

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

**EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO NA
ETANÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS PARA
SÍNTESE DE BIODIESEL**

Autor: Maria Vanessa Souza Oliveira
Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima
Prof^a. Dra. Cleide Mara Faria Soares

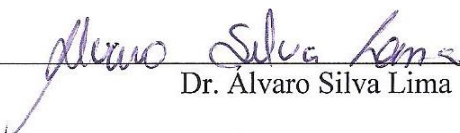
ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2013

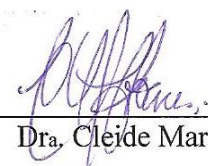
EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO NA ETANÓLISE
ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS PARA SÍNTESE DE BIODIESEL

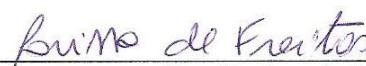
Maria Vanessa Souza Oliveira

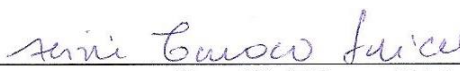
DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS.

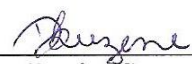
Aprovada por:


Dr. Alvaro Silva Lima


Dra. Cleide Mara Faria Soares


Dra. Larissa de Freitas


Dra. Alini Tinoco Fricks


Dra. Denise Santos Ruzene

ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2013

O48e Oliveira, Maria Vanessa Souza
Emprego de diferentes fontes de irradiação na etanólise enzimática de óleos vegetais para síntese de biodiesel. / Maria Vanessa Souza Oliveira; orientadores: Álvaro Silva Lima, Cleide Mara Faria Soares. – Aracaju, 2013.

105 p. : il. ;
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo). –
Universidade Tiradentes, 2013.

1. *Burkholderia cepacia*. 2. Óleo de babaçu. 3. Óleo de coco bruto.
4. Biodiesel. 5. Aquecimento não convencional. I. Lima, Álvaro
Silva (orient.). II. Soares, Cleide Mara Faria (orient.). III.
Universidade Tiradentes. IV. Título

CDU: 542

*“Grandes realizações não são feitas por impulso,
mas por uma soma de pequenas realizações.”*

(Vincent Van Gogh)

Agradecimentos

A Deus, por me capacitar e me fortalecer permitindo superar todos os obstáculos.

Aos meus orientadores, prof. Álvaro S. Lima e profª. Cleide Mara F. Soares que sempre foram uma fonte de oportunidades, idéias e estímulo. A paciência e o apoio concedidos por vocês nos momentos de dificuldades foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal, sou muito grata a vocês.

A profª. Heizir F. de Castro pela atenção, sugestões, disponibilidade e confiança, além do livre acesso e permanência em seu laboratório. A sua contribuição foi além de uma simples colaboração.

Aos meus pais Vicente e Mariene pelo dom da vida, por todo carinho, compreensão, apoio e pelas orações de longe para tudo dar certo.

Aos meus irmãos Madalena pela paciência e pela ajuda carinhosa, Vilma pelo carinho e motivação constante, Miranilha, Messias e Vicente pelo carinho e compreensão. Obrigada por vocês não hesitarem em medir esforços para que eu alcançasse esta vitória.

Aos meus queridos sobrinhos Mauricinho, Arthurzinho, Victinho e Jonhzinho pela paciência e compreensão da minha ausência e a Lavínia serzinho que veio iluminar nossas vidas.

A Luisinha por sempre estar do meu lado, pelo apoio carinhoso e confidências.

A Marx, meu namorado, pelo amor, carinho, suporte e compreensão dedicada durante a realização desse sonho e pela presença marcante em minha vida.

A Anderson, Acenini e Taynara pela ajuda constante, companheirismo, sorrisos e abraços durante os bons e maus momentos.

Aos amigos Ana Karine, Patrícia, Larissa, Grazielle, Weriton, William, Daniel, Lainy, Bruno e ao prof. Pedro pelo carinho com o qual me receberam e me acolheram, pelas

conversas, ensinamentos e convivência que apesar de curta foi suficiente para deixar saudade e ser plantado em meu coração carinho e admiração por todos vocês.

A todos os amigos e colegas de jornada, Fabiane, Roberto, Jaci, Fernando, Bruno, Verusca, Aiala, Glaucia, Ana Claudia, Lays, Douglas, Denisson, Lucas, Oscar, Joanna e Marcos pela amizade, brincadeiras e ajuda. Vocês são pessoas especiais.

A todos os amigos de laboratório, Rachel, Luana, Rafaela, Roneval, Igor, Samuel, Bruna, Joyce, Tâmara, Nayana, Ranyere, Polyane, Emanuelle, Milena, Alisson, Fernanda, Gustavo, Camila, Anderson Barbosa, Matheus Albuquerque, Carla e em especial a Matheus, Murillo, prof^a Hofsky e Erika pelos momentos de alegria que passamos juntos e aprendizagem mútua e a Nayara pelos socorros sempre oferecidos.

A Universidade Tiradentes, pela excelência do curso.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles, sem exceção, que contribuíram de maneira direta ou indireta durante a minha caminhada e tornaram possível a realização deste trabalho de um modo ou de outro.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO NA ETANÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS PARA SÍNTESE DE BIODIESEL

Maria Vanessa Souza Oliveira

A aplicação de lipases imobilizadas como catalisadores na reação de transesterificação é uma alternativa para tornar a síntese de biodiesel mais vantajosa, pois permite uma fácil recuperação do glicerol e consome menos energia. O processo ainda pode se tornar mais limpo por meio da aplicação de aquecimento não convencional (micro-ondas e ultrassom) fundamentais para o aumento da eficiência energética. Dessa forma, este trabalho objetivou estudar a etanólise enzimática de um óleo vegetal não comestível (óleo de babaçu refinado) e um óleo residual (óleo de coco) em meio isento de solvente, assistida por diferentes fontes de energia (aquecimento convencional, micro-ondas e ultrassom). A etanólise do óleo de babaçu foi catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* (PS) imobilizada por encapsulamento em matriz sol-gel usando líquido iônico prótico (pentanoato de N-metilmonoetanolamina) como aditivo e a etanólise do óleo de coco bruto foi catalisada por PS imobilizada em suporte híbrido (SiO_2 -PVA) por ligação covalente. Para o estudo das sínteses enzimáticas foi aplicado o planejamento fatorial completo 2^2 com três pontos centrais considerando como variáveis independentes a razão molar (óleo:álcool) e a temperatura, e como variável resposta o percentual do rendimento em ésteres etílicos. Para comparação também foi verificado o potencial dos biocatalisadores Novozym 435 e PS imobilizada em diatomácia (comercial) na transesterificação do óleo de coco bruto. Adicionalmente, as propriedades (densidade, viscosidade, índice de acidez, peróxido, saponificação e iodo) e a composição em ácidos graxos do óleo de coco bruto foram avaliadas, o que permitiu identificar uma composição predominantemente láurica (42,25%), índice de acidez e de peróxido elevados. Para a etanólise do óleo de babaçu empregando aquecimento convencional, a temperatura foi a variável significativa ($p < 0,1$), atingindo o maior rendimento em ésteres etílicos (51,9%) em 48 h de reação (40°C, razão molar de 1:7). Entretanto o aumento do carregamento da lipase no sistema imobilizado elevou o rendimento para 98% em 96 h de reação, nas mesmas condições de processamento. Na etanólise do óleo de coco bruto assistida por micro-ondas, a variável razão molar foi significativa ($p < 0,05$), apresentando o maior rendimento (66,37%) em 8 h de reação formada pela combinação de 1:12 de razão molar e 40°C. A transesterificação assistida por ultrassom apresentou conversão máxima (100%) dos ácidos graxos do óleo de coco bruto para os biocatalisadores PS imobilizada em SiO_2 -PVA e Novozym 435 em apenas 8 e 6 h, respectivamente, indicando que foi possível diminuir o tempo de reação em comparação aos outros sistemas de aquecimento (aquecimento convencional e micro-ondas).

Palavras chave: *Burkholderia cepacia*, Óleo de babaçu, Óleo de coco bruto, Biodiesel, Aquecimento não convencional.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of University Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

USE OF DIFFERENT IRRADIATION SOURCES IN THE ENZIMATIC ETHANOLYSIS OF VEGETABLE OILS FOR BIODIESEL SYNTHESIS

Maria Vanessa Souza Oliveira

The application of immobilized lipase as catalysts in the transesterification reactions is an alternative to make the biodiesel synthesis more advantageous, since it allows the easy recovery of glycerol uses less energy and are biodegradable. The process can still become cleaner through the application of non – conventional heating (microwave and ultrasound) fundamental for the increase in energy efficiency. Therefore, this work has as goal to study the enzymatic ethanolysis of a vegetable non – edible oil (refined babassu oil) and a residual oil (coconut oil) in a medium without solvent, assisted by different energy sources (conventional heating, microwave and ultrasound). Babassu oil ethanolysis was catalyzed by *Burkholderia cepacia* (PS) lipase immobilized by encapsulating in sol-gel matrix using protic ionic liquid (N-methylmonoethanolamine pentanoate) as additive and crude coconut oil ethanolysis was catalyzed by PS immobilized in hybrid support (SiO₂–PVA) by covalent bonding. For the study of enzymatic synthesis was applied full 2² factorial design with three central points considering molar ratio (oil: alcohol) and temperature as independent variables, and ethyl esters yield as the response variable. For comparison was also verified the potential of biocatalysts Novozym 435 and PS immobilized on diatomite (commercial) in the crude coconut oil transesterification. Additionally, properties (density, viscosity, acid index, peroxide, saponification and iodine) and fatty acids composition of the crude coconut oil were analyzed, which allowed to identify the predominant lauric composition (42.25 %), acid index and peroxides elevated. For the babassu oil ethanolysis, using conventional heating, the temperature was significant variable ($p < 0.1$), achieving the higher yield of ethyl esters (51,9 %) in a 48 h reaction (40 °C, molar ratio 1:7). However, the increased lipase loading in the immobilized system increased the yield to 98 % in a 96 h reaction for the same process conditions. In the crude coconut oil ethanolysis assisted by microwave, the molar ratio variable was significant ($p < 0.05$), showing a higher yield (66.37%) in 8 h of reaction, with molar ratio 1:12 and 40 °C. The transesterification assisted by ultrasound showed an efficient conversion (100 %) of fatty acids from crude coconut oil for the biocatalysts PS immobilized on SiO₂–PVA and Novozym 534 in only 8 and 6 h, respectively, indicating that was possible reduce the reaction time in comparing to others heating systems (conventional heating and microwave).

Keywords: *Burkholderia cepacia*, Babassu Oil, Crude Coconut Oil, Biodiesel, Non-conventional heating.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I	
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO II	
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES.....	5
3.1.1. Lipases	7
3.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	10
3.2.1. Matrizes para Imobilização: Técnica Sol-gel	11
3.2.2. Método de Imobilização: Encapsulamento	12
3.2.3. Método de Imobilização: Ligação Covalente	14
3.2.4. Aditivos: Líquidos Iônicos	18
3.3. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO	21
3.4. BIODIESEL.....	22
3.5. MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	23
3.5.1. Óleo de Babaçu	27
3.5.2. Óleo de Coco	28
3.6. DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO DE ENERGIA.....	29
3.6.1. Micro-ondas	29
3.6.2. Ultrassom	34
CAPÍTULO III	
ARTIGO I	38
ARTIGO II	54
CAPÍTULO IV	
CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO V	
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Reações Catalisadas por lipases.....	8
FIGURA 2: Representação da estrutura tridimensional da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> . As fitas β estão representadas como setas (em verde) e as α - hélices em azul. A posição do íon Ca^{+2} está indicada por uma esfera amarela e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho.....	9
FIGURA 3: Esquema representacional do encapsulamento de biomoléculas por meio da tecnologia sol-gel.....	13
FIGURA 4: Característica física e composição química da lipase imobilizada em matriz sol-gel.....	14
FIGURA 5: Esquema da reação química para preparação da matriz híbrida SiO_2 -PVA.....	16
FIGURA 6: Mecanismo da ativação da matriz de SiO_2 -PVA utilizando epicloridrina como agente de ativação.....	17
FIGURA 7: a) Equação geral para uma reação de transesterificação; b) equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.....	21
FIGURA 8: Faixa de frequência e comprimento de onda de micro-ondas.....	30
FIGURA 9: Região de frequência do som.....	34
FIGURE 10: Protic ionic liquid structure N-methylmonoethanolamine pentanoate.....	42
FIGURE 11: Response surface that represents the transesterification yield of babassu oil catalyzed by lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive.....	46
FIGURE 12: Formation profile of ethyl monoesters as a function of time for reaction 1 (babassu oil transesterification with molar ratio 1:7 at 40°C) catalyzed by <i>Burkholderia cepacia</i> lipase encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive.....	49
FIGURE 13: Formation profile of ethyl monoesters as a function of time for reaction 2 (babassu oil transesterification with molar ratio 1:7 at 40°C) catalyzed by <i>Burkholderia cepacia</i> lipase encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive after enzyme loading increase.....	49
FIGURE 14: Response surface that represents the transesterification yield of crude coconut oil catalyzed by lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> immobilized on epoxy SiO_2 -PVA.....	66
FIGURE 15: Time course of the transesterification yield of crude coconut oil catalysed by PS immobilized on epoxy SiO_2 -PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 employing conventional heating.....	68
FIGURE 16: Time course of the transesterification yield of crude coconut oil catalysed by PS immobilized on epoxy SiO_2 -PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 employing microwave irradiation.....	69

FIGURE 17: Time course of the transesterification yield of crude coconut oil catalysed by PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 employing ultrasound irradiation.....71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação das enzimas com base no tipo de reação química catalisada.....	7
TABELA 2: Aditivos utilizados nos procedimentos de imobilização de enzimas.....	18
TABELA 3: Relatos de imobilização de enzimas empregando LIA's como aditivos.....	19
TABELA 4: Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de diferentes matérias-primas.....	26
TABELA 5: Reações enzimáticas realizadas por meio do aquecimento por micro-ondas.....	33
TABLE 6: Factor levels used according to the 2^2 full factorial design.....	44
TABLE 7: Experimental design and values for transesterification yield (%) according to the 2^2 full factorial design (variables in coded values with real values in parenthesis).....	45
TABLE 8: Analysis of variance (ANOVA) for transesterification yield (%) of babassu oil using the 2^2 full factorial design.....	46
TABLE 9: Regression coefficient, standard errors, and Student's t test for transesterification yield of babassu oil (%) using the 2^2 full factorial design.....	47
TABLE 10: Factor levels used according to the full 2^2 factorial design.....	60
TABLE 11: Composition of the fatty acids in coconuts oils.....	63
TABLE 12: Characterization of crude coconut oil.....	63
TABLE 13: Yields obtained in the enzymatic transesterification of crude coconut oil.....	64
TABLE 14: Regression coefficient, standard errors, and Student's t test obtained in the enzymatic transesterification of crude coconut oil according to the full 2^2 factorial design.....	65
TABLE 15: Analysis of variance (ANOVA) for enzymatic transesterification yield (%) of crude coconut oil.....	65

1. INTRODUÇÃO

Diante de fatores como o uso maciço de fontes de energia fóssil, crise energética, degradação ambiental aliada a inúmeras vantagens como capacidade de renovação, biodegradabilidade e menor emissão de gases, o desenvolvimento do biodiesel como combustível alternativo para complementar ou substituir o petro-diesel tem recebido grande atenção entre os pesquisadores e formuladores de políticas públicas (ATADASHI *et al.*, 2012; BRUNSCHWIG *et al.*, 2012). No Brasil, o Congresso Nacional aprovou a lei nº 11.097, em 13/01/2005, que tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel (B2) em 2008 e desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado contém 5% de biodiesel, esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009. Ressaltando que, de acordo com o decreto nº 5.448, de 20 de maio de 2005, a adição de biodiesel ao óleo diesel de origem fóssil poderá ser superior a essa porcentagem, em volume, quando o combustível resultante da mistura for destinado a teste ou uso em: frotas veiculares; transporte aquaviário ou ferroviário; geração de energia elétrica e processo industrial específico (ANP, 2012).

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual de 2,4 bilhões de litros em 2010 e uma capacidade instalada, no mesmo ano, para cerca de 5,8 bilhões de litros (ANP, 2012). A produção de biodiesel ocorre por meio do processo de transesterificação, também chamado de alcoólise, que pode ser resumido na reação de um óleo vegetal ou gordura animal com um álcool de cadeia curta formando como produtos ésteres e glicerol, ressaltando que esta reação é facilitada por um catalisador adequado. O processo é uma sequência de três reações reversíveis, em que a molécula de triglicerídeo é convertida, passo a passo em diglicerídeo, monoglicerídeo e glicerol (CHOUHAN e SARMA, 2011).

