

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

João Henrique Cabral Wancura

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO A LIPASE
Thermomyces lanuginosus COMO CATALISADOR**

**Santa Maria, RS
2017**

João Henrique Cabral Wancura

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO A LIPASE
Thermomyces lanuginosus COMO CATALISADOR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Luiz Jahn

Santa Maria, RS
2017

Wancura, João Henrique C.

PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO A LIPASE *Thermomyces lanuginosus* COMO CATALISADOR / João Henrique C. Wancura.- 2017.

87 p.; 30 cm

Orientador: Sergio Luiz Jahn

Coorientadores: Marcio Antonio Mazutti, Raquel Cristine Kuhn

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, RS, 2017

1. Biodiesel 2. *Thermomyces lanuginosus* 3. Sebo 4. Transesterificação I. Jahn, Sergio Luiz II. Mazutti, Marcio Antonio III. Kuhn, Raquel Cristine IV. Título.

João Henrique Cabral Wancura

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO A LIPASE
Thermomyces lanuginosus COMO CATALISADOR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovado em 03 de Março de 2017:

Sergio Luiz Jahn, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marcus Vinícius Tres, Dr. (UFSM)

Michele Hoeltz, Dr. (UNISC)
(Participação por vídeo-conferência)

Santa Maria, RS
2017.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de prestar minha sincera gratidão a todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho. De uma forma especial, gostaria de agradecer:

À Deus;

À minha família, em especial meus pais Sergio e Bia, pelo suporte constante em todos os momentos, principalmente em decisões pessoais e profissionais ao longo da minha vida e no incentivo a inicialização e realização deste trabalho;

À minha namorada e companheira Sara Thomas pelo apoio, carinho e compreensão ao longo destes anos e principalmente durante o período de desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Jahn pela oportunidade a mim dada de desenvolver este projeto, pelos ensinamentos e confiança depositada;

Ao Prof. Dr. Marcus Tres pelo fornecimento da enzima utilizada neste estudo. Sem sua ajuda não seria possível desenvolver este estudo;

À Prof. Dra. Raquel Kunh, à Dra. Juliana Felisberto da Silva, ao MSc. Gustavo Ugalde e à acadêmica em engenharia química Daniela Rosset pelas dúvidas esclarecidas, auxílio prestados, realização de análises e contribuições gerais que de alguma forma vieram a acrescentar positivamente a este trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, incluindo professores e funcionários, pela estrutura, ambiente e serviços prestados direta e indiretamente durante a elaboração desta pesquisa;

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pelo companheirismo, momentos de descontração e auxílios prestados ao longo destes dois anos;

À CAPES pelo suporte financeiro dado na forma de bolsa de estudos.

RESUMO

PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO A LIPASE *Thermomyces lanuginosus* COMO CATALISADOR

AUTOR: João Henrique Cabral Wancura
ORIENTADOR: Prof. Sergio Luiz Jahn

Com a inevitável diminuição das reservas de combustíveis fósseis, pesquisas recentes consolidaram o biodiesel como uma promissora fonte de energia, principalmente na substituição do diesel de petróleo. Várias tecnologias se mostraram apropriadas para produzir o biocombustível, dentre elas a rota biotecnológica, onde emprega-se enzimas como catalisador do processo. Muitos trabalhos publicados nos últimos anos utilizaram-se da rota enzimática para produção de biodiesel empregando suportes poliméricos para imobilização da lipase e conseqüentemente tentar o seu reuso. Entretanto, este método encarece o processo, comprometendo sua viabilidade. Neste sentido, a formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus* surge como uma alternativa a técnica visto que permite o seu uso de forma pura na reação. Este trabalho se propõe a investigar a utilização da formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus* (nome comercial Callera™ Trans L), como catalisador de uma reação de transesterificação para produzir biodiesel. Para isso, através do uso de um planejamento de experimentos, foi avaliada a influência no rendimento de biodiesel produzido no processo das principais variáveis envolvidas na reação: temperatura reacional (variando de 25°C a 45°C), relação molar de metanol em relação a matéria-prima usada (variando de 3:1 a 6:1), carga de enzima na reação (variando 0,4% a 1,8%) e, posteriormente com os dados otimizados, a influência da adição de água no meio reacional (variando de 0% a 12%). Nestes procedimentos, utilizou-se óleo de soja degomado como matéria-prima da reação. Em um segundo momento, com a obtenção da melhor condição reacional a partir do planejamento experimental, avaliou-se a substituição gradativa do óleo de soja por uma matéria-prima de menor valor agregado – sebo de carne desacidificado – com o intuito de minimizar custos de produção. Os resultados obtidos mostraram que a rota enzimática é capaz de alcançar elevados rendimentos de biodiesel. A variável excesso molar de metanol no meio reacional foi a que apresentou maior influência nos rendimentos de biodiesel obtidos no processo visto que o metanol é o principal responsável pela desnaturação e perda da capacidade catalítica da lipase. Já a substituição do óleo de soja por sebo proporcionou um aumento na conversão dos ácidos graxos, uma vez que os maiores rendimentos de biodiesel foram alcançados quando se utilizou sebo de carne puro como substrato da reação enzimática (84,6% contra 73,1% de rendimento quando se utilizou apenas óleo de soja degomado como matéria-prima). Sendo assim, a utilização de lipases em sua forma solúvel como catalisador de uma reação de transesterificação para produção de biodiesel mostrou ser uma alternativa satisfatória às rotas mais difundidas de produção do biocombustível em questão.

Palavras-chave: Biodiesel, *Thermomyces lanuginosus*, sebo, transesterificação.

ABSTRACT

BIODIESEL PRODUCTION USING THE LIPASE OF LIQUID FORMULATION *Thermomyces lanuginosus* AS CATALYST

AUTHOR: João Henrique Cabral Wancura

ADVISOR: Sergio Luiz Jahn

With the inevitable decline in fossil fuel reserves, recent research has consolidated biodiesel as a promising source of energy, especially in the replacement of petroleum diesel. Several technologies have proven appropriate to produce the biofuel, among them the biotechnological route, where enzymes are employed as catalysts of the process. Many researches published in recent years have utilized the enzymatic route for biodiesel production employing polymeric supports for lipase immobilization and consequently to try to reuse it. However, this method makes the process more expensive, compromising its viability. In this sense, the liquid formulation of *Thermomyces lanuginosus* lipase arises as an alternative to the technique since it allows its use in a pure way in the reaction. This work proposes to investigate the utilization of the liquid formulation of the *Thermomyces lanuginosus* lipase (tradename Callera™ Trans L), as a catalyst of a transesterification reaction to produce biodiesel. For this, through the use of experimental design, the influence in the biodiesel yield produced in the process of the main variables involved in the reaction was evaluated: reaction temperature (ranging from 25°C to 45°C), methanol to feedstock molar ratio (ranging from 3:1 to 6:1), enzyme load (ranging from 0,4% to 1,8%) and, subsequently with the optimized data, the influence of water addition in the reaction medium (ranging from 0% to 12%). In these procedures, degummed soybean oil was utilized as raw material of the reaction. Posteriorly, with the obtaining of the best reactional condition from the experimental design, it was evaluated the gradual replacement of soybean oil a feedstock of lower aggregate value – deacidified beef tallow - was evaluated in order to minimize production costs. The results obtained showed that the enzymatic route is able to reach high biodiesel yields. The variable “methanol excess” in the reaction medium was the one that had the greatest influence on the FAME yields obtained in the process since methanol is the main responsible for the denaturation and loss of the catalytic capacity of the lipase. On the other hand, the substitution of soybean oil for beef tallow resulted in an increase in the conversion of fatty acids, since the highest biodiesel yields were achieved when pure beef tallow was used as substrate of the enzymatic reaction (84,6% versus 73,1% of yield when only degummed soybean oil was used as feedstock). Therefore, the use of lipases in its soluble form as a catalyst for a transesterification reaction to produce biodiesel showed to be a satisfactory alternative to the more widespread production routes of the biofuel in question.

Keywords: Biodiesel, *Thermomyces lanuginosus*, tallow, transesterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP.....	18
Figura 2. Passo-a-passo da reação de transesterificação para produção de biodiesel.....	20
Figura 3. Principais matérias-primas utilizadas para produzir biodiesel no Brasil. ...	21
Figura 4. Reação de Esterificação.....	27
Figura 5. Sistema chave-fechadura de uma catálise enzimática.....	30
Figure 6. Typical chromatogram of the biodiesel samples obtained.....	43
Figure 7. Predicted and observed values for response variable on situations “A” e “B”.	47
Figure 8. Contour surface plot for biodiesel yield after 45 minutes of reaction varying (A) temperature and MeOH to oil molar ratio, (B) temperature and catalyst amount and (C) MeOH to oil molar ratio and catalyst amount.....	48
Figure 9. Contour surface plot for biodiesel yield after 8 hours of reaction varying (A) temperature and MeOH to oil molar ratio, (B) temperature and catalyst amount and (C) MeOH to oil molar ratio and catalyst amount.....	49
Figure 10. Reaction kinetics comparing the total and gradual addition of methanol during the process.....	51
Figure 11. Reaction system utilized to perform the assays (1. thermocouple, 2. opening for sample collection, 3. thermal bath container, 4. magnetic stirrer, 5. water bath, 6. temperature controller, 7. reflux condenser and 8. ultrathermostatic bath)...	59
Figure 12. Typical chromatogram of the biodiesel samples obtained from (A) degummed oil and (B) beef tallow.....	61
Figure 13. Influence of water content in the biodiesel yield.....	63
Figure 14. FAME yield produced from blend of degummed soybean oil and treated beef tallow considering the amount of tallow in the raw material (triangles) and insaturation index (circles).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de emissões médias do biodiesel em comparação ao diesel de petróleo.....	18
Tabela 2. Condições reacionais típicas de um processo de esterificação para produção de biodiesel	27
Tabela 3. Comparação entre a transesterificação via catálise química e enzimática.	31
Tabela 4. Diferentes lipases utilizadas na síntese de biodiesel.	33
Table 5. Process parameters variation and levels of biodiesel production by enzymatic catalysis.....	41
Table 6. Statistical design for a five-level-three-factor centre composite rotatable design.....	42
Table 7. Identification of the components present in the FAME samples.....	44
Table 8. Results obtained by ANOVA for samples collected with 45 minutes (A) and 8h (B) of reaction.....	45
Table 9. Composition of the raw material used in the transesterification assays.	60
Table 10. Identification of the components present in the FAME samples.....	62
Table 11. Biodiesel production using waste tallow and blend with edible and nonedible as feedstock.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância, técnica estatística para avaliar diferenças entre médias e influência entre variáveis independentes e dependentes;
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis;
B15	Sigla para o combustível contendo 15% (v/v %) de biodiesel misturado ao diesel de petróleo;
B20	Sigla para o combustível contendo 20% (v/v %) de biodiesel misturado ao diesel de petróleo;
B100	Sigla para o combustível contendo biodiesel puro
CaIT	<i>CalleraTM Tran L</i> , nome comercial da formulação líquida da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> ;
CCD	<i>Central Composite Design</i> , termo em inglês para um tipo planejamento experimental estatístico;
CCRD	<i>Central Composite Rotable Design</i> , termo em inglês para o tipo de planejamento experimental utilizado neste trabalho;
CV	Coeficiente de Variação;
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional, tipo de planejamento experimental utilizado neste estudo;
E85	Sigla para o combustível contendo 85% de etanol anidro e 15% de água;
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> , sigla em inglês para Metil Ésteres de Ácidos Graxos (biodiesel);
GC	<i>Gas Chromatography</i> , sigla em inglês para cromatografia gasosa;
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
MeOH	Abreviatura para metanol;
MP	Matéria particulada;
NHPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrados
NO _x	Representação da fórmula química para óxidos de nitrogênio
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> , sigla em inglês para Metodologia de Superfície de Resposta, resultado estatístico para investigação de variáveis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Motivação para Realizar este Trabalho	12
1.2 Estrutura da Dissertação	14
1.3 Objetivos	15
1.3.1 Objetivo geral	15
1.3.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Biodiesel	16
2.2 Métodos de Produção de Biodiesel	19
2.2.1 Transesterificação	19
2.2.2 Esterificação	26
2.2.3 Outras Técnicas de Produção de Biodiesel.....	28
2.3 Utilização da Catálise Enzimática na Produção de Biodiesel	29
3 PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO PELA LIPASE <i>THERMOMYCES LANUGINOSUS</i> NA SUA FORMA SOLÚVEL: UMA ABORDAGEM ESTATÍSTICA	36
Abstract.....	36
3.1 Introduction	37
3.2 Materials and Methods.....	39
3.2.1 Materials.....	39
3.2.2 Transesterification Reaction	39
3.2.3 Experimental Design and Statistical Analysis	40
3.2.4 Analysis by Gas Chromatography	41
3.3 Results and Discussion.....	43
3.3.1 Quantitative Analysis of Biodiesel.....	43
3.3.2 Reaction Parameters Optimization by RSM	44
3.3.3 Influence of Independent Variables on Biodiesel Yield.....	47
3.4 Conclusion	52
Acknowledgment.....	52
References	53
4 PRODUÇÃO DE BIODIESEL ENZIMÁTICO USANDO UM <i>BLEND</i> DE MATÉRIAS-PRIMAS COMESTÍVEIS E NÃO-COMESTÍVEIS E INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA NA REAÇÃO	55
Abstract.....	55
4.1 Introduction	56
4.2 Materials and Methods.....	58
4.2.1 Materials.....	58
4.2.2 Transesterification Reaction Assays.....	58
4.2.3 Gas Chromatography	59
4.3 Results and Discussion.....	60
4.3.1 Raw Material Composition.....	60
4.3.2 GC Analysis.....	61
4.3.3 Influence of Water Content in the Reaction	62
4.3.4 Beef Tallow as Feedstock for the Reaction	64
4.4 Conclusion	68
Acknowledgment.....	68
References	68
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	70

6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO PARA REALIZAR ESTE TRABALHO

Com a iminente diminuição das reservas de petróleo, a busca por combustíveis alternativos que possuam a habilidade de substituir os convencionais combustíveis de origem fóssil e que ao mesmo tempo reduzam as emissões de poluentes que afetam o meio ambiente tornou-se um desafio. Somado a isso, temos a crescente demanda por energia em um nível mundial, o qual intensifica a necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de produção de combustíveis alternativos renováveis.

Dentre esses combustíveis alternativos, destacam-se nas matrizes energéticas de diversos países o etanol e o biodiesel. O etanol já possui uma considerável aceitação como combustível automotivo, sendo a sua eficiência em motores aprimorada constantemente. Já o biodiesel se consolidou como um eficaz substituto ao óleo diesel de petróleo devido a suas propriedades ambientalmente favoráveis, capacidade de uso em motores à diesel com poucas ou até mesmo sem modificações mecânicas, compatibilidade com a infraestrutura de distribuição de combustíveis existente e pelo fato de ser derivado de fontes renováveis (OGNJANOVIC et al., 2009, p. 5.146; DU et al., 2008, p. 331; BHARATHIRAJA et al., 2014, p. 368; FIRDAUS et al., 2016, p. 52).

Em termos de Brasil, a introdução do biodiesel em sua matriz energética se deu através de medidas socioeconômicas e ambientais através da implantação do Programa Nacional de Produção de Biodiesel no ano de 2004. Este programa, dentre outros objetivos, visou melhorar a balança comercial do país (uma vez que o país é um importador de diesel) e atenuar as emissões de gases que causam o efeito estufa, um engajamento a nível mundial deste o lançamento do Protocolo de Kyoto (RATHMANN et al., 2012, p. 91; SALIS et al., 2008, p. 19). Segundo o Ministério de Minas e Energia (BRASIL, 2015), entre os anos de 2007 e 2014, por exemplo, foram economizados U\$5,3 bilhões com importações de óleo diesel.

O processo de produção de biodiesel através da reação de transesterificação de óleos e gorduras animais é uma tecnologia bem definida e estruturada, tanto em escala laboratorial quanto industrial, devido a sua alta conversão em curtos tempos reacionais. Em termos industriais, utiliza-se o processo de transesterificação do óleo vegetal (ou gordura animal) com um álcool de cadeia curta (metanol, por exemplo) na

presença de um catalisador básico, onde promove-se a clivagem das moléculas de triglicerídeos, gerando uma mistura de ésteres de ácidos graxos – *Fatty Acid Methyl Esters*, ou FAME (KNOTHE et al., 2006, p. 35; OGNJANOVIC et al., 2009, p. 5.146). No entanto, esta tecnologia apresenta diversos contratempos tais como a necessidade de remoção do catalisador, difícil recuperação do glicerol (subproduto da reação), reações secundárias indesejáveis como a produção de sabões, uma grande demanda energética naturalmente exigida pelo processo e a necessidade de um tratamento prévio da matéria-prima para remoção de impurezas (HAMA e KONDO, 2013, p. 386; CHEN e WU, 2003, p. 466).

Levando em consideração estes fatores, um processo que tem a capacidade de suprir todas as desvantagens do processo via catálise básica, citadas anteriormente, além de produzir um biodiesel com maior grau de pureza (ANTCZAK et al., 2009, p. 1.186; PRICE et al., 2014, p. 6.204; MARCHETTI et al., 2007, p. 1.306), o que é de grande importância para a utilização deste biocombustível em motores a diesel, é a transesterificação via catálise enzimática, utilizando-se lipases como catalisador. Uma das principais vantagens da produção de biodiesel utilizando-se lipases como catalisador, dentre outras vantagens que serão discutidas posteriormente, é a necessidade de uma temperatura reacional mais branda, diminuindo consideravelmente o gasto energético do processo (TAMALAMPUDI et al., 2008, p.185; NELSON et al., 1996, p. 1.191).

Porém, apesar de ser uma rota promissora, a produção de biodiesel via catálise enzimática ainda não é viável economicamente, principalmente pelo custo das enzimas (SALIS et al., 2008, p. 20; ORÇAIRE et al., 2006, p. 107; WANG et al., 2006, p. 29). Assim, com o intuito de minimizar esta situação, a empresa Novozymes desenvolveu uma variedade de lipases solúveis em água e com menor custo para sua produção, o qual tem um grande potencial para reverter esta circunstância. No entanto, faz-se necessário estudos que otimizem as variáveis da reação. A literatura tem poucos trabalhos que empregam enzimas solúveis como catalisador para produção de biodiesel, abrindo-se uma oportunidade de estudo nesta área. Além disso, há poucos trabalhos publicados que focam na utilização de enzimas solúveis na produção de biodiesel empregando gorduras animais puras ou blendadas com óleos vegetais como matéria-prima. Sendo assim, o foco deste trabalho está relacionado com a investigação das principais variáveis da reação de transesterificação empregando lipases solúveis como catalisador utilizando como matéria-prima óleo de

soja degomado puro e misturado proporcionalmente a sebo de carne pré-tratado.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho está dividido em sete capítulos, onde os resultados obtidos foram dispostos na forma de artigos, submetidos a revistas científicas de áreas de interesse.

O Capítulo Um apresenta uma introdução sobre o tema do trabalho, onde é descrita a motivação para a realização do mesmo, a estrutura textual da dissertação e os objetivos deste estudo.

No Capítulo Dois é descrita uma breve revisão bibliográfica do tema, o qual se faz indispensável para dar embasamento científico ao trabalho realizado, mostrando considerações importantes e necessárias à compreensão dos resultados obtidos.

O Capítulo Três apresenta o primeiro artigo escrito com os resultados obtidos com este trabalho, intitulado *“Produção de Biodiesel Catalisado pela Lipase Thermomyces lanuginosus na sua Forma Solúvel: Uma Abordagem Estatística”*, o qual foi submetido à revista *Energy & Fuels*. Este artigo mostra a influência das variáveis principais da reação no rendimento de biodiesel, utilizando para isto um planejamento de experimentos previamente elaborado.

No Capítulo Quatro encontra-se o segundo artigo elaborado com resultados deste assunto. O artigo intitulado *“Produção de Biodiesel Enzimático Usando um Blend de Matérias-Primas Comestíveis e Não-Comestíveis e Influência da Concentração de Água na Reação”*, o qual será submetido a um periódico na área de Engenharias II, avalia inicialmente a influência da concentração de água presente no sistema reacional, parâmetro o qual se mostrou fundamental através dos resultados obtidos com o primeiro artigo e em um segundo momento utilizou-se de uma matéria-prima residual (sebo de carne) para investigar a eficiência da lipase utilizada nos experimentos em catalisar a conversão desse material em biodiesel.

O Capítulo Cinco traz uma discussão dos resultados alcançados e apresentados nos dois capítulos anteriores e a correlação destes entre si.

No Capítulo Seis é apresentada a conclusão do trabalho, onde salienta-se algumas sugestões para trabalhos futuros sobre o tema abordado nessa dissertação.

E por fim, no Capítulo Sete, à título de informação e consulta para demais pesquisadores, está apresentada as referências que foram consultadas para a realização deste estudo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o processo de produção de biodiesel através de reação de transestificação de óleo de soja degomado puro e blendado em diferentes proporções com sebo de carne pré-tratado, utilizando-se como catalisador a enzima em formulação líquida Callera™ Trans L (CalT), produzida pela Novozymes a partir da lipase *Thermomyces lanuginosus* e metanol como reagente.

1.3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar as variáveis de processo temperatura de reação, concentração de catalisador e razão molar metanol/óleo no grau de transesterificação da fonte oleaginosa, através de um planejamento de experimentos do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional);
- Investigar a influência da concentração de água no meio reacional no grau de transesterificação da fonte oleaginosa utilizada;
- Avaliar o efeito da composição do ácido graxo, através da mistura de óleo de soja degomado e sebo de carne em diferentes proporções, no grau de transesterificação da matéria-prima em questão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

De acordo com a Resolução nº 45 de 2014 da ANP, biodiesel é definido como (BRASIL, 2014b): “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2004”. Tal biocombustível se firmou como um interessante substituto ao diesel de petróleo devido a suas propriedades físicas e químicas semelhantes ao do combustível fóssil (VERMA e SHARMA, 2016, p. 1.064). Mais precisamente, a escala de cetano, um indicativo adimensional da qualidade de

ignição de um combustível diesel, dita a razão do biodiesel ser uma boa alternativa ao petrodiesel. Geralmente, um combustível formado por compostos que apresentam ramificações em sua estrutura química tende a apresentar um baixo número de cetano e vice-versa. Os ácidos graxos possuem uma cadeia longa, linear e não-ramificada, quimicamente semelhante às existentes em *n*-alcanos do diesel e por consequência disso, apresentam uma escala de cetano similares entre si (KNOTHE, 2006, pg. 85).

