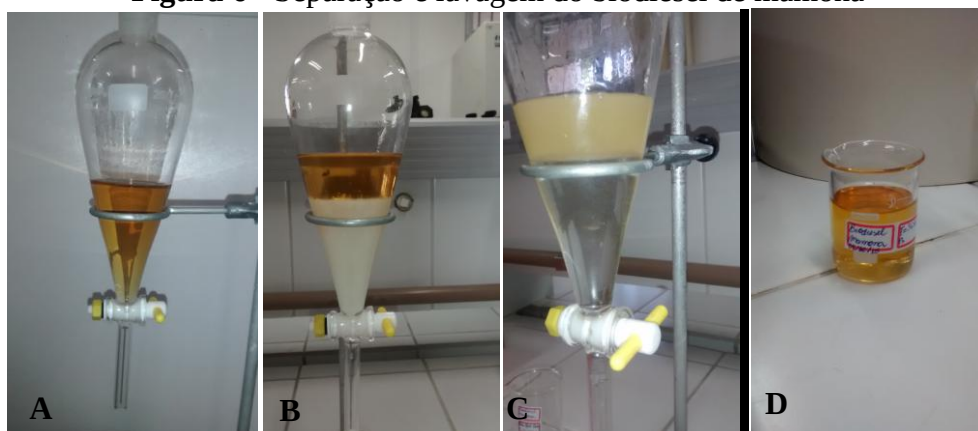
4.2 BIODIESEL DE MAMONA

Para a reação de transesterificação do óleo de mamona, misturou-se 1g de hidróxido de potássio (KOH) com 15 g de metanol sob agitação constante, para formação de metóxido de potássio. Em seguida, a solução de metóxido de potássio foi misturada a 50 g do óleo de mamona. A mistura foi mantida sob agitação por 1 horas e 30 minutos a uma temperatura de 60 °C

Ao término da reação o material foi transferido para um funil de decantação e mantido em repouso cerca de 30 minutos para a separação de fases fosse observada. Duas fases, uma clara e menos densa (os ésteres metílicos) e outra mais escura e mais densa (a glicerina), foram constatadas (Figura 6).

Após a reação e realizado uma lavagem da mistura biodiesel/glicerina, transferiu para um funil de decantação e adicionou-se água para total remoção da fase inferior impurezas base/glicerina/sabão/álcool, até completa a remoção das impurezas.

Figura 6 - Separação e lavagem do biodiesel de mamona



*Da esquerda para direita: A: mistura biodiesel/glicerina; B: biodiesel após 1º lavagem; C: biodiesel após última lavagem; D: biodiesel seco.

FONTE: próprio autor

4.3 OBTENÇÃO DO PADRÃO RICINOLEATO DE METILA A PARTIR DO BIODIESEL DE MAMONA

Para o isolamento do ricinoleato de metila o biodiesel metílico de mamona foi submetido a cromatografia em coluna usando com adsorvente sílica 60 ($\Phi = 0,025-0,020\text{mm}$), em que foi preparado uma mistura de sílica cerca de 35 g com o biodiesel 15 g. Como eluente foram utilizados hexano e acetato de etila de qualidade PA em misturas binárias na proporção 8:2, respectivamente (200 mL hexano, 150 mL hexano/acetato 5%, 100 mL hexano/acetato 10%, 50 mL hexano/acetato 20%, 50 mL hexano/acetato 30%, 50mL hexano/acetato 50%, 50mL hexano/acetato 100%).

4.4 OBTENÇÃO DO PADRÃO RICINOLEATO DE METILA ACETILADO

Foram preparados 40 mL de uma solução contendo anidrido acético/piridina na proporção 4:2. Esta solução foi adicionada em um erlenmeyer que continha 2,5 g de ricinoleato de metila que foi mantido sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Finalizada a reação o material foi vertido em um funil de decantação em seguida foi adicionada uma solução de sulfato de cobre (CuSO_4) 5%, com o intuito de remover a piridina residual. Após a separação da fase aquosa, que continha a solução de CuSO_4 , realizaram-se diversas lavagens para remoção do resíduo do sal de cobre. Após esta etapa, a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo a pressão reduzida e o material resultante foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa Acoplado a Espectrometria de Massa (CG-EM) para verificação da pureza.

Em seguida, foi feita uma análise de Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Chama (CG-DIC), com rampa de 5 minutos, temperatura de 220 °C mínima e 320 °C máxima, coluna capilar, injetor Split, com 8 minutos de corrida, para confirmação do produto totalmente acetilado.

4.5 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Foram construídas duas curvas de calibração uma para o ricinoleato de metila e outra do ricinoleato de metila acetilado. De início foi preparada uma solução multielementar om as

duas amostras de 1000 ppm cada, pesou-se 50 mg das amostras em um balão de 50 mL, aferindo-se o menisco com metanol. Em seguida diluiu-se em balões de 10 mL, as amostras apresentaram concentrações de 800, 400, 200, 100 e 50 ppm. Cada curva foi constituída com cinco pontos, analisada no CG-DIC em triplicata.

4.6 FONTES ENZIMÁTICAS

Para a seleção das enzimas foram testadas seis para verificar qual apresentava o melhor rendimento: Amano Lípase OS de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea, lipase de *Candida rugosa*, lipase do pâncreas de porco (PPL), Amano PS, Lipozyme RM, Novozyme.

Em um erlenmeyer foram adicionados 30 mg de biodiesel, 30 mg da enzima com 4 mL dos solventes testados (hexano e éter etílico), doador acila (acetato de vinila), mantidos por agitação 180 rpm em um agitador orbital, por 72 horas. Em seguida foi realizada a análise no Cromatografo (CG-DIC) e (CG-EM), para verificar o maior rendimento.

4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento fatorial foi escolhido por propiciar um estudo dos efeitos de duas ou mais variáveis de influência, onde todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável foram investigadas (LIMA, 2013 apud BARROS NETO et al.,1996). O planejamento fatorial determina as variáveis que tem efeitos relevantes nas respostas, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores e também permite estabelecer e quantificar as correlações entre as diferentes variáveis. Sem o uso de planejamentos fatoriais importantes interações entre fatores podem não ser detectadas e a otimização máxima do sistema pode levar mais tempo (LIMA, 2013).

No presente trabalho foi utilizado o planejamento fatorial completo, com cada fator k presente em apenas dois níveis (experimento fatorial 2^k). Quatro variáveis ($k=4$), massa de enzima, temperatura, solvente e doador de grupo acila (acetato de vinila), foram avaliadas considerando a margem de significância de 0,05 (95% de confiança).

Portanto, o planejamento consistiu de 2^4 (dezesseis experimentos), com três repetições cada, totalizando 48 experimentos. Não foram utilizados pontos centrais e extremos. A análise

foi realizada com o software Minitab® versão 17. Na Tabela 2 é apresentado o planejamento para esse trabalho. Em todos os experimentos as seguintes condições foram fixadas: 30 mg de biodiesel de mamona, 10 mL de solvente, 24 horas de reação e 180 rpm de agitação em agitador magnético.

Tabela 2- Planejamento Fatorial das condições

	Massa enzima (mg)	Temperatura (°C)	Solvente	Proporção de doador acila (acetato de vinila) Equivalente
1	2	30	-1	5
2	10	30	-1	15
3	10	30	-1	5
4	2	45	-1	15
5	10	45	-1	5
6	2	30	1	15
7	2	45	-1	15
8	10	45	1	15
9	2	30	-1	5
10	2	30	-1	15
11	2	30	1	5
12	10	45	1	5
13	2	45	1	5
14	10	30	1	15
15	2	30	1	5
16	10	30	1	5
17	10	45	-1	5
18	2	30	1	15
19	2	30	-1	15
20	10	30	1	15
21	2	30	1	15
22	2	30	-1	5
23	10	45	-1	15
24	10	30	-1	5
25	10	45	-1	15
26	10	30	-1	15
27	10	30	1	5
28	10	30	1	15
29	10	45	1	5
30	2	45	-1	5
31	2	45	-1	5
32	2	45	1	5
33	10	45	-1	15
34	2	30	-1	15
35	10	45	1	5

36	10	30	-1	5
37	2	45	1	5
38	10	45	1	15
39	10	30	-1	15
40	2	45	-1	5
41	10	45	-1	5
42	10	45	1	15
43	2	45	-1	15
44	2	30	1	5
45	2	45	1	15
46	10	30	1	5
47	2	45	1	15
48	2	45	1	15

Hexano = 1 e Éter etílico = -1

FONTE: próprio autor

4.8 DEFINIÇÃO DOS VALORES DOS NÍVEIS NO PLANEJAMENTO

Todos os valores, exceto a massa de enzima, foram fixados baseando-se em dados publicados na literatura. As massas da enzima foram fixado entre 2 e 10 mg.

O intervalo de temperatura foi de 30-45 °C, valores baseados nos trabalhos de Raita, Champreda e Laosiripojana (2010) e Oliveira (2007). Com relação ao doador de acila (tipo e proporção) e aos solventes foram utilizados como referência os trabalhos de Machado et al. (2008 e 2009). Os solventes selecionados, hexano e éter etílico, também foram baseados nestes trabalhos e os mesmos foram adicionados ao sistema em uma quantidade fixa de 10 mL.

As outras condições foram fixadas em: velocidade de agitação 180 rpm em um agitador orbital e tempo de reação 24 horas.

4.9 ESTUDO CINÉTICO

Em um vidro âmbar de 50 mL, foram adicionados uma quantidade de 10 mL do solvente hexano, 30 mg do biodiesel, 10 mg da enzima e 15 equivalentes (525µL) do grupo acila ((acetato de vinila) sob uma temperatura de 30 °C e mantidos em agitação 180 rpm em um agitador magnético, por um período de 4 dias. Foram realizados análises no CG-DIC em 30 minutos, uma hora, duas horas, após 12 horas os intervalos foram de 12 e 12 horas até 4 dias.