Um grande desafio para a viabilidade econômica das indústrias de biodiesel está associado à utilização de matérias-primas de preço reduzido. Apesar de óleos vegetais comestíveis de elevado custo serem utilizados em muitos países é inevitável a procura por matérias-primas mais economicamente viáveis como óleos vegetais não comestíveis e residuais (DEKA e BASUMATARY *et al.*, 2011). Óleos compostos predominantemente de ácido láurico, como no caso do óleo de babaçu e do óleo de coco, proporcionam o aumento da

velocidade catalítica da reação de transesterificação, tornando estas oleaginosas excelentes matérias-primas para a produção de biodiesel (GUARTE *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2007).

A reação de transesterificação pode ser catalisada quimicamente ou enzimaticamente. Entretanto a via enzimática apresenta certas vantagens sobre a catálise química como permitir uma fácil recuperação do glicerol e ocorrer a temperaturas mais baixas, além do mais, biocatalisadores são biodegradáveis e não tóxicos. Contudo, pesquisas vêm tentando superar algumas limitações da transesterificação enzimática como o custo elevado da enzima, o rendimento baixo, tempo de reação elevado e a necessidade de água e de solventes orgânicos à mistura de reação (ANTCZAK *et al.*, 2009; BAJAJ *et al.*, 2010).

Tem sido desenvolvido no Instituto de Tecnologia e Pesquisa de Sergipe, pelo nosso grupo de pesquisa, estudos de preparações de lipases utilizando como método de imobilização o encapsulamento em matrizes de sílica desenvolvidas pela técnica sol-gel utilizando tetraetilortossilicato (TEOS) como precursor e líquido iônico como aditivo. Os resultados têm revelado que as lipases de *Bacillus sp.* ITP-001 e de *Burkholderia cepacia* foram imobilizadas com sucesso apresentando positivos efeitos na estrutura morfológica da preparação (SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013). Concomitantemente, o Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena tem desenvolvido estudos de imobilização por ligação covalente de lipases em suporte híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) obtido pela técnica sol-gel. Resultados desses estudos mostraram uma alta atividade e estabilidade operacional para as lipases de *Burkholderia cepacia* e de *Candida rugosa* (SANTOS *et al.*, 2008a; FREITAS *et al.*, 2009).

O processo de transesterificação mais comumente relatado baseia-se na utilização de um processo em batelada, que embora seja um processo simples, geralmente requer tempos longos de reação. Portanto, torna-se conveniente para intensificação da produção de biodiesel a aplicação de outras fontes de energia como micro-ondas e ultrassom no sistema em batelada. Muitas são as vantagens associadas à utilização destas fontes de irradiação de energia durante a síntese de biodiesel. Dentre os benefícios comuns estão à possibilidade de obter rendimentos mais elevados, maior seletividade e menor decomposição térmica (ASAKUMA *et al.*, 2011; ENCINAR *et al.*, 2012).

No aquecimento convencional a energia térmica é transferida para a reação a partir das superfícies do reator por meio de condução, convecção e radiação, utilizando grande

quantidade de energia para aquecer o meio. A irradiação de micro-ondas, por outro lado, proporciona a energia diretamente para os reagentes. Portanto, a etapa de pré-aquecimento é eliminado e, conseqüentemente, a reação de transesterificação pode ser concluída em um menor período de tempo. Já a cavitação, proveniente da irradiação ultrassônica, em reações heterogêneas líquido/líquido irá provocar perturbações e mistura na interface ou perto dela, resultando na formação de emulsões finas. Quando as emulsões são formadas, a área de superfície disponível para a reação entre as duas fases é significativamente aumentada, o que resulta no aumento da taxa de reação. A emulsão formada usando a cavitação é geralmente menor em tamanho e mais estável (DUZ *et al.*, 2011; GOLE e GOGATE *et al.*, 2012).

Desta forma, em virtude desse contexto, da parceria estabelecida entre o Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e o Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena e para dar continuidade à linha de pesquisa, o presente trabalho buscou melhorar e enriquecer processos de produção de biodiesel por meio do emprego de fatores como: biocatalisadores compostos por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada tanto por encapsulação como por ligação covalente; diferentes fontes de irradiação de energia (micro-ondas, ultrassom e aquecimento convencional); planejamento fatorial como ferramenta de estudo dos efeitos e das interações entre as variáveis no processo de etanólise enzimática; e utilização de óleos não comestível e residual como fonte de matéria-prima. Os resultados obtidos a partir das reações de transesterificação enzimática foram comparados, considerando-se a velocidade de formação dos ésteres etílicos e rendimento global da reação.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Estudar a síntese enzimática de ésteres etílicos a partir da etanólise de óleos vegetais em meio isento de solventes empregando diferentes fontes de energia (aquecimento convencional, micro-ondas e ultrassom).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ajustar as condições operacionais (razão molar e temperatura) relacionadas à etanólise de um óleo vegetal não comestível sob aquecimento convencional, catalisada por *Burkholderia cepacia* imobilizada em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel utilizando líquido iônico prótico como aditivo, empregando-se um planejamento fatorial;
- Determinar as características físico-químicas e a composição em ácidos graxos de um óleo residual;
- Ajustar as condições operacionais (razão molar e temperatura) relacionadas à etanólise de um óleo residual, empregando planejamento fatorial, irradiação micro-ondas e *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte inorgânico-orgânico (híbrido, SiO₂-PVA) por ligação covalente como biocatalisador;
- Realizar reações de síntese de biodiesel assistidas por micro-ondas, ultrassom e aquecimento convencional empregando catalisadores enzimáticos distintos (comerciais e preparados em laboratório);
- Comparar os rendimentos globais e os tempos das reações de biodiesel empregando biocatalisadores diferentes assim como fontes de energia distintas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica apresenta um levantamento contendo informações relevantes para o desenvolvimento deste trabalho com enfoque nas lipases, técnicas de imobilização das enzimas, o uso de líquidos iônicos como aditivos no processo de imobilização e por fim a síntese de biodiesel com destaque na aplicação da irradiação micro-ondas e do ultrassom.

3.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES

As enzimas atuam como catalisadores biológicos acelerando as reações químicas das células vivas (TORTORA *et al.*, 2005). As reações catalisadas por enzimas têm velocidades muito elevadas, entre 10^6 a 10^{12} vezes maiores que as reações não catalisadas. Além disso, a estrutura complexa das enzimas possibilita características vantajosas como um alto grau de especificidade (BORZANI *et al.*, 2001). Segundo Raita *et al.* (2010) a síntese biocatalítica é uma abordagem promissora e ambientalmente amigável em comparação com as reações químicas catalisadas convencionalmente.

O avanço do conhecimento do metabolismo microbiano, dos métodos de recuperação e dos processos de fermentação tem tornado as técnicas de produção de enzimas cada vez mais satisfatória. Além disso, o aumento da demanda dos métodos que requerem a utilização de biocatalisadores enzimáticos vem tornando-as objeto de intenso estudo, devido seu vasto campo de utilização (SHARMA *et al.*, 2001).

As enzimas, como toda proteína natural, são constituídas de uma ou mais cadeias de aminoácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sequência destes na cadeia são características particulares de cada enzima, sendo que, induz uma conformação tridimensional própria, essencial à atividade catalítica. Esta atividade é exercida pelo sítio ativo, que pode ser definido como a parte da estrutura da

enzima que atua em contato direto com a substância (substrato) a ser transformada (FABER, 1997).

O sítio ativo é responsável pela alta especificidade das enzimas e no mesmo ocorre a reação catalítica que normalmente é realizada em várias etapas. Desconsiderando a transferência de massa, a primeira etapa é a ligação do substrato à enzima, a qual ocorre devido às interações altamente específicas entre o substrato e as cadeias laterais dos aminoácidos que constituem o sítio ativo. Dois modelos importantes foram desenvolvidos para descrever o processo de ligação. O primeiro deles, o modelo chave-fechadura, no qual assume um alto grau de complementaridade entre a forma do substrato e a geometria do sítio de ligação da enzima. Este modelo, atualmente é de interesse histórico, uma vez que não leva em conta uma propriedade importante das proteínas, ou seja, sua flexibilidade conformacional. O segundo modelo leva em consideração a flexibilidade tridimensional da enzima. O modelo sugere um encaixe induzido, ou seja, o sítio ativo tem uma forma tridimensional diferente antes da ligação ao substrato e é induzido a uma alteração conformacional até que o substrato acesse completamente o sítio ativo da enzima e forme o produto (BON *et al.*, 2008).

A especificidade da enzima pode ser expressa por vários tipos: estereoespecificidade: capacidade que algumas enzimas possuem em discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica; especificidade estrutural ou regioseletividade: decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do sítio ativo à ligação do substrato. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima, ou seja, de sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfazem determinadas relações espaciais. Desse modo, a catálise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir formas enantiômeras (CASTRO *et al.*, 2004).

As enzimas podem ser agrupadas em seis classes de acordo com o tipo de reação química que elas catalisam: oxidoredutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase, como mostra a Tabela 1 (TORTORA *et al.*, 2005). Entretanto, as lipases, que fazem parte da classe das hidrolases, são as mais amplamente utilizadas em síntese orgânica devido a fatores como a disponibilidade de grande número de preparações comerciais, ampla especificidade e estabilidade relativamente melhor em meios contendo solventes orgânicos (em comparação com outras enzimas) (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Tabela 1: Classificação das enzimas com base no tipo de reação química catalisada.

Classe	Tipo de reação química catalisada	Exemplos
Oxidoredutases	Oxidação-redução em que oxigênio e hidrogênio são ganhos ou perdidos	Citocromo oxidase, lactato desidrogenase
Transferases	Transferência de grupos funcionais, tais como um grupo amino, grupo acetil ou grupo fosfato	Acetato quinase, alanina deaminase
Hidrolases	Hidrólise (transferência de grupos funcionais da água)	Lipase, sacarase
Liasas	Remoção de grupos de átomos sem hidrólise	Oxalato descarboxilase, isocitrato liase
Isomerases	Rearranjo de átomos dentro de uma molécula	Glicose-fosfato isomerase, alanina racemase
Ligases	União de duas moléculas (usando energia geralmente derivada da quebra do ATP)	Acetil-CoA sintetase, DNA ligase

Fonte: TORTORA *et al.* (2005).

3.1.1. Lipases

O interesse sobre lipases de diferentes fontes (micro-organismos, animais e plantas) aumentou acentuadamente nos últimos anos devido ao seu potencial de aplicações na indústria e na medicina (TAIPA *et al.*, 1992). As lipases microbianas ocupam um lugar de destaque entre os biocatalisadores devido à sua capacidade de catalisar uma grande variedade de reações em meio aquoso e não aquoso. As características específicas destas enzimas tem gerado um enorme interesse entre os pesquisadores permitindo que catalisem reações com redução de produtos secundários, rebaixado custo de tratamento de resíduos e em condições branda de temperatura e pressão (VILLENEUVE *et al.*, 2000; SAXENA *et al.*, 2003; HASAN *et al.*, 2009), além do interesse na obtenção de produtos para as indústrias química, cosmética, farmacêutica e alimentícia (KOBLITZ e PASTORE, 2004).

Lipases (triacilglicerol hidrolases de ésteres, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a quebra de gorduras e óleos com subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoglicerois e glicerol. Além disso, elas também são eficientes em reações diversas, como

esterificação, transesterificação e aminólise em solventes orgânicos. Portanto, essas enzimas são amplamente estudadas tanto pelo seu potencial de aplicações industriais como pelo grande interesse no desenvolvimento de métodos recorrentes a melhoria de suas propriedades catalíticas (VILLENEUVE *et al.*, 2000). A Figura 1 apresenta um esquema das reações catalisadas por lipases dependentes dos reagentes de partida empregados (CASTRO *et al.*, 2004).

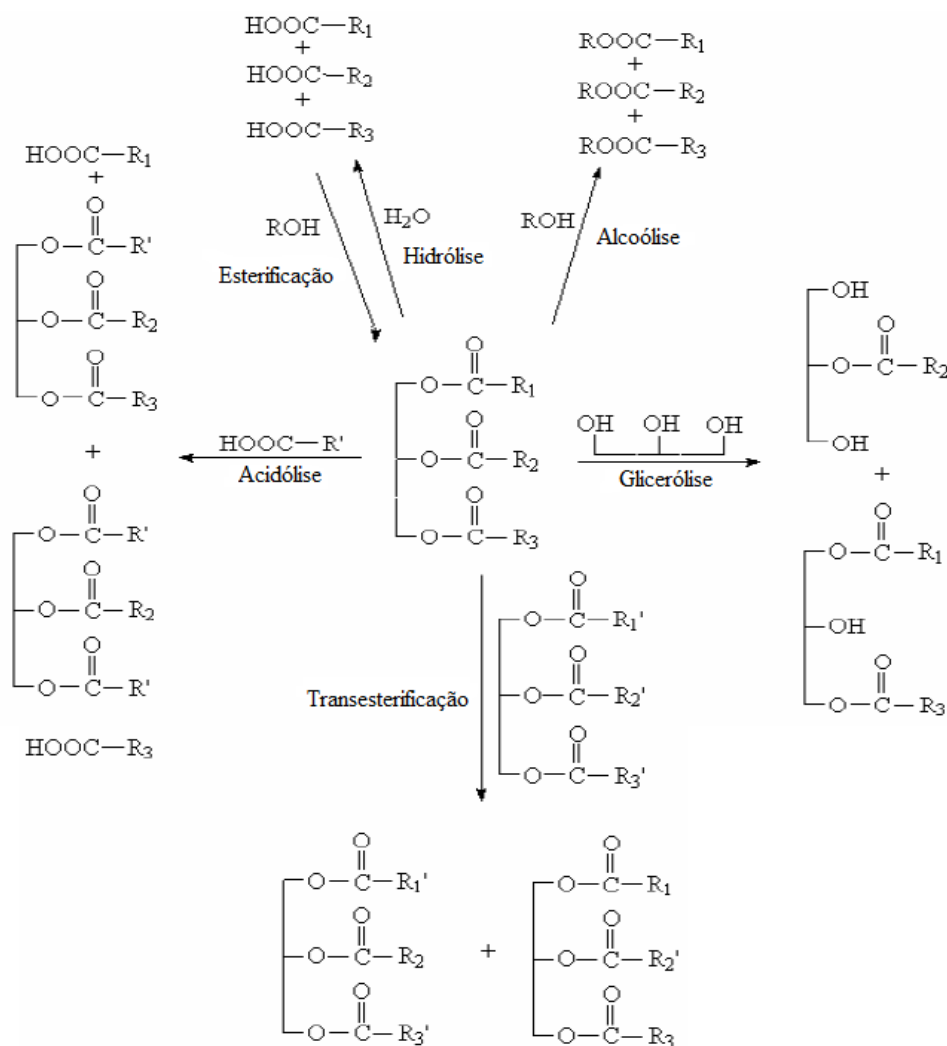


Figura 1: Reações catalisadas por lipases.

Fonte: CASTRO *et al.*, 2004.

As lipases são capazes de catalisar a reação de transesterificação para a produção de biodiesel tornando o processo mais limpo, uma vez que permite uma fácil recuperação do glicerol, reuso do biocatalisador, não exige etapa de neutralização, consome menos energia e reage em temperaturas baixas (ANTCZAK *et al.*, 2009). Em virtude das vantagens da transesterificação por via enzimática pesquisadores vêm tentando superar limitações tais como o elevado custo da enzima, o baixo rendimento, o tempo elevado de reação, a

necessidade de água e solventes orgânicos na mistura da reação (BAJAJ *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2010).

Dentre as enzimas lipolíticas, a obtida por *Burkholderia cepacia* (anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia* – codificada comercialmente como lipase PS) tornou-se versátil e especialmente adequada para reações em solventes orgânicos devido à sua enantiosseletividade (HARA *et al.*, 2008). Outra justificativa está relacionada à estrutura cristalina desta lipase (Figura 2), a qual apresenta algumas características incomuns a outras lipases como um sítio de cálcio que, supostamente, estabiliza a tríade catalítica e a presença de um ácido carboxílico adicional que pode servir como uma alternativa para aceitação de prótons (KIM *et al.*, 1997, SCHRAG *et al.*, 1997).



Figura 2: Representação da estrutura tridimensional da lipase *Burkholderia cepacia*. As fitas β estão representadas como setas (em verde) e as α - hélices em azul. A posição do íon Ca^{+2} está indicada por uma esfera amarela e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho.

Fonte: SCHRAG *et al.* (1997).

Jegannathan *et al.* (2010) testaram o potencial catalítico das lipases de *Burkholderia cepacia* (PS), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Candida rugosa* (AYS), *Aspergillus niger* (AS) e de *Candida antarctica* (CALB) na reação de transesterificação enzimática de óleo de palma com metanol em um sistema isento de solvente. Dentre as cinco lipases testadas no estado livre, a lipase de *Burkholderia cepacia* resultou numa maior conversão de triglicerídeos.