O biodiesel possui vantagens e desvantagens em sua utilização como combustível. Como vantagens destaca-se a sua transportabilidade (devido ao maior ponto de fulgor em comparação com o diesel), a alta eficiência de combustão, o alto número de cetano, o baixo conteúdo de enxofre e aromáticos, biodegradabilidade, além de não contribuir para o efeito estufa (DATTA e MANDAL, 2016, p. 802; CHRISTOPHER et al., 2014, p. 498). Mas há desvantagens a serem consideradas como alta viscosidade, baixo conteúdo energético, alto ponto de entupimento a frio, alta emissão de óxidos de nitrogênio e alto preço de mercado (FANG, 2012, p. 209). Para amenizar estas desvantagens e introduzir gradativamente o biodiesel na frota em geral, são realizados *blends* com o diesel derivado de petróleo, designados por acrônimos como B20.

Em termos de balanço energético, o biodiesel tem a seu favor um número bastante favorável: segundo Ma e Hanna (1999, p. 2) o biodiesel contém 3,2 vezes a quantidade de energia necessária para produzi-lo quando comparado aos combustíveis fósseis. Entretanto, os custos de produção do biodiesel é aproximadamente 30% superior ao custo para produzir a mesma quantidade de petrodiesel.

O grande diferencial entre o diesel e o biodiesel está nas taxas de emissões de exaustão. Wan Ghazali (2015, p. 586) destaca que os motores a diesel contribuem significativamente com o inventário de poluentes gasosos através da geração de NO_x e MP e que com a utilização de misturas de biodiesel ao diesel, a emissão de hidrocarbonetos e monóxidos de carbono, por exemplo, pode apresentar consideráveis reduções de até 45 e 40% respectivamente. Christopher e colaboradores (2014, p. 498) mencionam a respeito das emissões de gases do efeito estufa pelo biodiesel (B100) que são 4,5 vezes menores que a gasolina, 3 vezes menores que o diesel de petróleo e 85% do etanol (E85). Avaliando a Tabela 1, pode-se notar que das principais emissões de motores abastecidos com biodiesel, apenas há acréscimo nas emissões de NO_x. Este aumento está relacionado a uma variação

no intervalo de injeção do combustível, causado por diferenças nas propriedades mecânicas do biodiesel em relação ao diesel. Entretanto, vários trabalhos investigam sugestões para reduzir valores deste parâmetro. Datta e Mandal (2016, p. 813) citam como alternativas um aumento no número de cetano ou na diminuição no teor de aromáticos do biocombustível, um ajuste adequado no tempo de injeção do combustível ou até mesmo a introdução de um reciclo dos gases de exaustão no motor.

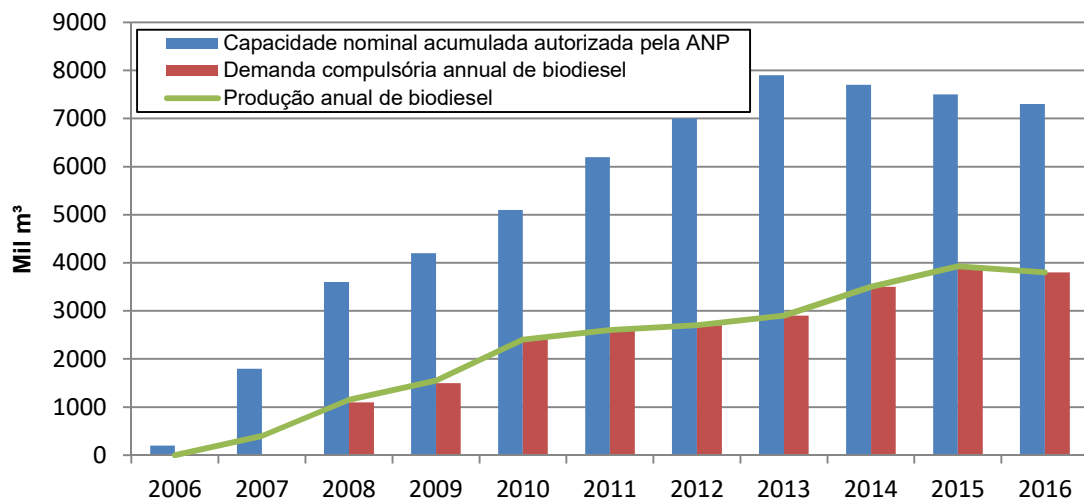
Tabela 1. Dados de emissões médias do biodiesel em comparação ao diesel de petróleo.

Emissões regulamentadas	B100	B20
Material particulado	-45%	-12%
Monóxido de carbono	-40%	-12%
Hidrocarbonetos totais não queimados	-67%	-20%
Óxidos de nitrogênio	10%	+2%
Emissões não regulamentadas		
Sulfatos	-100%	-20%
HPAs ^a	-80%	-13%
NHPAs ^a	-90%	-50%
Hidrocarbonetos com potencial de formação de ozônio	-50%	-10%

^a Média de todos os componentes medidos (Fonte: National Biodiesel Board, 2010).

Em termos de Brasil, passou a vigorar em território nacional, desde novembro de 2014, a mistura de 7% (sete por cento) de biodiesel ao óleo diesel comercializado – B7 - medido em volume, disposto pela Lei nº 13.033/2014 (BRASIL, 2014a). Esta lei foi alterada pela Lei nº 13.263/2016, o qual foram estabelecidos novos percentuais de adição de biodiesel ao diesel: de 7% para 8% até 2017, 9% até 2018 e 10% até 2019. A mistura pode chegar até 15% - B15 – nos anos seguintes desde que sejam realizados testes e haja aprovação do Conselho Nacional de Política Energética (BRASIL, 2016b). Isso acarreta um natural aumento na produção brasileira, apesar da queda verificada no último ano devido a crise econômica verificada no país, conforme mostra os dados retirados do Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis mostrado na Figura 1.

Figura 1. Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP.



Fonte: BRASIL, 2016a.

2.2 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Para ser usado em motores à diesel sem a necessidade de modificações mecânicas, os óleos vegetais devem passar por processos químicos para serem convertidos em biodiesel. Tal transformação visa não somente reduzir a viscosidade do óleo vegetal – uma das principais características que o difere do petrodiesel – mas também modificar características químicas importantes para usos em motores automobilísticos.

A seguir é discutido alguns métodos de produção de biodiesel contidos na literatura.

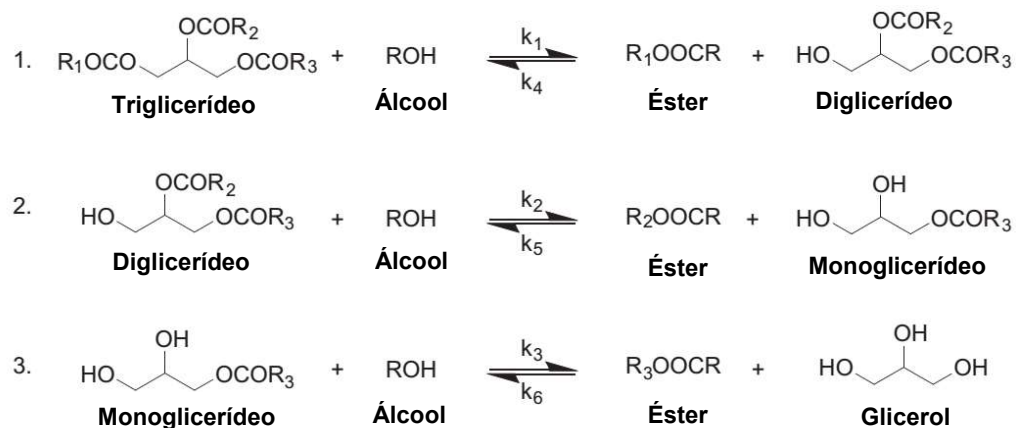
2.2.1 Transesterificação

O biodiesel pode ser obtido através de uma reação de transesterificação onde o óleo vegetal ou gordura animal reage com um álcool de cadeia curta (geralmente metanol ou etanol) na presença de um catalisador (básico, ácido, biocatalisador, heterogêneos ou usando álcoois nos seus estados supercríticos) para produzir ésteres alquílicos e glicerol, processo também denominado de alcoólise (LUQUE e MELERO, 2012, p. 133).

Estequiometricamente, uma alcoólise requer três mols de álcool para cada mol

de triglicerídeo, conforme mostra a Figura 2. Demirbas (2008, p. 121) destaca o caráter reversível da reação de transesterificação, onde é necessário um excesso de álcool na reação para aumentar o rendimento do processo e permitir a formação de uma fase separada de glicerina. A transesterificação é o método mais utilizado hoje industrialmente para produzir biodiesel (VERMA e SHARMA, 2016, p. 1.064).

Figura 2. Passo-a-passo da reação de transesterificação para produção de biodiesel.



Fonte: Adaptado de CHRISTOPHER et al, 2014.

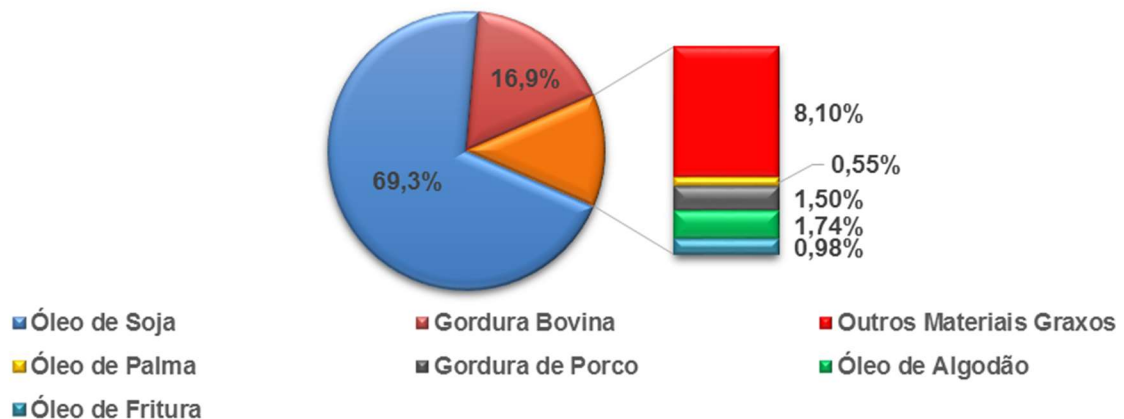
2.2.1.1 Matérias-primas Empregadas para Produção de Biodiesel

O custo das matérias-primas constitui atualmente um grande percentual do passivo total da produção de biodiesel. Tal custo pode variar entre 70 a 85% do custo total de produção, indicando que a seleção apropriada da matéria-prima é importante para garantir a viabilidade econômica do processo (HAMA e KONDO, 2013, p. 387).

Atualmente, óleos comestíveis derivados de sementes de colza, palma, girassol e, em termos de Brasil, o óleo de soja são as matérias-primas mais difundidas para produção comercial de biodiesel (LUQUE e MELERO, 2012, p. 69; BRASIL, 2016a). Entretanto, a utilização de óleos comestíveis para fins energéticos é bastante controversa, uma vez que organizações sociais e não-governamentais associam a alta dos preços de produtos originários destes óleos à utilização dos mesmos para produção de biocombustíveis (BASKAR e AISWARYA, 2015, p. 497). No Brasil, a soja, contendo um teor de óleo na semente entre 17 a 20%, lidera por vários anos como a fonte oleaginosa mais utilizada para produção de biodiesel, uma vez que encontra

aqui condições favoráveis para seu desenvolvimento (RATHMANN et al, 2012, p. 93). A Figura 3 apresenta as principais matérias-primas para produção de biodiesel utilizadas no Brasil.

Figura 3. Principais matérias-primas utilizadas para produzir biodiesel no Brasil.



Fonte: Adaptado de Relatório Mensal de Energia, BRASIL, 2016a.

Tendo em vista a questão da disputa com o setor alimentício e também como opção para reduzir custos de produção, o uso de fontes alternativas e de baixo valor agregado como óleos não comestíveis, óleos residuais de cozinha ou sebo animal é sugerido por Christopher e colaboradores (2014, p. 498) como uma forma de aumentar a competitividade do biodiesel frente ao diesel de petróleo.

A seleção de matérias-primas não-comestíveis para produzir biodiesel depende da disponibilidade do cultivo da semente desses óleos em cada país. A árvore de pinhão manso (*jatropha curcas*), por exemplo, vem sendo bastante pesquisada como fonte oleaginosa para produzir biodiesel (CALGAROTO et al., 2013; DEMIRBAS, 2008, p. 166). Esta árvore pode crescer em desertos com o mínimo de água e fertilizantes. Além disso, a presença de componentes tóxicos limita sua aplicação como óleo destinado a alimentação. Entretanto, o alto teor de água e ácidos graxos do óleo de *jatropha* dificulta sua aplicação numa catálise alcalina convencional (HAMA e KONDO, 2013, p. 387).

Outra fonte alternativa para produção de biodiesel, o óleo residual de cozinha alcança em torno de 16,6 milhões de toneladas geradas por ano somente na Europa, América do Norte e Ásia (VERMA e SHARMA, 2016, p. 1.064). Apesar dessa quantidade não ser suficientemente grande para solucionar a questão de substituição

do petrodiesel, tendo em vista a atual demanda mundial deste combustível, a utilização dessa matéria-prima para produzir biocombustíveis pode ajudar a minimizar a dependência pelo óleo fóssil, além de reduzir problemas ambientais gerados pela má gestão desse resíduo (BART et al., 2010, p. 143).

Para reduzir custos envolvidos com matérias-primas, uma ferramenta muito utilizada hoje pelas indústrias brasileiras de biodiesel de grande escala é realizar um *blend* entre óleo e sebo bovino (BRASIL, 2016a). A quantidade máxima a ser misturada no processo é guiada pela análise do ponto de entupimento à frio do biocombustível, que aumenta com o acréscimo da gordura animal ao meio reacional, tendo em vista a quantidade significativa de ácidos graxos saturados presentes neste material (AVHAD e MARCHETTI, 2015, p. 698). Baskar e Aiswarya (2015, p. 498) relatam que em termos econômicos, o sebo chega a custar três vezes menos que óleos tradicionalmente utilizados para produzir biodiesel, o que o torna uma matéria-prima interessante para utilização no processo.

Entretanto, todas as fontes alternativas aos óleos comestíveis citadas anteriormente apresentam um grande inconveniente para utilização na produção de biodiesel. A catálise homogênea química, método utilizado para produzir biodiesel em grande escala, é sensível a presença de umidade e ácidos graxos livres em excesso na reação, materiais naturalmente presentes nesses tipos de matérias-primas (KNOTHE et al., 2006, p. 195). Assim, um pré-tratamento desses materiais é indispensável, agregando custos ao processo que, até então, tinham sido evitados ao se utilizar essas fontes alternativas (DEMIRBAS, 2008, p. 66). Tendo em vista esses fatores e considerando a habilidade que as lipases tem de catalisar alquil-ésteres de matérias-primas de baixo custo com alto teor de ácidos graxos livres como óleo residual de cozinha e sebo animal, a catálise enzimática pode atuar nesse ponto onde a catálise química homogênea falha (FJERBAEK et al., 2008, p. 1.301).

2.2.1.2 Reagentes e Catalisadores Empregados na Reação de Transesterificação

Os álcoois usados para a produção de biodiesel incluem o metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, *n*-butanol e isobutanol, conduzidos através do uso de catalisadores ácidos, básicos, enzimáticos ou fluidos supercríticos (FUKUDA et al., 2001, p. 406). Dentre estes álcoois, o metanol e o etanol são os mais baratos e produzidos em maior escala e, portanto, são usados principalmente em escala

industrial de produção de biodiesel (ANTCZAK et al, 2009, p. 1.188). No Brasil, o metanol é o álcool mais utilizado para produção de biodiesel em grande escala, devido principalmente a sua reatividade, natureza volátil e, conforme citado anteriormente, ao baixo custo de produção se comparado a outros álcoois (RATHMANN, 2012, p. 93). Devido a estes fatores, optou-se pelo metanol como reagente para a realização dos experimentos deste trabalho.

Apesar dos seus preços elevados, reagentes como o acetato metílico e etílico são atualmente vistos como promissores substitutos para os álcoois na produção de biodiesel (BHARATHIRAJA, 2014, p. 374). A principal vantagem da interesterificação de triglicerídeos com metil ou etil ésteres em comparação com os álcoois é que não há formação de glicerol, o qual elimina a necessidade de recuperação e separação do coproduto, onde ao invés disso, um novo coproduto com maior valor agregado é obtido: o triacetilglicerol ou triacetina (LUKOVIC, 2011, p. 60). A triacetina é miscível com biodiesel em todas as proporções e pode ser incluída na formulação do biodiesel, uma vez que aumenta o número de cetano do biocombustível (NIELSEN, 2008, p. 694). Por outro lado, normas europeias limitam o conteúdo de triacetina nas misturas de biodiesel de 3,5 a 10% devido ao seu efeito de aumentar a densidade e viscosidade do combustível (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014, p. 453).

Em termos de catalisadores, a catálise básica homogênea é a mais comumente utilizada para produção de biodiesel em escala industrial (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014, p. 454). Isto devido as altas taxas de conversão do processo em curtos intervalos de tempo, temperaturas não tão elevadas e com a utilização de matérias-primas com baixo teor de umidade e ácidos graxos livres, além de um excesso de reagente relativamente baixo em comparação a outras técnicas. Aransiola e colaboradores (2014, p. 281) trazem resultados de 97% de conversão de triglicerídeos em biodiesel em 45 minutos de reação à 65°C. Apesar dessa grande vantagem frente as demais tecnologias, a catálise básica homogênea necessita de uma matéria-prima com elevado grau de pureza para processamento (devido ao risco de ocorrer reações de saponificação no processo, onde o catalisador reage com os ácidos graxos livres do óleo, formando sabão) e o produto final deve ser conduzido a etapas de purificação e remoção de catalisador, gerando resíduos no processo (ABBASZADEH et al, 2012, p. 141). Os principais compostos químicos utilizados nessa técnica são o metóxido e etóxido de sódio e potássio.

Tendo em vista a quantidade de água residual gerada na catálise básica

homogênea para purificação do biodiesel, buscando simplificar a separação do catalisador do biocombustível, a catálise básica heterogênea é sugerida como rota alternativa para produzir biodiesel (DEMIRBAS, 2009, p. 21). Apesar da simplificação no processo devido a esta facilidade em separar o catalisador do produto, reduzindo custos com equipamentos, além de minimizar impactos ambientais do processo, Aransiola e colaboradores (2014, p. 284) relatam os mesmos inconvenientes do processo homogêneo citado anteriormente, como baixa tolerância a umidade e ácidos graxos livres presentes na matéria-prima, impedindo a sua utilização como fontes de triglicerídeos com alta acidez. Além disso, há inevitáveis problemas de lixiviação dos componentes do catalisador básico, o que podem ser minimizados com o uso de um catalisador de óxido de metal alcalino-terroso (VERMA e SHARMA, 2016, p. 1.066). Apesar desses contratempos, Verma e Sharma trazem rendimentos interessantes desse processo, onde relatam conversões de 98% de óleo residual de cozinha em biodiesel, sob condições de temperatura e excesso de álcool semelhantes ao utilizado no processo homogêneo.

Em situações onde a catálise básica não apresenta desempenho satisfatório – quando se utiliza matérias-primas sem um pré-tratamento adequado, e conseqüentemente uma alta acidez – a catálise ácida homogênea se mostra como uma interessante alternativa para produção de biodiesel (MA e HANNA, 1999, p. 10). Esta técnica denominada esterificação pode ser uma alternativa a catálise básica uma vez que possui a capacidade de processar matérias-primas residuais de baixo custo, apesar da reação ser bastante sensível a presença de umidade na reação (ABBASZAADEH et al, 2012, p. 142), conforme descrito anteriormente no item 2.2.2 desse trabalho.

Com a mesma habilidade de catalisar tanto a transesterificação de triglicerídeos e a esterificação de ácidos graxos livres, a catálise heterogênea ácida surge como alternativa ao processo homogêneo ácido, uma vez que facilita a purificação do biodiesel e é menos corrosivo e tóxico em comparação ao catalisador líquido (ARANSIOLA et al., 2014, p. 282). Mesmo assim, Bart e colaboradores (2010, p. 364) destacam o pouco interesse científico de pesquisadores por essa técnica devido a expectativas pessimistas das taxas reacionais destes catalisadores e eventuais reações paralelas indesejáveis que possam ocorrer. Acima de determinadas temperaturas, pode ocorrer uma dupla desidratação do glicerol, formando acroleína e água, acarretando perda do rendimento reacional (DEMIRBAS, 2009, p. 21).

Analisando as variações no processo de produção de biodiesel, uma alternativa de processo que vem sendo profundamente estudada é a utilização de um catalisador enzimático (lipase) na reação de transesterificação do óleo (NELSON et al., 1996, p. 1.191). Apesar de ainda não ser viável industrialmente, pesquisas voltadas a otimização das condições do processo vêm sendo desenvolvidas para tentar viabilizar a utilização desta técnica em grande escala (RAVINDRA e JEGANNATHAN, 2015, p. 11). Esta técnica de produção de biodiesel, que é o foco deste trabalho, será discutida e detalhada posteriormente, na seção 2.3 dessa dissertação.

2.2.1.3 Fatores que Afetam a Reação de Transesterificação

Segundo Fang (2012, p. 210), a reação de transesterificação pode ser afetada por diversos fatores tais como o excesso de álcool no processo, o catalisador utilizado, a presença de água e ácidos graxos livre no processo e temperatura da reação.

Estequiometricamente, a reação de transesterificação requer três mols de álcool para cada mol de triglicerídeo envolvido na reação. Porém, como a reação é de caráter reversível, um excesso de álcool é necessário para deslocar a reação em direção a formação de produtos. O excesso molar de álcool no processo é de fundamental importância para conduzir a reação a um rendimento satisfatório, preferencialmente superior a 90%. Segundo Bart e colaboradores (2010, p. 286), rendimentos inferiores a esse valor não viabilizam um processo em escala industrial, reduzindo o interesse comercial por determinada tecnologia. Por outro lado, um excesso de álcool além do necessário no processo dificulta a separação do glicerol durante a etapa de decantação, visto que há um aumento da solubilidade do subproduto (AHMAD et al., 2013, p. 44).

O valor ótimo de álcool a ser utilizado na reação está interligado com o tipo de catalisador utilizado no processo. Em uma transesterificação básica utilizando-se metanol como reagente, um excesso de 6:1 (seis mols de álcool para cada um de triglicerídeo) é capaz de converter 98% da matéria-prima sem maiores problemas (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014, p. 453). Entretanto em uma catálise ácida, para se chegar a uma conversão semelhante, é necessário um excesso de álcool em torno de 30:1 (BHARATHIRAJA et al., 2014, p. 370). Em uma transesterificação enzimática, foco deste trabalho, o excesso de álcool a ser utilizado no processo é um fator ainda

de maior importância visto que o metanol em demasiado excesso causa a inativação da enzima (OGNJANOVIC et al., 2009, p. 5.150; CHEN e WU, 2003, p. 469).