5.0 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO, BIODIESEL E DO BIODIESEL ACETILADO DA MAMONA

Todas as propriedades Físico-Químicas foram realizadas de acordo com a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985, exceto a viscosidade e densidade.

5.0.1 Determinação da viscosidade e massa específica

Foi utilizado para o experimento da viscosidade bem como para densidade/massa específica o viscodensímetro Anton Paar modelo SVM 3000 (figura 7). O equipamento fornece valores de densidade da mistura líquida em Kg/m^3 com quatro casas decimais.

Para efetuar a leitura o equipamento foi ajustado inicialmente a temperatura de 20 °C com o auxílio de uma seringa (aproximadamente de 10 mL) transferindo para o viscodensímetro as amostras do óleo, biodiesel e biodiesel acetilado. O mesmo procedimento foi realizado ajustando a temperatura para 40 °C.

Figura 7 - Equipamento usado para medida da viscosidade e densidade



FONTE: próprio autor

5.0.2 Determinação do Índice de Acidez e Ácidos Graxos Livres

O índice de acidez foi medido pelo método titulométrico, em que 2 g da amostra (óleo, biodiesel e biodiesel acetilado) foram transferidos para um erlenmeyer de 250 mL juntamente com uma solução de éter etílico-álcool etílico (2:1) e 2 gotas do indicador fenolftaleína. Em seguida, a amostra foi titulada com solução padrão de NaOH 0,01 M até o aparecimento de coloração rósea, que permanecerá por pelo menos 30 segundos. As medidas foram realizadas em triplicata. O resultado foi calculado pela relação entre massa em miligramas de hidróxido de sódio consumidos por grama de amostra analisada conforme as equações 1 (a e b).

$$I.A = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times MM_{\text{base}} \times C_{\text{base}}}{m} \quad \text{Eq. 1 (a)}$$

$$\%AGL = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times MM_{\text{ác. graxo}} \times C_{\text{base}} \times 100}{m} \quad \text{Eq. 1 (b)}$$

V_{amostra} = Volume (mL) de solução NaOH gasto na titulação

V_{branco} = Volume (mL) de solução NaOH gasto na titulação do branco

MM_{base} = Massa molar do NaOH (40 g/mol)

C_{base} = Concentração molar (mol/L) da solução de NaOH

$MM_{\text{ác. graxo}}$ = Massa molar do ácido graxo ricinoleico (298g/mol)

m = Massa da amostra (g)

%AGL = Percentual de ácido graxo livre

5.0.3 Determinação do Índice de Iodo

Uma massa de 0,25 g de amostra de biodiesel e seu acetilado foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL com tampa e boca esmerilhada, adicionando-se em seguida 10 mL de tetracloreto de carbono (CCl_4), 25 mL da solução de Wijs agitou-se para total homogeneização e deixou-se em repouso, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Acrescentaram-se 10 mL da solução de iodeto de potássio 15% e 100 mL de água

recentemente ebulida. Titulou-se com solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Acrescentaram-se entre 1 e 2 mL de solução indicadora de amido 1% e continuou-se a titulação até o completo desaparecimento da cor azul. O branco foi preparado sob as mesmas condições, sendo que não contém a amostra e procedeu-se da mesma maneira quando contém a amostra. O índice de iodo foi calculado pela equação a baixo.

$$\text{Índice de iodo} = \frac{(V_B - V_A) \times M \times 12,68}{P_{\text{amostra}}} \quad \text{Eq. (2)}$$

M = concentração molar da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

V_B = volume (mL) gasto na titulação do branco

V_A = volume (mL) gasto na titulação da amostra

P_{amostra} = massa (g) da amostra

12,68 = massa molar do iodo dividido por 10

5.0.4 Determinação do Índice de Saponificação

Em um erlenmeyer de boca esmerilhada de 150 mL pesaram-se 4 g da amostra de óleo de mamona e adicionaram-se 50 mL da solução alcoólica de KOH 4%. Conectou-se o erlenmeyer ao condensador e aqueceu-se até suave fervura, por aproximadamente uma hora. Após resfriamento, adicionaram-se duas gotas do indicador fenoftaleína e titulou-se com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M até desaparecimento da cor rósea. Um teste em branco, sobre as mesmas condições, foi realizado. O índice de saponificação foi calculado a partir dos volumes gastos de HCl, através da equação 3.

$$\text{Índice de saponificação} = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}) \times \text{MM}_{\text{KOH}} + C_{\text{HCl}}}{P_{\text{amostra}}} \quad \text{Eq. (3)}$$

V_{amostra} = volume (mL) gasto na titulação da amostra

V_{branco} = volume (mL) gasto na titulação do branco

P_{amostra} = massa (mL) da amostra

5.0.5 Determinação do Teor de umidade

Pesou-se um cadinho, levou-se a estufa por 1 hora à 120 °C para a total secura, depois colocou-se em um dessecador (resfriamento) pesou-se novamente e anotou-se a massa M_1 . Em seguida, adicionou-se 2g do óleo levou-se novamente a estufa à 110-115 °C e resfriou-se e pesou-se novamente M_2 . Repetiu-se este procedimento de aquecer, resfriar e pesar até que não ocorresse variação da massa da amostra. Depois aplicou-se na seguinte equação 4.

$$U\% = \frac{(M_1 - M_{\text{amostra}}) - M_2 \times 100}{M_{\text{amostra}}} \quad \text{Eq. (4)}$$

M_1 = Massa (g) do cadinho

M_2 = Massa (g) do cadinho + óleo

M_{amostra} = Massa (g) da amostra

5.0.6 Determinação de Metais e não-metais em Biodiesel

Os testes para a determinação dos metais: cálcio, magnésio, sódio e potássio. Não-metais: fósforo e enxofre foram realizados pelo laboratório da Usina de biodiesel da Petrobras de Quixadá-CE.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

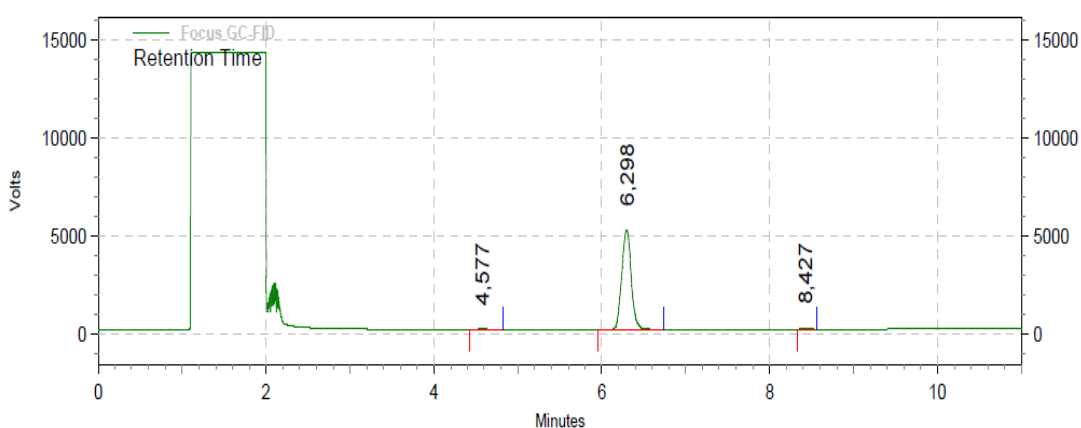
6.1 OBTENÇÃO CONVENCIONAL DO BIODIESEL DE MAMONA

O processo de obtenção do biodiesel ocorreu por meio de transesterificação rota metílica, obtendo-se um rendimento de 77%. Segundo Barreto et al. (2010), depois de uma etapa de otimização seu melhor resultado foi de 87,97% em biodiesel de mamona, o que mostra que o presente resultado está de acordo com aqueles registrados na literatura, pois o processo não foi otimizado. Esta etapa objetivou obter biodiesel rico em ricinoleato de metila para que este último pudesse ser isolado por cromatografia e utilizado como padrão analítico.

6.2 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DO RICINOLEATO DE METILA E SEU ACETILADO

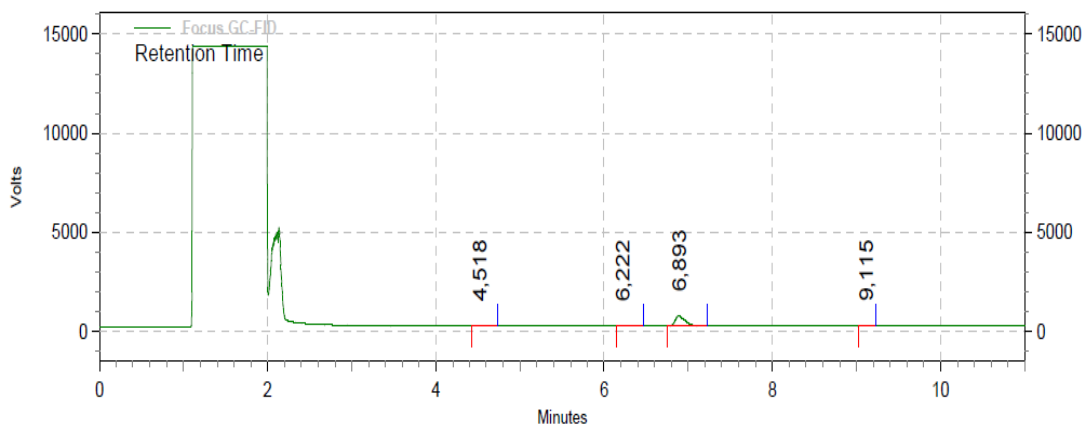
Os padrões químicos das substâncias ricinoleato de metila (éster metílico do ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico) e acetato de ricinoleato de metila (éster metílico do ácido 12-acetiloxi-9-octadecenóico), utilizados nas quantificações das bioacetilações, foram obtidos em grau de pureza superiores a 98%. Portanto, foram padrões adequados para as quantificações dos produtos reacionais. As Figuras 8 e 9 exibem os cromatogramas de ambos os padrões obtidos.