No entanto, apesar das enzimas solúveis apresentarem excelentes propriedades catalíticas, elas necessitam de algumas melhorias que possibilitem sua reutilização, por exemplo, por longos períodos em reatores. Geralmente as enzimas são imobilizadas por técnicas que aprimoram a sua atividade e estabilidade e então a utilização do tratamento adequado da enzima pode resultar no êxito final da reação estudada (MATEO *et al.*, 2007).

3.2.IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O termo "enzimas imobilizadas" refere-se a "enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região de espaço definido, com retenção da sua atividade catalítica, e que pode ser usada repetidamente e de forma contínua." (GUISAN *et al.*, 2006). Além disso, a imobilização confere uma estabilidade adicional para uma variedade de enzimas contra diversas formas de desnaturação (BAYRAMOGLU *et al.*, 2002).

Em virtude das vantagens provenientes da imobilização, desde 1960 uma extensa variedade de técnicas tem sido desenvolvidas para imobilizar biomoléculas (BIRGIT *et al.*, 1999; KANDIMALLA *et al.*, 2006). Dentre os métodos mais comuns de imobilização de enzimas estão adsorção física e ligação covalente a um suporte sólido, e encapsulamento físico dentro de um suporte de matriz polimérica (MORENO-PIRAJÁN e GIRALDO 2011). Segundo TAN *et al.* (2010) estes métodos de imobilização têm sido empregadas nos últimos anos para melhorar a estabilidade da lipase para a produção de biodiesel.

Cada método relatado acima apresenta vantagens tais como: (i) Adsorção: possui fáceis condições de preparo e de baixo custo e o suporte pode ser regenerado para uso repetido; (ii) Ligação Covalente: a lipase imobilizada é bastante estável, devido às fortes forças entre a proteína e o suporte; (iii) Encapsulamento: as condições de aprisionamento são moderadas, e o método de imobilização é aplicável a uma ampla gama de suportes e lipases. E como desvantagens: (i) Adsorção: a interação entre a lipase e o suporte é fraca, de modo que a lipase imobilizada torna-se sensível ao pH, temperatura, entre outros. A capacidade de adsorção é pequena e a proteína pode ser extraída do suporte; (ii) Ligação Covalente: as condições de preparo são rigorosas, de modo que a lipase pode perder a sua atividade durante o processo de imobilização, além de alguns reagentes de ligação serem tóxicos; (iii)

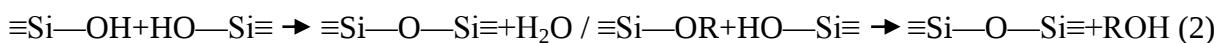
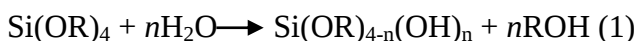
Encapsulamento: este método de imobilização tem sempre a restrição de transferência de massa durante o processo catalítico (TAN *et al.*, 2010).

As técnicas de imobilização necessitam de suportes para a ligação ou encapsulamento da enzima. Portanto, para a escolha do suporte, que podem ser de origem orgânica (naturais e sintéticos) ou inorgânica (minerais e fabricados), vários parâmetros são importantes e devem ser considerados como, por exemplo, resistência mecânica, estabilidade química e física, de caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de carregamento da enzima e custo, entre outros (CARVALHO *et al.*, 2006). O suporte é considerado ideal quando fixar a enzima de maneira irreversível enquanto utilizado, sem afetar sua atividade e sem interferir na reação, na qual será aplicado (MALCATA *et al.*, 1990). Matrizes de sílica produzidas por meio da técnica sol-gel têm atraído muita atenção como materiais ideais para a bio-imobilização em virtude da possibilidade deste processo ser usado em muitos métodos de imobilização, além de gerar formas de matrizes diferentes (SAKAI-KATO e ISHIKURA, 2009).

3.2.1. Matrizes para Imobilização: Técnica Sol-gel

O método sol-gel é muito utilizado para o preparo de matrizes hidrofóbicas para imobilização de catalisadores químicos e bioquímicos e baseia-se na formação de uma suspensão coloidal (sol), que por meio do processo de policondensação forma uma matriz sólida (gel) (REETZ *et al.*, 1996; FRANKEN *et al.*, 2002). A técnica sol-gel envolve um ácido ou uma base na catálise da hidrólise de tetra-alcóxisilanos $[\text{Si}(\text{OR})_4]$. Mecanicamente, o precursor-silano sofre hidrólise e condensação com formação de uma matriz de SiO_2 (GUISAN *et al.*, 2006).

A reação de polimerização do processo sol-gel pode ser dividida em duas etapas descritas pelas reações seguintes: (1) corresponde à hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do tipo silanol e (2) condiz com as reações de condensação do grupo silanol a qual leva inicialmente à formação sol e, eventualmente, ao gel (ALFAYA e KUBOTA, 2002).



Benvenuti *et al.* (2009) descreveram características interessantes do método sol-gel relacionando como vantagens a possibilidade de obtenção de componentes orgânicos e inorgânicos altamente dispersos; reações de gelificação processadas a baixas temperaturas permitindo inserir matriz sólida de biomoléculas como enzimas, proteínas e anticorpos, de difícil incorporação por outros métodos que utilizem temperaturas mais elevadas e a possibilidade de obter materiais sob diferentes configurações como fibras, corpos cerâmicos, monolitos, filmes, membranas e pós. E como desvantagens foram destacadas o elevado custo de alguns precursores; o número limitado de precursores disponíveis comercialmente e longos tempos de processamento, ressaltando que a reprodutibilidade nas propriedades finais dos materiais somente é alcançada com um controle minucioso das condições experimentais de síntese.

Materiais sol-gel podem ser utilizados para imobilização de enzimas tanto por encapsulação como por ligação covalente (SANTOS *et al.*, 2008a). As propriedades físicas e químicas da sílica são atrativas para unir materiais inorgânicos com biomoléculas, especificamente, a estabilidade termodinâmica da ligação Si-O que torna os materiais de silicato inertes para interações com muitas biomoléculas instáveis, permitindo que elas funcionem normalmente, na presença dos silicatos (SAKAI-KATO e ISHIKURA, 2009).

3.2.2. Método de Imobilização: Encapsulamento

Encapsulamento é um método de imobilização que tem atraído um crescente interesse em diversas áreas como biotecnologia, medicina, farmacêutica, catálise, ecologia e nutrição. O encapsulamento pode concentrar as biomoléculas para protegê-las em um volume definido e criar um único compartimento que representa um microambiente separado do ambiente exterior (KATO *et al.*, 2011).

A imobilização de enzimas no interior do suporte, ou seja, o método de encapsulamento apresenta como vantagens principais a grande área superficial para o contato entre o substrato e a enzima no interior de um volume relativamente pequeno além da possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Contudo, como

desvantagem há a possível inativação da enzima durante o processo, a necessidade de uma alta concentração de enzima e os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substratos no interior da matriz porosa (BON *et al.*, 2008).

A Figura 3 ilustra o método de encapsulamento pela técnica sol-gel permitindo a observação da incorporação da biomolécula de interesse após a formação da solução coloidal sol por meio da hidrólise do precursor. Uma solução tampão da biomolécula é adicionada à solução de sol para iniciar uma rápida policondensação do silano. Após esta policondensação, a biomolécula é imobilizada no gel hidratado, sem a necessidade de uma ligação covalente (SAKAI-KATO e ISHIKURA, 2009).

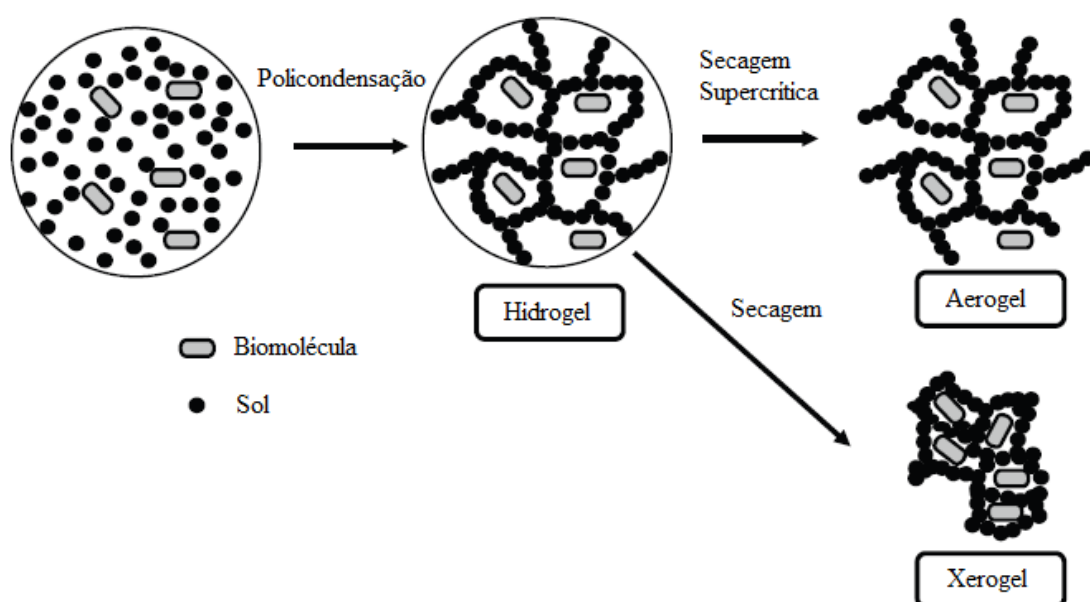


Figura 3: Esquema representacional do encapsulamento de biomoléculas por meio da técnica sol-gel.

Fonte: Adaptado de SAKAI-KATO e ISHIKURA, 2009.

Conforme Kim *et al.* (2006) após a formação do gel as enzimas ficam encapsuladas em matrizes de silicato. Nesta matriz final (Figura 4) vários poros e canais são formados, variando de 0,1 a 500 nm de tamanho.

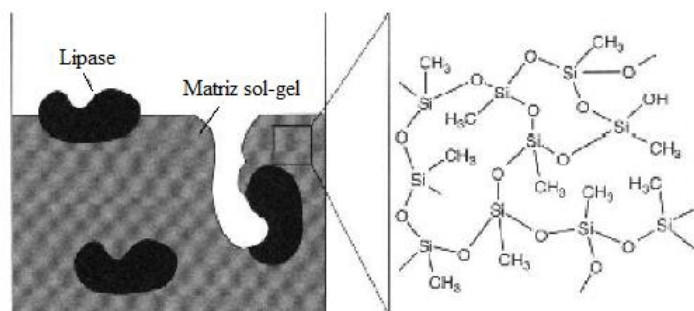


Figura 4: Característica física e composição química da lipase imobilizada em matriz sol-gel.
Fonte: Adaptado de REETZ *et al.*, 1996.

Hara *et al.* (2008) encapsularam a lipase de *Burkholderia cepacia* em matriz sol-gel utilizando liofilização para secagem do gel, e concluíram que o sistema imobilizado pode ser reutilizado por oito vezes para acilação com acetato de vinila em tolueno à temperatura ambiente.

Yang *et al.* (2009) imobilizaram lipase a partir de *Arthrobacter sp.* pelo processo de encapsulamento sol-gel utilizando vários agentes como precursores. A lipase imobilizada com (metacriloxipropil)-trimetóxisilano (MAPTMS) e TEOS demonstrou uma atividade de até 13,6 vezes maior que a da forma livre, maior estabilidade térmica e melhoramento da enantiosseletividade da enzima.

Cao *et al.* (2009) em seu trabalho encapsularam a lipase *Burkholderia cepacia* por meio da técnica sol-gel utilizando metiltrimetoxissilano (MTMS) e tetrametoxissilano (TMOS) como precursores, conseguindo um melhoramento de 2,5 vezes na atividade de esterificação além de aumento na estabilidade térmica.

Além da encapsulação outro método comum de imobilização que tem demonstrado potencial para imobilização de proteínas é a ligação covalente de enzimas em diversos suportes (FERNANDEZ *et al.*, 2008; BAYRAMOGLU *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

3.2.3. Método de Imobilização: Ligação Covalente

Neste método de imobilização a enzima é ligada covalentemente a um material insolúvel em água, por meio da reação entre os grupos funcionais da proteína e grupos

reativos com o material ativado (SANTOS *et al.*, 2008a), ou seja, o método da ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte. Portanto enzimas imobilizadas desta forma são estáveis, isto é, não se dissociam do suporte na presença do substrato ou de soluções com elevada concentração iônica (BON *et al.*, 2008).

Uma variedade de materiais capazes de alterar o micro-ambiente e consequentemente melhorar a atividade da enzima tem sido usada como suporte para a imobilização de lipases por ligação covalente, como, por exemplo, esferas de quitosana, poliacrilonitrilo, quitosana/álcool polivinílico, dentre outros (LI *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2012a). Entretanto a matriz híbrida de polissiloxano-álcool polivinílico tem demonstrado um bom comportamento como suporte para a imobilização de várias fontes de lipase (BRUNO *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008a).

O suporte híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico é preparado pelo processo sol-gel a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA) envolvendo três etapas: hidrólise, subsequente policondensação do TEOS e formação da matriz híbrida de SiO₂-PVA (SANTOS *et al.*, 2008a). O esquema da reação química de preparação deste suporte está ilustrado pela Figura 5.

A técnica sol-gel é um excelente método para preparação de material híbrido, pois a baixa temperatura de síntese permite que espécies orgânicas ou inorgânicas sejam incorporadas numa matriz de óxido de silício rígida, sem degradação. O compósito resultante combina as propriedades químicas e físicas do hóspede com a excelente estabilidade óptica, térmica e química das matrizes hospedeiras de óxido de silício (BARROS *et al.*, 2002).

A matriz resultante de SiO₂-PVA combina a propriedade do álcool polivinílico tal como um polímero adequado para reter as proteínas com as propriedades relatadas anteriormente da matriz hospedeira (SANTOS *et al.*, 2008b). Segundo Paula *et al.* (2008) esta matriz permite a manipulação da hidrofilicidade e hidrofobicidade, carga iônica, porosidade, condutividade elétrica e propriedades mecânicas em geral, bem como elevada atividade e estabilidade.

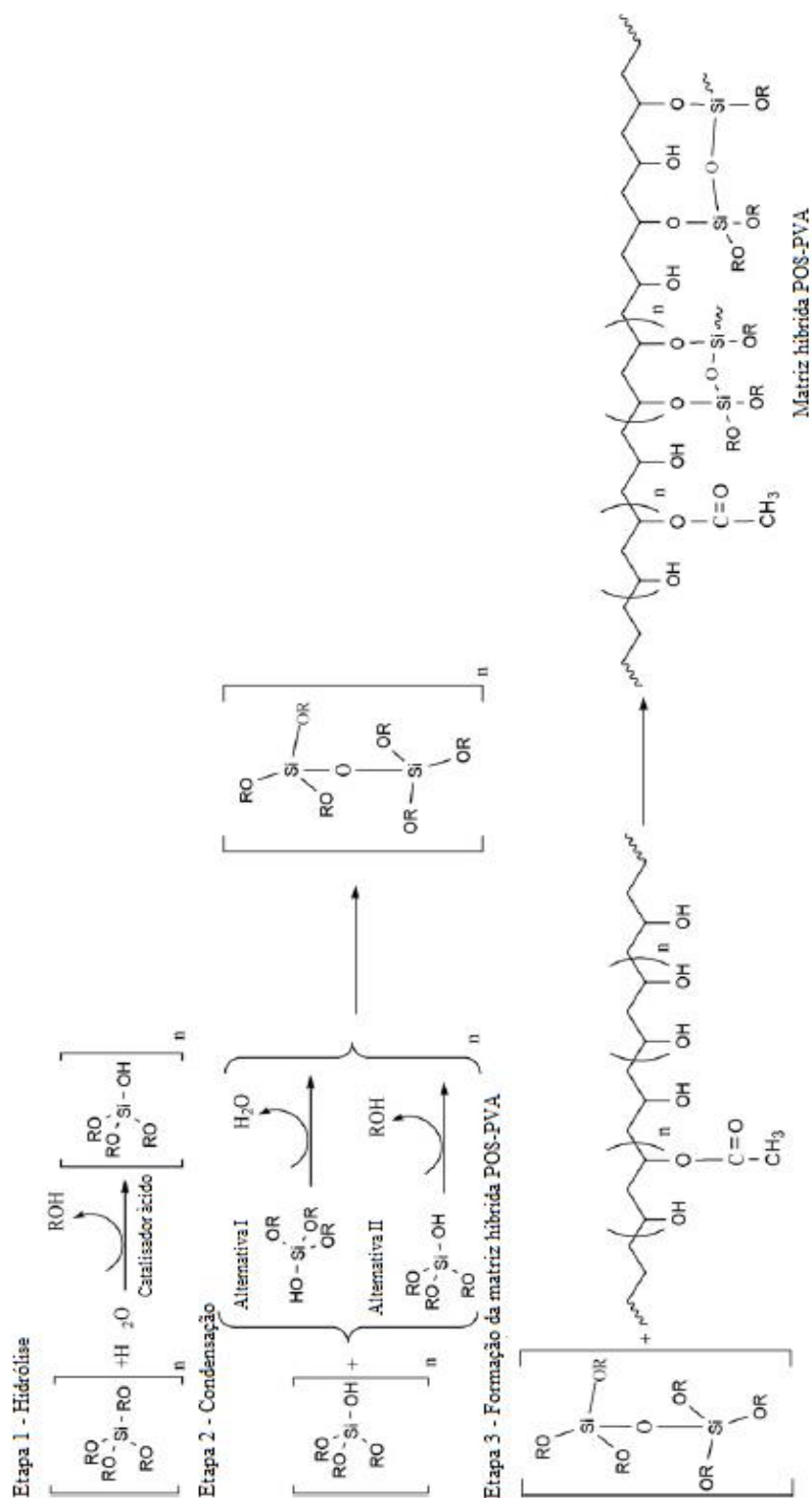


Figura 5: Esquema da reação química para preparação da matriz híbrida SiO₂-PVA.

Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.*, 2008a.

A ativação do grupo ligante é frequentemente realizada no suporte com o propósito de reduzir o risco da diminuição da atividade catalítica da enzima (BON *et al.*, 2008). Estudos realizados por Santos *et al.* (2008b) verificaram por meio da modificação química da matriz de SiO₂-PVA que a epícloridrina é um eficiente agente de ativação resultando em um sistema imobilizado constituído pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* de elevada atividade hidrolítica. O mecanismo de ativação do suporte está apresentado na Figura 6, sendo possível observar que os grupos epóxi (de uma forma geral o grupo epóxi é constituído por um átomo de oxigênio ligado a dois átomos de carbono) são formados na superfície do suporte, portanto somente um grupo hidroxil é necessário para a reação. Como consequência, é possível que um maior número de locais ativos para a ligação da enzima estejam disponíveis na matriz SiO₂-PVA ativada com epícloridrina.

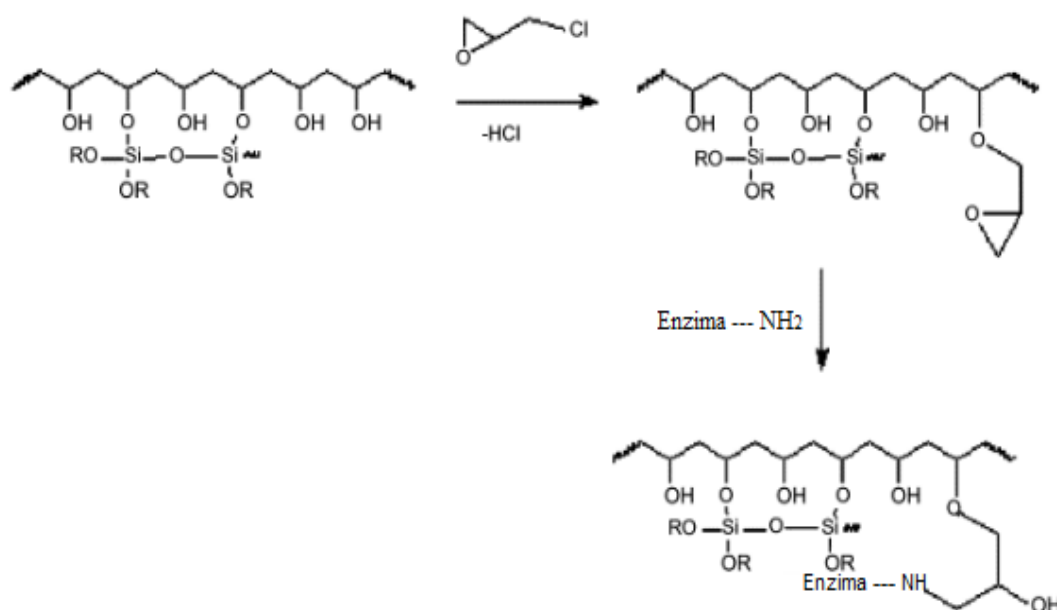


Figura 6: Mecanismo da ativação da matriz de SiO₂-PVA utilizando epícloridrina como agente de ativação.

Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.*, 2008b.

Relatos da literatura indicam que diversas enzimas têm sido imobilizadas por ligação covalente no suporte híbrido constituído de polissiloxano-álcool polivinílico utilizando como agente de ativação a epícloridrina, como por exemplo: *Pseudomonas fluorescens* ; *Candida antarctica* B ; *Penicillium camembertii* e *Burkholderia cepacia*; (FREITAS *et al.*, 2009; DA ROS *et al.*, 2010). Entretanto, dentre os citados o

imobilizado que se destacou por apresentar maior atividade hidrolítica e melhor desempenho na reação de transesterificação foi a preparação obtida com a lipase *Burkholderia cepacia*.

Entretanto, a taxa de difusão lenta do substrato nas matrizes de sílica pode reduzir a atividade das enzimas imobilizadas, e uma forma de superar esta desvantagem seria por meio da utilização de aditivos para estabilizar as enzimas dentro da matriz sol-gel. Aditivos também podem influenciar as propriedades do gel, por meio da participação nas reações de condensação com os grupos silanóis livres (LEE *et al.*, 2007).

3.2.4. Aditivos: Líquidos Iônicos

O uso de aditivos no procedimento de imobilização gera um melhoramento significativo na atividade e na estabilidade de enzimas imobilizadas. Açúcares, aminoácidos e agentes tensoativos são exemplos de aditivos utilizados para aumentar a atividade e estabilidade de várias enzimas, alterando a hidratação da enzima e reduzindo o encolhimento do gel, outros exemplos de aditivos estão evidenciados na Tabela 2. Todavia, nem todos os aditivos são eficientes como estabilizantes, pois a seleção do aditivo adequado deve ser em função do tipo de enzima e do método de imobilização (SOARES *et al.*, 2003 e LEE *et al.*, 2007).

Tabela 2: Aditivos utilizados nos procedimentos de imobilização de enzimas.

Agente Aditivo	Referência
Albumina	SOARES <i>et al.</i> , 2003
Polietilenoglicol	
Esporopolenina	YILMAZ <i>et al.</i> , 2010
Aliquat 336	SOUZA <i>et al.</i> , 2012
Zeólito	VIDINHA <i>et al.</i> , 2006
Líquidos iônicos próticos	SOUZA <i>et al.</i> , 2013
Derivados de calixareno	SAHIN <i>et al.</i> , 2009

No caso da imobilização por encapsulamento a enzima pode ser encapsulada juntamente com o aditivo durante o processo sol-gel (SAKAI-KATO e ISHIKURA, 2009). Segundo Gupta e Chaudhury (2007) vários estudos sugerem que o nível de sintonia e a natureza do aditivo dentro da matriz sol-gel podem proporcionar um mecanismo para manipular a dinâmica e acessibilidade das biomoléculas, e assim aperfeiçoar a atividade e estabilidade das biomoléculas aprisionadas.

A utilização de líquidos iônicos (LI's) como aditivos no processo de imobilização tem como função proteger a enzima da inativação pela liberação do álcool e pelo encolhimento do gel durante o processo sol-gel (LEE *et al.*, 2007). A utilização de LI's em processos biocatalíticos tem demonstrado maior seletividade e maior estabilidade da enzima (PARK e KAZLAUSKAS, 2003). Além do mais o caráter hidrofóbico dos LI's influencia na estrutura do suporte do sistema imobilizado possibilitando a formação de uma camada de hidratação ao redor da enzima favorecendo a atividade e induzindo a água para mais próximo da enzima (SOUZA *et al.*, 2013). O forte interesse em Líquidos Iônicos é motivado pela sua combinação única de propriedades, tais como pressão de vapor desprezível, estabilidade térmica, não-inflamabilidade, alta condutividade iônica e estabilidade eletroquímica (VIOUX *et al.*, 2010). Relatos da aplicação de LI's como aditivos durante a imobilização de enzimas pela técnica sol-gel são descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Relatos de imobilização de enzimas empregando LI's como aditivos.

Enzima	Líquido iônico	Resultados	Referências
<i>Candida rugosa</i>	Misturas de LI hidrofílico [C ₂ mim][BF ₄] e hidrofóbico [C ₁₆ mim][Tf ₂ N]	Tanto a atividade como a estabilidade do derivado imobilizado foram superiores as da lipase imobilizada na ausência dos LI's	Lee <i>et al.</i> (2007)
Pepsina e tripsina	1-butil-3-metil-imidazolium hexafluorofosfato [bmim][PF ₆]	A atividade catalítica dos ensaios imobilizados excederam as atividades das soluções de enzimas livres	Kato <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[Omim] BF ₄	Biocatalisadores de alta eficiência com rendimento de recuperação superior a 100%	Zarcu <i>et al.</i> (2010)

Os líquidos iônicos podem ser classificados em dois tipos, Líquidos Iônicos Apróticos (LIAs) e Líquidos Iônicos Próticos (LIPs). Os LI's constituídos principalmente dos cátions orgânicos a base do imidazólio, piridino, tetraalquilamônio e tetraalquilfosfônio, são os chamados líquidos iônicos apróticos (LIAs), os quais ainda apresentam elevados custos de síntese o que dificulta sua aplicação industrial (Álvarez *et al.*, 2010a; Zarcuła *et al.*, 2010).

Os LI's obtidos a partir de aminas, ácidos orgânicos e inorgânicos são chamados líquidos iônicos próticos (LIPs), os quais apresentam baixo custo, simplicidade de síntese, e diferentes aplicações o que favorece o interesse industrial (Álvarez *et al.*, 2010b). Os líquidos iônicos próticos fazem parte de um subconjunto dos líquidos iônicos formados pela combinação estequiométrica de um ácido com uma base de Brønsted. Quando LIPs são sintetizados por uma mistura de um ácido forte e de uma base forte o próton fica localizado muito fortemente na base. Os LIPs são caracterizados por sua grande habilidade para formar ligações de hidrogênio e presente pela consequência de uma interação forte com solventes polares (ANOUTI *et al.*, 2010). No entanto, sua aplicação em reações de biocatálise é pouco relatada.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa verificaram na biocatálise a influência da cadeia alquílica e da concentração dos líquidos iônicos próticos utilizados como aditivo no processo de imobilização da enzima de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel na reação de hidrólise de azeite de oliva em reator em batelada. A partir dos resultados verificou-se que o líquido iônico mais hidrofóbico (pentanoato de N-metilmonoetanolamina) na concentração de 1% p/v foi o que apresentou maior rendimento de imobilização, cerca de 1500% acima da atividade inicial oferecida no processo de imobilização. Além da determinação da atividade hidrolítica estudos prévios para a produção de biodiesel, sob aquecimento convencional, foram realizados para este novo biocatalisador e obteve-se 46,5% de ésteres etílicos em 72h de reação. Neste estudo o substrato foi óleo de soja e etanol na razão molar 1:15,2 e 0,075g de água (SOUZA *et al.*, 2013).

3.3. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

A reação de transesterificação é o processo químico mais viável para obtenção do biodiesel. A transesterificação (Figura 7) resume-se em uma reação química envolvendo matéria-prima renovável como óleos vegetais e gorduras animais e um álcool de cadeia curta como metanol ou etanol utilizando substâncias homogêneas ou heterogêneas como catalisador para produzir biodiesel e glicerol (MEHER *et al.*, 2006; ATADASHI *et al.*, 2012). Atualmente, relatos indicam que a reação de transesterificação pode ser catalizada por ácido/base (ANITESCU e BRUNO, 2012) ou por via enzimática (DA ROS *et al.*, 2012). O processo geral de transesterificação envolve uma sequência de três reações consecutivas, na qual mono e diglicerídeos são formados como intermediários (GERIS *et al.*, 2007). É importante evidenciar que alguns fatores podem afetar a produção de biodiesel como a quantidade de álcool, concentração do catalisador, tempo e temperatura da reação (LEUNG *et al.*, 2010).

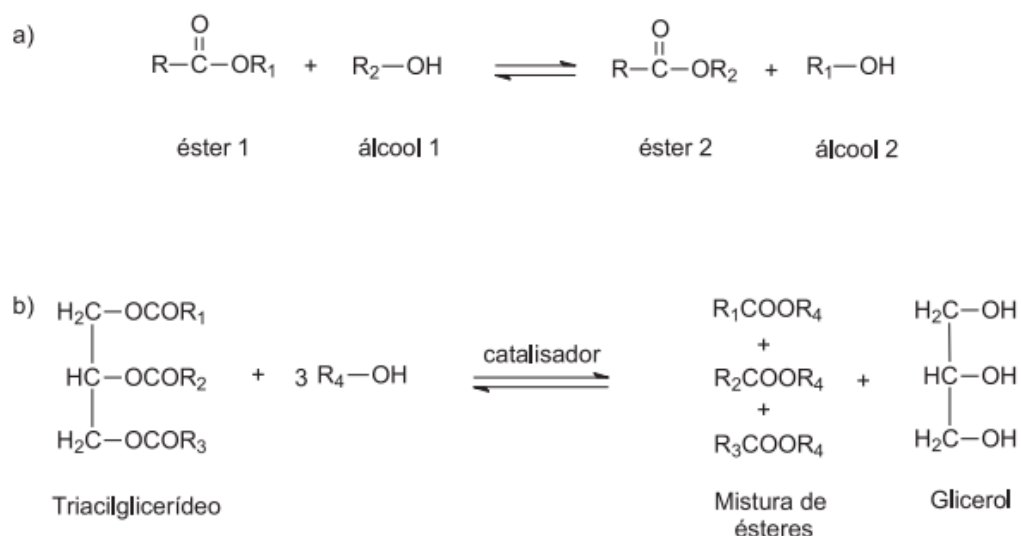


Figura 7: a) Equação geral para uma reação de transesterificação; b) equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.

Fonte: GERIS *et al.*, 2007.

A transesterificação por meio da catálise alcalina foi amplamente utilizada para a produção do biodiesel em vários países (FUKUDA *et al.*, 2001). Todavia, a transesterificação alcalina gera subprodutos indesejados como sabões e, portanto a compreensão da via enzimática e um progresso considerável na produção de

preparações sólidas de lipases podem resultar na substituição de catalisadores químicos para a síntese de biodiesel (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Os produtos da transesterificação são submetidos a técnicas de purificação diferentes. Um processo de purificação simples do biodiesel e de recuperação da glicerina de alta qualidade são os fatores-chave a serem considerados para reduzir o preço do combustível biodiesel e torná-lo competitivo com o combustível diesel convencional (ATADASHI *et al.*, 2012).

3.4. BIODIESEL

O biodiesel é um combustível renovável, que desponta como uma alternativa para o combustível diesel à base de petróleo, pois apresenta benefícios como não toxicidade, biodegradabilidade e baixa emissão de poluentes (KUMAR *et al.*, 2010). Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, o biodiesel é definido como biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. Quimicamente este biocombustível corresponde a monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa gerados por meio da reação de transesterificação (descrito no item 3.3) (KANITKAR *et al.*, 2011).

Entretanto, para a obtenção de um biocombustível de elevada qualidade, algumas características técnicas são imprescindíveis tais como: a reação de transesterificação deve ser completa, refletindo a ausência total de ácidos graxos remanescentes, e o biodiesel produzido deve ser de alta pureza, não contendo traços de glicerina residual ou álcool excedente de reação (KNOTHE *et al.*, 2006). Os ésteres alquílicos produzidos por meio da reação de transesterificação devem atender ainda a certas exigências de pureza estabelecidas por normas regulamentadoras, como a Norma Européia para o combustível biodiesel, ASTM especificações de qualidade de biodiesel e no Brasil a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis).

Em motores de ignição por compressão o biodiesel é amplamente aceito como combustível comparável ao diesel, oferecendo muitas vantagens, incluindo: maior número de cetano; redução das emissões de particulados, NO_x, SO_x, CO e hidrocarbonetos; toxicidade reduzida; maior segurança e menor ciclo de vida das emissões de CO₂ (MISRA e MURTHY, 2011). O biodiesel também pode ser usado em qualquer mistura com o diesel, pois estes combustíveis possuem características muito semelhantes (DEMIRBAS, 2005).

Contudo o principal obstáculo para a comercialização do biodiesel é o seu elevado custo (CHEN *et al.*, 2012b) provocado principalmente pelo preço da matéria-prima (LAI *et al.*, 2005; DEMIRBAS 2007), portanto para a produção se tornar economicamente viável é necessário que a geração do biocombustível seja a partir de gorduras não comestíveis ou residuais (ANTCZAK *et al.*, 2009). De acordo com Qiul *et al.* (2011) as fontes de matérias-primas de baixo custo estão desempenhando um papel vital em toda indústria de biodiesel.