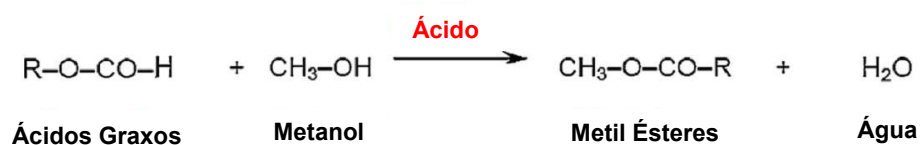
Tais valores de conversão satisfatórios citados são, obviamente, alcançados considerando que a matéria-prima utilizada apresente teores aceitáveis de umidade e ácidos graxos livres. Segundo Ahmad e colaboradores (2013, p. 25) o teor de umidade e ácidos graxos livres são fatores cruciais para determinar a eficácia de um processo de transesterificação de determinado óleo vegetal. O efeito destes dois parâmetros também está interligado com o tipo de catalisador a ser usado. Em uma catálise básica por exemplo, um teor baixo de ácidos graxos livres – preferencialmente inferior a 0,5% - é fundamental para evitar a formação de sabão durante o procedimento reacional (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014, p. 452). O mesmo pode ocorrer com a presença de água no processo, onde há o favorecimento da hidrólise dos glicerídeos formando sabão e glicerol (DEMIRBAS, 2008, p. 110). Tal revés, no entanto, pode ser contornado utilizando-se lipases como catalisador, uma vez que estas enzimas tem a capacidade de esterificar estes ácidos graxos livres e transesterificar os triglicerídeos no mesmo processo (LUQUE e MELERO, 2012, p. 250). A transesterificação catalisada por ácidos também não é sensível a presença de ácidos graxos, entretanto, conforme já foi citado, necessita de um grande tempo reacional que agregado aos problemas de corrosão causados pelo catalisador, inviabilizam seu uso a nível industrial (MARCHETTI et al., 2007, p. 1.307).

A taxa de reação é fortemente influenciada pela temperatura reacional. De acordo com o tipo de catalisador usado, a temperatura da reação pode variar consideravelmente (BART et al, 2010, p. 287). Em um processo de transesterificação em escala industrial, onde se utiliza uma catálise básica homogênea tendo metanol como reagente, normalmente se utiliza uma temperatura reacional próxima ao ponto de ebulição do álcool, ou seja, entre 62°C e 64°C. Já em uma transesterificação catalisada por lipases, um dos grandes diferenciais do processo é a possibilidade da utilização de uma temperatura reacional mais amena. Estudos sobre este assunto mostram rendimentos satisfatórios com temperaturas de reação entre 30°C até 45°C (PEDERSEN et al, 2014, p. 90; NORDBLAD et al, 2014, p. 2450; NELSON et al, 1996, p. 1.192; HAMA e KONDO, 2013, p. 387; CESARINI et al, 2013, p. 485).

2.2.2 Esterificação

Outra maneira bem difundida de produzir biodiesel é através da esterificação de ácidos graxos. Convencionalmente, uma esterificação é conduzida através de uma catálise ácida homogênea utilizando-se ácidos de Brønsted como o ácido sulfúrico, *p*-tolueno sulfônico ou ácido fosfórico (SARAVAN et al, 2015, p. 108) conforme apresenta a Figura 4.

Figura 4. Reação de Esterificação.



Fonte: Adaptado de BORGES e DÍAZ, 2012.

A principal vantagem desse processo é a possibilidade de se utilizar matérias-primas de baixo valor agregado, principalmente contendo altos teores de ácidos graxos livres, os quais são convertidos em biodiesel. Bart e colaboradores (2010, p. 389) citam tal procedimento como sendo muito utilizado como uma etapa de pré-tratamento do processo industrial. Entretanto, além do processo ser sensível a presença de água no meio reacional (MA e HANNA, 1999, p. 10), a utilização de ácidos conduz a problemas de corrosão nos equipamentos do processo, necessitando de uma etapa de neutralização onde há inevitáveis formações de sal e conseqüente redução da eficiência do processo frente a outras tecnologias (BORGES e DÍAZ, 2012, p. 2.844).

Uma vez que a reação é relativamente lenta, altas temperaturas e altos excessos de álcool são necessários para minimizar este inconveniente. A Tabela 2 mostra as condições reacionais típicas de um processo de esterificação.

Tabela 2. Condições reacionais típicas de um processo de esterificação para produção de biodiesel

Características do Processo	Condições Reacionais Típicas
Matérias-primas	Mistura de triglicerídeos com alto conteúdo de ácidos graxos livres e álcoois (geralmente metanol)
Excesso molar de álcool:óleo	30:1 – 50:1
Temperatura	50° - 150°C
% catalisador	1,3:1 (H ₂ SO ₄ :óleo)
Conversão	~97% após 4h

Fonte: Adaptado de Abbaszaadeh et al., 2012.

2.2.3 Outras Técnicas de Produção de Biodiesel

In-situ é um processo de conversão do óleo contido nas sementes oleaginosas diretamente em biodiesel. Neste processo o álcool é misturado com o catalisador para realizar uma transesterificação dos triglicerídeos. Este processo pode atingir altos rendimentos (BASKAR e AISWARYA, 2015, p. 499) e além disso elimina passivos relativos a processos de extração e degomagem do óleo. Ocorre sob temperaturas reacionais brandas e requer uma quantidade de álcool reduzida em comparação com as demais técnicas uma vez que há a necessidade de secar os grãos para remoção de umidade (HAAS et al., 2007, p. 965).

Outra interessante opção para reduzir a viscosidade de óleos vegetais é o procedimento de microemulsificação. Sua ideia principal é misturar a óleos vegetais álcoois de baixo peso molecular, como o metanol ou etanol, com o intuito de formular um chamado diesel híbrido de viscosidade reduzida (MA e HANNA, 1999, p. 4). Uma microemulsão é uma dispersão equilibrada termodinamicamente de microestruturas fluidas óticamente isotrópicas com um comprimento médio menor que um quarto do comprimento de onda da luz visível (FUKUDA et al., 2001, p. 406).

Destaca-se também a pirólise ou craqueamento térmico, o qual envolve a clivagem de moléculas químicas de substâncias para formar uma mistura de hidrocarbonetos com propriedades similares às dos combustíveis de petróleo, pela ação do calor na ausência de ar ou oxigênio. O processo é simples, não há desperdícios e é mais eficiente que outros processos de craqueamento (WAN GHAZALI, 2015, p. 588). Óleos vegetais e gorduras animais estão entre alguns

materiais que podem ser utilizados para pirólise. Conforme sugere Ma e Hanna (1999, p. 5), esta técnica é indicada para produção de biodiesel em regiões onde há escassez de fontes oleaginosas, onde pode-se utilizar como matéria-prima gorduras animais e óleos de cozinha residuais. Entretanto, o produto formado possui características mais semelhantes a gasolina do que ao diesel.

Uma metodologia que ganhou considerável destaque nos últimos anos em pesquisas da área é a utilização de condições supercríticas para produzir biodiesel. A produção de biodiesel em condições supercríticas tem uma grande vantagem em comparação frente aos demais processos que é a não necessidade da utilização de catalisador na reação. Assim, a purificação do biodiesel final obtido é facilitada já que a reação não envolve outros produtos químicos que não sejam reagentes (BASKAR e AISWARYA, 2015, p. 502). Apesar do processo necessitar de uma alta demanda energética visto que trabalha a alta pressão e temperatura e de necessitar um excesso de álcool maior que os demais processos tradicionais (DA SILVA e OLIVEIRA, 2014, p. 271; BHARATHIRAJA et al, 2014, p. 371), Avhad e Marchetti (2015, p. 713) e Demirbas (2008, p. 125) destacam pontos interessantes dessa técnica como a já citada facilidade em purificar o biodiesel, pelo processo ser ambientalmente favorável já que não se utiliza catalisadores químicos, a possibilidade de se usar matérias-primas com alto teor de umidade uma vez que a água não tem influência em condições supercríticas, além de um baixo tempo de reação (em torno de 2 a 4 minutos).

Os líquidos iônicos, em termos de produção de biodiesel, têm diversas aplicações estabelecidas no processo, tais como catalisador, suporte para catalisador e solvente para catálise enzimática (FAUZI e AMIN, 2012, p. 5.778). Líquidos iônicos são sais orgânicos com pontos de fusão em torno ou abaixo da temperatura ambiente os quais são compostos por cátions orgânicos e também por ânions orgânicos ou inorgânicos (LIU et al, 2012, p. 407). Fauzi e Amin (2012, p. 5.771) citam líquidos iônicos como substâncias apropriados para substituir solventes convencionais em sínteses químicas devido principalmente a sua pressão de vapor desprezável, boa solubilidade tanto em materiais orgânicos como inorgânicos e capacidade de formar sistemas multifase devido à sua miscibilidade. Tendo em vista os contratempos como toxicidade e inflamabilidade associados aos solventes convencionais utilizados no processo de produção de biodiesel enzimático (hexano e *t*-butanol principalmente), a opção de se utilizar líquidos iônicos como solvente para o processo desperta grande interesse, visto que não causam a inativação da enzima quando presente na reação.

2.3 UTILIZAÇÃO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

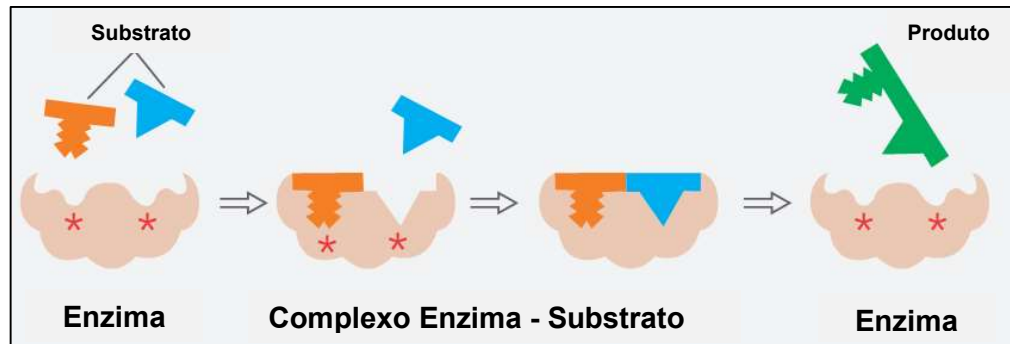
Enzimas são proteínas que consistem em uma cadeia de aminoácidos que apresentam atividade catalítica. A conformação e a estabilização da estrutura molecular das enzimas são asseguradas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals (LIMA et al., 2001, p. 324). A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima, depende de sua estrutura tridimensional, sendo que condições ambientais como pH e temperatura afetam suas propriedades (REED, 1995, p. 7).

A ação catalítica das enzimas é semelhante a dos catalisadores inorgânicos, atuando na redução da energia de ativação da reação. Além disso, as enzimas apresentam uma elevada especificidade, o qual pode se expressar referente ao tipo de reação ou de substrato (REED, 1995, p. 8). Esta especificidade também é utilizada na classificação da enzima: as lipases (triacilgliceril-hidrolases, EC 3.1.1.3), por exemplo, são classificadas como hidrolases, pois catalisam a hidrólise de grupos carboxílicos de ácidos carboxílicos (LUKOVIC et al., 2011, p. 49).

A funcionalidade de qualquer enzima é normalmente limitada a uma específica reação, o qual é vantajoso pois dificulta reações secundárias indesejadas (NOVOZYMES BIOENERGY, 2010, p. 10). Conforme descreve Reed (1995, p. 10) esta especificidade faz com que suas ações sejam comparadas a um sistema “chave-fechadura”, onde como uma chave, apenas um conjunto específico de substratos consegue encaixar-se no sítio ativo – fechadura – de uma enzima, sendo possível alcançar apenas uma conversão catalítica. Tal sistema descrito é representado na Figura 5.

As lipases possuem a capacidade de catalisar a hidrólise das ligações do grupo éster carboxílico das moléculas de triglicérides para formar ésteres de ácidos graxos, glicerol, mono e diglicérides (LUKOVIC et al., 2011, p. 49). Estas enzimas são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, nos quais preenchem um papel chave na modificação biológica de lipídeos (FANG, 2012, p. 211). As lipases podem catalisar reações de hidrólise, alcoólise, acidólise, esterificação e transesterificação, principal técnica para produção de biodiesel (MEDEIROS et al., 2013, p. 79).

Figura 5. Sistema chave-fechadura de uma catálise enzimática.



Fonte: Adaptado de NOVOZYMES BIOENERGY, 2010.

Comparada com a convencional reação de produção de biodiesel através da transesterificação via catálise alcalina de gorduras ou óleos vegetais, a rota enzimática é considerada uma “reação verde” devido a seus benefícios ambientais (PRICE et al, 2014, p. 6.204). Além disso, tal tecnologia é bastante atrativa pois possui como características a produção de um biodiesel com alta pureza sem a necessidade de etapas de purificação do produto, a facilidade na separação dos produtos da reação, condições reacionais de operação brandas, produção de uma glicerina com conteúdo mínimo de contaminação por presença de catalisador além de eliminar os problemas com o processamento de matérias-primas com alto índice de acidez, uma vez que as lipases possuem a capacidade de catalisar simultaneamente triglicerídeos e ácidos graxos livres presentes na matéria-prima por transesterificação e esterificação (KNOTHE et al., 2006, p. 70).

Porém, a catálise enzimática também apresenta alguns contrapontos, representados na Tabela 3, que dificultam a sua aplicação em um processo de produção em grande escala. Um dos principais obstáculos que o processo enzimático enfrenta para tentar viabilizar sua aplicação em escala industrial é o alto custo associado ao catalisador e as menores taxas de reação desse processo em comparação ao processo catalisado por produtos químicos (JEGANNATHAN e ABANG, 2008, p. 254). Além disso, as lipases sofrem com uma eminente perda da atividade enzimática devido ao excesso de metanol presente no meio reacional, excesso o qual imprescindível é para um bom rendimento do processo (KAIEDA et al., 2001, p. 13, CHEN e WU, 2003, p. 469).

Tabela 3. Comparação entre a transesterificação via catálise química e enzimática.

Características do Processo	Catálise Química	Catálise Enzimática
Temperatura de reação (°C)	60 - 70	30 - 40
Ác. graxos livres no óleo não refinado	Produtos saponificados	Metil Ésteres
Água na matéria-prima	Interferência na reação	Não influencia
Rendimento em ésteres alquílicos	Normal	Alto
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres	Lavagens consecutivas	Nenhuma
Custo do catalisador	Barato	Relativamente caro
Rendimento de produto	Alto	Baixo

Fonte: RAVINDRA e JEGANNATHAN, 2015, p. 30.

Um grande número de lipases de diferentes fontes vem sendo estudadas na síntese de biodiesel. A escolha da enzima adequada para um alto rendimento do processo dependerá de fatores diversos tais como o tempo e temperatura de reação, reutilização ou não da enzima e facilidade de obtenção da lipase (FJERBAEK et al., 2008, p. 1.299). Alguns desses estudos, com seus respectivos resultados e variáveis estão resumidamente mostrados na Tabela 4.

Um dos principais obstáculos para aplicação de lipases em escala industrial é o alto custo deste biocatalisador. Para amenizar esta situação, alguns autores propõem imobilizar a enzima em um suporte químico, permitindo o seu reuso (DIZGE et al, 2009, p. 1.983; KOSE et al, 2002, p. 126). Porém, os materiais mais adequados para o processo de imobilização não são baratos, agregando outra fonte de custos a técnica (ORÇAIRE et al, 2006, p. 106; RAVINDRA e JEGANNATHAN, 2015, p. 84; SALIS et al, 2008, p. 20). Há um grande número de suportes que podem ser usados para a imobilização de enzimas, sendo que sua seleção depende de fatores tais como estabilidade térmica, durabilidade química, tipo da enzima que será utilizada na reação e custo do suporte (CHEN et al, 2008, p. 668). Geralmente, a imobilização da enzima é acompanhada por mudanças na sua atividade e estabilidade. Segundo Jegannathan e Abang (2008, p. 257), frequentemente observa-se nessas reações a perda da atividade da enzima, que por sua vez é normalmente compensada pela estabilidade operacional aprimorada da técnica. Como esses parâmetros são essenciais para avaliar a produtividade do biocatalisador, tais variações não são interessantes para o controle do processo (LUKOVIC et al., 2011, p. 53). Este fator,

Tabela 4. Diferentes lipases utilizadas na síntese de biodiesel.

Lipase	Óleo	Reagente	Solvente	Tempo de Reação	Rendimento	Fonte
<i>Candida antarctica</i> B	Resíduo de óleo de palma	Metanol	<i>Tert</i> -butanol	4h	79%	Halim et al. (2009)
<i>Rhizomucor Miehei</i> <i>Penicilium cyclopium</i>	Óleo de soja	Metanol	Sem solvente	12h	68% - 95%	Guan et al. (2010)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de girassol Óleo de soja Resíduo de óleo de fritura	Metanol	Sem solvente	24h	90% - 97%	Dizge et al. (2009)
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de girassol	Acet. Metílico	Sem solvente	12h	> 95%	Ognjanovic et al. (2009)
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de algodão	Metanol Propanol Butanol	Sem solvente	7h	92%	Kose et al. (2002)
<i>Rhizomucor miehei</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de girassol Óleo de soja	Metanol	<i>n</i> -hexano Sem solvente	24h	> 80% > 90%	Soumanou e Bornscheuer (2003)
<i>Candida sp.</i> 99-125	Resíduo de óleo de cozinha	Metanol	<i>n</i> -hexano	10h	91%	Chen et al. (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de soja	Metanol	Sem solvente	90h	> 80%	Kaieda et al. (2001)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de soja	Metanol	Água	24h	95%	Cesarini et al. (2013)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de canola	Etanol	Água	24h	> 98%	Pedersen et al. (2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de canola	Metanol	Água	24h	95%	Nordblad et al. (2014)

acrescido ao passivo envolvido no processo de imobilização incentiva pesquisas para a busca de uma alternativa que aumente a competitividade deste processo biotecnológico (PEDERSEN et al, 2014, p. 89).

Tendo em vista estes inconvenientes, a utilização de lipases em formulações líquidas surge como uma promissora alternativa para o processo enzimático de produção de biodiesel (REMONATTO et al., 2016; AMOAH et al., 2016, p. 225; NORDBLAD et al., 2014, p. 2.446, CESARINI et al., 2013, p. 485; PRICE et al., 2014, p. 6.205; FIRDAUS et al., 2016, p. 52). Há alguns trabalhos publicados a respeito deste assunto, onde a formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus*, uma nova enzima desenvolvida pela Novozymes, com nome comercial de CalleraTM Trans L, é utilizada. Em comparação com as lipases imobilizadas, as enzimas de formulação líquida têm as vantagens de possuir um custo de preparação mais baixo, além de uma maior taxa de reação (LI, et al., 2015, p. 965).

Muitos dos trabalhos publicados sobre produzir biodiesel usando catalisadores enzimáticos utilizaram a lipase *Candida antarctica B*, desenvolvida pela Novozymes com o nome comercial de Novozym[®]435, na forma imobilizada. Porém, Nordblad e colaboradores (2014, p. 2.447), citam que a vantagem da simples reutilização da enzima imobilizada após recuperação do meio reacional não viabiliza o processo uma vez que com o atual preço da lipase Novozym[®]435, o número de reusos necessários do catalisador, para compensar seu custo, teria que ser em torno de cem vezes. Tendo em vista que a atividade e estabilidade da enzima após muitos reusos dificilmente se manterá alta, há um aumento no interesse para aplicação de lipases líquidas para produção de biodiesel (AMOAH et al., 2016, p. 225).

O uso de uma lipase em sua formulação líquida altera o sistema reacional do processo em comparação a situações onde se utilizaria a enzima em sua forma imobilizada. Segundo Pedersen et al. (2014, p. 90), a principal alteração é a introdução de água no sistema para promover hidrólise, o que significa que o produto irá conter alguns ácidos graxos livres que necessitarão ser removidos posteriormente. Por outro lado, a presença de água na reação dilui o álcool no sistema, contribuindo para minimizar o efeito de inibição da enzima. A quantidade de água adicionada ao sistema é um parâmetro importante no processo, pois afeta simultaneamente o volume reacional das fases polares e não-polares, além da atividade termodinâmica do álcool utilizado (NORDBLAD et al., 2014, p. 2.447). Da mesma maneira, a presença de água no sistema conduz a formação de uma fase aquosa separada do meio reacional, na

qual é conhecido que lipases como a *Thermomyces lanuginosus* são ativadas pela interface entre essas duas fases (CESARINI et al., 2013, p. 485). Por outro lado, Amoah e colaboradores (2016, p. 226), citam que a atividade catalítica não é distribuída ao longo do volume reacional, mas sim eficientemente restrita a interface, significando que a velocidade da reação pode ser facilmente limitada pela área interfacial disponível.

Sendo assim, considerando as variáveis que afetam a reação de transesterificação evidenciadas, a correta identificação da combinação dos fatores que direcionam a um rendimento satisfatório do processo é um desafio que este trabalho se propôs a investigar. A utilização de lipases em sua formulação líquida para catalisar a reação de produção de biodiesel é uma técnica muito promissora, onde apenas seus benefícios ambientais já servem como incentivo. Os resultados obtidos através deste estudo estão dispostos na forma de artigos que serão publicados em periódicos da área de interesse, os quais estão descritos a seguir.

3 PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO PELA LIPASE *THERMOMYCES LANUGINOSUS* NA SUA FORMA SOLÚVEL: UMA ABORDAGEM ESTATÍSTICA

O artigo a seguir foi submetido a revista *Energy & Fuels* (ISSN: 1520-5029).

Production of biodiesel catalysed by the lipase *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form: A statistical approach

João H. C. Wancura^a, Marcio. A. Mazutti^a, Sergio L. Jahn^a

^aChemical Engineering Department, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

ABSTRACT

With the imminent depletion of fossil fuel reserves, biodiesel has consolidated in recent years as a promising source of energy, mainly in the petroleum diesel substitution. The method of biodiesel production through the transesterification of oleaginous sources utilizing basic catalysts shows many drawbacks in the process like need of a raw material with high purity degree and generation of alkaline wastewater from bioproduct washing step, although this methodology be that there is higher reaction rates. These drawbacks can be overcome with the use of enzymes as catalyst. In this context, the lipase Callera™ Trans L (a liquid formulation of *Thermomyces lanuginosus* lipase) arises as a good alternative as a catalyst for transesterification reaction. In order to evaluate the use of liquid lipases in biodiesel synthesis and optimize the main variables of the transesterification process (reaction temperature, molar ratio methanol/oil and catalyst concentration), this work used a statistical design from a Central Composite Design as a tool to find the combination of reactive factors that lead to maximum biodiesel yield. The results presented that the second-order quadratic model found was significant ($p < 0.0001$) and a biodiesel yield of 83.25% (with the total addition of methanol in the beginning of the reaction) and 92.75% (with gradual addition of methanol during the reaction) was obtained after 24h of reaction. The optimized variables found after 8h of reaction were 35°C of reaction temperature, methanol to oil molar ratio of 4.5:1 and 1.45% of catalyst load.