Figura 8 - Cromatograma obtido por CG-DIC do padrão do ricinoleato de metila



FONTE: próprio autor

Figura 9- Cromatograma obtido por CG-DIC do padrão do ricinoleato de metila acetilado

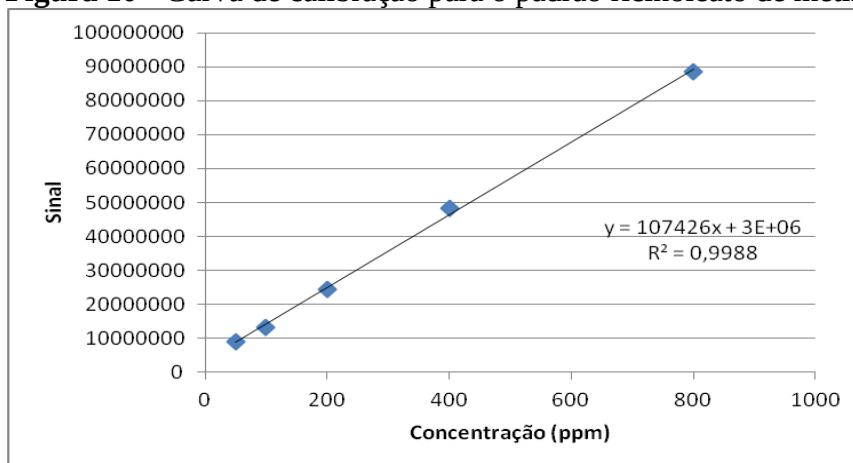


FONTE: próprio autor

6.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS PADRÕES DE RICINOLEATO DE METILA E SEU ACETILADO

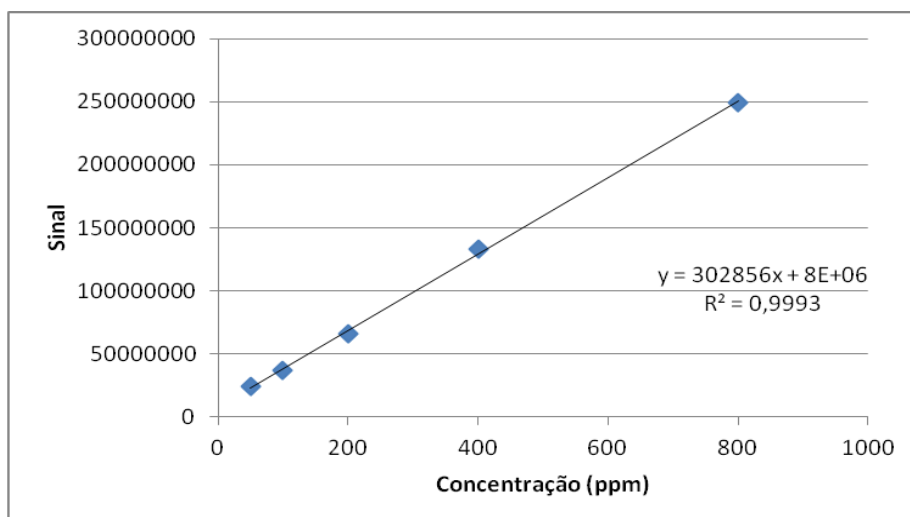
As curvas de calibração para ambos os padrões apresentaram ótima linearidade ($R^2 > 0,999$), indicando que as quantificações no intervalo de concentração utilizado (50 a 800 ppm) foram analiticamente eficientes. Isto demonstra que o método analítico utilizado CG-DIC foi adequado para o estudo. As Figuras 10 e 11 ilustram as referidas curvas.

Figura 10 - Curva de calibração para o padrão ricinoleato de metila



FONTE: próprio autor

Figura 11 - Curva de calibração para o padrão ricinoleato de metila acetilado



FONTE: próprio autor

Segundo Dutra (2013) a linearidade compreende a correlação entre a resposta do método e a concentração, ou quantidade, de amostra cujo comportamento deve ser descrito por uma equação linear. A linearidade possui como resultado uma curva analítica em função da concentração da amostra, quanto mais próximo da unidade for o fator R^2 , mais linear será a curva, sendo que o ideal para sua construção mínimo de cinco parâmetros de concentrações.

6.4 TRIAGEM DAS LIPASES

Um conjunto de seis (6) enzimas comerciais, Amano Lípase OS de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea, lipase de *Candida rugosa*, lipase de pâncreas de porco (PPL), Amano PS, Lipozyme RM, Novozyme, foi testado em sua capacidade de catalisar a reação de acetilação do biodiesel metílico de mamona.

Os melhores resultados foram obtidos com Amano Lipase OS (90,1%), Amano Lipase OS imobilizada (53,3%) e Lipase de *Candida rugosa* (42,9%). As outras fontes enzimáticas mostraram rendimentos de conversão muito baixo nas condições testadas. Como o processo de imobilização confere maior resistência a estrutura da enzima resolveu-se selecionar Amano Lipase PS imobilizada para os estudos subsequentes, apesar desta ter apresentado uma conversão inferior a da Amano Lipase OS. Contudo, a próxima etapa do

estudo será a otimização das condições reacionais em busca de melhorar rendimento de conversão. Os resultados encontram-se ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento de conversão da acetilação do ricinoleato de metila

Enzima	Rendimento de acetilação (%)
Amano Lipase PS imobilizada	53,3
Amano Lipase OS	90,1
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	42,9
Lipozyme RM	-
Novozyme	4,1
PPL	1,2

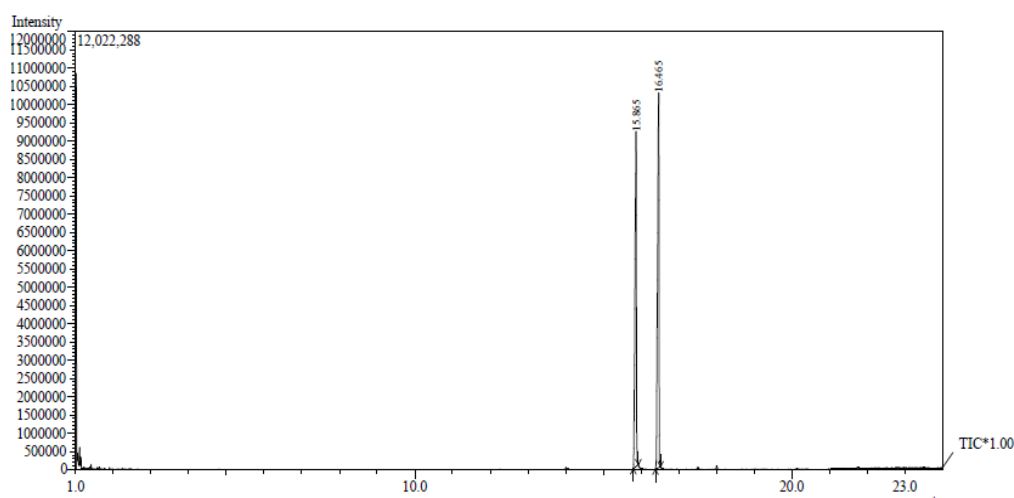
FONTE: próprio autor

Estudos realizados por Gomes (2006) relataram que qualquer que seja o método de imobilização de enzimas, deseja-se preservar, tanto quanto possível, a atividade biocatalítica e a especificidade. Este questionamento justifica a escolha da enzima amano lipase PS imobilizada nos experimentos seguintes.

Trabalho publicado por Tiossol (2014), mostra que a mesma enzima também apresentou melhor desempenho que Novozym 435, bastante citada na literatura. No mesmo trabalho, o pior desempenho observado foi para Lipozyme TL IM, semelhante aos resultados obtidos no presente estudo.

Na Figura 12 é possível observar o cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) do produto de acetilação enzimática do biodiesel de mamona catalisada por Amano Lipase PS imobilizada.

Figura 12 - Cromatograma CG-EM do produto de acetilação enzimática com Amano Lipase PS imobilizada



Em 15,865 é o pico referente ao ricinoleato de metila e em 16,465 é o ricinoleato de metila acetilado.

FONTE: próprio autor

6.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

No planejamento estático dos experimentos, foi estudado a influência da temperatura, massa da enzima, solvente e massa do doador de grupo acila, para obtenção de um maior rendimento no biodiesel mamona/metanol, considerando a margem de significância de 0,05 (95% de confiança).

Em qualquer área de pesquisa é interessante saber quais variáveis são importantes em algum estudo que se esteja realizando, assim como limites inferior e superior de valores/condições dessas variáveis. Portanto, a procura pelas variáveis que desempenham aspectos negativos e positivos durante qualquer unidade processual é importante para o bom andamento e o desenvolvimento da mesma.