Segundo Demirbas (2007) a produção e utilização do biodiesel são facilitadas em primeiro lugar por meio da política agrícola de subsidiar o cultivo de culturas não alimentares e em segundo lugar em virtude do biodiesel ser isento do imposto do petróleo.

3.5. MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Entre as fontes de biomassa os óleos vegetais e as gorduras animais têm atraído muita atenção como um recurso com potencial para a produção de biodiesel (ENWEREMADU e MBARAWA, 2009).

O inventor do motor a diesel, Rudolph Diesel, testou óleo de amendoim pela primeira vez, em seu motor de ignição por compressão, e relatou: "O uso de óleos vegetais para combustíveis de motor pode parecer insignificante hoje. Mas tais óleos podem no decorrer do tempo tornar-se tão importante como o petróleo e os produtos de alcatrão de carvão do tempo presente" (MEHER *et al.*, 2006).

Castro *et al.* (2004) relataram que as propriedades físicas dos óleos e gorduras dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes nele, nos quais o triglicerídeo é o componente mais expressivo. Algumas propriedades dos óleos vegetais podem influenciar na eficiência do funcionamento do sistema de injeção do motor (COSTA NETO *et al.*, 2000). Portanto os óleos vegetais não são usados diretamente como combustíveis, sendo necessário um óleo leve modificado quimicamente, principalmente por transesterificação (MEHER *et al.*, 2006).

Apesar dos triglicerídeos serem os principais constituintes dos óleos vegetais, é importante ressaltar que quantidades apreciáveis de ácidos graxos livres (originados dos processos de extração dos óleos vegetais), fosfolipídeos, esteróis e tocoferóis podem fazer parte da composição dos óleos vegetais (RINALD *et al.*, 2007).

A escolha dos óleos vegetais para a síntese de biodiesel depende das condições específicas dos países em questão (clima, potencial agrícola, desenvolvimento econômico do país, hábitos da população em relação à coleta de matéria-prima secundária, etc.). As matérias-primas mais utilizadas na produção de biodiesel na Europa foram os óleos vegetais tais como o de colza e o de semente de girassol, nos Estados Unidos da América foi o óleo de soja e em países tropicais foi o óleo de palma (STAMENKOVI *et al.*, 2011).

O Brasil é um país que contém grandes plantações de oleaginosas e, conseqüentemente, usufrui de uma diversidade de opções para produção de biodiesel a partir de plantas como palma, babaçu, mamona e dendê (GERIS *et al.*, 2007).

Segundo Balat (2011) cerca de 7% do abastecimento mundial de óleo vegetal foi utilizado para a produção de biodiesel em 2007. Na produção de biodiesel, a utilização de óleos vegetais não comestíveis em relação aos comestíveis é muito significativo nos países em desenvolvimento, visto que há uma grande demanda por estes óleos no setor alimentício, além do seu elevado custo para serem utilizados como combustível no momento.

Em relação ao álcool utilizado para a produção do biodiesel, o uso de metanol é mais comumente citado na literatura, entretanto outros álcoois também podem ser utilizados como o etanol, propanol, iso-propanol e butanol (MOSER, 2009).

Para algumas lipases o efeito do metanol é mostrado na inibição da atividade hidrolítica da enzima, além de poder participar diretamente na reação de transesterificação (ZHANG *et al.*, 2011). Segundo Hernández-Martín e Otero (2006) algumas propriedades do etanol (nucleófilo) podem induzir uma menor perda da atividade da lipase quando comparado com o metanol, favorecendo um maior rendimento de ésteres etílicos de ácidos.

De acordo com Kumar *et al.* (2010) o metanol é uma substância química tóxica enquanto o etanol possui a vantagem de não ser tóxico, nacionalmente disponível e que possui átomos de carbono superior oferecendo maior teor de calor. Além do mais o uso do bioetanol é atrativo para produção do biodiesel, uma vez que é derivado da conversão de biomassa, tornando possível utilizar os recursos locais, proporcionando independência em termos de fornecimento (BRUNSCHWIG *et al.*, 2012).

A Tabela 4 resume alguns trabalhos publicados empregando diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel em sistemas enzimáticos isentos de solventes. Com base em alguns desses trabalhos juntamente com a procura em tornar a produção de biodiesel economicamente viável, as matérias-primas selecionadas para este trabalho foram o óleo de babaçu, óleo de coco residual e o etanol.

Tabela 4: Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de diferentes matérias-primas.

Fonte de matéria-prima	Biocatalisador	Agente Acilante	Rendimento (%)	Referência
Óleo de soja	<i>Burkholderia cepacia</i>	Etanol	67	NOUREDDINI <i>et al.</i> , 2005
			65	
Óleo de babaçu	Lipase pancreática	Etanol	75	PAULA <i>et al.</i> , 2007
		Propanol	80	
		Butanol	95	
Óleo de oliva	Novozym 435	Dimetilcarbonato	81,2	SU <i>et al.</i> , 2007
Óleo de babaçu	<i>Burkholderia cepacia</i>	Etanol	>98	FREITAS <i>et al.</i> , 2009
Óleo residual de fritura	Novozym 435	Metanol	97,8	AZÓCAR <i>et al.</i> , 2010
Óleo de colza				
Óleo de soja	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Etanol	90	RODRIGUES e AYUB, 2011
	<i>Rhizomucor miehei</i>			
Óleo de palma	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Etanol	±80	TONGBORIBOON <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pseudomonas cepacia</i>			
Óleo de girassol	<i>Vasconcellea x heilbornii</i>	Metanol	73	CAMBON <i>et al.</i> , 2009
Óleo de coco	Novozym 435	Etanol	80,5	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012

3.5.1. Óleo de Babaçu

O babaçu (*Orbignya phalerata*) é uma palmeira (com aproximadamente 20 m de altura) nativa dos estados do norte do Brasil (Piauí, Tocantins, Maranhão), que aparece em um ecossistema entre o Cerrado e a Floresta Amazônica chamado Mata dos Cocais. Normalmente, cada árvore produz 15-25 cachos de frutas, cada fruta pesando 98-280 g. A produção anual de coco de babaçu a partir de uma área com 141-160 palmas por hectare é de cerca de 2,5 ton/ano (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Do ponto de vista pragmático, o babaçu não pode ser considerado como uma espécie de oleaginosa, uma vez que contém apenas 4% de óleo. No entanto, considerando os milhões de hectares de florestas tropicais com uma grande quantidade de árvores de babaçu e as possibilidades da utilização integral do coco, o babaçu constitui, potencialmente, uma fonte de matéria-prima extraordinária para produção de biodiesel, enquanto isso as outras partes da árvore podem ser utilizadas para outros fins (FREITAS *et al.*, 2009). Segundo Teixeira (2008) o babaçu é uma fonte de biomassa com potencial para contribuir com o suprimento de energia.

No que se refere à produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes para produção de biodiesel, devido à sua composição ser predominantemente láurica, o que facilita a reação de transesterificação. Os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficientemente e efetivamente com o agente acilante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas, inclusive quando o catalisador é diferente do NaOH, que é o mais utilizado (LIMA *et al.*, 2007).

Segundo a Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA o óleo de babaçu possui, no geral, a seguinte composição em ácidos graxos: caprílico 2,6 – 7,3%, cáprico 1,2 – 7,6%, láurico 40 – 55%, mirístico 11 – 27%, palmítico 5,2 – 11%, esteárico 1,8 – 7,4%, oléico 9,0 – 20% e linoléico 1,4 – 6,6%.

3.5.2. Óleo de Coco

O coqueiro (*Cocos nucífera* L.) é cultivado em aproximadamente 90 países, sendo típico de clima tropical. Tem origem no Sudeste Asiático e os maiores produtores mundiais são: Filipinas, Indonésia e Índia. No Brasil a cultura do coqueiro, variedade gigante, chegou possivelmente, com a colonização portuguesa em 1553, oriunda da ilha de Cabo Verde, que por sua vez, foram originadas de plantações Indianas, introduzidas na África (JERONIMO, 2012). O Nordeste brasileiro é a região responsável por 73% da produção nacional de coco, proporcionando emprego e renda para mais de 220 mil produtores (MARINHO *et al.*, 2006). A cultura do coco possui elevada importância econômica devido ao seu diverso aproveitamento pela indústria brasileira. O fruto do coqueiro é utilizado para a fabricação de produtos tais como, o leite de coco, coco ralado, óleo de coco, além de ser consumido *in natura* e possuir as partes do coqueiro e as fibras do coco empregadas no artesanato. Vale ressaltar que a produção do óleo de coco pode ser uma alternativa ao reuso e reaproveitamento dos resíduos gerados na indústria de coco (CALLADO e PAULA JÚNIOR, 1999).

O óleo de coco é produzido pelo esmagamento da copra, o núcleo seco, que contém cerca de 60-65% de óleo. O mesmo é caracterizado por um valor baixo de iodo, valor de saponificação e conteúdo de ácidos graxos saturados elevados (KRISHNA *et al.*, 2010). O óleo de coco está classificado no grupo de ácido láurico dos óleos vegetais, contendo mais de 90% de ácidos graxos saturados. Devido à esta composição de baixa insaturação o óleo de coco é resistente à oxidação e possui uma longa vida de prateleira (GUARTE *et al.*, 1996).

Segundo a Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999 - ANVISA o óleo de coco possui composição predominantemente láurica, assim como o óleo de babaçu, apresentando as seguintes porcentagens, em geral: capróico 0,4 - 0,6%, caprílico 5,0 - 10%, cáprico 4,5 - 8,0%, láurico 43 - 51%, mirístico 16 - 21%, palmítico 7,5 - 10%, esteárico 2,0 - 4,0%, oléico 5 - 10% e linoléico 1,0 - 2,5%.

O uso combinado das matérias-primas ideais forma um bom meio para a síntese de biodiesel, porém a fonte de irradiação de energia empregada no processo pode

reforçar a produção deste biocombustível, como tem sido relatado por Fang *et al.* (2008) que o uso de aquecimento não convencional tem se mostrado capaz de acelerar reações biocatalisadas.

3.6. DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO DE ENERGIA

Os efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre os reagentes no sistema de síntese de biodiesel é uma das principais razões responsáveis pelas baixas taxas de reação obtidas durante o processo de transesterificação (CINTAS *et al.*, 2010; SALAMATINIA *et al.*, 2012). Em virtude deste fato muitos pesquisadores têm investigado técnicas distintas para intensificação da produção de biodiesel, conhecidas por técnicas não convencionais, as quais serão abordadas nos tópicos seguintes.

3.6.1. Micro-ondas

A energia de micro-ondas é uma forma de energia eletromagnética com a faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz, com comprimento de onda correspondente entre 1mm e 1m. As micro-ondas possuem os comprimentos de onda mais longos e menor energia quântica disponível do que as outras formas de energia eletromagnética como a luz visível, raios ultravioleta ou infravermelhos (OGHBAEI e MIRZAEI, 2010). A região de micro-ondas situa-se entre a região do infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético como é mostrado na Figura 8 (SANSEVERINO, 2002).

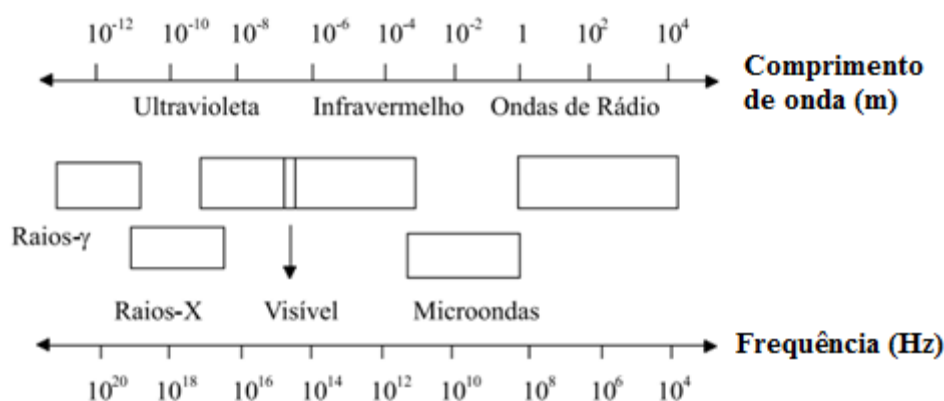


Figura 8: Faixa de frequência e comprimento de onda de micro-ondas.
Fonte: Adaptado de SANSEVERINO, 2002.

O aquecimento por micro-ondas é provocado pela capacidade dos materiais de absorver a energia de micro-ondas e convertê-lo em calor (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2012). Segundo Thostenson e Chou (1999) a energia de micro-ondas é transferida diretamente aos materiais por meio da interação molecular com o campo eletromagnético. Em transferência de calor, a energia é transferida devido aos gradientes térmicos, mas aquecimento por micro-ondas é baseado na conversão de energia sendo a transferência da energia eletromagnética para energia térmica. Essa diferença no fenômeno de transferência de energia permite que as micro-ondas penetrem em materiais e depositem energia, gerando calor em todo o volume do material, resultando, assim em inúmeras vantagens potenciais para o uso de micro-ondas no processamento de materiais.

Segundo Sanseverino (2002) o aquecimento por micro-ondas, também denominado aquecimento dielétrico, pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais. O primeiro, chamado de rotação de dipolo, relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida nestes dipolos é dissipada na forma de calor. No segundo mecanismo, denominado condução iônica, o calor é gerado por perdas por fricção, que acontecem pela migração de íons dissolvidos sob a ação de um campo magnético.

Como a capacidade de aquecimento desta técnica de transferência de energia está relacionada com as propriedades dielétricas dos materiais e a distribuição do campo

eletromagnético, o aquecimento torna-se rápido durante toda a espessura do material, com redução de gradientes térmicos, quando o campo eletromagnético é homogêneo (THOSTENSON e CHOU, 1999; SANTOS *et al.*, 2011).

Vários exemplos de transesterificação sob catálise química assistida por irradiação micro-ondas têm sido publicados na literatura, como Hernando *et al.* (2007), Hsiao *et al.* (2011), Kanitkar *et al.* (2011) e Chen *et al.* (2012b) que relataram o fato da irradiação de micro-ondas ter revelado benefícios na síntese de biodiesel quando comparada a aplicação do aquecimento convencional.

No entanto, os estudos de utilização da irradiação de micro-ondas em reações enzimáticas ainda estão em fase inicial de investigação (GUPTA e ROY, 2004). Nogueira *et al.* (2010) estudaram o efeito da irradiação de micro-ondas sobre a taxa de transesterificação enzimática usando óleo de macaúba e etanol como matérias-primas. Apesar de conseguirem rendimentos abaixo de 50% para *Novozyme 435* e *Lipozyme IM* os autores fizeram uma comparação da atividade catalítica das enzimas sob aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas notando um aumento significativo na atividade de ambas as enzimas na presença desta forma de aquecimento não convencional.

Réjasse *et al.* (2004) estudaram a influência do aquecimento por micro-ondas sobre a estabilidade da lipase imobilizada *Candida antarctica* a 100°C em meio orgânico. Os resultados obtidos pelos pesquisadores mostraram que a estabilidade enzimática foi maior sob aquecimento proveniente das micro-ondas do que sob aquecimento térmico convencional. Além disso, o ganho da estabilidade enzimática sob aquecimento por micro-ondas parece ser mais elevada em um solvente mais polar, que interage fortemente com o campo de micro-ondas.

Parker *et al.* (1996) encontraram um aumento de 2-3 vezes na taxa de reação de lipase hidratada suspensa em meios orgânicos utilizando micro-ondas (2,45 GHz, 50°C) em comparação com o aquecimento clássico.

Yadav e Lathi (2006) utilizaram lipases imobilizadas para a esterificação do ácido láurico com 1,2 propanodiol sob aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas, descrevendo um aumento da atividade de até 2,84 vezes.

Da Rós *et al.* (2012) em seu trabalho de transesterificação enzimática de biodiesel a partir de sebo bovino demonstraram que o meio reacional, quando submetido à irradiação por micro-ondas, promoveu um aumento significativo na velocidade da reação, em comparação com o sistema de aquecimento convencional. A Tabela 5 apresenta de forma resumida outros exemplos de reações enzimáticas assistidas por aquecimento de micro-ondas.

Tabela 5: Reações enzimáticas realizadas por meio do aquecimento por micro-ondas.