Keywords: Biodiesel, Callera™ Trans L, Methanol, Transesterification, Optimization.

3.1 INTRODUCTION

The increase in global energy demand associated with the depletion of fossil fuels conventional sources served as an incentive to researches conducted in recent years to search of alternative sources of energy. In addition, the global appeal for the utilization of fuels and technologies that do not damage the environment have become a social need nowadays. Fossil fuels such as petrodiesel – main source of supply of the global road logistics ^{1,2} – besides of not being renewable, contribute with the generation of pollutants responsible for climate change and for the emission of greenhouse gases responsible for global warming of our planet in recent years ³. In Brazil, for example, according to the Brazilian Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels, around 57 billion liters of diesel were consumed in 2015, of wich 12% corresponds to imports, representing annual expenditures in the order of US\$3.4 billion ⁴.

Thus, the quest for an alternative fuel to diesel that is self-sustaining, environmentally friendly, economically competitive ⁵⁻⁷ and at the same time reducing the dependence of countries like Brazil on unwanted imports has become an indispensable factor for the political, economic and social equilibrium of future generations. In this scenario, biodiesel has gained notable attention in recent years as a substitute for petrodiesel due mainly to its properties similar to fossil fuel ⁸⁻¹⁰. Biodiesel has many benefits in relation to petroleum diesel such as renewability, non-toxicity, low emissions profile (not contributing with carbon dioxide emissions into the atmosphere, main greenhouse gas), biodegradability, high combustion efficiency, high cetane number, high flash point, low sulfur content, non-explosive, non-flammable and still can be used in diesel engines without the need of mechanical modifications ¹¹⁻¹⁴.

Chemically, biodiesel is denominated of as fatty acid alkyl esters, usually obtained through a transesterification reaction between a fatty acid (vegetable oil or animal fat) and a short chain alcohol (usually methanol or ethanol) in the presence of a catalyst (basic, acid or enzymatic) ¹⁵, generating glycerol as byproduct of the reaction. When the short chain alcohol utilized is methanol, the biodiesel obtained is named fatty acid methyl ester (FAME). Currently, on industrial scale, the diffused widely production process is the transesterification between a fatty acid from

oleaginous source and methanol in the presence of an alkaline catalyst in homogeneous phase. Despite the high conversions in short time intervals, this process presents several drawbacks, among them: difficulty to recover the catalyst and glycerol, production of a large amount of alkaline residual water, high energy demand and the need for a raw material with low levels of free fatty acids in order to avoid saponification reactions ^{16–19} that besides to causing the catalyst consumption, leads to the formation of emulsions that hampers the separation between the biodiesel and glycerol phases, reducing the process yield ²⁰.

Considering these drawbacks, several studies suggest the use of lipases in an enzymatic transesterification of triglycerides as an interesting alternative to the alkaline process ^{21–24}. Lipases (tryacylglycerol acylhydrolase E.C.3.1.1.3) are enzymes that catalyze the hydrolysis of carboxylic ester link in the triacylglycerol molecule to form free fatty acids, di- and monoglycerides and glycerol. ²⁵ Compared to conventional reaction of biodiesel production, the enzymatic route is considered a "greener reaction" due to its environmental benefits, since there is no generation of effluents, insofar as washing steps for catalyst removal are not necessary ²⁶. In addition, this technology has benefits such as production of a high purity biodiesel without the need of product purification steps, easily separation of products and by-products from the reaction, mild reaction conditions of temperature and pressure, production of a glycerin with minimum content of contamination by the catalyst ^{27–29}. Another important point is the possibility of utilization of raw materials with high levels of free fatty acids, since the lipases have the capacity to catalyze simultaneously transesterification and esterification reactions, causing triglycerides and free fatty acids present in the raw material to react with alcohol for produce esters of fatty acids. ³⁰.

However, the process employing enzymatic catalysis also presents problems that hamper its application in large-scale, such as lower reaction rates compared to the alkaline process and enzyme denaturation by the excess of methanol in the reaction, resulting in loss of catalytic activity with the progress of the process ^{27,30}. Besides, the high cost of enzymes affects the operational cost of the process ³¹.

To overcome this problem, some authors propose the enzymes immobilization in polymeric support, allowing the catalysts reutilization ^{21,22,26,32,33}. However, the most suitable supports for the immobilization process also present high prices, adding another source of operational cost to the process, causing the number of reuses of the catalyst has to be very high to offset these costs ³⁴. In these circumstances, the use of

lipases in aqueous formulations – with manufacturing costs well below the purified and supported enzymes – such as the novel lipase developed by Novozymes, Callera™ Trans L, arises as a promising alternative for the enzymatic process of biodiesel production^{34–37}.

In order to maximize yields, many studies use statistical design as way of optimizing a biodiesel production process^{38–45}. Central Composite Design (CCD) is a full-factorial two-level design that allows to optimize a process, quantifying the effects of important variables, in a small number of experiments^{42,46}

The objective of this work was to optimize the process yield of degummed soybean oil transesterification using as catalyst the liquid lipase formulation *Thermomyces lanuginosus* (tradenamed Callera™ Trans L). A 5-level-3-factor CCD was used to investigate the interaction of three process variables: reaction temperature, methanol to oil molar ratio in the reaction and catalyst load.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Materials

Degummed soybean oil used in the experiments was supplied by Olfar Alimento e Energia S/A (Erechim, Brazil). The oil contained 0,16% of free fatty acids, 128 ppm soaps, 24,5 ppm phosphorus and 0,09% water with the following fatty acids composition: 10.4% palmitic acid, 3.6% stearic acid, 25.8% oleic acid, 53.2% linoleic acid and 7.0% linolenic acid. The enzyme utilized in the reactions, provided by Novozymes (Denmark), was the liquid formulation of lipase *Thermomyces lanuginosus*, under tradename Callera™ Trans L (CaIT, enzymatic activity of approximately 100,000 LU.g⁻¹). Methanol, isooctane, methyl tricosanoate and a mixed fatty acid methyl ester standard (37 components), utilized in the chromatographic analysis, were purchased from Sigma-Aldrich (Germany).

3.2.2 Transesterification Reaction

The reaction system used to perform the experiments consisted of a 250 mL 3-way round bottom flask equipped with a reflux condenser, water bath, temperature controller and magnetic stirrer. In all experiments was utilized 80 g of degummed

soybean oil and a fixed amount of distilled water of 6% (w/w, relative to the mass of the oil) in order to dilute the methanol. The reaction medium stirring speed was set at 300 rpm for all experiments.

The procedure adopted to perform the tests consisted in determining the mass of degummed soybean oil and enzyme to be used, to add them to the round bottom flask and to couple it to the condensation system and temperature control. After the system to reach the pre-set temperature, added in a single step the methanol diluted in distilled water (moment considered as “reaction starting”).

The conditions employed in the tests are shown in Table 5, where the range normally employed by the researchers ^{20,29,34,36} were amplified in order to investigate the influence of the variables for a wider range. For statistical analysis, the experiments were finalized after 8 h of reaction and samples were collected at 45 minutes and in the end of the assay in order to evaluate the influence of the reactional variables at the initial and final moments of the reaction. For the reaction kinetics analysis, the experiments were finalized after 24 h of reaction. Collected samples were centrifuged at 4,000 rpm for 5 minutes at a temperature of 15°C for phase separation and upper layer (FAME) was collected and stored for analysis by gas chromatography. Calculation of the biodiesel yield obtained in the assays was determined through the methodology proposed by EN14103.

3.2.3 Experimental Design and Statistical Analysis

To optimize the biodiesel production process via enzymatic catalysis, a five-level-three-factor centre composite rotatable design – CCRD – was utilized. A complete factorial for three independent variables was employed in this study, resulting in seventeen experiments ($= 2^k + 2 \cdot k + 3$ repetitions on the centre point), where k is the number of independent variables. The independent variables selected were reaction temperature (x_1 , °C), methanol to degummed soybean oil molar ratio in the reaction (x_2 , mol/mol) and enzyme concentration in relation to the soybean oil present in the reaction (x_3 , % w/w). The dependent variable or response variable of the experimental design was FAME yield (Y , %). Table 5 presents the considered values for the independent variables (coded and non-coded) and its respective levels. Table 6 shows the complete matrix of central composite design and the respective predefined values of the independent variables in the seventeen experiments performed.

Table 5. Process parameters variation and levels of biodiesel production by enzymatic catalysis.

Independents Variables	Simbols	Levels				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Reaction Temperature (°C)	x ₁	25	29	35	41	45
Molar Ratio Methanol:Oil (mol/mol)	x ₂	3.0:1	3.6:1	4.5:1	5.4:1	6.0:1
Catalyst Concentration (% w/w)	x ₃	0.4	0.7	1.1	1.5	1.8

With the objective of analyzing the experimental results obtained from the central composite design, response surface methodology (RSM) was used, where the experimental data were plotted in a second order model in order to correlate the response variable with the independent variables, according to Equation 1:

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \alpha_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (1)$$

where Y is biodiesel yield in the process, α_0 is the constant term, α_i , α_{ii} e α_{ij} are the terms for linear, quadratic and interactive effect respectively; x_i e x_j are the independent variables.

Through the analysis of variance (ANOVA), regression analysis and plotting of contour curves, was established optimal conditions that maximize FAME production yield. Obtained data were analyzed using the software StatSoft Statistica, version 8.0.

3.2.4 Analysis by Gas Chromatography

Process yield (amount of FAME present in the reaction mixture) was determined by gas chromatography. The content of fatty acid esters was quantified using a Shimadzu GC-2010 Plus chromatograph, equipped with an autoinjector AOC-20i, an autosampler AOC-20s and a flame ionization detector. Compounds separation was realized employing a Zebron ZB-WAX plus column (Phenomenex, Estados Unidos), with 30.0m x 0.32mm I.D. x 0.25 μ m film thickness. Helium was utilized as carrier gas at a split ratio 1:50 and column flow rate of 1.24 mL.min⁻¹. Injector temperature was set to 242°C and the detector temperature set to 250°C. The following temperature program was used: oven temperature was started at 150°C, increased at 10°C.min⁻¹

Table 6. Statistical design for a five-level-three-factor centre composite rotatable design.

Experiment	Non-coded independent variables			Coded independent variables			FAME yield obtained (%)		FAME yield predicted (%)	
	Reaction temperature (°C), x_1	Methanol to oil molar ratio (mol/mol), x_2	Catalyst load (%), x_3	x_1	x_2	x_3	Y_A^a	Y_B^a	Y_A^a	Y_B^a
1	29°C	3.6:1	0.7	-1	-1	-1	57.50	65.02	57.96	65.26
2	41°C	3.6:1	0.7	+1	-1	-1	53.09	62.58	51.61	60.17
3	29°C	5.4:1	0.7	-1	+1	-1	58.78	61.66	57.68	61.19
4	41°C	5.4:1	0.7	+1	+1	-1	41.06	51.31	42.48	52.92
5	29°C	3.6:1	1.5	-1	-1	+1	58.51	66.35	55.57	64.60
6	41°C	3.6:1	1.5	+1	-1	+1	61.41	63.77	60.99	65.21
7	29°C	5.4:1	1.5	-1	+1	+1	55.42	60.40	55.38	62.68
8	41°C	5.4:1	1.5	+1	+1	+1	53.91	60.49	51.94	60.11
9	25°C	4.5:1	1.1	-1,68	0	0	59.95	64.88	61.39	63.52
10	45°C	4.5:1	1.1	+1,68	0	0	52.49	56.59	53.24	57.13
11	35°C	3:1	1.1	0	-1,68	0	54.17	61.68	56.07	63.76
12	35°C	6:1	1.1	0	+1,68	0	48.00	58.01	48.29	56.12
13	35°C	4.5:1	0.4	0	0	-1,68	50.48	62.10	50.14	62.62
14	35°C	4.5:1	1.8	0	0	+1,68	54.00	68.67	56.33	68.33
15	35°C	4.5:1	1.1	0	0	0	56.65	68.02	55.93	67.91
16	35°C	4.5:1	1.1	0	0	0	55.35	67.81	55.93	67.91
17	35°C	4.5:1	1.1	0	0	0	56.06	67.93	55.93	67.91

^a Yields obtained for conditions with subscripts A and B correspond to samples collected at 45 minutes and 8 hours of reaction respectively.

to 200°C and then increased at a rate of 1°C.min⁻¹ to 242°C. Methyl tricosanoate (C23:0) was used as internal standard and isooctane as solvent. Peaks identification in the chromatograms obtained was realized by analysis of a fatty acid methyl esters standards mix.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Quantitative Analysis of Biodiesel

A typical chromatogram resulting by the GC analyzes of the biodiesel samples obtained in the experiments performed is shown in Figure 6. By comparison between these chromatograms and the chromatogram of a standard formed by the mixture of 37 methyl esters (from C14:0 to C24:0) it was possible to confirm the formation of biodiesel (FAME) in the experiments.

For quantification of biodiesel present in the samples and subsequent calculation of the process yield, were accounted the areas of the majority peaks of the chromatograms, duly identified in Table 7.

Figure 6. Typical chromatogram of the biodiesel samples obtained.

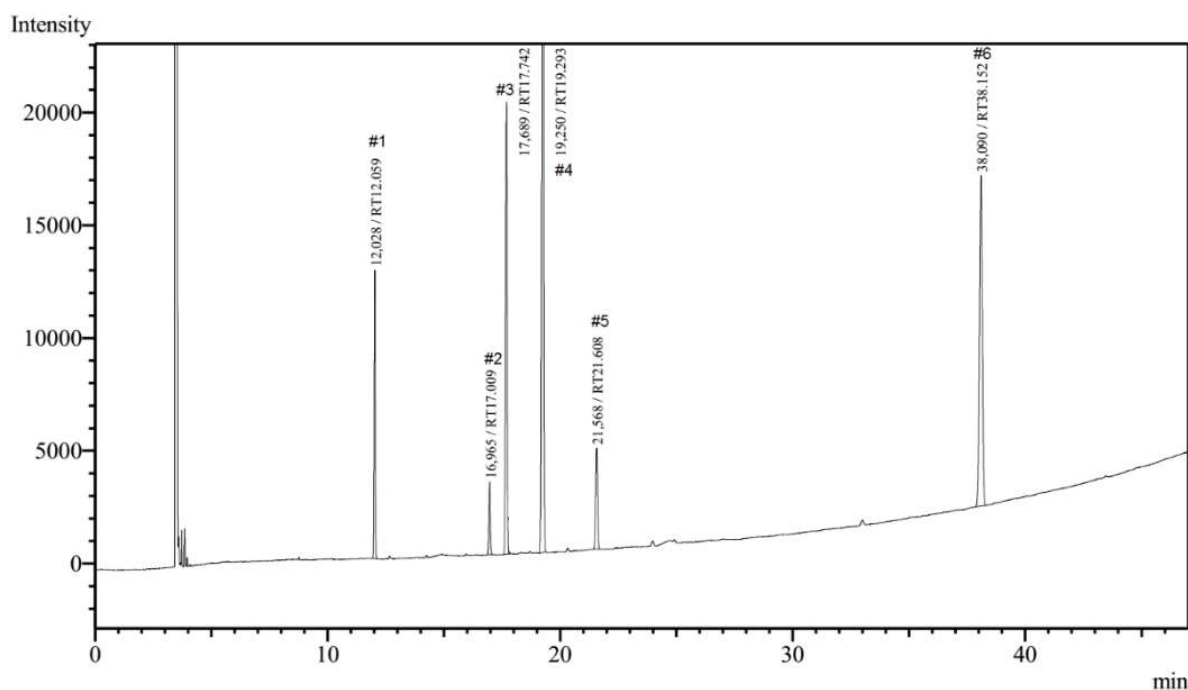


Table 7. Identification of the components present in the FAME samples.

Peak	Retention Time	Chemical Structure	Component
#1	12.03	C16:0	Methyl palmitate
#2	16.97	C18:0	Methyl stearate
#3	17.69	C18:1	Methyl oleate
#4	19.25	C18:2	Methyl linoleate
#5	21.59	C18:3	Methyl linolenate
#6	38.09	C23:0	Methyl tricosanoate ^a

^a Internal Standard.

3.3.2 Reaction Parameters Optimization by RSM

Table 6 presents the results obtained experimentally and predicted by the model for biodiesel yield after 45 and 480 minutes of reaction. The quadratic regression model of biodiesel yield in the situations "A" (45 minutes of reaction) and "B" (8h of reaction) given by a CCD with 5-level-3-factor, based on the coded variables, are represented by Equations 2 and 3:

$$Y_A = 55.889 - 2.439x_1 - 2.324x_2 + 1.813x_3 - 2.215x_1x_2 + 2.940x_1x_3 \quad (2)$$

$$Y_B = 67.910 - 1.910x_1 - 2.691x_1^2 - 2.282x_2 - 2.828x_2^2 + 1.655x_3 \quad (3)$$

where Y is the biodiesel yield, x_1 is the reaction temperature, x_2 is the methanol to oil molar ratio and x_3 is the enzyme content. Coefficients with positive sign indicate synergic effect whereas negative coefficients indicate antagonistic effect.

The statistical significance of equations 2 and 3 were confirmed by analysis of variance – showed in Table 8 – determining the significance and fitness of the quadratic regression model found as well as the effects of significant individuals variable and their interaction in the responde variable. The coefficient of determination of 0.9166 ($R^2 = 0.9166$) obtained for the model determined for situation "A" and 0.9236 ($R^2 = 0.9236$) obtained for situation "B" shows a great fit since 91.66% and 92.36% of variability, in the situations named "A" and "B" respectively, can be explained by the model and are assigned at independent variables analyzed. In addition, the low values for the coefficient of variation obtained (CV = 2.23% for situation "A" and CV = 1.76% for situation "B") indicate a good precision and reliability of the experiments performed, since as general rule, a value of coefficient of variation less than 10% indicates that a

Table 8. Results obtained by ANOVA for samples collected with 45 minutes (A) and 8h (B) of reaction.

Factor	Sum of Squares		Degree of Freedom		Mean Square		F-value		p-value	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Model	339.45	361.55	9	9	37.72	40.17	8.43	10.75	< 0.0001 ^a	< 0.0001 ^a
Temperature, x ₁	81.14	49.79	1	1	81.13	49.79	18.14	13.31	0.0037 ^a	0.0081 ^a
x ₁ .x ₁	2.90	81.42	1	1	2.89	81.42	0.64	21.78	0.4474 ^b	0.0023 ^a
MeOH, x ₂	73.67	71.05	1	1	73.67	71.05	16.48	19.01	0.0048 ^a	0.0033 ^a
x ₂ .x ₂	19.34	89.88	1	1	19.34	89.88	4.33	24.04	0.0760 ^b	0.0017 ^a
Catalyst, x ₃	44.83	37.39	1	1	44.83	37.39	10.02	10.00	0.0157 ^a	0.0159 ^a
x ₃ .x ₃	9.16	8.40	1	1	9.16	8.41	2.04	2.25	0.1954 ^b	0.1774 ^b
x ₁ .x ₂	39.24	5.04	1	1	39.25	5.04	8.77	1.35	0.0210 ^a	0.2836 ^b
x ₁ .x ₃	69.15	16.27	1	1	69.15	16.27	15.46	4.35	0.0057 ^a	0.0753 ^b
x ₂ .x ₃	< 0.01	2.30	1	1	< 0.01	2.30	< 0.01	0.62	0.9794 ^b	0.4584 ^b
Residual	31.30	26.17	7	7	4.47	3.74				
Total	375.25	342.40	16	16						

^a Significant at "Prob > F" less than 0.05

^b Insignificant at "Prob > F" more than 0.05

For situation "A": CV = 2.23%; standard deviation = 1.22; R² = 0.9166

For situation "B": CV = 1.76%, standard deviation = 1.11, R² = 0.9236

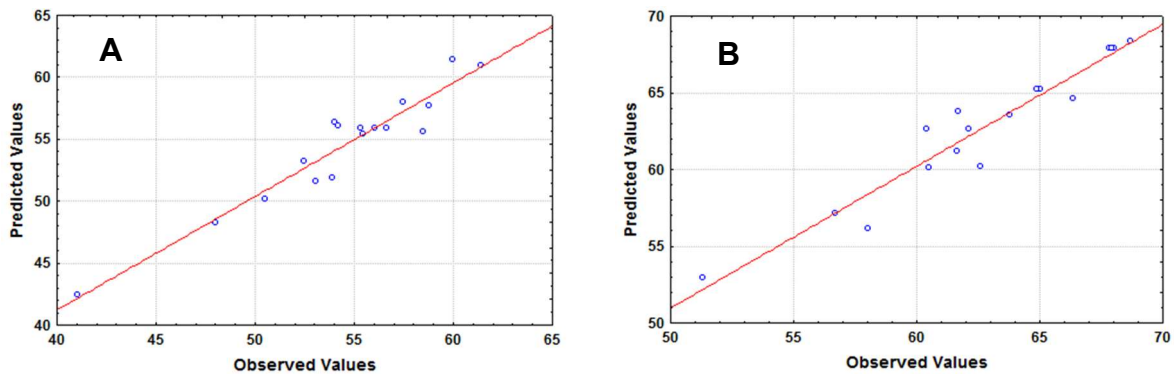
model can be considered reasonably reproducible⁴⁶. The quadratic regression model for situation "A" has a F-value of 8.43 and a p-value less than 0.0001, whereas for situation "B" the F-value is 10.75 and the p-value less than 0.0001 also, indicating with a reliability level of 95%, that the model is significant, since the tabulated F-value is $F_{\text{tab}}(9, 7, 5\%) = 3.68$. From the analysis of the variance (Table 8), was verified that, for 45 minutes of reaction, the amount of catalyst and the interaction between reaction temperature and amount of catalyst had a positive effect on biodiesel yield; while the molar ratio MeOH:Oil, reaction temperature and interaction between reaction temperature and molar ratio MeOH:Oil had a negative effect on product yield. The interaction between amount of catalyst and methanol to oil molar ratio and the quadratic interactions did not show significant effect in this reaction step. In the same way, the ANOVA analysis for the experimental data collected with 8h of reaction showed that the amount of catalyst has a positive effect for the FAME yield, while methanol to oil molar ratio and reaction temperature have a negative effect on the response variable. However, the interactions between the variables did not present statistical significance, an inverse behavior verified for the analysis performed with data obtained with 45 minutes of reaction. The quadratic parameters for reaction temperature and methanol to oil molar ratio showed significant and negative effect, while the quadratic effect for amount of enzyme present in the reaction did not show a significant effect.