Tabela 4 - Planejamento Fatorial das condições e os resultados em rendimento

	Massa enzima	Temperatura	Solvente	Grupo Acila	Proporção de doador acila (acetato de vinila) Equivalente
1	2	30	-1	5	18,61
2	10	30	-1	15	99,90
3	10	30	-1	5	54,04
4	2	45	-1	15	8,98
5	10	45	-1	5	34,64
6	2	30	1	15	58,93
7	2	45	-1	15	12,08
8	10	45	1	15	85,57
9	2	30	-1	5	21,96
10	2	30	-1	15	91,95
11	2	30	1	5	60,06
12	10	45	1	5	96,22
13	2	45	1	5	54,00
14	10	30	1	15	95,22
15	2	30	1	5	63,18
16	10	30	1	5	98,77
17	10	45	-1	5	36,48
18	2	30	1	15	40,09
19	2	30	-1	15	90,00
20	10	30	1	15	91,10
21	2	30	1	15	58,99
22	2	30	-1	5	16,18
23	10	45	-1	15	76,81
24	10	30	-1	5	61,49
25	10	45	-1	15	70,39
26	10	30	-1	15	76,63
27	10	30	1	5	99,90
28	10	30	1	15	80,40
29	10	45	1	5	98,54
30	2	45	-1	5	22,87
31	2	45	-1	5	25,87
32	2	45	1	5	39,32
33	10	45	-1	15	81,52
34	2	30	-1	15	32,81
35	10	45	1	5	93,44
36	10	30	-1	5	78,09
37	2	45	1	5	77,33
38	10	45	1	15	95,73
39	10	30	-1	15	78,09
40	2	45	-1	5	32,00
41	10	45	-1	5	33,15

42	10	45	1	15	86,15
43	2	45	-1	15	6,76
44	2	30	1	5	66,84
45	2	45	1	15	37,43
46	10	30	1	5	99,80
47	2	45	1	15	46,32
48	2	45	1	15	51,89

Hexano = 1 e Éter etílico = -1

FONTE: próprio autor

Percebe-se, analisando a (Tabela 4), que houve condições em que o rendimento reacional foi muito alto (99,9%) indicando que a busca pelas condições reacionais ótimas da enzima segue o caminho correto. As quatro variáveis ($k=4$), que apresentaram as melhores condições foram: massa da enzima de 10 mg, temperatura 30 °C, solvente hexano e doador de grupo acila (acetato de vinila) 15 equivalente (525 µL).

Na Tabela 5, é possível verificar os efeitos dos fatores que foram significativos para a atividade da enzima. Os fatores que apresentaram efeitos positivos contribuíram para o aumento do rendimento de biodiesel e aqueles com sinal negativo para a redução do rendimento. Massa de enzima e solvente foram os fatores de maior impacto, ambas com efeitos positivos.

Tabela 5 - Efeitos das variáveis estudadas nos experimentos

Código	Variável	Efeito	Coefficiente de regressão	p-valor*
-	Constante	-	61,18	0,000
A	Massa de enzima	36,15	18,08	0,000
B	Temperatura	-13,73	-6,87	0,000
C	Solvente	25,58	12,79	0,000
D	Doador acila	7,12	3,56	0,042
E	Temp./solv.	9,45	4,73	0,000
F	Solv./ acila	-17,09	-8,54	0,000
G	Massa/temp./acila	12,01	6,01	0,001
H	Massa/temp./solv./acila	-10,85	-5,43	0,003

P= probabilidade de significância do teste t, a 3 graus de liberdade.

FONTE: próprio autor

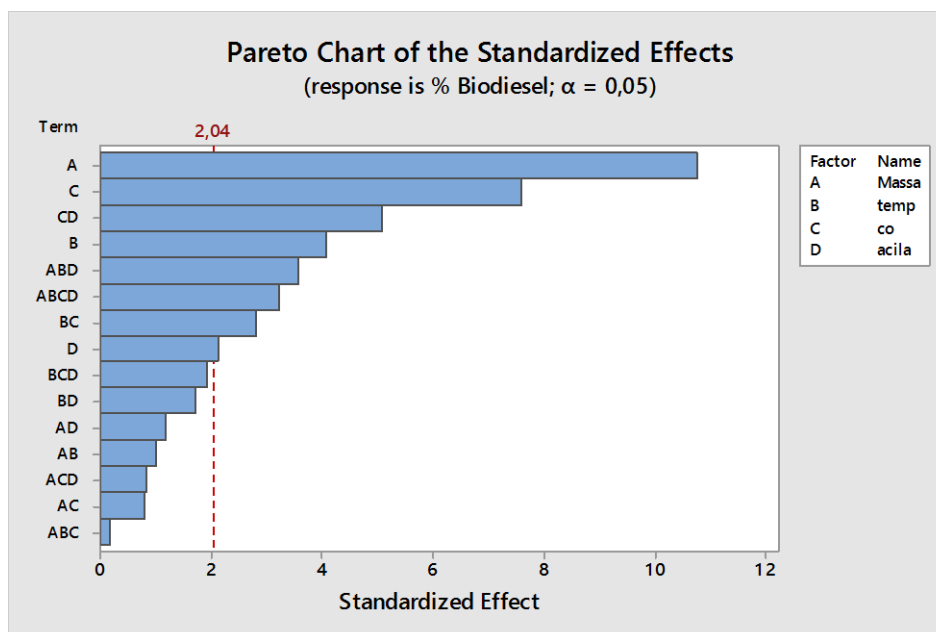
A partir dos coeficientes de regressão, obtidos com as variáveis significativas, foi possível encontrar a equação 5 que representa o modelo da catálise enzimática para produção do biodiesel nos máximos rendimentos.

$$\%Biodiesel = 61,18 + 18,08 \times A - 6,87 \times B + 12,79 \times C + 3,56 \times D + 4,73 \times E - 8,54 \times F + 6,01 \times G - 5,43 \times H \quad (\text{Equação 5})$$

Através do gráfico de Pareto (Figura 13) é possível verificar quais fatores foram significantes para o experimento. Novamente, observou-se que, independentemente, massa de enzima e o tipo de solvente foram os fatores que mais impactaram no rendimento da reação. A massa de enzima, o fator de maior impacto, deve ser aumentada para se atingir os rendimentos máximos. A temperatura também foi significativa, porém a combinação dos fatores tipo de solvente e proporção de doador acila foram superior. Isoladamente, a proporção de doador de acila não influenciou significativamente no rendimento reacional. A combinação dos quatro fatores também foram relevantemente significantes para o experimento, comprovando que um estudo clássico, onde as variáveis são testadas individualmente, sobre as melhores condições reacionais deve ser modelo via um planejamento experimental completo.

Se o efeito da interação for não significativo pode-se interpretar isoladamente cada efeito principal. Caso o efeito seja significativo, se deve construir e analisar hipóteses sobre os níveis de um dos fatores dentro de cada nível do outro. A interação não-significativa, nos leva a duas retas paralelas, sem as variáveis interceptarem (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

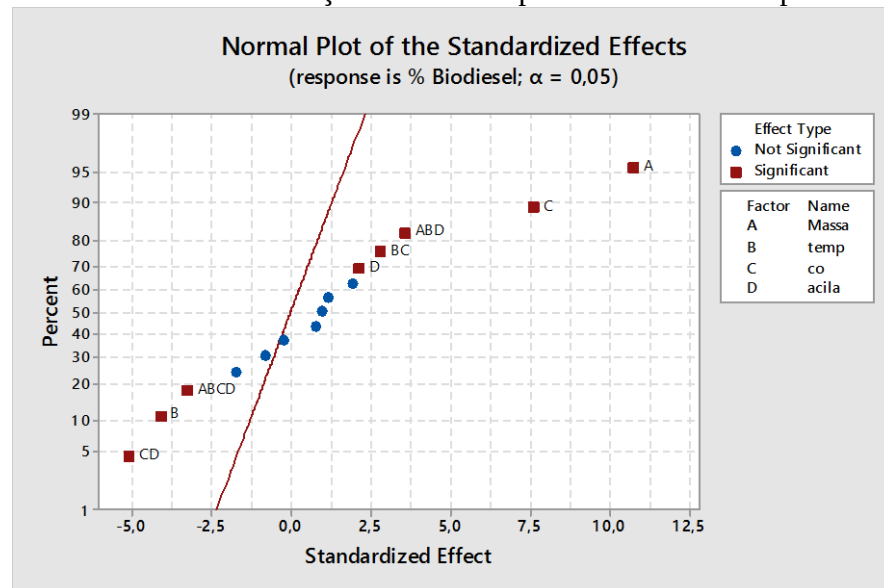
Figura 13 - Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas nos experimentos



FONTE: próprio autor

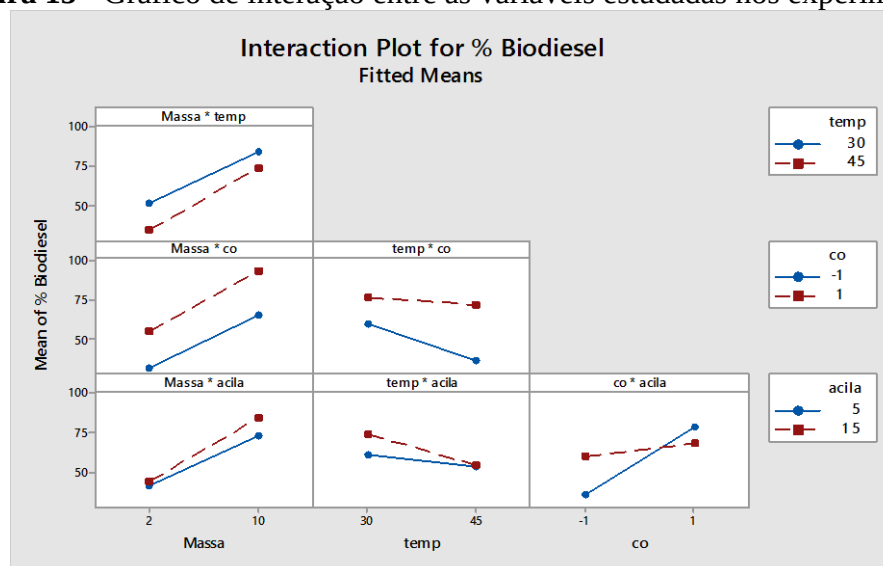
O gráfico de normalização dos efeitos padronizados (Figura 14) reforça a ilustração dos fatores significantes, bem como a intensidade e o sentido do efeito. Novamente, verificou-se que a massa de enzima e o tipo de solvente foram os fatores mais importantes (95% e 90%, respectivamente), com efeitos padronizados positivos. Já a temperatura e a combinação solvente/proporção de doador acila (acetato de vinila) foram variáveis com efeitos negativos.