Tipo de Reação	Substrato	Enzima	Parâmetros (Potência/Temperatura)	Referência
Esterificação	Pentanol e ácido caprílico	<i>Mucor miehei</i>	200W / 50°C	FANG <i>et al.</i> , 2008
Esterificação	n-álcool homólogos e ácido caprílico	<i>Mucor miehei</i>	200W / 40-50°C	HUANG <i>et al.</i> , 2005
Esterificação	Xilitol e ácido oleico	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Penicillium camembertii</i> e lipase de pâncreas de porco.	- / 45-60°C	RUFINO <i>et al.</i> , 2010
Transesterificação	etil-3-fenilpropanoato e n-butanol	Novozym 435, Lipozyme RMIM e Lipozyme TL IM	- / 60°C	YADAV e PAWAR, 2012
Transesterificação	Óleo vegetal	Lipase de <i>Aspergillus carneus</i>	800W/ 90°C	SAXENA <i>et al.</i> , 2005
Transesterificação	Metanol e óleo de soja	Novozym 435	- / 40°C	YU <i>et al.</i> , 2010

3.6.2. Ultrassom

Ultrassom é uma frequência superior a da audição humana, que é usada para uma variedade de fins em diversas áreas (ROKHINA *et al.*, 2009). A Figura 9 mostra uma ideia da frequência do ultrassom em relação à sensibilidade do ouvido humano . (16 Hz a 16 KHz). A frequência característica do ultrassom, em geral, está no intervalo de 16 KHz a 1 MHz. Sendo que frequências de 1 a 10 MHz correspondem à região de alta frequência (MARTINES *et al.*, 2000).

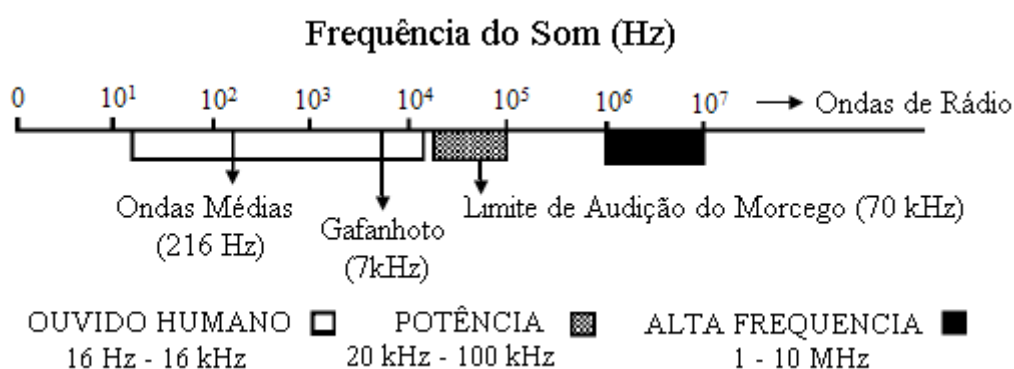


Figura 9: Região de frequência do som.

Fonte: Adaptado de MARTINES *et al.*, 2000.

É considerada uma tecnologia 'verde' em virtude de sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, tempo de processo reduzido significativamente em comparação com outras técnicas convencionais e desempenho economicamente viável. Efeitos químicos de ultrassom não ocorrem a partir de uma interação direta com espécies moleculares, mas a partir do fenômeno de cavitação: formação, crescimento e colapso implosivo de cavidades em líquidos que liberam grandes quantidades de energia altamente localizada (ROKHINA *et al.*, 2009).

A irradiação de ultrassom provoca bolhas de cavitação próximo ao limite entre as fases do sistema. Como resultado, micro bolhas são formadas. O colapso assimétrico das bolhas de cavitação perturba o limite das fases causando emulsificação por jatos de ultrassons que incidem de um líquido para o outro. Uma vez que tal emulsão é formada, a área da superfície disponível para a reação entre as duas fases aumenta significativamente. A cavitação pode também levar a um aumento localizado da

temperatura no limite da fase enriquecendo a reação de transesterificação (SANTOS *et al.*, 2009; VELJKOVIC *et al.* 2012).

Muitos são os benefícios oriundos da aplicação da cavitação em processos químicos, tais como: redução do tempo de reação; aumento do rendimento da reação; uso de menos condições de força (temperatura e pressão) em comparação com as rotas convencionais; redução do período de indução da reação desejada; possíveis mudanças nas vias reacionais resultando no aumento da seletividade; aumento da eficácia do catalisador utilizado na reação (GOGATE *et al.*, 2006).

A irradiação ultrassônica favorece o aumento dos rendimentos de biodiesel quando comparados com os sistemas que empregam aquecimento convencional e agitação mecânica, além do mais são obtidos em tempos de reação mais curtos, independentemente do tipo de ultrassom, do catalisador e das matérias-primas utilizadas (VELJKOVIĆ *et al.*, 2012). O aumento na taxa de formação de éster sob condições de mistura ultrassônica é resultante de fatores como emulsificação e transferência de massa eficientes induzidos pelas condições de turbulência e pela circulação do líquido no reator gerados pelo emprego da cavitação (KELKAR *et al.*, 2008; HSIAO *et al.*, 2010).

O ultrassom tem sido usado em muitos processos biológicos, dentre eles seu potencial em influenciar as atividades dos processos enzimáticos tem sido estudada. A atividade das enzimas pode ser melhorada por meio da aplicação da cavitação, no entanto a influência da radiação sônica sobre a atividade e a estabilidade das enzimas depende dos parâmetros de sonicação e da preparação enzimática específica, ressaltando que sistemas compostos por ultrassom de alta potência provoca a interrupção da função da enzima em estudo e ruptura das células ao contrário do emprego das baixas potências (KWIATKOWSKA *et al.*, 2011).

Batistela *et al.* (2012) descreveram a transesterificação de óleo de soja com etanol usando Lipozyme como catalisador sob a influência de irradiação de ultrassom. Estes autores mostraram que esta pode ser uma alternativa potencial para o método alcalino, dado que o rendimento elevado da reação (~90 wt.%) foi obtido em 4h, na temperatura de 60°C e aproximadamente 100 W de potência.

Wang *et al.* (2007) utilizaram Novozym 435 como biocatalisador para a transesterificação de óleo residual contendo alto índice de acidez e 1-propanol em oleato de propila. A aplicação do ultrassom melhorou a atividade enzimática e acelerou a velocidade de difusão, proporcionando a obtenção de 95% de rendimento em 50 minutos de reação a uma temperatura de 40°C e potência de 100 W.

A transesterificação enzimática de 1-gliceril benzoato sob irradiação ultrassom foi estudada por Ceni *et al.* (2011) utilizando a lipase imobilizada comercial Novozym 435. A maior conversão, cerca de 16%, foi obtida a 65°C com 40% de potência ultrassônica em 4 h de reação. Os autores concluíram que esta técnica é uma perspectiva promissora para ultrapassar as limitações de transferência de massa resultantes da utilização de glicerol como substrato. Entretanto, não há relatos na literatura que apresentem comparação entre o emprego da irradiação de micro-ondas e do ultrassom na síntese enzimática de ésteres.

CAPÍTULO III

Este capítulo está apresentado na forma de artigos científicos, e estão organizados conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Este capítulo traz uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além das conclusões de cada etapa.

No primeiro artigo (ARTIGO I _ “Transesterification of babassu oil using lipase from *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as additive”) a etanolise de óleo de babaçu sob aquecimento convencional foi otimizada por meio do emprego do planejamento experimental 2² utilizando a lipase *Burkholderia cepacia* (PS) imobilizada por encapsulação pelo método sol-gel utilizando o aditivo líquido iônico prótico (*N*-metilmonoetanol-amina pentanóico). Este artigo foi submetido ao periódico Acta Scientiarum Technology.

O segundo artigo (ARTIGO II – “Enzymatic ethanolysis of crude coconut oil to produce biodiesel by different sources of energy irradiation”) avalia o potencial do óleo de coco bruto em reações de transesterificação enzimática assistida por diferentes fontes de irradiação de energia (aquecimento convencional, micro-ondas e ultrassom). Este artigo será submetido ao periódico Industrial Crops and Products.

ARTIGO I

Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as additive

Maria Vanessa Souza Oliveira^a, Nayara Bezerra Carvalho^a, Patricia Caroline Molgero Da Rós^b, Silvana Mattedi^c, Miguel A. Iglesias Duro^c, Heizir Ferreira de Castro^b, Cleide Mara Faria Soares^a, Álvaro Silva Lima^a

^a*Universidade Tiradentes, ITP - Instituto de Tecnologia e Pesquisa, 300, Aracaju – SE, Brazil;*

^b*Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 116, Lorena – SP, Brazil.*

^c*Universidade Federal da Bahia-UFBA, Departamento de Engenharia Química, Rua Aristides Novis 2, Federação, Salvador-BA, Brazil.*

e-mail: aslima2001@yahoo.com.br

ABSTRACT

This paper addressed the study of the enzymatic transesterification from non-edible vegetable oil (babassu oil) and ethanol using full 2^2 factorial design leading to a set of seven runs with three center points considering different combinations of molar ratio and temperature as independent variables. Transesterification reactions were catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated on hydrophobic matrices obtained by sol-gel technique using protic ionic liquid (N-methylmonoethanolamine pentanoate) as additive in the immobilization process under conventional heating. The highest yield of ethyl esters (51.90 %) was obtained with 1:7 molar ratio and temperature at 40 °C. However, the process with increase of enzymatic load on five fold allowed a 98.69 % ethyl esters yield with viscosity of $4.29 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

KEYWORDS: N-methylmonoethanolamine pentanoate, enzymatic loading, factorial design, molar ratio, temperature, ethyl esters.

INTRODUCTION

Enzymatic transesterification has certain advantages over chemical transesterification, such as, enable easy recovery of glycerol, transesterification of glycerides with high free fatty acid contents, less energy intensive, which turns the process for ethyl esters production in a cleaner process (BAJAJ et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2010); also, these biocatalysts are ecofriendly (ANTCZAC et al., 2009). The steadily growing interest in lipases over the last two decades stems from their biotechnological versatility and the ability of these enzymes to catalyze a broad spectrum of bioconversion reactions such as hydrolysis, esterifications, transesterifications, aminolysis and others (SAXENA et al., 2003; MINOVSKA et al., 2005).

The immobilization is an advantageous method that improves the stability of the biocatalyst and provides for its repeated use and easy separation of the catalyst from the reaction medium (MINOVSKA et al., 2005; KATO et al., 2011). Lipases have been entrapped by sol-gel matrix employing different additives (KANDIMALLA et al., 2006; REETZ et al., 1996; MACARIO et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

The use of additives in the process of immobilization favors a significant improvement in the activity and stability of immobilized enzymes (REETZ et al., 1996; SOARES et al., 2003). Commonly the literature has reported the use of additives such as albumin and polyethylene glycol (SOARES et al., 2003), sporopollenin (YILMAZ et al., 2010), zeolite (VIDINHA et al., 2006), calixarene derivatives (SAHIN et al., 2009), ionic liquid (SOUZA et al., 2013). However, due to their unique properties the use of ionic liquids (IL) in all areas of the chemical industries has excellent prospect (KESKIN et al., 2007). Ionic liquid are used as additive in the immobilization process as agent that protect the enzyme from deactivation and modify the morphology surface of the support (SOUZA et al., 2013; FAUZI and AMIN, 2012).

Ionic liquids (ILs) are organic salts with melting points around or below the ambient temperature, negligible vapor pressure, high chemical and thermal stabilities constituted of organic cations and organic or inorganic anions (LIU et al., 2012). Protic ionic liquids (PILs) compose a subset of the ionic liquids formed by the stoichiometric (equimolar) combination of a Bronsted acid with a Bronsted base and are characterized

by their great ability to form H-bond and consequently show a strong interaction with polar solvents (ANOUTI et al., 2010).

The use of PILs in the process of enzyme immobilization is not usually reported in the literature, however a study performed by Souza et al. (2013) using lipase *Burkholderia cepacia* encapsulated on hydrophobic matrixes obtained by sol-gel technique using protic ionic liquid as additive in the immobilization process showed promise results. The authors demonstrated an outstanding increase in the immobilization yield (over 1000 %) compared to the activity offered by the immobilized enzymes without PIL.

The present work aims to analyze the effects lipase from *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid in the transesterification of non-edible vegetable oil under conventional heating, through the use of a 2^2 factorial design with three replicates of the center point.

MATERIAL AND METHODS

Materials and reagents

Commercial lipase from *Burkholderia cepacia* ($1,317.16 \text{ U.mg}^{-1}$) was purchased from Aldrich. Tetraethoxysilane (TEOS) was supplied by Across Organic (New Jersey, United States). Ethanol (> 99 % pure), ammonia (28 % pure), hydrochloric acid (minimum 36% pure) Arabic and gum (85 % pure) were obtained from Synth (São Paulo, Brazil). Ultrapure water, double distilled, passed by a reverse osmosis system and further treated with a Milli-Q plus 185 water purification apparatus, was used throughout the experiments. The protic ionic liquids N-methylmonoethanolamine pentanoate encoded as C₅ (Figure 10) was supplied from Federal University of Bahia (UFBA). Babassu oil was kindly supplied by Cognis (Jacareí, SP, Brazil) having the follow composition in fatty acids (% w.v⁻¹): 3.5 caprylic, 4.5 capric, 44.7 lauric, 17.5 myristic, 9.7 palmitic, 3.1 stearic, 15.2 oleic and 1.8 linoleic. The average molecular weight of babassu oil is $709.90 \text{ g.mol}^{-1}$. All chemicals were of analytical grade.

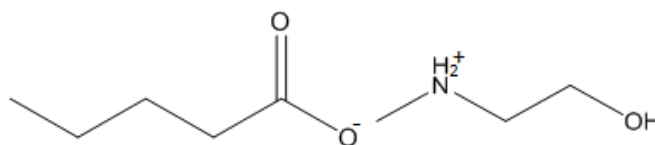


Figure 10: Protic ionic liquid structure N-methylmonoethanolamine pentanoate.

Lipase immobilization

The sol-gel matrices encapsulation methodology applied by Souza et al. (2013) was used with some modifications and it is briefly describe as follows: 30 mL of TEOS were dissolved in 36 mL of absolute ethanol under an inert nitrogen atmosphere. To this, 0.22 mL of hydrochloric acid was dissolved in 5 mL of slowly added ultra-pure water, and the mixture was agitated (200 rpm) for 90 min at 35 °C. The commercial lipolytic enzyme from *B. cepacia* (2.7 g) was dissolved in a solution of 10 ml of ultra-pure water, to which was simultaneously added 1% (w.v⁻¹) of N-methylmonoethanolamine (protic ionic liquid). Next, 1.0 mL of ammonium hydroxide dissolved in 6.0 mL of ethanol (hydrolysis solution) was added to the sol-gel reaction, and the mixture was kept under static conditions for 24 h until complete polycondensation. The bulk gel was washed with heptane and acetone and dried under vacuum at room temperature for 72 h. Average measured hydrolytic activity of immobilized derivatives was $428.58 \text{ U.g}^{-1} \pm 25.79 \text{ U.g}^{-1}$.

The reloading of previously immobilized system was carried by adsorption, based on Freitas et al. (2009). The immobilized system was soaked into hexane under stirring (100 rpm) at 25 °C. After 1 h the excess of hexane was removed and lipase was added at a ratio of 1:4 gram of enzyme per gram of support. PEG-1500 was added together with the enzyme solution at a fixed amount (100 µl/g of support). Lipase-support system was maintained in contact for 16 h at 4 °C under static conditions and then was filtered and thoroughly rinsed with hexane. Average measured hydrolytic activity of immobilized lipase derivatives was around $2176.5 \text{ U.g}^{-1} \pm 99.48 \text{ U.g}^{-1}$.

Lipase activity

Enzymatic activities of the free and immobilized lipase samples were assayed by the olive oil emulsion method according to the modification proposed by Soares et al. (1999). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that

liberates 1 mol of free fatty acid per min under the assay conditions (37 °C, pH 7.0, 5 min incubation).

Ethyl esters synthesis

The reactions were performed according to the methodology described previously by Freitas et al. (2009) in closed reactors with a capacity of 25 mL containing 12 g of substrate consisting of babassu oil and anhydrous ethanol, without the addition of solvents. The mixtures were incubated with the immobilized lipase at proportions of 20 % (w.w⁻¹) in relation to the total weight of reactants involved in the reaction media. Reactions were performed for a maximum period of 48 h under constant magnetic agitation of 150 rpm, stressing that two reactions entitled 1 and 2 were performed for 96 h. For the time course studies, an aliquot of reaction medium was taken at various time intervals for GC-analysis.

The ethyl esters formed were analyzed by gas chromatograph using a Varian CG 3800 model (Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with flame—ionization detector and 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6 ft, 2.0 mm ID, in a stainless-steel-packed column (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltd., SP, Brazil). Nitrogen was used as the gas carrier with a flow rate of 25 ml min⁻¹. Temperature programming was used. The column temperature was kept at 90 °C for 3 min, heated to 120 °C at 25 °C.min⁻¹ and kept constant for 10 min. Then, the temperature was programmed from 25 °C.min⁻¹ to 170 °C and kept constant for 15 min. The temperatures of the injector and detector were set at 250 °C. Data collection and analyses were performed using the software Galaxie Chromatography Data System version 1.9. Calibration curves were built from standard ethyl esters using hexanol as internal standard. The transesterification yield was calculated by taking into account the mass of ester content detected by GC analysis and the total theoretical ester mass based on the molar ratio of the reaction.