The plot between the values obtained experimentally and predicted by the quadratic regression model for situations of 45 minutes of reaction (situation "A") and 8 hours of reaction (situation "B") – Figure 7 – shows that predicted values are very close to actual values, which demonstrates that the model reliability to represent the dependence between the response variable and the independent variables considered.

In the initial phase of the reaction, the optimum reaction conditions indicated a temperature of 45°C, a methanol to oil molar ratio of 4.5:1 and a catalyst load of 1.8%, with a predicted biodiesel yield of 62.20% after 45 minutes of reaction. For the final phase of the reaction, the optimized reaction conditions obtained were 35°C, methanol to oil molar ratio of 4.5:1 and enzyme load of 1.45%, providing a predicted biodiesel yield of 68.73% after 8 hours of reaction. As the optimum conditions found did not coincide with any of the experimental assays, new experiments were performed (in duplicate) to validate the accuracy of the model, being verified an average yield of

61.85% after 45 minutes of reaction and 73.10% after 8h of reaction; values close to predicted by the model. These results indicate that the quadratic regression models used are appropriate to represent the experimental data collected.

Figure 7. Predicted and observed values for response variable on situations "A" e "B".



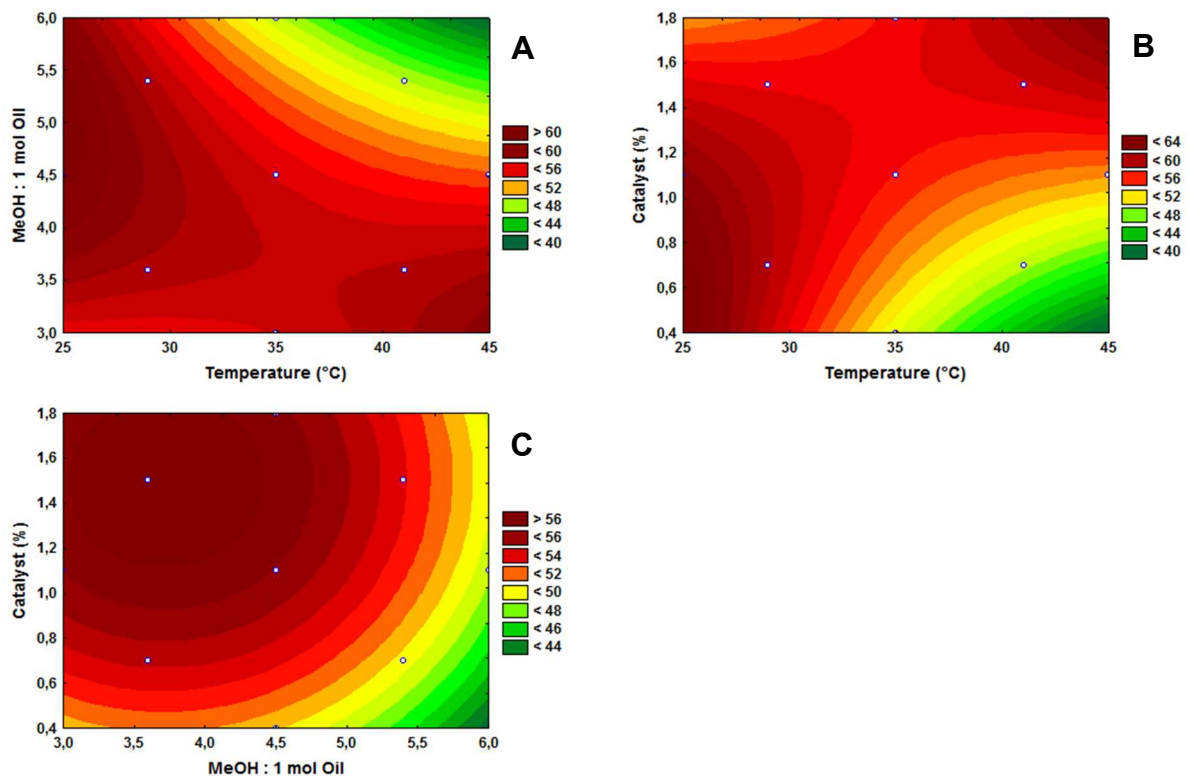
3.3.3 Influence of Independent Variables on Biodiesel Yield

Due to the interactive effects between the variables, the independent analysis of the parameters would not be correct ⁴⁴. To evaluate these effects, was utilized contour surfaces, represented by Figure 8 and Figure 9 in the reaction times of 45 minutes and 8 hours respectively, describing the system behavior in an initial and final phase of the reaction. For each of the contour surfaces, the interactive effects between two parameters were plotted while the third parameter was fixed at its center point.

Figure 8A represents the effects of the reaction temperature variation and the methanol to oil molar ratio, Figure 8B shows the effects of the reaction temperature variation and the amount of enzyme added to the reaction; and the Figure 8C simulates the effects of molar ratio variation MeOH:Oil and amount of catalyst for 45 minutes of reaction. From these plots it is possible to observe the damaging effect to the process yield at the initial moments of the reaction when using, simultaneously, high methanol excess and high temperature in the reaction. Even at higher temperatures (above 40°C), high FAME yields can be obtained since the methanol to oil molar ratio is low (less than 3.6:1). At low reaction temperatures (below 29°C), it is possible to obtain satisfactory FAME yields for a wide range of MeOH excess (3.6:1 - 6.0:1). The variables "reaction temperature" and "molar excess of methanol" also show great influence on biodiesel yield when analyzed together with the variable "amount of

enzyme". High reaction temperatures (higher than 41°C) only benefit the biodiesel yield at the initial moments of the process when a larger amount of catalyst is used (above 1.5%). Satisfactory FAME yields can be obtained with a low amount of enzyme in the reaction medium (less than 1.0%) provided that low reactional temperatures are used (below 29°C). On the other hand, when evaluating "methanol excess" and "amount of catalyst", is clearly perceived that high methanol excesses drastically damage the biodiesel yield at the initial moments of the process and consequently the reaction advance. Initially satisfactory FAME yields can be obtained with a low amount of lipase added to the process, since intermediate values of temperature and molar excess of methanol are used. When high methanol excess is utilized in the reaction (higher than 5:1), satisfactory yields are only possible with the presence of a higher amount of enzyme (higher than 1.3%). Logically, an increase in the amount of enzyme added to the reaction increases the process yield at its initial moments.

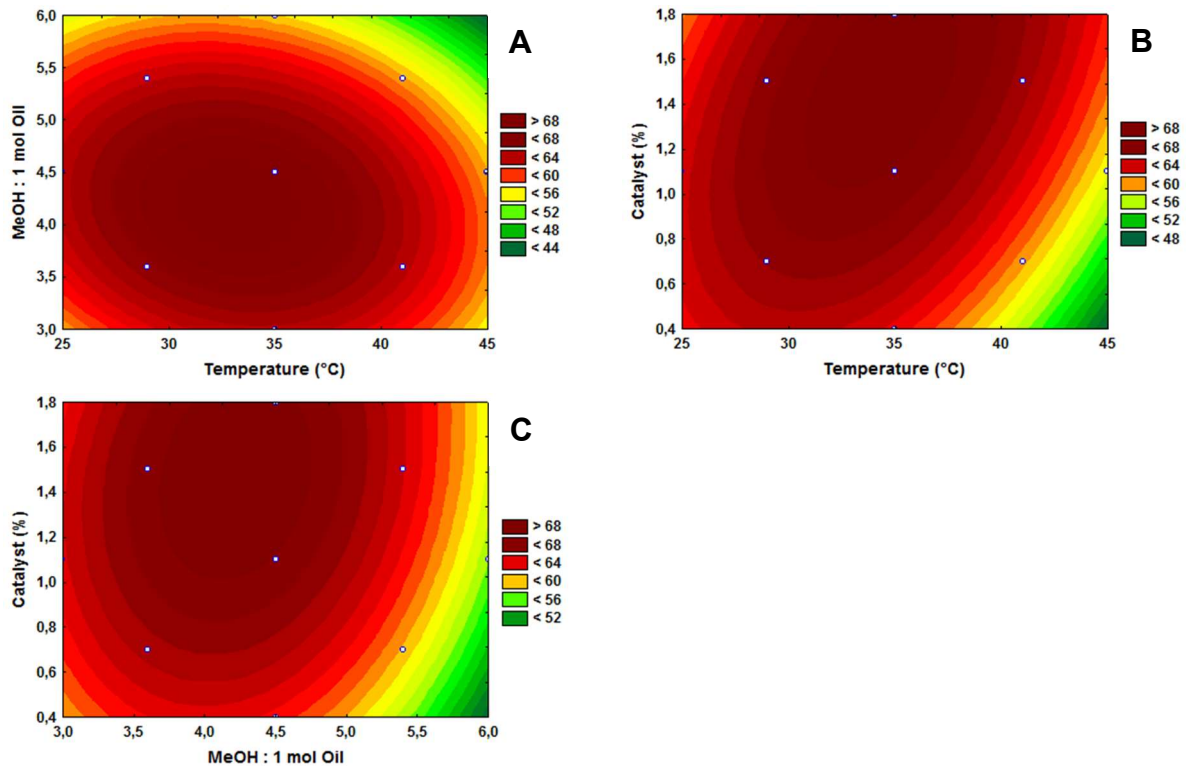
Figure 8. Contour surface plot for biodiesel yield after 45 minutes of reaction varying (A) temperature and MeOH to oil molar ratio, (B) temperature and catalyst amount and (C) MeOH to oil molar ratio and catalyst amount.



The independent variables analyzed in this study showed effects considerably different when analyzing distinct moments of the reaction. The interaction between

the variables for the samples collected after 8h of reaction are represented by contour surfaces, illustrated in Figure 9.

Figure 9. Contour surface plot for biodiesel yield after 8 hours of reaction varying (A) temperature and MeOH to oil molar ratio, (B) temperature and catalyst amount and (C) MeOH to oil molar ratio and catalyst amount.



As the previous figures, the Figure 9A represents the effects of the reaction temperature variation and the methanol to oil molar ratio, Figure 9B shows the effects of the reaction temperature variation and the amount of enzyme added to the reaction; and the Figure 9C simulates the effects of molar ratio variation MeOH:Oil and amount of catalyst. Similarly to the initial moments of the reaction, high reaction temperatures and high methanol excesses harm the final yield of the process. However, different from what was previously verified, the higher biodiesel yields were obtained in narrow ranges of reaction temperature (30 – 36°C) and molar ratio MeOH:Oil (3.6 – 4.7) for a amount of enzyme superior than 1%. When the reaction system is operated at temperatures above the central point (35°C), it is necessary to feed higher contents of enzyme to achieve higher biodiesel yields, a fact opposite to that observed when the reaction temperature of the reaction medium is reduced. This can be explained by the fact that with the reaction progress, low values of temperature and methanol excess

are not enough to shift the reaction equilibrium in direction at products. On the other hand, high temperatures and high methanol excesses are the main agents that cause the loss of the enzymatic activity of the catalyst⁴⁷. Both situations have been shown to harm the process yield. The increase of the amount of enzyme present in the reaction medium, evidently still leads to higher biodiesel yields.

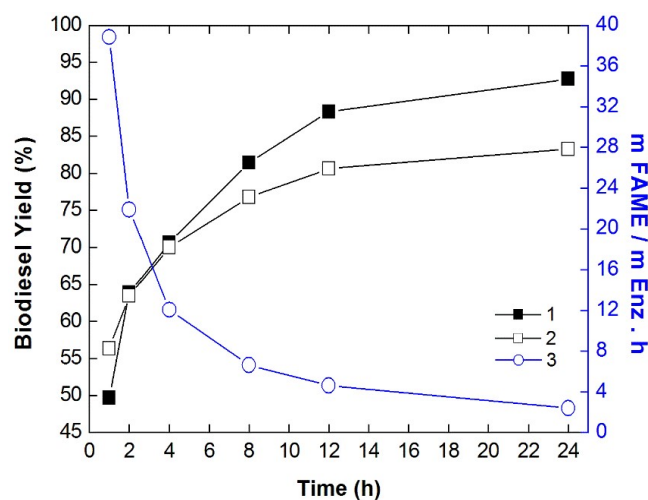
Unlike the amount of enzyme added to the process that evidently increases the process yield, the effects of reaction temperature and methanol to oil molar ratio were the two variables that demonstrated to have more significant effects on the biodiesel yield. One of the main opponents of enzymatic catalysis for biodiesel production, the lipase inactivation caused by excess of temperature and methanol, has already been the focus of several studies that have used enzymes immobilized on a polymer support^{20,27,29,47-49}. It was observed from the collected data that high reaction temperatures are not beneficial to the process yield – except for the initial moments of the reaction where it was worked with lower methanol excess, which the enzyme activity was not yet compromised (Figure 8A). As the reaction progressed, elevated temperatures further hampered the catalytic capacity of lipase (Figure 9A e Figure 9B). Likewise, when the reaction was running at higher temperature, an increase in the alcohol excess had a negative effect on the biodiesel yield since this excess contributes and accelerates the lipase inactivation. Inhibition of the enzymatic activity caused by methanol excess is attributed to the low solubility of the alcohol in the oil, which causes the formation of insoluble drops of alcohol in the system that, in contact with the enzyme, negatively affect its catalytic capacity⁵⁰.

Since this molar excess of alcohol is fundamental to dislocate the equilibrium of transesterification reaction in direction at products, some strategies to circumvent this problem have been suggested: stepwise addition of methanol at the reaction system, keeping the alcohol concentration low in the medium; use of other alcohols or use of solvents (such as hexane or t-butanol)²⁷. As it is proven that methanol is the alcohol with higher reactivity and with lower manufacturing cost than the others and the use of solvents would add more undesirable costs to the process, the stepwise addition of methanol at the reaction medium is the alternative most commonly used in enzymatic transesterification to reduce the lipase inactivation^{34,36,37}. In this work, was adopted the total addition of methanol at the reaction beginning in order to optimize the biodiesel production process under the most adverse condition possible. However, to prove the efficacy of the stepwise addition of methanol at the reaction, experiments were carried

out comparing the two reactive strategies commonly adopted by researchers. The reaction conditions utilized were the same as those obtained by CCD optimization: reaction temperature of 35°C, methanol to oil molar ratio of 4.5:1 and catalyst load of 1.45%. After 24h of reaction, with 45% of the mass of methanol added in time 0h, 20% in 3h, 20% in 5h and 15% of the mass of methanol added in the reaction time of 8h, a biodiesel yield of 92.75 % was obtained.

Figure 10 shows a comparison of the progress of the degummed soybean oil conversion to biodiesel through the total and gradual addition of methanol at the process in a reaction time of 24 hours. Biodiesel yield obtained for the situation where all the methanol was added at the beginning of the reaction was 83.25%. With the stepwise addition of alcohol at the reaction, the reagent concentration remains low in the system, decreasing inhibition effects in the activity of lipase, increasing the biodiesel yield in the process. From Figure 10 it is possible to verify that the lipase used in the experiments shows high catalytic activity during the first hours of reaction, which fell substantially with the process progress due to the maleficent action of the temperature and methanol on the enzymatic activity of the catalyst, as can be confirmed by the abrupt reduction in the production rate of product (ratio between the mass of FAME produced and the mass of enzyme used by the time).

Figure 10. Reaction kinetics comparing the total and gradual addition of methanol during the process.



- 1 – Gradual addition of MeOH: 45% in t = 0h; 20% in t = 3h; 20% in t = 5h and 15% in t = 8h of reaction;
- 2 – Total addition of MeOH on reaction beginning;
- 3 – Production rate of FAME for the transesterification process.

Similar works where the lipase Callera™ Trans L was applied as a biocatalyst for biodiesel production were addressed in recent researches. Cesarini et al. (2013) evaluated the water concentration in the transesterification reaction to produce enzymatic biodiesel from crude soybean oil, keeping the variables reaction temperature, molar excess of methanol and catalyst load fixed, where was obtained a biodiesel yield of 96.3% after 24h of reaction, with 3% (w/w) of water in the reaction medium. Nakayama et al. (2017) utilized ultrasound to increase the rate of reaction in a new two-compartment reactor model to produce enzymatic biodiesel from rapeseed oil, where after 15 hours a biodiesel yield of 91% was achieved. The use of ultrasound in the system is relevant when it is desired to decrease the reaction time, however the energy cost of the process may increase considerably. Toftgaard Pedersen et al. (2014) investigated the use of the lipase Callera™ Trans L in the production of biodiesel from rapeseed oil in an ethanolysis (ethanol as acyl acceptor), where a biodiesel yield of 98% was achieved after 24 hours of reaction, however it was necessary an elevated water concentration of 20% (w/w) in the system.

3.4 CONCLUSION

This work focused on the evaluation of reactional parameters of the enzymatic biodiesel production using the lipase *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form as catalyst. Through the Central Composite Design technique, the variables reaction temperature, methanol to oil molar ratio and catalyst load showed be significant factors in the biodiesel yield. These variables demonstrated distinct effects at the initial and final moments of the reaction, where after 8h of reaction, a biodiesel yield of 73.10% was obtained with total addition of the amount of methanol at the beginning of the reaction. In comparative terms, the stepwise addition of methanol in the reaction showed to be more effective in reducing the inhibitory effect of the presence of alcohol excess in the system: after 24h of reaction the biodiesel yield obtained was 83.25% (integral addition) and 92.75% (stepwise addition), indicating the tendency of inhibition of the enzyme catalytic activity in the presence of alcohol.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express thier sincere gratitude to National Council of

Technological and Science Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support for this project.

REFERENCES

- (1) Abbaszaadeh, A.; Ghobadian, B.; Omidkhah, M. R.; Najafi, G. *Energy Convers. Manag.* **2012**, *63*, 138–148.
- (2) Baskar, G.; Aiswarya, R. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *57*, 496–504.
- (3) Aransiola, E. F.; Ojumu, T. V.; Oyekola, O. O.; Madzimbamuto, T. F.; Ikhu-Omoregbe, D. I. O. *Biomass and Bioenergy* **2014**, *61*, 276–297.
- (4) ANP. Anuário e Dados Estatísticos
<http://www.anp.gov.br/?pg=82730&m=vendas&t1=&t2=vendas&t3=&t4=&ar=0&ps=1&1476194941245> (accessed Oct 11, 2016).
- (5) Avhad, M. R.; Marchetti, J. M. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *50*, 696–718.
- (6) Verma, P.; Sharma, M. P. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *62*, 1063–1071.
- (7) Kılıç, M.; Uzun, B. B.; Pütün, E.; Pütün, A. E. *Fuel Process. Technol.* **2013**, *111*, 105–110.
- (8) Bharathiraja, B.; Chakravarthy, M.; Kumar, R. R.; Yuvaraj, D.; Jayamuthunagai, J.; Kumar, R. P.; Palani, S. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *38*, 368–382.
- (9) Costa, A. O.; Oliveira, L. B.; Lins, M. P. E.; Silva, A. C. M.; Araujo, M. S. M.; Pereira, A. O.; Rosa, L. P. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2013**, *27*, 407–412.
- (10) Rico, J. A. P.; Sauer, I. L. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *45*, 513–529.
- (11) Wan Ghazali, W. N. M.; Mamat, R.; Masjuki, H. H.; Najafi, G. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *51*, 585–602.
- (12) Özener, O.; Yüksek, L.; Ergenç, A. T.; Özkan, M. *Fuel* **2014**, *115*, 875–883.
- (13) Hoekman, S. K.; Robbins, C. *Fuel Process. Technol.* **2012**, *96*, 237–249.
- (14) Chavan, S. B.; Kumbhar, R. R.; Kumar, A.; Sharma, Y. C. *Energy & Fuels* **2015**, *29* (7), 4393–4398.
- (15) Issariyakul, T.; Dalai, A. K. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *31*, 446–471.
- (16) Hama, S.; Kondo, A. *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 386–395.
- (17) Duarte, S. H.; del Peso Hernández, G. L.; Canet, A.; Benaiges, M. D.; Maugeri, F.; Valero, F. *Bioresour. Technol.* **2015**, *183*, 175–180.
- (18) Chen, Y.; Xiao, B.; Chang, J.; Fu, Y.; Lv, P.; Wang, X. *Energy Convers. Manag.* **2009**, *50* (3), 668–673.
- (19) Guldhe, A.; Singh, B.; Rawat, I.; Permaul, K.; Bux, F. *Fuel* **2015**, *147*, 117–124.
- (20) Christopher, L. P.; Hemanathan Kumar; Zambare, V. P. *Appl. Energy* **2014**, *119*, 497–520.
- (21) Nouredini, H.; Gao, X.; Philkana, R. S. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96* (7), 769–777.
- (22) Bonet-Ragel, K.; Canet, A.; Benaiges, M. D.; Valero, F. *Fuel* **2015**, *161*, 12–17.
- (23) Tupufia, S. C.; Jeon, Y. J.; Marquis, C.; Adesina, A. A.; Rogers, P. L. *Fuel Process. Technol.* **2013**, *106*, 721–726.
- (24) Kohepka, D. M.; Dill, L. P.; Couto, G. H.; Krieger, N.; Ramos, L. P. *Energy & Fuels* **2015**, *29* (12), 8074–8081.
- (25) Luković, N.; Knežević-jugović, Z.; Bezbradica, D. *Altern. fuel* **2009**, 47–72.
- (26) Jegannathan, K. R.; Jun-Yee, L.; Chan, E. S.; Ravindra, P. *Fuel* **2010**, *89* (9),

- 2272–2277.
- (27) Guldhe, A.; Singh, B.; Mutanda, T.; Permaul, K.; Bux, F. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *41*, 1447–1464.
 - (28) Guan, F.; Peng, P.; Wang, G.; Yin, T.; Peng, Q.; Huang, J.; Guan, G.; Li, Y. *Process Biochem.* **2010**, *45* (10), 1677–1682.
 - (29) Szczesna Antczak, M.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S. *Renew. Energy* **2009**, *34* (5), 1185–1194.
 - (30) Fjerbaek, L.; Christensen, K. V.; Norddahl, B. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102* (5), 1298–1315.
 - (31) Cesarini, S.; Haller, R. F.; Diaz, P.; Nielsen, P. M. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7* (1), 29.
 - (32) Bezerra, T.; Gomes, M.; Eduardo, F.; Rodrigues, A.; Thomas, D.; Arruda, D.; Maria, N.; Silva, P.; Barbosa, M.; Costa, K.; Araújo, D. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *91*, 264–271.
 - (33) Bautista, L. F.; Vicente, G.; Mendoza, Á.; González, S.; Morales, V. *Energy & Fuels* **2015**, *29* (8), 4981–4989.
 - (34) Nordblad, M.; Silva, V. T. L.; Nielsen, P. M.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (12), 2446–2453.
 - (35) Amoah, J.; Ho, S. H.; Hama, S.; Yoshida, A.; Nakanishi, A.; Hasunuma, T.; Ogino, C.; Kondo, A. *Bioresour. Technol.* **2016**, *211*, 224–230.
 - (36) Cesarini, S.; Diaz, P.; Nielsen, P. M. *Process Biochem.* **2013**, *48* (3), 484–487.
 - (37) Firdaus, M. Y.; Guo, Z.; Fedosov, S. N. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *105*, 52–61.
 - (38) Yücel, Y. *Fuel Process. Technol.* **2012**, *99*, 97–102.
 - (39) Dharma, S.; Masjuki, H. H.; Ong, H. C.; Sebayang, A. H.; Silitonga, A. S.; Kusumo, F.; Mahlia, T. M. I. *Energy Convers. Manag.* **2016**, *115*, 178–190.
 - (40) Wan Omar, W. N. N.; Saidina Amin, N. A. *Biomass and Bioenergy* **2011**, *35* (3), 1329–1338.
 - (41) Verma, P.; Sharma, M. P.; Dwivedi, G. *Fuel* **2016**, *183*, 185–194.
 - (42) Kiran, B.; Pathak, K.; Kumar, R.; Deshmukh, D. *Ecol. Eng.* **2016**, *92*, 73–81.
 - (43) Razack, S. A.; Durairasan, S. *Waste Manag.* **2015**, *47*, 98–104.
 - (44) Hamze, H.; Akia, M.; Yazdani, F. *Process Saf. Environ. Prot.* **2015**, *94* (C), 1–10.
 - (45) Gupta, J.; Agarwal, M.; Dalai, A. K. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *8*, 112–120.
 - (46) Halim, S. F. A.; Kamaruddin, A. H.; Fernando, W. J. N. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (2), 710–716.
 - (47) Toftgaard Pedersen, A.; Nordblad, M.; Nielsen, P. M.; Woodley, J. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *105*, 89–94.
 - (48) Kaieda, M.; Samukawa, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91* (1), 12–15.
 - (49) Hernández-Martín, E.; Otero, C. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99* (2), 277–286.
 - (50) Ognjanovic, N.; Bezbradica, D.; Knezevic-Jugovic, Z. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (21), 5146–5154.
 - (51) Du, W.; Li, W.; Sun, T.; Chen, X.; Liu, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79* (3), 331–337.
 - (52) Nakayama, R.; Imai, M.; Woodley, J. M. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2017**, *92* (3), 657–665.