Figura 14 - Gráfico de normalização dos efeitos padronizados nos experimentos



FONTE: próprio autor

Figura 15 - Gráfico de interação entre as variáveis estudadas nos experimentos



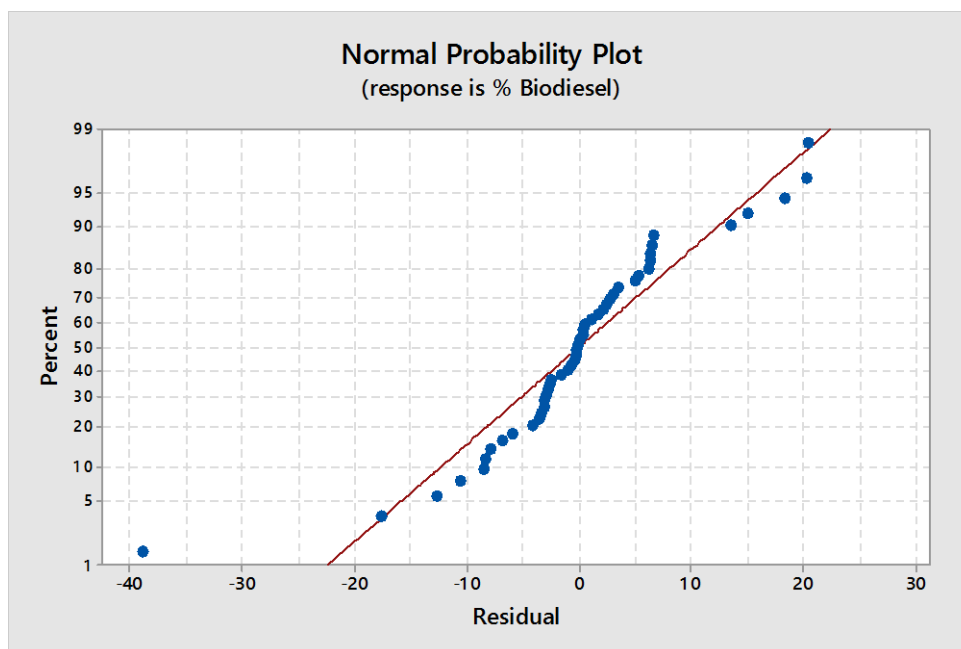
FONTE: próprio autor

A partir do gráfico da Figura 15 foi possível verificar a influência, par a par, entre as variáveis significantes no planejamento. Ainda pôde-se confirmar se a influência do fator foi positiva ou negativa para o rendimento reacional. A massa de enzima, o fator mais significativo, influenciou diferentemente os resultados de acordo com a interação de outras variáveis. A correlação da massa de enzima com a temperatura demonstrou que a 30°C os rendimentos foram superiores àqueles obtidos a 45°C. Já o hexano como solvente levou a melhores resultados. A proporção de doador acila (acetato de vinila) influenciou pouco, sendo o rendimento levemente superior quando se utilizou 15 equivalente do mesmo.

Também pela Figura 15 foi possível observar que a temperatura influenciou negativamente no rendimento reacional. Portanto, temperaturas mais brandas são as mais convenientes para as lipases avaliadas. Essa característica foi relatada na literatura, pois temperaturas altas tendem a desnaturar enzimas (MACHADO et al., 2008).

O solvente também é um fator determinante para a ação enzimática, sendo o hexano o que levou a rendimentos mais elevados neste estudo. Solventes apolares tendem a resultar em melhores rendimentos por não danificar a camada de hidratação da enzima, essencial para sua atuação, diferente dos polares (SALUN et al., 2010).

Figura 16 - Relação entre os valores observados e os preditos pela Equação 5



FONTE: próprio autor

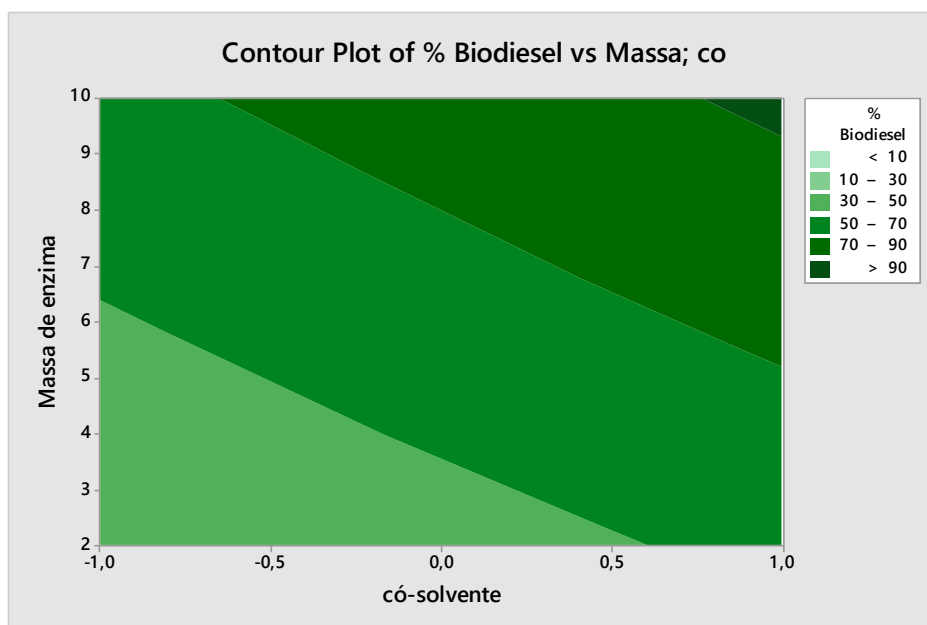
O gráfico da Figura 16 ilustra a distribuição dos valores obtidos experimentalmente e os previstos pelo modelo matemático descrito pela equação 5.

Pode-se perceber que os pontos não apresentaram uma dispersão relevante frente aos preditos pelo modelo, indicando que o planejamento experimental foi válido.

Sabendo que o planejamento foi válido, gráficos de contorno foram obtidos para verificação das regiões (combinação de variáveis) que resultam nos máximos rendimentos figura 17.

Segundo a Figura 17 os máximos rendimentos (>90%) em biodiesel podem ser alcançados quando se utiliza combinações de 10 mg de enzima e hexano como solvente. A literatura relata que lipases respondem melhor quando catalisam reações de acilação em solventes apolares (MACHADO et. al., 2008; MACHADO et. al., 2009). A quantidade máxima de enzima testada no estudo foi a que mostrou maiores rendimentos, porém, como os rendimentos foram próximos de 100% não se viu a necessidade de elevar mais ainda a quantidade.

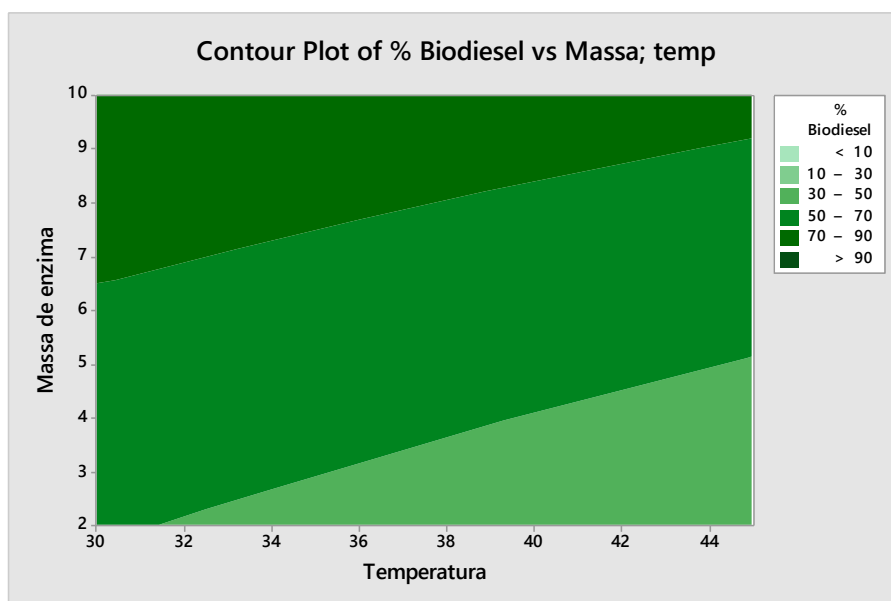
Figura 17 - Gráfico de contorno para as variáveis massa de enzima e có-solvente



FONTE: próprio autor

Já na Figura 18 foi possível observar que a temperatura influenciou negativamente no rendimento de biodiesel. Portanto, para os melhores resultados deve-se manter a temperatura do sistema reacional abaixo dos 32°C. Se conhece que o comportamento das enzimas frente a temperatura é muito influenciado, exigindo um controle rígido deste parâmetro afim de evitar possível desnaturação da mesma. Portanto, neste caso específico é indicado o controle da temperatura próximo a ambiente (MACHADO et al., 2008).