Experimental design

Experiments were carried out according to full 2² factorial design with three replicates at the central point in order to study the effect of the temperature and ethanol to babassu molar ratio (independents variables) on yield of ethyl esters.

The experimental design applied to this study was amplified to surface response methodology (RSM). The ethanol to babassu molar ratio (X_1) and temperature (X_2) were chosen as independent variables. Selection of the levels was carried out on the basis of the results obtained in a preliminary study (Table 6). The transesterification yield corresponded to response variable. Results were analyzed using *Statistica* software version 8.0 (StatSoft Co.) to verify the independent variables effects on the response assuming levels of $p < 0.1$ as statistical significance criteria. The statistical significance of the regression coefficient was assayed by *Student's* test.

Table 6: Factor levels used according to the 2^2 full factorial design

Variable	Symbol	Levels		
Molar ratio (oil babassu to ethanol)	X_1	1:7	1:10	1:13
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	X_2	40	48	56

Downstream procedure

At the end of the reaction with the highest yield on ethyl esters (96 h), the lipase was separated from the medium, and the organic phase was washed three times with water to remove the free glycerol formed as a by-product. Residual ethanol was removed by rotaevaporation, and the water remaining was removed with addition of sodium sulfate salt to attain the final fatty acid ethyl ester product (ANDRADE et al., 2012).

Viscosity determination

The absolute viscosity of biodiesel was measured with LVDV-II cone and plate spindle Brookfield viscosimeter (Brookfield Viscometers Ltd, England) utilizing a CP 42 cone. A circulating water bath maintained the temperature at 40°C for each analysis. Samples of 0.5 mL were used and the measurements were replicated three times. The shear stress measurements were taken as a function of shear rate, and the dynamic viscosity was determined as a slope constant.

RESULTS AND DISCUSSION

The lipase catalyzed reaction rate depends on the concentrations of the enzyme, substrate, temperature, and others factors (DA RÓS et al., 2012). The study of the molar ratio (X_1) and temperature (X_2) effect in the transesterification reaction was carried out in a solvent free system catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid (N-methylmonoethanolamine pentanoate) as additive. The enzymatic transesterification reaction is generally performed at lower temperature than the chemical reaction to prevent loss of lipase activity (GOG et al., 2012). In this work, the temperature range studied was from 40 to 56 °C and the molar ratio oil: alcohol was 1:7 - 1:13.

Results shown in Table 7 clearly indicate that the highest conversion babassu oil in ethyl esters, corresponding to 51.90 %, was obtained with the smallest excess alcohol (1:7) and temperature of 40 °C for 48 h reaction.

Table 7: Experimental design and values for transesterification yield (%) according to the 2² full factorial design (variables in coded values with real values in parenthesis)

Runs	Variables		Yield (%)
	Oil-to-Ethanol Molar Ratio	Temperature (°C)	
1	-1 (1:7)	-1 (40)	51.90
2	+1 (1:13)	-1 (40)	44.07
3	-1 (1:7)	+1 (56)	35.41
4	+1 (1:13)	+1 (56)	35.01
5	0 (1:10)	0 (48)	46.66
6	0 (1:10)	0 (48)	40.15
7	0 (1:10)	0 (48)	41.79

Figure 11 shows that when both values of molar ratio and temperature changed from +1 (1:13, 56 °C) to -1 (1:7, 40 °C) the highest conversions of babassu oil in ethyl esters were obtained. Through Table 8 it can be seen that factors such as molar ratio, curvature and interaction between molar ratio and temperature were not significant showing $p > 0.1$.

Regression coefficient and p-values were calculated using experimental results. It can be seen from Tables 8 and 9 that temperature was the most significant independent variable. Thus, transesterification yields can be fitted to a three-dimensional surface described by a first-order model as a function of X_1 and X_2 (Equation 1, Figure 11). The values of both R^2 (0.89) and R^2 adj (0.69) of this model suggests a close agreement between the experimental data and the theoretical values predicted by the model. No optimal conditions were observed in the response surface for the transesterification of babassu oil. Therefore, only the identification of the region corresponding to the best response can be achieved.

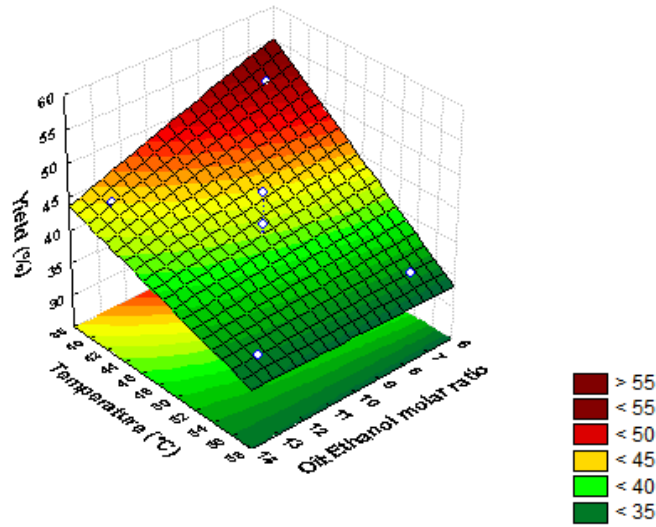


Figure 11: Response surface that represents the transesterification yield of babassu oil catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive

Table 8: Analysis of variance (ANOVA) for transesterification yield (%) of babassu oil using the 2^2 full factorial design

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Curvature	2.76	1	2.76	0.24	0.672
(X_1) Molar Ratio	16.93	1	16.93	1.48	0.348
(X_2) Temperature	163.20*	1*	163.20*	14.23*	0.064*
$X_1.X_2$	13.80	1	13.80	1.20	0.387
Pure Error	22.93	2	11.46		
Total	219.62	6			

*Significant at 90% confidence level.

The model equation for the response can therefore be written as ($p < 0.1$) in the following first -order equation that describes the response surface (1):

$$\text{Yield (\%)} = 41.60 - 2.06 \cdot X_1 - 6.39 \cdot X_2 + 1.86 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

Table 9: Regression coefficient, standard errors, and Student's t test for transesterification yield of babassu oil (%) using the 2^2 full factorial design

Factor	Regression coefficient	Standard Error Pure Error	t value	P value
Mean/Interc.	41.60	1.69	24.57	0.002
Curvature	1.27	2.59	0.49	0.672
(X ₁) Molar Ratio	-2.06	1.69	-1.21	0.348
(X ₂) Temperature	-6.39*	1.69*	-3.77*	0.064*
X ₁ .X ₂	1.86	1.69	1.10	0.387

* $p < 0.1$

In this work, the amount of alcohol added in the babassu oil transesterification, equivalent to a molar ratio of 1:10 and 1:13, achieved ethyl esters yields lower than 50%. According to Tongboriboon et al. (2010), a larger amount of ethanol causes an inhibitory effect on the enzymatic activity of the mixed lipase (*Pseudomonas fluorescens* and *Candida rugosa*). Alcohols have the capacity to bind with proteins and induce their dehydration resulting in a drastic loss of enzyme activity (CAMBON et al., 2009). Theoretically, transesterification reaction of one mole of triglyceride requires three moles of ethanol, however, the yield of ethyl esters of fatty acids depends on the preferred equilibrium under various conditions (CHEIRSILP et al., 2008). Still, other hypothesis (CAMBON et al., 2009), related that when alcohols are dissolved in the oil phase, the effect of denaturation of the enzyme is greatly reduced due to the hydrogen bonds with the lipid species. Therefore, it can be suggested that the amount of the alcohol in the reaction medium prepared at molar ratio oil to ethanol of 1:7 gives the highest transesterification yield possible by decreasing the substrate mass transfer limitations.

Moreover, the temperature also influences the enzymatic activity. According to the Arrhenius equation, the reaction rate increases as the temperature rises. However,

above a certain temperature enzyme inactivation occurs and the catalytic activity decreases (SU et al., 2007). Cambon et al. (2009) reported that decreasing temperature from 55 °C to 30 °C increased the production of esters showing a growth in conversion rate from 55 to 73 %.

Freitas *et al.* (2009) achieved the highest transesterification yield while operating under the lowest excess ethanol (1:7) and temperature (39 °C) using babassu oil as a source of triglycerides. The authors used as catalyst lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on SiO₂-PVA confirming the profile this lipase in this condition which is very similar to this work using *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid (N-methylmonoethanolamine pentanoate) as additive.

The performance of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in this work can be considered satisfactory when compared with performances reported by other lipases preparations, such as *Burkholderia cepacia* immobilized on niobium oxide hydrate (Nb₂O₅) (DA RÓS et al., 2010), in which the biocatalyst immobilized gave 40.21 % of the ethyl esters yield for a system composed of beef tallow and ethanol for 48 h. Lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized studied by Iso et al. (2001) showed a conversion of sunflower oil in the range of 0 to 50 % for a period of 50 h when reaction consisting by absence or 90 wt% of 1,4-dioxane. While this study used solvent-free medium.

This work shows promising results compared to Souza et al. (2013) that evaluated the production of ethyl esters from soybean oil and ethanol using lipase from *Burkholderia cepacia* encapsulated in matrix obtained by sol-gel technique and same protic ionic liquid as additive. The authors found a yield of 46.5 % in 72 h of reaction in conditions of 1:15.2 of molar ratio and 0.075 g of water.

Catalytic efficiency is the ratio between catalytic activity and enzyme loading, and thus it provides the activity per milligram of immobilized enzyme. Therefore this parameter is useful for comparative purposes among biocatalysts with different enzyme loading (SERRA et al., 2010). The values obtained for hydrolytic activity shows that catalytic efficiency of immobilized lipase by adsorption with enzyme loading increase more than five times highest at other enzyme loading studied (*Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive).

In an attempt to evaluate the transesterification reaction using a biocatalyst having high lipase loading further experiment was performed and the results were compared

with those attained by the biocatalyst having low lipase loading. Both reactions were carried out for 96 h using babassu oil and ethanol as raw materials. These results may be analyzed under two different perspectives: the transesterification yield (%) and formation of ethyl monoesters as a function of time (Figures 12 and 13). The below results indicate that maximal transesterification yield (98.69 %) was achieved using immobilized enzyme having high lipase loading (Reaction 2, Figure 13). Compared with reaction 1, the biocatalyst used in the experimental design, exhibited lowest transesterification yield (78.26 %) (Figure 12).

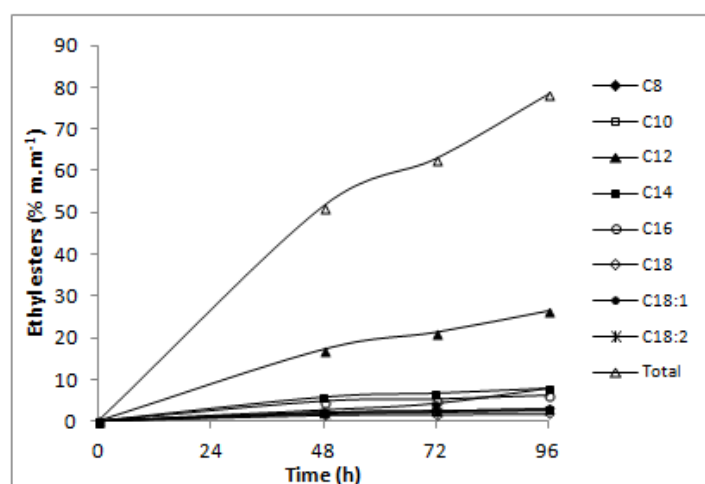


Figure 12: Formation profile of ethyl monoesters as a function of time for reaction 1 (babassu oil transesterification with molar ratio 1:7 at 40 °C) catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive.

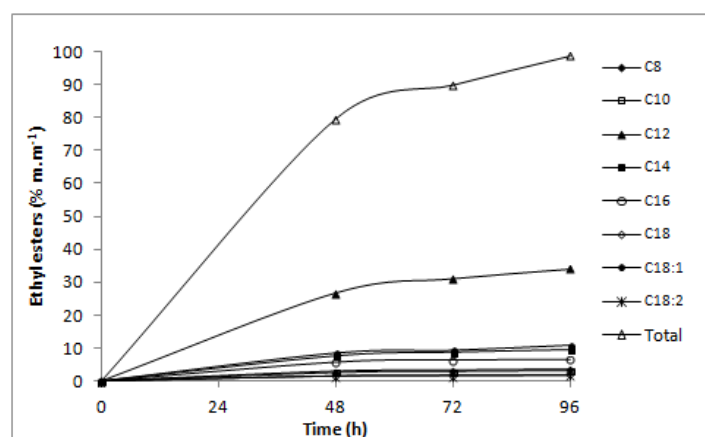


Figure 13: Formation profile of ethyl monoesters as a function of time for reaction 2 (babassu oil transesterification with molar ratio 1:7 at 40 °C) catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sol-gel matrix using protic ionic liquid as additive after enzyme loading increase.

The second reaction revealed that total conversion of the fatty acids present in the babassu oil was reached their corresponding esters in 96 h reaction. The highest ethyl ester concentrations were in regard to ethyl laurate, in the both experiments around 30 % of the C12 was formed in accordance with the babassu oil fatty acids composition.

Comparatively, transesterification yield for others studies using lipase immobilized on SiO₂-PVA indicated that similar results to those obtained in this work after enzyme loading increase (DA RÓS et al., 2010). Nouredini et al. (2005) also related that when enzyme loading (*Pseudomonas cepacia* lipase) was increased there was a sudden surge in the formation of alkyl esters from transesterification of soybean oil.

The difference between the percentages of conversion of babassu oil in the corresponding esters during the two reactions shows the influence of catalytic activity and possibly of the type of immobilization of the biocatalysts used. The viscosity values determined at 40 °C were 6.67 and 4.29 mm².s⁻¹ for reaction 1 and 2, respectively. In accordance with the effective specified standards: European Union EN-14214: (3.5 - 5.0 mm².s⁻¹), American Society for Testing and Materials ASTM D6751 (1.9 - 6.0 mm².s⁻¹) (BIODIESEL STANDARDS, 2012) and ANP resolution n° 14 Brazil (3.0 – 6.0 mm².s⁻¹) (ANP, 2013) the value of the viscosity attained in the reaction 2 is within the recommended range.

CONCLUSION

Experimental design was used to study ethyl esters production catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix. Through this technique a mathematical model was composed which could explain the variation of the transesterification yields as a function of the independent variables (molar ratio and temperature). The maximum transesterification yield was 51.9 %, obtained in the molar ratio 1:7 and 40 °C and when the reaction was performed with biocatalyst having high lipase loading the yield on ethyl esters was increased to 98.69 % originating sample with appropriate property to be used as a fuel (viscosity value of 4.29 mm².s⁻¹).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support and scholarship for Maria Vanessa Souza Oliveira from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183– 188, 2012.
- ANOUTI, M.; JACQUEMIN, J.; LEMORDANT, D. Transport properties of protic ionic liquids, pure and in aqueous solutions: Effects of the anion and cation structure. **Fluid Phase Equilibria**, v. 297, p. 13–22, 2010.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185–1194, 2009.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- Biodiesel Standards. Available from: <http://www.biofuelsystems.com/specification.htm>. Accessed August 2012.
- BRAZIL. ANP – National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels. Resolution n° 14, of March 11, 2012. Provides on the specifications of biodiesel. Available from: http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml. Accessed March 2013.
- CAMBON, E.; BOURLIEU, C.; SALUM, T. F. C.; PIOMBO, G.; DUBREUCQ, E.; VILLENEUVE, P. Ability of *Vasconcellea_heilbornii* lipase to catalyze the synthesis of alkyl esters from vegetable oils. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1265–1269, 2009.
- CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A.; LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 261–269, 2008.
- DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508–5516, 2010.
- DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, H. F.; CARVALHO, A. K. F.; SOARES, C. M. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow

biodiesel. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, p. 529-536, 2012.

FAUZI, A. H. M.; AMIN, N. A. S. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 5770–5786, 2012.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53–58, 2001.

KANDIMALLA, V. B.; TRIPATHI, V. S.; JU, H. Immobilization of Biomolecules in Sol–Gels: Biological and Analytical Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, p. 73–106, 2006.

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol–gel reactions in ionic liquids. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 119, n. 2, p. 140-143, 2011.

KESKIN, S.; KAYRAK-TALAY, D.; AKMAN, U.; HORTAÇSU, O. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 150–180, 2007.

LIU, C.; WANG, F.; STILES, A. R.; GUO, C. Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. **Applied Energy**, v. 92, p. 406–414, 2012.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, p. 334–340, 2009.

MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 4, p. 609-624, 2005.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; JUNIOR, P. A. M. FÉLIX, R. C.; PINTO, J. C.; NELE, M. Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 117–121, 2010.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J.; Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 527-534, 1996.