4 PRODUÇÃO DE BIODIESEL ENZIMÁTICO USANDO UM *BLEND* DE MATÉRIAS-PRIMAS COMESTÍVEIS E NÃO-COMESTÍVEIS E INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA NA REAÇÃO

O artigo a seguir será submetido a um periódico da área de Engenharias II.

Production of enzymatic biodiesel using blend of edible and nonedible raw materials and influence of water concentration in the reaction

J. H. C. Wancura^a, D. V. Rosset^a, M. Brondani^a, M. V. Tres^b, S. L. Jahn^a

^a Chemical Engineering Department, Federal University of Santa Maria, Brazil

^b Laboratory of Agricultural Processes Engineering (LAPE), Federal University of Santa Maria, Campus of Cachoeira do Sul, Brazil.

ABSTRACT

This work investigates the use of a blend of edible (degummed soybean oil) and nonedible (deacidified beef tallow) raw materials as an alternative feedstock to the biodiesel production process through enzymatic catalysis. As biocatalyst, the liquid formulation of *Thermomyces lanuginosus* lipase (Callera™ Trans L) was used, an option to reduce the costs of the bioprocess instead of the common utilization of immobilized lipases in expensive polymer supports. Another point that was also evaluated in this study is the influence of the water concentration in the system during the reaction, a keypoint to minimize undesirable inhibitions of the lipase in the presence of methanol. Under the reaction conditions of 35°C, methanol to feedstock molar ratio of 4.5:1 and 1.45% of catalyst load, the best performance of the process was reached when using 9% of water concentration in the medium – biodiesel yield of 74.5% after 8 hours of reaction. In terms of the use of beef tallow blended with soybean oil as feedstock for the reaction, the best biodiesel yield was obtained when 100% of beef tallow was used in the process – 84.6% after 8 hours of reaction – showing that waste raw materials, such tallow, can be used as an alternative to the production of enzymatic biodiesel.

Keywords: Biodiesel, Tallow, Blend, Callera™ Trans L, Methanol, Transesterification.

4.1 INTRODUCTION

With the advent of biodiesel (fatty acid methyl esters - FAME) in the world energy matrix as a renewable fuel capable of replacing petroleum diesel, the transesterification via homogeneous alkaline catalysis has consolidated as a major production route of the biofuel in question ^{1,2}. Although it presents high reaction rates in short intervals of time, the alkaline transesterification for biodiesel production has some drawbacks ³. Among the main ones can be mentioned high energy demand, difficulty in recovering the glycerol – byproduct of the reaction –, the need to use a raw material with a low content of free fatty acids in the process to avoid undesirable reactions of saponification, besides the generation of a large amount of alkaline waste water from the product purification stages ⁴⁻⁶.

In this context, the use of enzymes as catalyst for the transesterification of oleaginous sources for biodiesel production has gained notoriety in recent years, since this route can overcome several drawbacks of the alkaline route ^{7,8}. Lipases (triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) are enzymes that have the capacity to catalyze the hydrolysis of the carboxylic ester group link of the triglyceride molecules to form esters of fatty acids, glycerol, mono and diglycerides ⁹. Besides to being considered a "greener route" due to its environmental benefits ¹⁰, the biodiesel production through enzymatic catalysis has the advantages of producing a high purity biodiesel without the need for purification steps, to facilitate the separation of the products from the reaction and to present mild operating conditions ¹¹. Furthermore there is the elimination of the problems with the processing of raw materials with high acidity content, since lipases have the ability to simultaneously catalyze triglycerides and free fatty acids present in the raw material by transesterification and esterification ¹².

One of the main obstacles for the application of lipases in biodiesel production is the high cost of this biocatalyst ^{13,14}. To mitigate this situation, some authors propose to immobilize the enzyme in a polymeric support, allowing its reuse, which would lead to the minimization of process costs ^{10,15,16}. However, the most suitable materials for the immobilization process are not cheap, adding another cost source to the technique, being that a high number of reuses of the biocatalyst would be necessary to compensate the cost of the support ¹⁷. In this sense, some studies published in recent years indicate the use of lipases in the soluble form as an alternative to the biodiesel production via enzymatic catalysis, since the elimination of the enzyme immobilization

step would reduce considerably costs of the process. ^{8,18,19}.

In addition to the considerable cost of lipase, the inevitable loss of its enzymatic activity in the presence of the main reactant used in the transesterification reaction – methanol – is another critical factor in the utilization of enzymes to produce biodiesel ¹³. Methanol is the most commonly alcohol utilized in transesterification reactions due to its reactivity, volatile nature and lower cost compared to other alcohols ¹¹. Stoichiometrically, the transesterification reaction of any oil requires three moles of alcohol for each mole of oil. Since transesterification is a reversible reaction, an excess of alcohol is required to shift the reaction equilibrium to the formation of products. This excess of alcohol is the main agent that causes lipase inhibition, resulting in the loss of its catalytic capacity ²⁰. The use of a liquid formulation of lipase instead of immobilized entail alterations in the reaction medium, mainly by the introduction of water into the system, promoting the hydrolysis of triglycerides and benefiting the system with the dilution of the alcohol present in the medium, minimizing the inhibition effect on enzyme ¹⁸. Thus, to minimize these inhibitory effects and consequently maintain the process efficiency at a satisfactory level, the amount of water added to the reaction is a key point in maintaining the structure of the enzyme and its activity ²¹.

Another point that has been explored in recent years when it comes to biodiesel is the use of nonedible raw materials for the production of biofuels ²²⁻²⁴. Because they are treated in many cases of waste, these materials have low aggregate value, which makes them an interesting alternative to be used as raw material in the production of enzymatic biodiesel, especially in the reduction of process costs. Moreover, the fact that the enzymatic process is not sensitive to raw materials with high acidity values is another point that favors the utilization of these residues in the biotechnological technique, since high acidity values are characteristic of these types of materials ²⁵. Besides that, it is reported by researchers that the use of edible raw materials for biodiesel production can lead to negative impacts such as rising food prices in developing countries ²⁶. In Brazil, for example, with 15%, animal tallow is the second most used raw material in biodiesel production ²⁷, behind only of soybean oil with 75.4% – where much of this amount is blended with raw materials of higher value, such as soybean oil, in order to minimize costs involved in the biofuel production.

The aim of this work is to evaluate the utilization of treated beef tallow blended in different proportions with degummed soybean oil for biodiesel production, using lipase *Thermomyces lanuginosus* in its liquid formulation as catalyst. In addition, the

influence of the concentration of water added to the reaction medium was evaluated as a way of reducing the inhibitory effects caused by methanol to the enzyme.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Materials

Desacidified waste beef tallow and degummed soybean oil used in the experiments was supplied by Olfar Alimento e Energia S/A (Erechim, Brazil). The tallow contained 0.32% of free fatty acids, 95 ppm soaps, 0.8% phosphorus and 0,09% water and the oil contained 0.16% of free fatty acids, 128 ppm soaps, 24.5 ppm phosphorus and 0.09% water. Methanol, isooctane, methyl tricosanoate and a mixed fatty acid methyl ester standard (37 components), utilized in the chromatographic analysis, were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). The enzyme utilized in the reactions was the liquid formulation of lipase *Thermomyces lanuginosus*, under tradename Callera™ Trans L (enzymatic activity of approximately 100,000 LU.g⁻¹), provided by Novozymes (Denmark).

4.2.2 Transesterification Reaction Assays

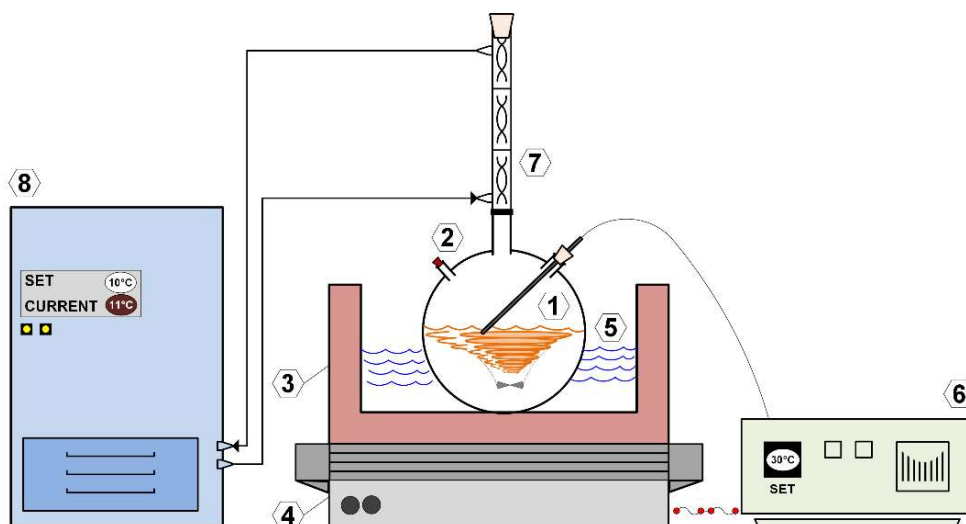
The reaction system used to perform the experiments consisted of a 250 mL 3-way round bottom flask equipped with a reflux condenser, water bath, temperature controller and magnetic stirrer, according Figure 11.

At all experiments was utilized 80g of fatty acids, a molar excess of methanol relative to the oil source of 4.5:1, 1.45% of catalyst (m/m, relative to the mass of fatty acids) and a reaction temperature of 35°C, according to previous study conducted by Wancura et al (in press). The stirring speed of the reaction system was set at 300rpm at all experiments. Experiments were performed by varying the amount of distilled water added to the reaction in 0.0% (ie, no water was added to the system, meaning that the water present in the reaction is only present in the soluble lipase), 3.0%, 6.0%, 9.0% and 12.0% (m/m, relative to the mass of degummed soybean oil used).

The influence of the substitution of degummed soybean oil by pre-treated beef tallow on biodiesel yield was also evaluated. The percentages analyzed were 0, 25, 50, 75 and 100% of oil replacement by tallow. In these assays, the water concentration

in the medium was set at 6% (m/m).

Figure 11. Reaction system utilized to perform the assays (1. thermocouple, 2. opening for sample collection, 3. thermal bath container, 4. magnetic stirrer, 5. water bath, 6. temperature controller, 7. reflux condenser and 8. ultrathermostatic bath).



The experimental procedure consisted of determining the mass of raw material and enzyme to be used in the test, adding them to the flask and then coupling it to the condensation and temperature control system. After the system reached the pre-defined reaction temperature, the methanol diluted in distilled water was added in a single step, moment considered as the reaction beginning. All experiments were finalized after 480 minutes of reaction. The samples that posteriorly were analyzed by gas chromatography to quantify the FAME obtained and thus calculate the biodiesel yield were centrifuged at 4,000rpm for 5 minutes at a temperature of 15°C for phases separation, being that the upper layer (FAME) was collected and stored.

4.2.3 Gas Chromatography

Gas chromatography for FAME quantification and subsequent calculation of biodiesel yield were performed using a Shimadzu GC-2010 Plus gas chromatograph, equipped with an autoinjector AOC-20i, an autosampler AOC-20s and a flame ionization detector. A Zebron ZB-WAX plus (Phenomenex, Estados Unidos) with 30.0m x 0.32mm I.D. x 0.25µm film thickness capillary column was used for the compounds separations. Helium was used as carrier gas at a split ratio 1:50 and a

column flow rate of 1.24 mL.min⁻¹. Methyl tricosanoate (C23:0) was used as internal standard and isoctane as solvent. Peaks identification in the chromatograms was realized by analysis of a fatty acid methyl esters standards mix. Injector temperature was set to 242°C and the detector temperature set to 250°C. The oven temperature was started at 150°C, increased at 10°C.min⁻¹ to 200°C and then increased at a rate of 1°C.min⁻¹ to 242°C.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Raw Material Composition

The fatty acids composition of the raw materials utilized in the assays is showed in the Table 9. In order to determine this composition, the fatty acids present in the raw material were converted into fatty acid methyl esters, using a alkaline catalysis, since this route has a high conversion in a short period of time, using a methodology proposed by Alcantara et al. (2000). Identification of the products was performed by comparing the chromatogram of the sample with the chromatogram of a standard formed by the mixture of 37 methyl esters (from C14:0 to C24:0).

The fatty acid composition found for the degummed soybean oil utilized in the assays is the average composition normally found in researches of the area, where linoleic acid is the predominant substance in the samples ²⁹. For pre-treated beef tallow, the predominant fatty acids were oleic and linoleic acid, and the sample showed traces of palmitoleic acid, not detected in degummed soybean oil.

Table 9. Composition of the raw material used in the transesterification assays.

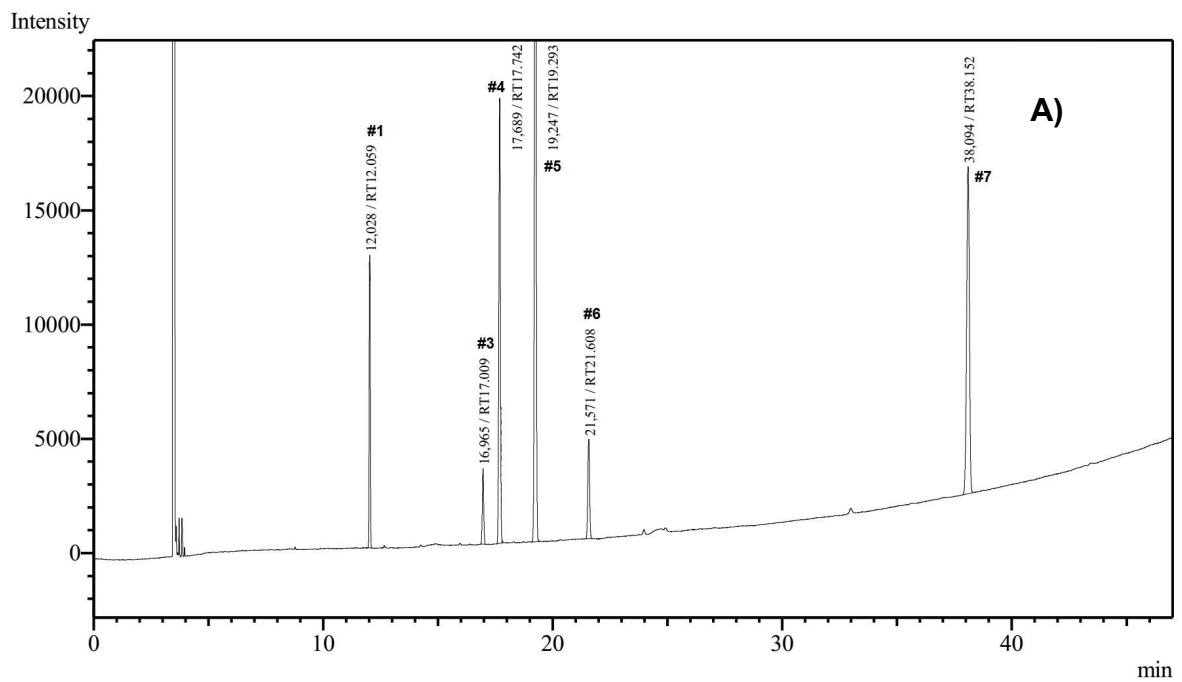
Fatty Acid	Tallow Composition	Soybean Oil Composition
Palmitic Acid (C16:0)	13.0%	10.4%
Palmitoleic Acid (C16:1)	4.3%	-
Steraric Acid (C18:0)	5.4%	3.6%
Oleic Acid (C18:1)	35.4%	25.8%
Linoleic Acid (C18:2)	38.8%	53.2%
Linolenic Acid (C18:3)	3.1%	7.0%

4.3.2 GC Analysis

Figure 12 shows the typical chromatograms of the biodiesel samples obtained by the tests performed with degummed soybean oil (12A) and pre-treated beef tallow (12B). By comparing these chromatograms and the chromatogram of a standard formed by the mixture of 37 methyl esters (from C14:0 to C24:0), it was possible to confirm the formation of biodiesel (FAME) and to identify each substance of the chromatographic analysis.

Calculation of the FAME yield was done by quantifying the ester content present in the samples, where only the major peak areas were considered, which are identified in Table 10.

Figure 12. Typical chromatogram of the biodiesel samples obtained from (A) degummed oil and (B) beef tallow.



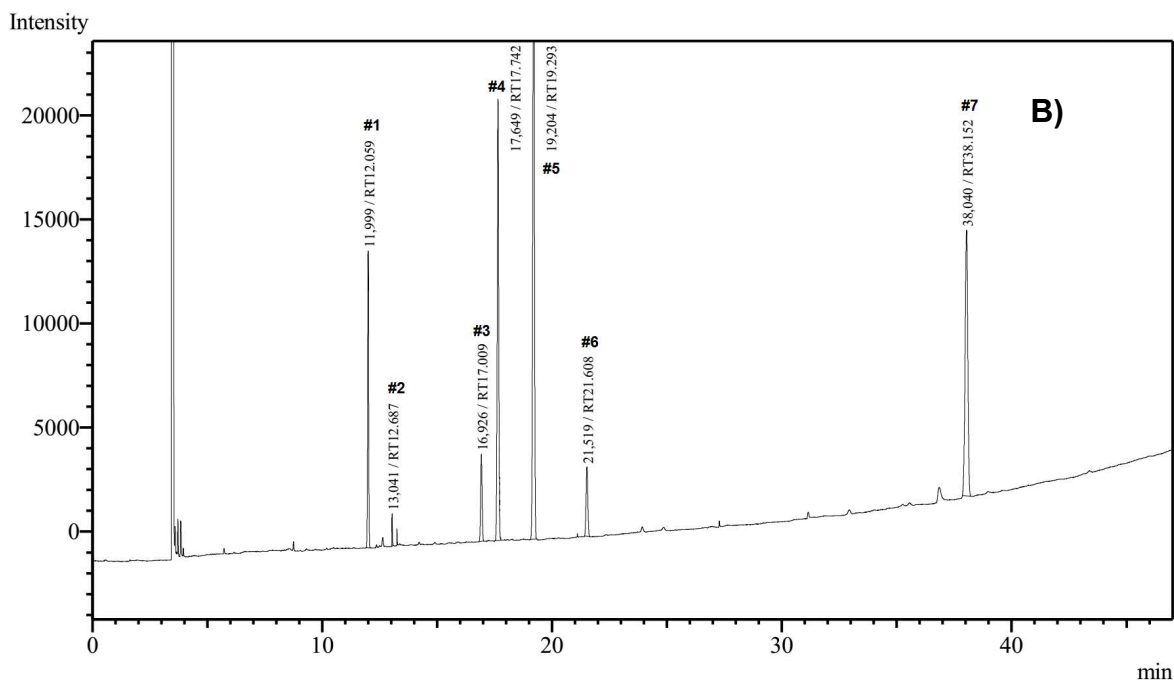


Table 10. Identification of the components present in the FAME samples.