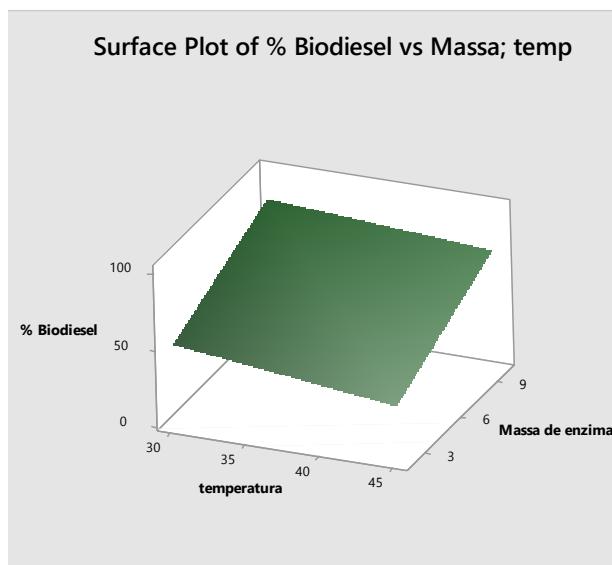
Figura 18 - Gráfico de contorno para as variáveis massa de enzima e temperatura



FONTE: próprio autor

O gráfico de superfície observado na Figura 19 mostra que as regiões onde são obtidos os melhores resultados são aquelas onde a massa da enzima é em torno de 10 mg e a temperatura próxima aos 30°C, ou seja, zona localizadas no interior do gráfico tridimensional.

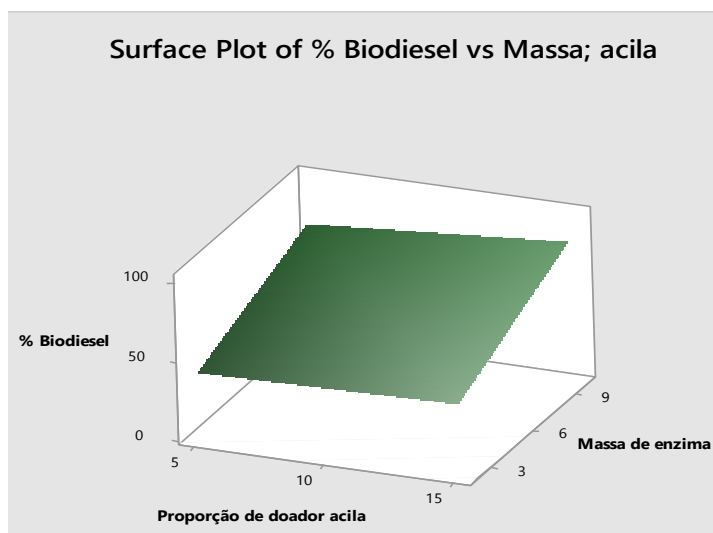
Figura 19 - Gráfico de superfície para as variáveis massa de enzima e temperatura



FONTE: próprio autor

Adicionalmente, o gráfico de superfície da Figura 20 mostra como os fatores massa de enzima e proporção de doador de acila (acetato de vinila) influenciam conjuntamente no rendimento da reação enzimática. Comprovou-se que a influência da proporção de grupo acila foi praticamente irrelevante, dentro do intervalo estudado. Machado et al., (2008), também acharam resultados semelhantes para a proporção de doador acila (acetato de vinila), em que foram testadas proporções de 5-10 equivalentes. Portanto, o importante é que a quantidade de doador acila seja superior estequiométrica para que a reação de acetilação enzimática do biodiesel transcorra adequadamente, sendo necessário o excesso deste reagente.

Figura 20 - Gráfico de superfície para as variáveis massa de enzima e doador acila

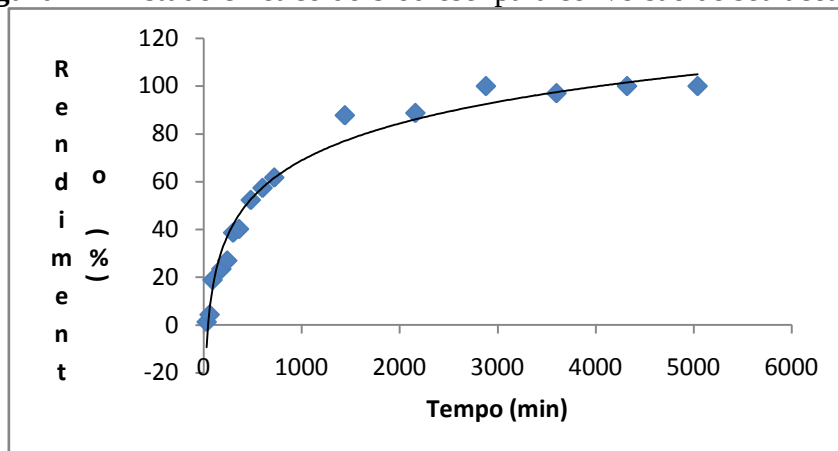


FONTE: próprio autor

6.6 ESTUDO CINÉTICO

A investigação da cinética reacional objetivou determinar o tempo mínimo para o qual é alcançado o rendimento máximo de conversão. Com os dados obtidos no planejamento experimental foi possível estabelecer as condições ótimas de reação para este estudo. Utilizando as condições otimizadas descritas no tópico metodologia experimental (solvente de 10 mL, temperatura de 30 °C, ricinoleato 30 mg, enzima 10 mg e grupo acila de 15 equivalentes (525 µL) foi possível obter o gráfico da Figura 21, onde se observar que o máximo rendimento é alcançado em 48 horas de reação (>99,9%). Inicialmente, o rendimento da reação foi medido em curtos intervalos de tempo (0,5, 1,0 e 2,0 horas) até as primeiras 12 horas de reação. Após este tempo o acompanhamento foi em intervalos de 12 horas. A curva cinética apresentou o aspecto de uma curva de Michaelis Menten.

Figura 21 - Estudo cinético do biodiesel para conversão de seu acetilado

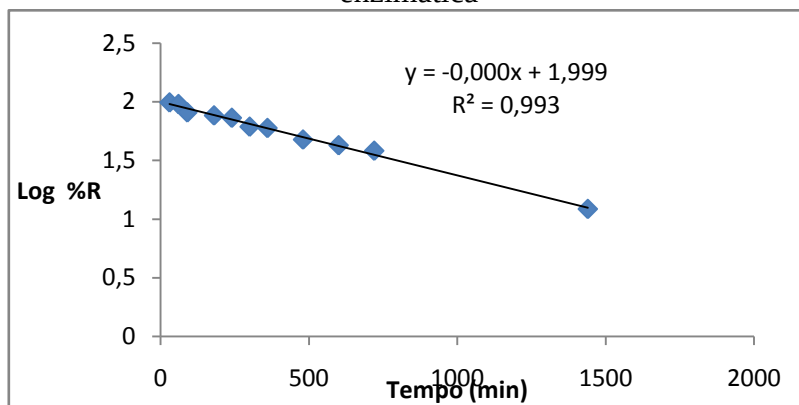


FONTE: Próprio autor

No trabalho de ^bSilva (2012) a taxa média de conversão de ricinoleato de metila em biolubrificantes foi de 3,96 horas (para uma quantidade inicial de 100 g), com o tempo ótimo para a reação de 24 horas (conversão de aproximadamente 100%) como catalisador o metóxido de sódio em pó foi utilizado como catalisador a 2% em massa do acetato de metila. Se comparado ao presente estudo é possível afirmar que seus resultados foram similares, em que uma conversão de 100% foi obtida após 48 horas de reação.

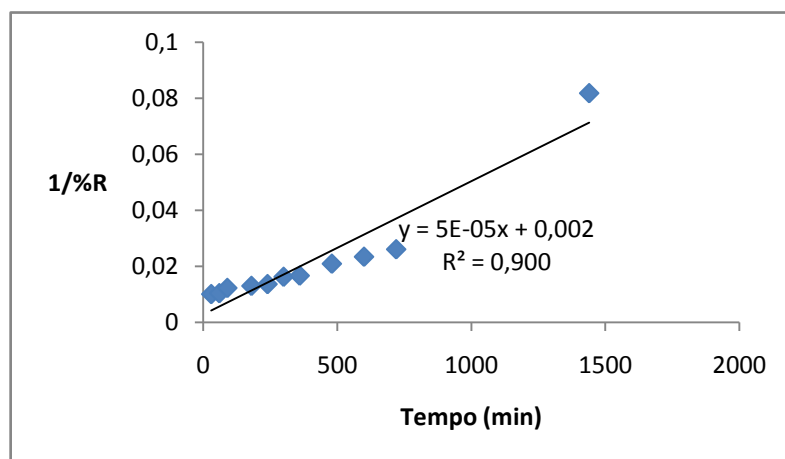
Os dados foram ajustados a modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para verificação de sua cinética. Gráficos de $\text{Log}\%R$ e $1/\%R$ em função do tempo de reação (Figuras 22 e 23), respectivamente para pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, foram confeccionados para verificação da linearidade. Abaixo seguem os referidos gráficos linearizados.

Figura 22 - Modelo cinético linearizado para pseudo-primeira ordem da reação de acetilação enzimática



FONTE: próprio autor

Figura 23 - Modelo cinético linearizado para pseudo-segunda ordem da reação de acetilação enzimática



FONTE: próprio autor

Percebe-se, pelo valor do coeficiente de linearidade R, o gráfico que apresentou maior linearidade foi o da Figura 22 ($R=0,9967$). Portanto, o modelo cinético que mais se adequa a reação de acetilação enzimática do biodiesel de mamona é o de pseudo-primeira ordem.

6.7 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO, BIODIESEL E BIODIESEL ACETILADO

A qualidade do biodiesel, e de sua matéria-prima (óleo), é avaliada através de parâmetros físico-químicos que determinam certas propriedades que podem influenciar na

queima do combustível, no desempenho do motor, na segurança do transporte e no seu manuseio.

Com o intuito de verificar a qualidade dos produtos estudados, óleo, biodiesel e biodiesel acetilado, bem como compara-los entre si, foram determinadas as seguintes propriedades Físico-Químicas: viscosidade, massa específica, índice de acidez, índice de iodo, índice de saponificação, ácidos graxos livres, teor de umidade, enxofre total, sódio + potássio, cálcio + magnésio e fósforo, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Propriedades Físico-Químicas do óleo, biodiesel e biodiesel acetilado

Propriedades	Método	Óleo de Mamona	Biodiesel de Mamona	Biodiesel Acetilado de Mamona	Normas ANP (Limite)
Viscosidade (mm ² /s) à 40°C	ASTMD445	259,83	15,44	9,76	3,0 a 6,0
Massa Específica à 20°C (Kg/m ³)	ASTMD4052	960,8	926,4	939,3	850 a 900
Índice de Ácidez (mgKOH/g)	EN14104	3,95	0,39	1,15	0,50
Ácidos Graxos Livres (%)	-	21,0	2,1	6,1	0,50
Índice de Saponificação (mgKOH/g)	-	360,9	-	-	-
Índice de Iodo (g de iodo/100g)	EN14111	-	16,86	27,31	Anotar
Teor de Umidade (%)	-	0,138	-	-	200
Enxofre (S) Total	ASTMD4737	-	4,86	7,43	10
Sódio (Na) + Potássio (K)	EN 14108 EN 14109 EN 14538	0,450 0,590	4,072 5,553	0,079 0,017	5
Cálcio (Ca) + Magnésio (Mg)	EN 14538	0,202 0,107	0,323 0,175	<LD	5
Fósforo (P)	EN 14107 EN 16294	0,059	<LD	0,031	10

<LD = menor limite de detecção

6.7.1 Viscosidade Cinemática

Diversos trabalhos relatam que a viscosidade é de grande importância para a qualidade dos biocombustíveis, pois aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação, afetando diretamente a combustão no motor. Um dos principais objetivos do trabalho foi buscar um método para a redução da viscosidade do biodiesel de mamona. O óleo de mamona apresenta uma viscosidade altíssima, devido as hidroxilas e saturações presentes de sua cadeia carbônica, sendo $259,83 \text{ mm}^2/\text{s}$ à 40°C o valor medido neste estudo. Costa (2006) em estudos sobre as especificações de alguns óleos vegetais das cultivares BRS-149 Nordestina encontrou um valor para a viscosidade de $210,2 \text{ mm}^2/\text{s}$ para o óleo de mamona a uma temperatura de 40°C . Já Neto e colaboradores (1999), verificaram uma viscosidade de $285 \text{ mm}^2/\text{s}$ à $37,8^\circ\text{C}$, muito similar ao encontrado no presente estudo.

Quanto ao biodiesel de mamona França (2008) encontrou uma viscosidade de $14,98 \text{ mm}^2/\text{s}$ resultado análogo ao nosso, $15,44 \text{ mm}^2/\text{s}$ à 40°C , valor bastante elevado se comparado ao limite estabelecido pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) que é de $3,0$ a $6,0 \text{ mm}^2/\text{s}$ à 40°C , refletindo sua alta viscosidade. Outro trabalho relevante foi aquele publicado por Dabdoub; Bronzel; Rampina, (2009), que encontraram um valor de $13,82 \text{ mm}^2/\text{s}$ para a viscosidade, a 40°C , do biodiesel de mamona, contra limites de $3,5$ a $5,0 \text{ mm}^2/\text{s}$ das normas. A alta viscosidade, neste caso, mesmo após a transesterificação do óleo pode reduzir a atomização do combustível causando uma maior formação de depósitos no sistema de injeção, além de dificultar o trabalho do sistema de bombeamento do combustível.

A acetilação enzimática do biodiesel de mamona alcançou seus objetivos, reduzindo em mais de 60% a viscosidade do mesmo, além de apresentar um excelente rendimento reacional ($>99,9\%$) nas condições ótimas. Apesar do que foi exposto, a viscosidade ainda se mostrou acima do limite exigido pela legislação, de $6,0 \text{ mm}^2/\text{s}$, sendo $9,76 \text{ mm}^2/\text{s}$ à 40°C o valor obtido.

6.7.2 Massa Específica

A massa específica constitui indicativo de como a matéria está organizada num corpo, ou seja, pode ser representada pela quantidade de massa por unidade de volume do combustível injetado no motor (ZUNIGA et al., 2011).

Em seu trabalho Zuniga et al. (2011), descobriram uma massa específica para o biodiesel de mamona de $0,917 \text{ g/cm}^3$ a 20°C , semelhante ao que foi obtido no presente estudo, de biodiesel $0,9264 \text{ g/cm}^3$ à 20°C e no biodiesel acetilado foi de $0,9393 \text{ g/cm}^3$ à 20°C .

6.7.3 Índice de Acidez

De acordo com a ANP, (2014) o biodiesel não pode apresentar um índice de acidez maior que $0,50 \text{ mgKOH/g}$, o que indica que o resultado obtido foi satisfatório para o referido limite, $0,39 \text{ mgKOH/g}$, bem abaixo do limite indicado pelas normas. Já o biodiesel acetilado obteve um resultado de $1,15 \text{ mgKOH/g}$ acima das normas proposta conforme.

Valores de referência podem ser ilustrado pelo trabalho de Moura (2010), que encontraram índices de acidez para o biodiesel do pinhão manso de $0,55 \text{ mgKOH/g}$.

6.7.4 Ácidos Graxos Livres

A presença de ácidos graxos livres nos óleos e gorduras é proveniente da hidrólise de moléculas de triacilglicerol, podendo ser expressa de diversas formas. A maneira mais conveniente de expressar o teor de ácidos graxos livres é em percentual, supondo que a massa molar dos ácidos graxos livres é semelhante à massa molar do ácido ricinoléico, principal constituinte do óleo de mamona (CHRISTOFF, 2006).

De acordo com as normas da ANP o permitido é de 0,5, então o valor obtido encontra-se fora das normas o mais próximo seria o biodiesel com 2,1, seguido do biodiesel acetilado com 6,1 e o mais alto o óleo com 21%. Todos os valores obtidos encontram-se acima do permitido.

6.7.5 Índice de Saponificação

O índice de saponificação é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) ou de hidróxido de sódio (NaOH) necessários para neutralizar os ácidos graxos resultantes da hidrólise de 1,0 g de óleo (CHRISTOFF, 2006).

O óleo de pinhão manso estudado no trabalho de Moura (2010), apresentou um índice de saponificação de 192,18 mgKOH/g, já no óleo de fritura foi de 188,50 mgKOH/g. O índice encontrado neste trabalho, o óleo com 360,9 mgKOH/g, se mostrou muito superior aos citados anteriormente, indicando relevante nível de deterioração do óleo de mamona utilizado.

6.7.6 Índice de Iodo

O valor do índice de iodo encontrado para do biodiesel de mamona foi de 16,86 gI₂/100g e para biodiesel acetilado de 27,31 gI₂/100g. De acordo com Moura (2010) apud Pereira (2007), quanto maior o índice de iodo, maior será o número de insaturações e, com isso, tenderá a instabilidade à oxidação do óleo vegetal e de seu biodiesel.

Nas normas da ANP não existe um valor limite para o índice de iodo. Contudo, de acordo com a norma internacional EN 14214 não pode ultrapassar 120 gI₂/g, o que denota que ambos os biodieseis estão dentro desta especificação.

6.7.7 Teor de Umidade

A presença de água, além de causar hidrólise resultando em ácidos graxos livres, está associada à proliferação de micro-organismos e corrosão em tanques de estocagem com consequente deposição de sedimentos.

O teor de umidade encontrado para o óleo de mamona foi 0,138%, em conformidade com aquele encontrado por Fagundes et al. (2005), que foi de 0,19%. Altos teores de umidade também podem acarretar em desativação do catalisador básico, por propiciar a maior formação de ácidos graxos livres, e promover reações de saponificação. Segundo a ANP, (2015) o limite do valor do teor de umidade não pode ser excedido de 500%.

6.7.8 Teor de Cálcio, Magnésio, Sódio, Potássio, Fósforo e Enxofre

Sabendo do grande aumento na produção do biodiesel foram estabelecidos especificações a serem seguidas por todos os produtores do mundo, com a finalidade de garantir a qualidade ao mesmo. Compreendendo que alguns elementos químicos podem ser incorporados ao biodiesel por meio do processo de obtenção, faz-se necessário testes de determinação para evitar possíveis danos aos motores dos carros.

De acordo com a resolução ANP Nº 45 de 25/11/2014, a concentração máxima no biodiesel para os parâmetros Na + K e Ca + Mg é de 5 mg kg^{-1} , e o teor de enxofre e fósforo é de 10 mg kg^{-1} . Os limites estabelecidos pelos parâmetros de qualidade devem ser respeitados para que o combustível seja considerado conforme. Os parâmetros que se apresentaram fora das normas da ANP foram apenas Sódio no óleo, Sódio + Potássio (pouco acima) no biodiesel não acetilado. A determinação dos referidos elementos químicos revelou que estes se encontram nos biodieseis em níveis aceitáveis. Portanto, pode-se inferir que é possível a produção de biodiesel em larga escala através desse óleo, desse modo contribuindo para a preservação ambiental e buscando formas eficazes e eficientes para o seu uso.

7. CONCLUSÃO

O planejamento experimental foi bem sucedido, sendo os parâmetros de maior impacto a massa de enzima (10 mg) e o tipo do solvente, ambos com influência positiva. Já a temperatura apresentou impacto negativo no rendimento. O estudo cinético e otimização contribuíram de forma significativa para que o objetivo do trabalho fosse alcançado.

Uma conversão quase que total (99,90%) na acetilação enzimática do biodiesel de mamona foi verificada na otimização das condições reacionais pelo planejamento experimental, indicando que a metodologia foi eficiente em minimizar os gastos, com reagentes e tempo, e ainda resultar em um excelente rendimento reacional.