Peak	Retention Time	Chemical Structure	Component
#1	12.06	C16:0	Methyl palmitate
#2	12.69	C16:1	Methyl palmitoleate
#3	17.01	C18:0	Methyl stearate
#4	17.74	C18:1	Methyl oleate
#5	19.29	C18:2	Methyl linoleate
#6	21.61	C18:3	Methyl linolenate
#7	38.15	C23:0	Methyl tricosanoate ^a

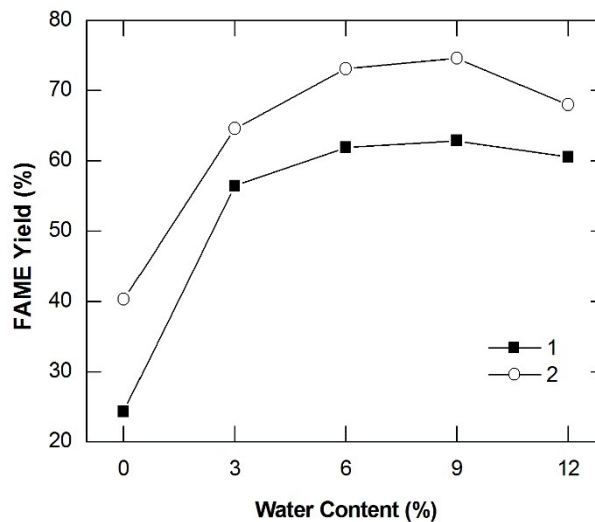
^a Internal standard

4.3.3 Influence of Water Content in the Reaction

The influence of water addition to the reaction system was investigated in proportions of 0, 3, 6, 9 and 12% (w/w, relative to the amount of degummed soybean oil present in the reaction medium) in the biodiesel yield after 45 and 480 minutes of reaction – presented in Figure 13. By the analysis of the Figure, it is possible to observe that the behavior for both situations is similar. It was verified that the FAME yield increased with the increase of the water content in the reaction medium, showing an apex with 9%, where the biodiesel yield reached 63% and 74.5% after 45 and 480 minutes of reaction respectively, decreasing to upper values. The yield verified for the

initial point, where no additional water was added to the reaction medium, was 24% and 40% after 45 and 480 minutes, respectively. Taking this assay as a reference, a considerable increase in FAME yield can be observed with the addition of 3% (w/w) of water to the reaction, reaching yields of 56% after 45 minutes of reaction and 64% after 480 minutes of reaction, representing an increase of 133% and 60% in the biodiesel yield, respectively.

Figure 13. Influence of water content in the biodiesel yield.



(1) Samples collected in 45 minutes of reaction; (2) Samples collected in 480 minutes of reaction.

For low concentrations of water in the reaction medium, the inhibitory action of alcohol on lipase showed its negative effect on FAME yield. In comparison to the assay where no water was added to the system, with 3% of water added, a leap in biodiesel yield was observed, especially in the initial moments of the reaction. This is associated with an increase in the available interfacial area propitiated by the addition of water to the reaction. However, with the progress of the reaction, the biodiesel yield does not develop substantially because although this amount of water added to the reaction benefits the process, it is still insufficient to stop the inhibition of the enzyme caused by methanol. Toftgaard Pedersen et al. (2014) cite the need to achieve a minimum and satisfactory interfacial area in systems with low water concentrations in the reaction system, since the polar nature of methanol will concentrate it in the aqueous phase of the medium, where lipase acts, favoring denaturation of the biocatalyst. Therefore, the low biodiesel yield for low concentrations of water added to the system is associated to an insufficient available interfacial area, besides the inactivation of lipase by

methanol. The water concentration present in the reaction medium is a key point for the catalytic stability of the lipase. An increase in the amount of water to a certain point in the reaction may prevent the inhibitory effect of methanol on lipase, resulting in an increase in its catalytic efficiency⁵. In addition, there is an increase in the interfacial area between the phases aqueous and organic, where lipase acts, minimizing hydrolytic reactions of the substrate, and consequently maximizing lipase activity¹⁰.

On the other hand, in situations where 12% of water was added in the reaction medium, a decrease in FAME yield was observed in comparison with the verified data for 9% of water added to the system. This behavior can be attributed to favoring the hydrolysis reaction of the substrate used to the detriment of the transesterification reaction, behaviors verified by other researchers in a similar reaction system^{17,20}.

4.3.4 Beef Tallow as Feedstock for the Reaction

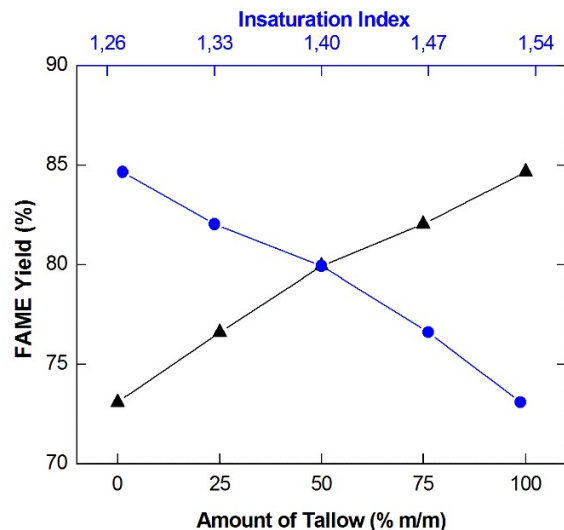
The efficiency of the liquid formulation of CalleraTM Trans L lipase when utilized as catalyst for a transesterification involving a mixture of degummed soybean oil and pretreated beef tallow was evaluated in this work. The degummed soybean oil used in the assays was gradually being replaced by beef tallow, with tallow proportions varying of 25, 50, 75 and 100%. The reaction conditions were fixed as 35°C of reaction temperature, 4.5:1 molar ratio of methanol to feedstock, 1.45% of loading amount of catalyst and 6% of distilled water added to the process.

Figure 14 presents data of the influence of the percentage of beef tallow blended to the degummed soybean oil in the biodiesel yield for 480 minutes of reaction, 35°C of temperature, 4.5:1 methanol to oil molar ratio and 1.45% of lipase. It was observed that the biodiesel yield increased proportionally with the elevation of the amount of tallow mixed with soybean oil. The highest biodiesel yield was 84.6% when 100% of beef tallow was used as feedstock for the process, while the biodiesel yield when using degummed soybean oil pure was 73.1%. These results show that the fatty acids composition involved in the transesterification process, using enzyme as a catalyst, affects the rate with which the reaction is processed. This research suggests that a possible explanation for this behavior may be related to the chemical structure of the raw material used in the experiments, more precisely to the number of double bonds of the fatty acid molecules that make up the feedstock. In this sense, the concept of insaturation index was introduced in the analysis, being defined by Equation 4:

$$I_s = (X_{SO} \cdot \sum C_{i,SO} \cdot n_i) + (X_{AT} \cdot \sum C_{i,AT} \cdot n_i) \quad (4)$$

where I_s is the insaturation index of the reaction, X_{SO} e X_{AT} are the mass fractions of soybean oil and beef tallow in the blend respectively, $C_{i,SO}$ e $C_{i,AT}$ is the mass fraction of the fatty acid “ i ” in soybean oil and beef tallow respectively and n_i is the number of insaturations (double bonds) present in the fatty acid “ i ” in question. Thus, the value of the insaturation index I_s is related to the average insaturation of the fatty acid used in the transesterification reaction.

Figure 14. FAME yield produced from blend of degummed soybean oil and treated beef tallow considering the amount of tallow in the raw material (triangles) and insaturation index (circles).



From the analysis of the obtained results (Figure 14, circles), it can be observed that the FAME yield increases, practically linear, according to the reduction of the insaturation index of the mixture of fatty acids that compose the raw material. These results show that the biodiesel yield increases when the raw material insaturation is reduced by the increase in the beef tallow content in the composition of the fatty acids. This behavior may be related to the solubility of methanol in the fatty acid. Galvão et al. (2013) verified that different fatty acids affect the methanol solubility of different ways. Calculating the Insaturation Index I_s for the fatty acids used in this research, it was observed that the lower the insaturation index of the compound, lower the amount of methanol dissolved. Thus, it can be assumed that, under the reaction conditions employed in this research, the amount of methanol dissolved in the beef tallow is lower

than in the degummed soybean oil, affecting the biodiesel yield in a positive way. Another parameter that also could affect the yield may be related to the electron density of the fatty acid, affecting the interaction with the active sites of the enzymes. Thus, the lower the electron density of the fatty acids in question, the easier the interaction between lipase and substrate, favoring the reaction rate and consequently the process. However, these theories need further substantiation and analysis, being that will serve as basis for future research.

Table 11 presents some works published in recent years about the use of waste feedstocks for biodiesel production, using different types of catalysts. There are few studies where tallow is used as raw material for the production of biodiesel via enzymatic catalysis, being that the most publications use chemical catalysis (alkaline or acidic) as a methodology for the production of the biofuel. Adewale et al. (2015) utilized the lipase *Candida antarctica* immobilized on a support to produce biodiesel from waste beef tallow, reaching a yield of 85.6% after 20 minutes of reaction, being the process assisted by ultrasound and with a catalyst load of 6%. This work, which dismissed the use of lipase immobilization through the use of its liquid formulation, reached 68.3% FAME yield from beef tallow after 45 minutes of reaction and 84.6% after 480 minutes of process. It is believed that the yield obtained by the cited authors can be attributed to the high content of catalyst employed in the reaction system (approximately four times higher than that used in this work).

Therefore, the results showed that the lipase Callera™ Trans L has great potential to be utilized in transesterification reactions for biodiesel production from nonedible materials, such as waste tallow.

Table 11. Biodiesel production using waste tallow and blend with edible and nonedible as feedstock.

Feedstock	Catalyst Utilized	Reaction Conditions	Yield (%)	Reference
Waste beef tallow	Immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase B assisted with ultrasound	Fat:methanol molar ratio of 1:4, 6% catalyst, 20 min of reaction and ultrasonic amplitude 40% at 5Hz	85.6	Adewale et al. 2015
Waste tallow	Sulfuric acid	50°C, fat:methanol molar ratio of 1:30, 25% catalyst, 24h of reaction	99	Bhatti et al. 2008
Duck tallow	Potassium hydroxide	65°C, methanol:fat molar ratio of 6:1, 1% catalyst, 3h of reaction	97	Chung et al. 2009
Mixture of edible and nonedible oils	Potassium hydroxide	43.5°C, methanol:oil molar ratio of 8.8:1, 1.9% catalyst, 58 min of reaction	96.4	Gupta et al. 2016
Waste goat tallow	Sulfuric acid in a infrared radiation assisted reactor (IRAR)	69.97°C IRAR, Methanol:tallow molar ratio of 31.88:1, 59.93% catalyst, 2.5h of reaction	96.7	Chakraborty and Sahu 2014
Beef tallow	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase in liquid form	35°C, methanol:tallow molar ratio of 4.5:1, 1.45% catalyst, 6% water added to system, 45 min of reaction	68.3	Present work
Beef tallow	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase in liquid form	35°C, methanol:tallow molar ratio of 4.5:1, 1.45% catalyst, 6% water added to system, 480 min of reaction	84.6	Present work

4.4 CONCLUSION

The objective of this work was to investigate the efficacy of the liquid formulation of the *Thermomyces lanuginosus* lipase as catalyst for a transesterification reaction for biodiesel production, where was evaluated the effect of the water content present in the process and the proportional substitution of soybean oil by beef tallow.

In tests using degummed soybean oil as raw material, it was verified that the addition of water to the reaction medium was beneficial to biodiesel yield until certain point. The best results were verified for the addition of 9% (w/w) of water to the reaction medium, obtaining biodiesel yields in the order of 74.5% after 480 minutes of reaction, against 40% of FAME yield when no water was added into the system (considering the same reaction time). Such behavior was attached to the minimization of the inhibitory effects caused by methanol to lipase in the presence of larger amounts of water

In relation to the effect of the blend of an edible raw material (degummed soybean oil) and another nonedible (beef tallow), it was verified that, under the same reaction conditions, the biodiesel yield is higher when higher is the proportions of tallow present in the feedstock. Such behavior was attributed to the lower insaturation index verified in the tallow composition.

The results of this study demonstrated that lipase Callera™ Trans L presents good prospects for being used as a biocatalyst in the transesterification reaction aimed at the biodiesel production from nonedible raw materials.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the National Council of Technological and Science Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support for this project.

REFERENCES

- (1) Aransiola, E. F.; Ojumu, T. V.; Oyekola, O. O.; Madzimbamuto, T. F.; Ikhu-Omoregbe, D. I. O. *Biomass and Bioenergy* **2014**, *61*, 276–297.
- (2) Abbaszaadeh, A.; Ghobadian, B.; Omidkhah, M. R.; Najafi, G. *Energy Convers. Manag.* **2012**, *63*, 138–148.
- (3) Avhad, M. R.; Marchetti, J. M. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *50*, 696–

- 718.
- (4) Mardhiah, H. H.; Ong, H. C.; Masjuki, H. H.; Lim, S.; Lee, H. V. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *67*, 1225–1236.
 - (5) Szczesna Antczak, M.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S. *Renew. Energy* **2009**, *34* (5), 1185–1194.
 - (6) Tu, Q.; Lu, M.; Yang, Y. J.; Scott, D. *Clean Technol. Environ. Policy* **2016**, *18* (2), 507–516.
 - (7) Nelson, L. a; Foglia, T. a; Marmer, W. N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73* (8), 1191–1195.
 - (8) Nordblad, M.; Silva, V. T. L.; Nielsen, P. M.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (12), 2446–2453.
 - (9) Luković, N.; Knežević-jugović, Z.; Bezbradica, D. *Altern. fuel* **2009**, 47–72.
 - (10) Guldhe, A.; Singh, B.; Mutanda, T.; Permaul, K.; Bux, F. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *41*, 1447–1464.
 - (11) Christopher, L. P.; Hemanathan Kumar; Zambare, V. P. *Appl. Energy* **2014**, *119*, 497–520.
 - (12) Firdaus, M. Y.; Guo, Z.; Fedosov, S. N. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *105*, 52–61.
 - (13) Hama, S.; Kondo, A. *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 386–395.
 - (14) Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2007**, *11* (6), 1300–1311.
 - (15) Chen, Y.; Xiao, B.; Chang, J.; Fu, Y.; Lv, P.; Wang, X. *Energy Convers. Manag.* **2009**, *50* (3), 668–673.
 - (16) Köse, Ö.; Tüter, M.; Aksoy, H. A. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83* (2), 125–129.
 - (17) Cesarini, S.; Diaz, P.; Nielsen, P. M. *Process Biochem.* **2013**, *48* (3), 484–487.
 - (18) Toftgaard Pedersen, A.; Nordblad, M.; Nielsen, P. M.; Woodley, J. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *105*, 89–94.
 - (19) Price, J.; Nordblad, M.; Woodley, J. M.; Huusom, J. K. *Fed-batch feeding strategies for enzymatic biodiesel production*; 2014; Vol. 19.
 - (20) Yücel, Y. *Fuel Process. Technol.* **2012**, *99*, 97–102.
 - (21) Li, Y.; Huang, Y.; Du, W.; Dai, L.; Liu, D. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2015**, *20* (5), 965–970.
 - (22) Chung, K. H.; Kim, J.; Lee, K. Y. *Biomass and Bioenergy* **2009**, *33* (1), 155–158.
 - (23) Adewale, P.; Dumont, M. J.; Ngadi, M. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *27*, 1–9.
 - (24) Bhatti, H. N.; Hanif, M. A.; Qasim, M.; Ata-ur-Rehman. *Fuel* **2008**, *87* (13-14), 2961–2966.
 - (25) Gupta, J.; Agarwal, M.; Dalai, A. K. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *8*, 112–120.
 - (26) Khan, T. M. Y.; Atabani, A. E.; Badruddin, I. A.; Badarudin, A.; Khayoon, M. S.; Triwahyono, S. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *37*, 840–851.
 - (27) Biofuels, B. A. of P. N. G. and. *Monthly Bulletin of Biodiesel*; 2016.
 - (28) Alcantara, R.; Amores, J.; Canoira, L.; Fidalgo, E.; Franco, M. J.; Navarro, A. **2000**, *18*.
 - (29) Ma, F.; Hanna, M. a. *Bioresour. Technol.* **1999**, *70*, 1–15.
 - (30) Galvão, A. C.; Boschi, R.; Coelho, K. A.; Machado, D. C.; Zuqui, V.; Robazza, S. *Ciência E Nat.* **2013**, *35* (2), 311–317.
 - (31) Chakraborty, R.; Sahu, H. *Appl. Energy* **2014**, *114*, 827–836.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos através deste trabalho propiciaram a elaboração de dois artigos de pesquisa que serão publicados em periódicos da área. Com o objetivo de avaliar a produção de biodiesel utilizando uma enzima como catalisador, interessantes resultados foram alcançados, os quais serão discutidos de forma global a seguir.

Em ambos os artigos foi utilizado como catalisador a formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus*, com nome comercial de Callera™ Trans L, desenvolvida e comercializada pela empresa Novozymes.

No primeiro trabalho foram avaliados os principais parâmetros básicos da reação de transesterificação para produção de biodiesel: temperatura reacional, excesso molar de metanol em relação ao óleo utilizado e quantidade de lipase utilizada na reação. Para isso, utilizou-se de um planejamento experimental com o intuito de varrer uma larga faixa de variáveis em um número não tão elevado de experimentos. Através do modelo estatístico obtido, as três variáveis analisadas mostraram ser fatores significativos para a variável resposta considerada, na ocasião o rendimento de biodiesel, sendo que com uma confiabilidade de 95%, o modelo estatístico obtido mostrou ser representativo. Analisando os rendimentos de biodiesel obtidos em dois momentos distintos da reação (após 45 minutos de reação e ao final da mesma, após 480 minutos), conclui-se que as variáveis analisadas demonstraram ter efeitos distintos sobre a variável resposta analisada, comportamento em grande parte atribuído ao efeito inibitório causado pelo metanol a lipase. Também se verificou que a forma como o metanol é alimentado ao processo é um fator de considerável importância para obtenção de eficiências aceitáveis na rota biológica em questão. Verificou-se que nos momentos iniciais da reação, onde a atividade catalítica da enzima não estava tão comprometida pela ação desnaturante do metanol e até mesmo pela ação da temperatura reacional, outro agente inibitório, o volume total de metanol a ser adicionado de uma única vez no início da reação não aparenta afetar drasticamente o rendimento do processo. Isto se comprova pelos valores de rendimento obtidos após 45 minutos de reação, na ordem de 60%, valor que pode ser considerado elevado levando em consideração que a atividade das enzimas é inferior ao dos catalisadores alcalinos, por exemplo. Entretanto, para tempos maiores de reação, a ação inibitória do metanol impacta mais drasticamente sobre o rendimento de biodiesel, visto que o rendimento máximo de biodiesel obtido após 480 minutos de

reação, e com a adição total de metanol no início da reação foi de 73,1%, ou seja, em 435 minutos de reação o ganho de conversão dos triglicerídeos presentes na matéria-prima foi de apenas 13%. Assim, uma diferente estratégia de adição de metanol ao processo foi adotada a fim de comprovar o observado nos ensaios preliminares: adição gradual do metanol ao processo. Em termos comparativos, a adição gradual de metanol na reação mostrou ser mais eficiente, uma vez que após 480 minutos de reação um rendimento de biodiesel de 83,25% foi alcançado, valor quase 10% superior a condição de alimentação citada anteriormente, mostrando que nesta condição, os efeitos inibitórios causados pelo contato da lipase com o álcool são menores. Ainda, neste mesmo ensaio, verificou-se um rendimento de biodiesel de 92,75% após 24h de reação.

Assim, ficou claro que estratégias reacionais que visem minimizar efeitos de desnaturação da lipase são alguns dos pontos fundamentais que possibilitarão aplicar esta rota biológica a fim de produzir biodiesel em uma maior escala.

Outro resultado considerado importante diz respeito a quantidade de catalisador incorporado a reação, já que a resposta quanto a quantidade de FAME formada não se mostrou linear. Analisando os pontos axiais do planejamento experimental utilizado, para 45 minutos de reação, onde a massa de catalisador é variada, mantendo as demais condições constantes, constatou-se que o rendimento de biodiesel empregando 0,4% (m/m) e 1,8% (m/m) de enzima foi de 50,48% e 54,00%, resultando em quantidade de biodiesel formada por massa de catalisador de 126,2g FAME/g de enzima e 30g FAME/g de enzima, respectivamente. Este resultado mostrou que um aumento na massa de enzima em 3,5 vezes, acarretou em ganho de rendimento de apenas 3,5%. Assim, acredita-se que na formatação do processo de produção de biodiesel por catálise enzimática, além da alimentação parcial do metanol ao processo, a enzima também deve ser adicionada de forma parcelada, permitindo uma redução na quantidade de enzima empregada no processo.

Tratando-se da lipase em sua forma solúvel, a concentração de água presente no meio reacional é outro ponto-chave na questão da perda da atividade catalítica da mesma na presença de metanol. Com as informações obtidas nestes ensaios, foi elaborado um segundo trabalho. Tendo isto em vista, foram realizados novos ensaios, onde avaliou-se a influência da concentração de água adicionada ao meio reacional. Enquanto que no primeiro trabalho elaborado, manteve-se a concentração de água no meio fixa, neste segundo momento, variou-se a concentração de água do sistema

(de 0 a 12%) enquanto manteve-se fixa as demais condições reacionais previamente otimizadas e obtidas com o primeiro trabalho. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos quando se adicionou dentre 6 e 9% de água ao sistema, onde rendimentos de 73 e 74,5% foram obtidos após 480 minutos de reação. Concentrações de água adicionada inferiores a esses valores mostraram rendimentos de FAME inferiores, visto que a concentração de metanol no meio era alta a ponto de diminuir consideravelmente a capacidade catalítica da lipase enquanto que para concentrações de água superiores ao citado acima também se observou um decréscimo no rendimento de biodiesel do processo, o qual foi atribuído ao favorecimento de reações de hidrólise do substrato em detrimento a reação de transesterificação.

Outro ponto abordado no segundo trabalho foi a utilização de matérias-primas não comestíveis para produzir biodiesel utilizando-se da lipase Callera™ Trans L como catalisador do processo. Visto que um dos pontos negativos da catálise enzimática é o elevado passivo associado ao biocatalisador, o uso de matérias-primas residuais, como o sebo animal, que possui custo de aquisição inferior ao do óleo de soja, pode ser uma boa alternativa de consumível do processo. Grande parte das indústrias produtoras de biodiesel no Brasil utilizam o óleo de soja como fonte oleaginosa para o processo, visto que este possui teores baixos de ácidos graxos livres. Entretanto, devido ao aumento dos preços dessa matéria-prima, muitas empresas têm utilizado *blends* com materiais residuais de qualidade inferior para contornar este inconveniente. Esta é uma das propostas do segundo trabalho citado: a investigação do rendimento de biodiesel produzido via catálise enzimática utilizando-se uma mistura de matérias-primas comestíveis e não-comestíveis. Os resultados atingidos comprovam que o uso de sebo animal é uma boa alternativa para ser usada como matéria-prima no processo enzimático. O mais interessante nos resultados obtidos foi que o rendimento de biodiesel aumentou gradativamente de acordo com o aumento da mistura de sebo de carne ao processo, sendo que o maior rendimento obtido foi de 84,6% após 8 horas de reação quando se utilizou 100% de sebo de carne, valor 11,5% superior ao verificado quando se utilizou óleo de soja degomado puro na reação (rendimento de 73,10%). Tentando buscar uma explicação para este comportamento, utilizou-se do conceito de índice de insaturação dos ácidos graxos envolvidos no processo, atrelado a natureza polar da água e metanol presentes no processo que poderiam beneficiar a atração de elétrons das ligações dos ácidos

graxos, favorecendo a reação. Todavia, esta é apenas uma teoria prévia que necessita de um estudo futuro mais profundo acerca da estrutura química dos compostos envolvidos no processo, sua natureza polar (ou apolar) e mecanismos cinéticos da reação enzimática.