O estudo cinético permitiu, ainda, determinar que a reação de acetilação enzimática segue um modelo de pseudo-primeira ordem.

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que é possível produzir um biodiesel de melhor qualidade através do óleo de mamona sob subsequente acetilação enzimática, produzindo um produto de menor viscosidade. Contudo, mesmo sendo reduzida em 36%, a viscosidade ainda se apresentou fora dos padrões. Acidez e ácidos graxos livres dos biodieseis também se mostraram muito acima dos limites. O conjunto sódio + potássio ficou acima do limite somente no biodiesel não acetilado. Outras propriedades como teor de umidade, massa específica, iodo, acidez, teor de metais, fosforo e enxofre estão dentro das normas expostas na ANP. Contudo, pode-se inferir que é possível a produção de biodiesel em larga escala através desse óleo, desse modo contribuindo para a preservação ambiental e buscando formas eficazes e eficientes para o seu uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONAB. (Companhia Nacional de Abastecimento) **Conab estima em 135,5 milhões de toneladas safra de grãos 2007- 2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acessado em: 06/06/2016.
- ANP. **Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acessado em: 06/06/2016.
- ALBUQUERQUE, G. A. **Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (*bassica napus*)**. f. 100, 2006. Dissertação (Mestrado em Química), universidade Federal da Paraíba, 2006.
- AMAI, R. S. **Desenvolvimento de procedimentos para determinação de enxofre em diesel, biodiesel e óleo lubrificante usando ICP OES e ICP-MS**. f. 152, 2014. Dissertação (mestrado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- BARRETO, M. L. G.; SILVA, G. P. da; MORAIS, F. R.; SILVA, G. F. da. **Otimização da reação de transesterificação do óleo de mamona**. In: IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, anais 2010, 168 p João Pessoa, 2010.
- BENFATTI, F.; CARDILLO, G.; GENTILUCCI, L.; MOSCONI, E.; TOLOMELLI, A. **Enzymatic resolution of ethyl 3-hydroxy-2(1'substituted-methylidene)- butyrate by *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed acetylation**. Tetrahedron: Asymmetry, v.18, p. 2227–2232, 2007.
- BRADY, J. E. **Química Geral**. vol. I. 2 ed. São Paulo: LTC, 1998.
- BROWN, T. L. **Química: a ciência central**. 9. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 952 p. ISBN 85-87918-42-7, 2005.
- CAIXETA, G. **Estudo de cenário de produção de biodiesel**. 139 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro Química, 2009.
- CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 2010.
- CHRISTOFF, P. **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial estudo de caso: Guaratuba**. 82 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Tecnologia) Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, 2006.
- CONSTANTINO, M. G.; DA SILVA, G. V. J.; DONATE P. M. **Fundamentos de Química Experimental**, Editora USP, São Paulo, 2004.

COSTA NETO, P. R. da. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. 133 f. 2002. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, 2002.

COSTA, T.L. **Características Físicas e Físico-Químicas do óleo de duas cultivares de mamona**. 113 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande, 2006.

CONTI, R. RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: Avanços Recentes. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672- 675, 2001.

DABDOUB, M. J. BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.

DUTRA, D. M. **Desenvolvimento e Validação de Método por CLAE para Análise da Estabilidade de Soluções Extrativas e Extrato Seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae)**. Itajaí, 2013.

FAGUNDES, F. P; BEZERRA, J. P.; GARCIA, M. A.; MEDEIROS, A. C. R.; BORGES, M. R.; GARCIA, R. B; COSTA, M. **Avaliação das propriedades do óleo de mamona na produção de biocombustível**. In: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, anais, 2005, Salvador, 6 p, 2005.

FRANÇA, Bruno. B. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo biodiesel de mamona + glicerina + álcool**. 87 f, 2008, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S. e.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, p. 19-23, 2005.

GAMA, P. E. S., GIL, R. A. da S.; LACHTER, E. R. Produção de biodiesel através de transesterificação *in situ* de sementes de girassol via catálise homogênea e heterogênea. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 9, p.1859-1862, 2010.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V. de; SILVA, G. dos S.; Castro, H. F. de. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, p.710-718, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1, p.266, 1985.

JESUS, A. **Desenvolvimento do método analítico para determinação de metais em biodiesel e óleo vegetal por espectrometria de absorção atômica com chama**. 65 f, 2008. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

KNOTHE, G.; CERMAK, S. C.; EVANGELISTA, R. L. Methyl esters from vegetable oils with hydroxy fatty acids: Comparison of lesquerella and castor methyl esters. **Fuel**, v. 96, 535–540 p. 2012.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel**. Traduzido do original “The Biodiesel Handbook” por Luiz Pereira Ramos. São Paulo – SP: Editora Edgard Blücher, 2006.

KOTZ, J. C.; TREICHEL JR, P. M. **Química Geral e Reações Químicas**. v. 1. Trad. Flávio Maron Vichi. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2005.

LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil. Novos estud. - CEBRAP [online]**. n.78, p. 15-21. ISSN 0101-3300, 2007.

LIMA, A. C. **Avaliação da remoção de Cr (III) empregando o pseudocaule da bananeira (*Musa paradisiaca*) como bioissorvente**. 68 f. 2013, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L.C.; CRUZ, R. S. da. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel Production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G., MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Immobilized *Manihot esculenta* preparation as a novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 1419-1424, 2008.

MACHADO, L. L.; GONZALO, G.; LEMOS, T. L. G., MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Enantioselective acetylation of racemic alcohols by *Manihot esculenta* and *Passiflora edulis* preparations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 157-162, 2009.

MEIER, L. Desenvolvimento de uma metodologia para acetilação de nucleosídeos e α -metileno- β - hidróxi ésteres (Derivados de Morita-BaylisHillman) empregando catálise heterogênea. 119 f. 2007. Dissertação (mestrado em Química) Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

MOURA, B. dos S. **Transesterificação Alcalina de Óleos Vegetais para Produção de Biodiesel: Avaliação Técnica e Econômica**. 146 f. 2010, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

NASCIMENTO, U.M.; VASCONCELOS, A. C. S.; AZEVEDO, E. B. Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de coco babaçu com aquecimento por micro-ondas. **Ecl. Química**, v. 34, p. 37 – 48, 2009.

NETO, P. R. C.; ROSSI L. F. S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 24, p. 531-537, 1999.

NUNES, M. R. dos S.; MARTINELLI, M.; PEDROSO M. M. Epoxidação do óleo de mamona e derivados empregando o sistema catalítico VO(acac)₂/TBHP. **Química Nova**, v. 31, p. 818-821, 2008.

NÓBREGA, M. B. de M.; GERALDI, I. O; CARVALHO, A. D. F. **Melhoramento genético vegetal avaliação de Cultivadores de Mamona em Cruzamentos dialélicos parciais**. Bragantina, v. 69, n. 2, Campinas, 2010.

O'BRIEN, R. D. **Fat and oils: formulating and processing for applications**. 3rd ed. CRC Press, 2005.

OLIVEIRA, M. A. **Resolução Enzimática de Álcoois Secundários**. 127 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Paraná, 2007.

PINA, M.; SEVERINO, Liv S.; BELTRÃO, N. E. M.; VILLENEUVE, P.; LAGO, R. Novas alternativas de valorização para dinamizar a cultura da mamona no brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 22, p. 453-462, 2005.

RAITA, M., CHAMPREDA, V. e LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 829–834, 2010.

RAPOSO, J. D. A. **Determinação simultânea de sódio, potássio e cálcio em biodiesel por espectrometria de emissão atômica com chama utilizando emulsão como preparo das amostras**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1 ed. Editora Casa do Pão. 2005.

RONSEN, M, E. **EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES DE SEMENTE DE MAMONA (Ricinus communis L.)**. 32 f. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso, (Bacharelado em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. 2ed. São Paulo: Makron Books, v.1, 1994.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, D. N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by Burkholderia cepacia LTEB11. **Process Biochemistry**, V. 45, p. 1348-1354, 2010.

SILVA, F. F. M. **Processos Biocatalíticos utilizando a casca da laranja da terra (Citrus aurantium L.)**. 188 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Ceará. 2012.

SILVA, F. M.; MORAIS, F. R.; SILVA, G. F.; PAIXÃO, A. E. A. **Estudo comparativo de modelos estatísticos para redução da viscosidade em mistura de biodieseis de mamona e soja, usando uma metodologia de superfície de resposta**. IV Congresso Brasileiro de Mamona, & I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: Anais... Campina grande: Embrapa Algodão, p. 81-91, 2010.

SILVA, J. A. C. da. **Obtenção de um lubrificante biodegradável a partir de ésteres do biodiesel da mamona via catálise enzimática e estudos de estabilidades oxidativa e térmica**. 188 f, 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

SOLOMONS, T. W. G. e FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, 8ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2006.

TISSOL, P. C.; CARVALHO, A. K. F.; CASTRO, H. F. de; MORAES, F. F. de; ZANIN, G. M. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, N. 4, p. 839 - 847, 2014.

VASCONCELOS, A. F. F. **Conformidade de misturas binárias de biodieseis etílicos quanto aos parâmetros reológicos, fluidodinâmicos, oxidativos e carburantes**. 88 f. 2009. Tese de Doutorado, Curso de Pós Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

VERZIU, M.; COMAN, S. M.; RICHARDS, R.; PARVULESCU, V. I. Transesterification of vegetable oils over CaO catalysts. **Catalysis Today**, v. 167, 70 f. 2011.

ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. E. M.; COIMBRA, J. S.DOS R.; MARTINS, E. C. A. Revisão: propriedades físico-químicas do biodiesel. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, v. 21, p. 55-72, 2011.