6 CONCLUSÃO

A inevitável depleção dos combustíveis fósseis não-renováveis consolidou o biodiesel como uma alternativa capaz de substituir o diesel de petróleo. Apesar da catálise química alcalina, estar atualmente estabelecida como sendo a principal técnica de produção de biodiesel em escala industrial, a rota enzimática possui algumas características positivas que a tornam um método potencial para obtenção deste biocombustível.

Através de um planejamento experimental do tipo DCCR foi investigada a influência da temperatura reacional, excesso molar de metanol em relação a matéria-prima e carga de catalisador no rendimento de FAME obtido por reação de transesterificação catalisada pela lipase *Thermomyces lanuginosus* na sua forma solúvel. As amostras foram coletadas e analisadas em tempos de reação de 45 minutos e 480 minutos. Para ambos os tempos de reação os modelos matemáticos tiveram ajuste superior a 90%, representando de forma adequada os resultados experimentais. Para 45 minutos de reação foi verificado que a massa de lipase empregada e interação entre massa de lipase e temperatura apresentaram efeito positivo na formação de FAME, enquanto a razão molar MeOH:óleo, temperatura reacional e interação entre razão MeOH:óleo e temperatura apresentaram efeito deletério. Para esse tempo reacional, o melhor rendimento de FAME foi de 61,85%, verificado para uma temperatura de 45°C, relação molar MeOH:óleo de 4.5:1 e massa de catalisador de 1.8% (m/m). Para 480 minutos de reação constatou-se que somente a massa de catalisador adicionado apresentou efeito positivo enquanto temperatura de reação, razão MeOH:óleo e fatores quadráticos desses parâmetros apresentaram efeito negativo. O melhor rendimento de FAME foi de 73,10%, verificado para temperatura de reação de 35°C, razão molar MeOH:Óleo de 4.5:1 e massa de catalisador de 1.45% (m/m). Para ambos tempos de análise os parâmetros de maior significância no rendimento de FAME foram a temperatura de reação e razão MeOH:Óleo.

Também se verificou que a adição do metanol, de forma fracionada ao meio reacional, proporcionou ganho de rendimento em FAME, comportamento esse atribuído a redução do efeito deletério do metanol na desnaturação da enzima.

Constatou-se que a incorporação de água ao meio reacional é benéfica ao rendimento de FAME. A incorporação de teores de até 9% (m/m) de água, em relação

a massa de ácidos graxos, apresentou comportamento positivo, onde foi possível observar um ápice em 74,5% de rendimento, sendo que para valores superiores ocorreu pequena queda na quantidade de biodiesel formado.

Comparativamente ao óleo de soja degomado, nas condições de reação empregadas neste trabalho, a utilização de sebo de carne como fonte de ácido graxo proporcionou maiores rendimentos de biodiesel para tempos de reação equivalentes. Para 480 minutos de reação o rendimento de FAME verificado quando se utilizou sebo foi de 84,6%, frente a um rendimento de 73,1% obtido com a utilização de óleo de soja degomado. Tal comportamento foi supostamente atribuído ao diferente índice de insaturação das matérias-primas.

Pelos resultados obtidos neste trabalho constatou-se que a formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus* mostrou ser efetiva para catalisar a reação de transesterificação entre óleo de soja degomado ou sebo de carne pré-tratado, apresentando resultados bastante satisfatórios, principalmente para baixos tempos de reação. Constatou-se que a taxa de formação de FAME (massa de FAME/ massa de enzima*hora) cai de forma drástica com o aumento do tempo de reação, fator que pode ser atribuído em grande parte a rápida desnaturação da enzima nas drásticas condições de reação, já que o metanol tende a desidratar a lipase, fazendo com que estas se inativem para a reação. Esse é um resultado a ser analisado quando da determinação da forma como o processo de produção de biodiesel irá operar quando se utiliza catalisadores enzimáticos.

Apesar dos interessantes resultados obtidos, algumas questões devem ser estudadas mais aprofundadamente para complementação do estudo, o qual servirá como sugestões para trabalhos futuros:

- Testar a adição fracionada de enzima a reação. Além da adição gradativa de metanol ao processo, acredita-se que este fator também afetará de forma positiva o rendimento de biodiesel;

- Simulação de um processo contínuo com reatores em série. O grande desafio quando se trata de produzir biodiesel utilizando uma catálise enzimática é encontrar uma forma de viabilizar o processo em uma escala maior. Para isso, o primeiro passo seria a utilização de reatores contínuos dispostos em série no processo, tal o qual se utiliza para produção de biodiesel em escalas industriais. Essa disposição de reatores também poderá afetar positivamente o rendimento de biodiesel visto que necessitará que o reagente e catalisador da reação sejam adicionados gradativamente a reação,

conforme sugestão citada anteriormente;

- Analisar qual a real influência da estrutura química do ácido graxo no rendimento de biodiesel. Neste trabalho verificou-se que um aumento na proporção de sebo na composição da matéria-prima levou a um aumento no rendimento de biodiesel do processo. Utilizou-se do conceito de índice de insaturação na tentativa de explicar os resultados. Todavia, uma investigação mais aprofundada a respeito deve ser realizada;

- Utilização do biodiesel produzido em motores. O uso de outras ferramentas que possam levar a maiores rendimentos de biodiesel permitirá que o biocombustível seja testado em motores a diesel. Assim, uma investigação sobre a influência do uso deste combustível em motores a diesel é pertinente, ainda mais quando o biodiesel provém de sebo, o qual é sabido que o biocombustível tem seu ponto de entupimento a frio elevado quando se utiliza esta matéria-prima.

Sendo assim, a lipase *Thermomyces lanuginosus* em sua forma solúvel demonstrou ser uma boa alternativa como catalisador de uma reação de transesterificação para produção de biodiesel. Entretanto, pesquisas adicionais devem ser feitas a fim de investigar maneiras que possam maximizar pontos fortes e minimizar fatores que afetam negativamente a reação, de forma que a quantidade de enzima empregada na técnica seja minimizada, impactando de forma positiva no rendimento final do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZAADEH, A. et al. Current Biodiesel Production Technologies: A Comparative Review. **Energy Conversion and Management**. V. 63, p. 138-148, November 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890412001185>>. Acesso em: 15 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.enconman.2012.02.027.
- AHMAD, M. et al. **Practical Handbook on Biodiesel Production and Properties**. 2ª Ed. New York: Taylor & Francis Group, 2013. 140p.
- AMOAHA, J. et al. Lipase Cocktail for Efficient Conversion of Oils Containing Phospholipids to Biodiesel. **Bioresource Technology**. V. 211, p. 224-230, July 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241630356X>>. Acesso em: 28 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.062.
- ANTCZAK, M. et al. Enzymatic Biodiesel Synthesis – Key Factors Affecting Efficiency Of The Process. **Renewable Energy**. V. 34, p. 1185 - 1194, May 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014810800431X>>. Acesso em: 6 out. 2015. DOI: 10.1016/j.renene.2008.11.013.
- ARANSIOLA, E. F. et al. A Review of Current Technology for Biodiesel Production: State of the Art. **Biomass & Bioenergy**. V. 61, p. 276-297, February 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953413004893>>. Acesso em: 12 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.11.014.
- AVHAD, M.; MARCHETTI, J. A Review on Recent Advancement in Catalytic Materials for Biodiesel Production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 50, p. 696-718, October 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115004979>>. Acesso em 29 abril 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.05.038.
- BART, J., PALMERI, N., CAVALLARO, S. **Biodiesel Science and Technology - From Soil to Oil**. 1ª Ed. Boca Ratón: Woodhead Publishing, 2010. 864 p.
- BASKAR, G. e AISWARYA, R. Trends in Catalytic Production of Biodiesel from Various Feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 57, p. 496-504, May 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115014847>>. Acesso em 18 março 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.101.

BHARATHIRAJA, B. et al. Biodiesel Production Using Chemical and Biological Methods – A Review of Process, Catalyst, Acyl Acceptor, Source and Process Variables. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 38, p. 368-382, October 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114004183>>. Acesso em 01 março 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2014.05.084.

BORGES, M., DÍAZ, L. Recent Developments on Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production by Oil Esterification and Transesterification Reactions: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 16, p. 5, p. 2.839-2.949, June 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112000834>>. Acesso em 14 abr. 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2012.01.071.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP. **Boletim Mensal do Biodiesel**. Brasília, DF, 01 dez. 2016. Disponível em:

<<http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/boletins-anp/2386-boletim-mensal-do-biodiesel>> Acesso em: 07 fev. 2017.

BRASIL. Lei n. 13.033 de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 2014. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm> Acesso em: 10 mar. 2016.

BRASIL. Lei n. 13.263 de 23 de março de 2016. Dispõe sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 mar. 2016. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm#art1> Acesso em: 5 abr. 2016.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia – MME. **Informações sobre a Produção Nacional de Biodiesel**. Brasília, DF, 02 jun. 2015. Disponível em:

<<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/perguntas.html>>. Acesso em 5 abr. 2016.

BRASIL. Resolução nº 45 de 26 de agosto de 2014. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 25 ago. 2014. Disponível em:

<http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml>. Acesso em: 1 abr. 2015.

CALGAROTO, C. et al. Production of biodiesel from soybean and *Jatropha Curcas* oils with KSF and amberlyst 15 catalysts in the presence of co-solvents. **Sustainable Chemical Processes**. V. 1, n.17, p. 1-6, September 2013. Disponível em:

<<http://sustainablechemicalprocesses.springeropen.com/articles/10.1186/2043-7129-1-17>>. Acesso em: 29 dez. 2016. DOI: 10.1186/2043-7129-1-17.

CESARINI, S., DIAZ, P., NIELSEN, P. Exploring a New, Soluble Lipase for FAMES Production in Water-containing Systems Using Crude Soybean Oil as a Feedstock. **Process Biochemistry**. V. 48, n. 3, p. 484-487, March 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511313000408>>. Acesso em 14 março 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.02.001.

CHEN, J., WU, W. Regeneration of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 95, n. 5. p. 466-469, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303800464>>. Acesso em 16 dezembro 2015. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80046-4.

CHEN, Y. et al. Synthesis of Biodiesel From Waste Cooking Oil Using Immobilized Lipase in Fixed Bed Reactor. **Energy Conversion and Management**. V. 50, n. 3, p. 668-673, March 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890408004184>>. Acesso em: 19 abr. 2015. DOI: 10.1016/j.enconman.2008.10.011.

CHRISTOPHER, L., KUMAR, H.; ZAMBARE, V. Enzymatic Biodiesel: Challenges and Opportunities. **Applied Energy**. V. 119, p. 497-520, April 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261914000361>>. Acesso em: 23 mar. 2015. DOI: 10.1016/j.apenergy.2014.01.017.

DA SILVA, C., OLIVEIRA, J. V. Biodiesel Production Through Non-Catalytic Supercritical Trasterification: Current State and Perspectives. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. V. 31, n. 2, p. 271–285, April 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjce/v31n2/v31n2a01.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2017. DOI: 10.1590/0104-6632.20140312s00002616

DATTA, A., MANDAL, B. A comprehensive Review of Biodiesel as an Alternative Fuel for Compression Ignition Engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 57, p. 799-821, May 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115015531>>. Acesso em: 2 maio 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.170.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel, A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines**. 1ª Ed. London: Springer Verlag London, 2008. 208 p.

DEMIRBAS, A. Progress and Recent Trends in Biodiesel Fuels. **Energy Conversion and Management**. V. 50, n. 1, p. 14-34, January 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890408003294>>. Acesso em: 22 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.enconman.2008.09.001.

DIZGE, N. et al. Biodiesel Production From Sunflower, Soybean and Waste Cooking Oils By Transesterification Using Lipase Immobilized Onto a Novel Microporous Polymer. **Bioresource Technology**. V. 100, n. 6, p. 1.983-1.991, March 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408008638>>. Acesso em: 3 jul. 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.10.008.

DU, W. et al. Perspectives for Biotechnological Production of Biodiesel and Impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 79, n. 3, p. 331-337, June 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-008-1448-8>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.1007/s00253-008-1448-8.
FANG, Z. **Biodiesel – Feedstocks, Production e Applications**. 1ª Ed. Rijeka, Croatia: Interchopen, 2012, 487 p.

FAUZI, A., AMIN, N. An Overview of Ionic Liquids as Solvents in biodiesel Synthesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 16, n. 8, p. 5.770-5.786, October 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112004157>>. Acesso em: 26 abril 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2012.06.022.

FIRDAUS, M., GUO, Z., FEDOSOV, S. Development of Kinetic Model for Biodiesel Production Using Liquid Lipase as a Biocatalyst, Esterification Steps. **Biochemical Engineering Journal**. V. 105, P. A, p. 52-61, January 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X15300486>>. Acesso em 17 março 2016. DOI: 10.1016/j.bej.2015.09.003.

FJERBAEK, L., CHRISTENSEN, K., NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 102, n. 05, p. 1.298-1.315, April 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215031>>. Acesso em: 11 out. 2015. DOI: 10.1002/bit.22256.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V. 92, n. 5, p. 405-416, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172301802887>>. Acesso em: 29 mar. 2015. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80288-7.

GUAN, F. et al. Combination of Two Lipases More Efficiently Catalyzes Methanolysis of Soybean Oil for Biodiesel Production in Aqueous Medium. **Process Biochemistry**, V. 45, n. 10, p. 1667-1682, October 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511310002503>>. Acesso em: 17 ago. 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.06.021.

HAAS, M. et al. The General Applicability of in Situ Transesterification for the Production of Fatty Acid Esters from a Variety of Feedstocks. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 84, n. 10, p. 963-970, September 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/43265134_The_General_Applicability_of_in_Situ_Transesterification_for_the_Production_of_Fatty_Acid_Esters_from_a_Variety_of_Feedstocks>. Acesso em: 7 abr. 2016. DOI: 10.1007/s11746-007-1119-4.

HALIM, S.; KAMARUDDIN, A.; FERNANDO, W. Continuous Biosynthesis of Biodiesel From Waste Cooking Palm Oil in a Packed Bed Reactor: Optimization Using Response Surface Methodology (RSM) and Mass Transfer Studies. **Bioresource Technology**. V. 100, n. 2, p. 710-716, January 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408006500>>. Acesso em: 27 maio 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.031.

HAMA, S., KONDO, A. Enzymatic Biodiesel Production: Na Overview of Potential Feedstocks and Process Development. **Bioresource Technology**. V. 135, p. 386-395, May 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412011820>>. Acesso em: 5 ago. 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.014.

ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. Biodiesel From Vegetable Oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 31, p. 446-471, March 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032113007508>>. Acesso em: 29 abril 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2013.11.001.

JEGANNATHAN, K.; ABANG, S. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase: A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, V. 28, n. 4, p. 253-264, December 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388550802428392#.VmhtOo-cHg8>>. Acesso em: 27 jun. 2016. DOI: 10.1080/07388550802428392.

KAIEDA, M. et al. Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel From Plant Oil Catalyzed by Various Lipases in a Solvent-Free System. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V. 91, n. 1, p. 12-15, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172301801031>>. Acesso em: 28 nov. 2015. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80103-1.

KNOTHE, G. et al. **Manual de Biodiesel**. Ed. 01. São Paulo: Blucher, 2006, 340 p.

KOSE, O.; TUTER, M.; AKSOY, H. Immobilized *Candida Antarctica* Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Cotton Seed Oil in a Solvent-Free Medium. **Bioresource Technology**, V. 83, n. 2, p. 125-129, June 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002036>>. Acesso em: 13 jul. 2015. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00203-6.

LI, Y. et al. Combined Phospholipase and Lipase Catalysis for Biodiesel Production from Phospholipids-containing Oil. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. V. 20, n. 5, p. 965-970, September 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12257-015-0250-6>>. Acesso em 15 março 2016. DOI: 10.1007/s12257-015-0250-6.

LIMA, U. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Ed. 01. São Paulo: Blucher, V. 03, 2002, 616 p.

LIU, C. et al. Ionic Liquids for Biofuel Production: Opportunities and Challenges.

Applied Energy. V. 92, p. 406-414, April 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261911007288>>. Acesso em 26 abril 2016. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.11.031.

LUKOVIC, N.; JUGOVIC, Z.; BEZBRADICA, D. Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives. **Alternative Fuel**. Ed. 01, p. 47-72, 2011. Disponível em:

<<http://www.intechopen.com/books/alternative-fuel/biodiesel-fuel-production-by-enzymatic-transesterification-of-oils-recent-trends-challenges-and-futu>>. Acesso em: 20 ago. 2015. DOI: 10.5772/21905.

LUQUE, R., MELERO, J. **Advances in Biodiesel Production – Processes and Technologies**. 1ª Ed. Oxford: Woodhead Publishing, 2012. 288 p.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel Production: A Review. **Bioresource Technology**. V. 70, n. 1, p. 1-15, October 1999. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499000255%20Viitattu%2017.8.2012>>. Acesso em: 14 jun. 2016. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00025-5.

MARCHETTI, J., MIGUEL, V., ERRAZU, A. Possible Methods for Biodiesel Production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 11, n. 6, p. 1.300-1.311, August 2007. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032105001073>>. Acesso em 16 dezembro 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2005.08.006.

MEDEIROS, G. A. et al. Enzimas e Líquidos Iônicos: Uma Combinação Promissora para um Biodiesel Limpo. **Revista Virtual de Química**. V. 5, n. 1, p. 74-94, Janeiro 2013. Disponível em: <<http://rvq.sbgq.org.br/index.php/rvq/article/viewArticle/424>>.

Acesso em 23 junho 2016. DOI: 10.5935/1984-6835.20130008.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. **Biodiesel Emissions**. Disponível em:

<<http://www.biodiesel.org/docs/ffs-basics/emissions-fact-sheet.pdf?sfvrsn=4>> Acesso em: 13 abril 2015.

NELSON, L., FOGLIA, T., MARMER, W. Lipase Catalysed Production of Biodiesel.

Journal of The American Oil Chemists Society. V. 73, p. 1.191-1.195, September 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02523383>>. Acesso em: 12 maio 2015. DOI: 10.1007/BF02523383.

NIELSEN, P.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic Biodiesel Production: Technical and Economical Considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**. V. 110, n. 8. p. 692-700, August 2008. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200800064/abstract>>. Acesso em: 14 junho 2016. DOI: 10.1002/ejlt.200800064.

NOVOZYMES BIOENERGY. **The Novozymes Enzymatic Biodiesel Handbook**. Bagsværd, Dinamarca, 2010, 110 p.

NORDBLAD, M. et al. Identification of Critical Parameters in Liquid Enzyme-Catalyzed Biodiesel Production. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 111, n. 12, p. 2.446-2.453, December 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.25305/full>>. Acesso em 17 março 2016. DOI: 10.1002/bit.25305.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic Conversion of Sunflower Oil to Biodiesel in a Solvent-Free System: Process Optimization and the Immobilized System Stability. **Bioresource Technology**, V. 100, n. 21, p. 5.146-5.154, November 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409006233>> Acesso em: 7 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.05.068.

ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. Application of Silica Aerogel Encapsulated Lipases in the Synthesis of Biodiesel by Transesterification Reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 42, n. 3-4, p. 106-113, November 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117706002499>>. Acesso em: 30 ago. 2015. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.08.002.

PEDERSEN, A. et al. Batch Production of FAEE-biodiesel Using a Liquid Lipase Formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 105, p. 89-94, July 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714001040>>. Acesso em 14 março 2016. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.04.005.

PRICE, J. et al. Fed-Batch Feeding Strategies for Enzymatic Biodiesel Production. In: THE INTERNATIONAL FEDERATION OF AUTOMATIC CONTROL. **Anais...** Cape Town, South Africa, August 2014. Disponível em: <<http://user.das.ufsc.br/~trofino/pub/IFAC%202014/media/files/1438.pdf>>. Acesso em 15 março 2016.

RATHMANN, R., SZKLO, A.; SCHAEFFER, R. Targets and Results of the Brazilian Biodiesel Incentive Program – Has it Reach the Promised Land? **Applied Energy**. V. 97, p. 91-100, September 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261911007185>>. Acesso em: 1 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.11.021.

RAVINDRA, P.; JEGANNATHAN, K. Production of Biodiesel Using Lipase Encapsulated in K-Carrageenan. **Briefs in Bioengineering**. 2015, 125 p. Disponível em: <<http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-10822-3>>. Acesso em: 01 set. 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-10822-3.

REED, G. **Enzymes, Biomass, Food and Feed**. Ed. 02. V. 9. Weinheim: VCH Germany, 1995. 803 p.

REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**. V. 12, n. 4, p. 254-262, August 2016. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ind.2016.0002>>. Acesso em: 14 jan. 2017. DOI: 10.1089/ind.2016.0002.

SALIS, A. et al. Comparison Among Immobilized Lipases on Macroporous Polypropylene Toward Biodiesel Synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 54, n. 1-2, p. 19-26, July 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117707002792>>. Acesso em: 16 set. 2015. DOI: 10.1016/j.molcatb.2007.12.006.

SARAVAN, K. et al. Esterification of Palmitic Acid with Methanol over Template-assisted Mesoporous Sulfated Zirconia Solid Acid Catalyst. **Applied Catalysis B: Environmental**. V. 172-173, n. 108-115, August 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092633731500065X>>. Acesso em: 14 abr. 2016. DOI: 10.1016/j.apcatb.2015.02.014.

SOUMANOU, M.; BORNSCHEUER, U. Improvement in Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Sunflower Oil. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 33, n. 1, p. 97-103, July 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903000905>>. Acesso em: 7 out. 2015. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00090-5.

TAMALAMPUDI, S. et al. Enzymatic Production of Biodiesel From Jatropha Oil. A Comparative Study of Immobilized-Whole Cell and Commercial Lipases as a Biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**. V. 39, n. 1, p. 185-189, April 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07003294>>. Acesso em: 13 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.bej.2007.09.002.

VERMA, P.; SHARMA, M. P. Review of Process Parameters for Biodiesel Production From Different Feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 62, p. 1.063-1.071, September 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116300879>>. Acesso em: 14 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2016.04.054.

WAN GHAZALI et al. Effects of Biodiesel from Different Feedstocks on Engine Performance and Emissions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 51, p. 585-602, November 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115006036>>. Acesso em 4 abril 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.06.031

WANG, L. et al. Lipase-catalyzed Biodiesel Production from Soybean Oil Deodorizer Distillate with Absorbent Present in *tert*-Butanol System. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 43, n. 1-4. p. 29-32, December 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117706001020>>. Acesso em 02 fevereiro 2016. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.03.005.