SAHIN, O.; ERDEMIR, S.; UYANIK, A.; YILMAZ, M. Enantioselective hydrolysis of (R/S)-Naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in presence of calix[n]arene derivatives. **Applied Catalysis A: General**, v. 369, p. 36-41, 2009.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SERRA, E.; DÍEZ, E.; DÍAZ, I.; BLANCO, R. M. A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 132, p. 487-493, 2010.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 745-757, 1999.

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. P.; CONCEIÇÃO, T. G. C.; CARVALHO, N. B.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A.; FREITAS, L. S.; SILVA, S. M.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Production of ethyl esters and emulsifiers using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase with protic ionic liquid as additives. **Enzyme and Microbial Technology**, in Press 2013.

SOUZA, R. L.; RESENDE, W. C.; BARÃO, C. E.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SANTOS, O. A. A.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 152-159, 2012.

SU, E.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; GAO, J.; WEI, D. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 167-173, 2007.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 52-59, 2010.

VIDINHA, P.; AUGUSTO, V.; ALMEIDA, M.; FONSECA, I.; FIDALGO, A.; ILHARCO, L.; CABRAL, J. M. S.; BARREIROS, S. Sol-gel encapsulation: An efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 23-33, 2006.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 162-168, 2010.

ARTIGO II

Enzymatic transesterification of crude coconut oil to produce biodiesel by different sources of energy irradiation

Maria Vanessa Souza Oliveira^a, Patricia Caroline Molgero Da Ros^b, Ana Karine Furtado de Carvalho^b, Alini Tinoco Fricks^a, Heizir Ferreira de Castro^b, Cleide Mara Faria Soares^a, Álvaro Silva Lima^a

^a*Universidade Tiradentes, ITP - Instituto de Tecnologia e Pesquisa, 300, Aracaju – SE, Brazil;*

^b*Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 116, Lorena – SP, Brazil.*

e-mail: aslima2001@yahoo.com.br

ABSTRACT

The present work focuses on the potential of different sources of energy (microwave, conventional heating and ultrasound) in the enzymatic transesterification of crude coconut oil to produce biodiesel in solvent free systems. Novozym 435, *Burkholderia cepacia* lipases immobilized in diatomite (commercial) or immobilized in polysiloxane–polyvinyl alcohol (SiO₂–PVA) by covalent binding were used as catalysts and ethanol was used as alcohol for transesterification reactions. To evaluate the effect of microwaves in the biodiesel synthesis catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SiO₂–PVA, was applied the full 2² factorial design leading to a set of seven runs with different combinations of oil:alcohol molar ratio (1:6–1:12) and temperature (40–50 °C). The maximum conversion of the fatty acid presented in the original coconut oil into ethyl esters (66.37%) was achieved at 40 °C using an oil-to-ethanol molar ratio of 1:12, for 8 h. Successfully, conversions were obtained with others energy sources tested in the enzymatic transesterification of crude coconut oil. For conventional heating the yields were higher than 98% for the three immobilized systems in different reaction times (between 24 and 72 h). For reactions using ultrasound was obtained 98% of ethyl esters with two biocatalystics (PS immobilized on epoxy SiO₂–PVA and Novozym 435), reducing the reaction time established by a process of conventional heating and of microwave irradiation.

KEYWORDS: Biodiesel, crude coconut oil, enzymatic transesterification, microwave, ultrasound.

INTRODUCTION

Biodiesel fuels, defined as monoalkyl esters from vegetable oils or animal fats, are currently produced by transesterification of triglyceride with methanol or ethanol catalyzed by base/acid (ANITESCU & BRUNO, 2012; DERMIBAS, 2007). Nevertheless the use of enzyme as catalysts in the production of biodiesel has attracted much attention in recent years facilitating purification of biodiesel and glycerol (DIZGE et al., 2009). Enzymatic transesterification converts triglycerides into biodiesel slowly and has high cost but the produced biodiesel in a feasible and economic way due to the reusability of catalyst for both the processes, e.g. batch and continuous (CHOUHAN & SARMA, 2011).

Although biodiesel is an attractive alternative fuel and the biggest obstacle to their commercialization is the high cost of raw materials used in their process (QIUL et al., 2011). The primary raw materials used in biodiesel production are from direct agricultural sources, such as sunflowers and rapeseed (DA RÓS et al., 2012). Recently, waste oils have been studied as raw materials for reduce the competition between the use of oils for food or fuels, lowest cost of biofuel, eliminate subsidies and minimize increases in edible oil prices resulting from their diversion to fuel usage (CHEN et al., 2012). Thus, studies have reported the application of coconut oil waste as low cost feedstock with potential in the reaction of esterification and transesterification to biodiesel production (OLIVEIRA et al. 2010, RIBEIRO et al., 2012). The coconut cultivation is in frank expansion in Brazil with intensification of planting. In 2010 the harvested area in the country reached 274,697 ha with a production of 1,991,957 tons (IBGE, 2012).

Stamenkovic et al. (2011) reported that vegetable oil ethanolysis has been investigated in the presence of free lipases of different origins achieving a significant fatty acid ethyl esters yield. However, the high cost of the enzymes often makes the enzymatic process lies in successful immobilization of the enzyme, which will allow for its recovery and reuse (GOMES et al., 2004; NOUREDDINI et al., 2005). Newly, the potential use of immobilized lipase by covalent bonding in hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol obtained through sol–gel process has have been demonstrated in enzymatic transesterification reaction to producing biodiesel using as feedstock babassu oil and ethanol with conventional heating (FREITAS et al., 2009)

and enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel with microwave assisted (DA RÓS et al., 2012).

The effective performances obtainment in the biodiesel production is also associated with energy sources used in the enzymatic process. Usually low reaction rates of the transesterification process are obtained essentially due the poor mass transfer between the reactants as oil and alcohols producing immiscible phases in the reaction system. In conventional heating the transfer of heat energy to the reaction of the biodiesel production occur through convection, conduction and radiation from the surfaces of the reactor, which is an inefficient heat transfer (ENCINAR et al., 2012). Currently several methods to accomplish rigorous mixing in the system has been studied for intensification of biodiesel production process such as ultrasound and microwave (CINTAS et al., 2010; VELJKOVIC et al., 2012).

The energy of ultrasonic irradiation can activate various mechanisms to affect positively chemical reactions and processes, which are not always known. These positive effects of ultrasound are generally attributed to so-called ultrasonic cavitation, which means the formation, growth and implosive collapse of bubbles (cavities) in a liquid irradiated with ultrasound. When ultrasound passes through the liquid, it consists of both expansion (negative pressure) and compression (positive pressure) waves. These form bubbles, filled with solvent and solute vapor and dissolved gases, which grow and recompress. Under proper conditions, ultrasonic cavitation leads to implosive cavitation bubble collapse, producing intense local heating, high pressures and very short lifetimes. The collapse of the cavitation bubbles gives rise to acoustic microstreaming or formation of small eddies that increase the mass and heat transfer in the liquid, (VELJKOVIC et al., 2012).

Ultrasound irradiation of ten to several hundred kHz would be able to disturb domain regions of an enzyme and thus affect its activity, in other words, the ultrasound can control the characteristics of the enzyme, changing its structure in response to a disturbance dynamics. The tolerance of enzymes for ultrasound may depend upon the physiological localization of the enzyme in the cell and on its molecular weight, however, very little is known about the actual effect of ultrasound and microwaves on the enzymes (ROKHINA et al. 2009). Works constituted by ultrasound-assisted lipase-catalyzed reaction showing the advantages of using this kind of heating system are

generally related with commercial available immobilized lipase preparations, in particularly Novozym 435 (WANG et al. 2007; YU et al. 2010; CENI et al. 2011).

However, microwave radiation delivers energy directly to the reagents. The heating of liquids using microwave can be explained by the interaction of matter with the electric field of the incident radiation, causing the movement of ions as well as that of induced or permanent molecule dipoles (the so-called dielectric heating) (ENCINAR et al., 2012). Use of microwave technology to assist the transesterification process have resulted in faster reaction times and reduced catalyst requirement (KANITAR et al., 2011). Several examples of the enzymatic reaction microwave assisted have been published showing the advantages of using this kind of heating system mainly using stable and effective biocatalysts (REJASSE et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2010; DA RÓS et al., 2012).

In the present work, aims to study the potential of crude coconut oil without any additional pretreatment as feedstock to the enzymatic synthesis of ethyl esters using different sources of energy (microwave, conventional heating and ultrasound) with three different immobilized lipases (Novozym 435, *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on diatomite or in SiO₂-PVA by covalent binding).

MATERIAL AND METHODS

Materials and reagents

Commercial Lipase from *Burkholderia cepacia* (PS - 2720 U.g⁻¹) and immobilized *Burkholderia cepacia* in diatomite (3698.7 U.g⁻¹) was purchased from Amano Pharmaceuticals (Nagoya, Japan) and Novozym 435 was purchased from Sigma. Tetraethoxysilane (TEOS) was acquired from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Epichlorohydrin, hydrochloric acid (minimum 36%), ethanol (minimum 99% and minimum 95%), polyvinyl alcohol (PVA molecular weight 72.000) and polyethylene glycol (PEG molecular weight 1.500) were supplied by Reagen (RJ, Brazil). Arabic gum was obtained from Synth (São Paulo, Brazil). Crude coconut oil was purchased through the market place of Aracaju - SE Brazil. Other chemicals were of analytical grade and used as received.

Support synthesis and lipase immobilization

Lipase immobilization on the support SiO₂-PVA activated was performed by covalent binding according to the methodology established by Paula et al. (2007) and subsequent by Freitas et al. (2009). SiO₂-PVA composite was prepared by the hydrolysis and polycondensation of tetraethoxysilane attaining particles. Activation of SiO₂-PVA particles was carried out with epichlorohydrin at 2.5% (w.v⁻¹) pH 7.0 for 1 h at room temperature, followed by washings with distilled water. Epoxy SiO₂-PVA activated was soaked into hexane under stirring (100 rpm) for 1 h at 25 °C. Then, excess of hexane was removed and lipase was added at a ratio of 1:4 gram of enzyme per gram of support. PEG-1500 (5mg.g⁻¹) was added together with the enzyme solution at a fixed amount (100 µl.g⁻¹ of support). Lipase-support system was maintained in contact for 16 h at 4 °C under static conditions. The immobilized lipase derivative were filtered (nylon membrane 62HD from Scheiz Seidengazefabrik AG, Thal Schweiz, Switzerland) and thoroughly rinsed with hexane. Average measured hydrolytic activity of immobilized derivatives produced in this work was 1805.5 U.g⁻¹ ± 137.7 U.g⁻¹.

Lipase activity

Enzymatic activities of the free and immobilized lipase samples were assayed by the olive oil emulsion method according to the modification proposed by Soares et al. (1999). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1 mol of free fatty acid per min under the assay conditions (37 °C, pH 7.0, 5 min incubation).

Synthesis of ethyl esters

All tests were composed by 12 g of substrate consisting of crude coconut oil and anhydrous ethanol without the addition of solvents. Reaction medium was incubated with the immobilized enzyme at a fixed proportion in relation to the total weight of reactants involved in the reaction. For PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA the fixed proportion was of 20% (FREITAS et al., 2009) while for biocatalysts obtained commercially (*Burkholderia cepacia* in diatomite and Novozym 435) the fixed proportion corresponded to 10% in function of hydrolytic activity and good potential in the synthesis of biodiesel, respectively. For the time-course studies, an aliquot of reaction medium was taken at various time intervals for subsequent GC analysis.

Tests under conventional heating were executed in closed reactors with a capacity of 25 mL under constant magnetic agitation of 150 rpm as reported by Freitas et al. (2009). Reactions were performed for a maximum period of 72 h.

Reactions under microwave irradiations were carried in a microwave reactor (Model Discover/University-Wave, Cem Corporation) according Da Rós et al. (2012) consisting of a cylindrical internal chamber of 75 mm in diameter and 100 mm in height. The cylindrical design assures homogeneous irradiation of the working volume that, for instance, is missing in the conventional microwave ovens available on the market and frequently used in experiments without modifications. The maximum power of operation was about 300 W. A magnetic stirrer was used to attain the liquid mixing qualitatively classified as high. The temperature was controlled with compressed air blown into the chamber. This chilling air was designed to operate at different levels of pressure and either on continuous or intermittent flow mode. The temperature of the reaction was monitored by an infrared sensor located in the lower part of the chamber. The 100 ml spherical glass reactor was coupled to a reflux condenser to avoid ethanol losses as vapor.

Experiments under microwave irradiations were performed according to full 2^2 factorial design with three replicates at central levels. The experimental variables were temperature, ethanol to coconut oil molar ratio (Table 10) and the measured response was ethyl esters yield. The data obtained were analyzed with help of *Statistica* software version 8.0 to verify the independent variables effects on the response assuming levels of $p < 0.05$ as the statistical significance, variance analysis (ANOVA) and optimization of ethyl esters production. The statistical significance of the regression coefficient was assayed by *Student's* test.

Table 10: Factor levels used according to the full 2^2 factorial design

Variable	Symbols	Levels		
Temperature (°C)	X_1	40	45	50
Molar ratio (coconut oil to ethanol)	X_2	1:6	1:9	1:12

Assays under ultrasound irradiations were conducted on ultrasonic UP 200S from Hielscher ultrasonic GmbH. Ultrasonic processes operate at 200 W and 24 kHz frequency. The amplitude and cycle for the reaction went adjustable for 30 % and 0.7

from 20 to 100% and from 0.1 to 1 cycle per tone, respectively. Titanium sonotrode S7 with a diameter of 7 mm and length of 100 mm was used to transmit the ultrasound into the liquid. The experiments were carried in spherical glass reactor with a capacity of 25 ml.

Ethyl esters analysis

The ethyl esters formed were analyzed by gas chromatograph using a Varian CG 3800 model (Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with flame—ionization detector and 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6 ft, 2.0 mm ID, in a stainless-steel-packed column (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltd., SP, Brazil). Nitrogen was used as the carrier gas with a flow rate of 25 ml min⁻¹. Temperature programming was performed. The column temperature was kept at 90 °C for 3 min, heated to 120 °C at 25 °C min⁻¹ and kept constant for 10 min. Then, the temperature was programmed at 25 °C min⁻¹ to 170 °C and kept constant for 15 min. The temperatures of the injector and detector were set at 250 °C. Data collection and analyses were performed using the software Galaxie Chromatography Data System version 1.9. Calibration curves were built from standard ethyl esters using hexanol as internal standard. The transesterification yield was calculated by taking into account the mass of ester content obtained by GC analysis and the total theoretical ester mass based on the reaction molar ratio (URIOSTE et al., 2008).

Viscosity determination

Absolute viscosity of biodiesel was measured with LVDV-II cone and plate spindle Brookfield viscosimeter (Brookfield Viscometers Ltd, England) utilizing a CP 42 cone. A circulating water bath maintained the temperature at 40 °C for each analysis. Samples of 0.5 mL were used and the measurements were replicated three times. The shear stress measurements were taken as a function of shear rate, and the dynamic viscosity was determined as a slope constant.

Properties of crude coconut oil

The properties of crude coconut oil were determined by standard test methods as follows:

- (i) Acid value: Adolfo Lutz Institute (1985)

- (ii) Peroxide value: AOCS (2004)
- (iii) Iodine value: Adolfo Lutz Institute (1985)
- (iv) Saponification value: Adolfo Lutz Institute (1985)
- (v) Fatty acid composition: outsourced - AOCS (2004)
- (vi) Density: Digital densimeter DMA 35N EX (Anton Paar)

RESULTS AND DISCUSSION

Many benefits have been addressed to the use of enzymatic catalysis as to associate the heating in the biodiesel production using different oils, but still was not studied the comparison of the three types energy sources in only article for enzymatic transesterification of crude coconut oil to produce biodiesel. Therefore, in this work enzymatic synthesis of ethyl esters was carried out using different sources of energy irradiation: conventional heating, ultrasound or microwave.

Characterization of crude coconut oil

Coconut oil used in this study consisted of 86.85% saturated fatty acids, being their predominance of lauric acid (>40%), and 13.15% by unsaturated acids. Fatty acid composition this crude coconut oil is similar to coconut oil used by Jiang & Tan (2012) and Nakpong & Wootthikanokkhan (2010), as shown in Table 11.

Crude coconut oil had high acid value ($21.05 \text{ mg}_{\text{KOH}}\cdot\text{g}^{-1}$) and peroxide value ($6.81 \text{ meq}\cdot\text{Kg}^{-1}$) corresponding with crude oils which have not undergone any refining process, even degumming. These and other physicochemical characteristics of coconut oil used in the enzymatic transesterification reactions are shown in Table 12.

Table 11: Composition of the fatty acids in coconuts oils

Fatty Acids	Composition (wt %)	*Composition (wt.%)	**Composition (%)
C 6:0 caproic	0.38	-	-
C 8:0 caprylic	5.40	7.7	3.35
C10:0 capric	4.61	6.4	3.21
C12:0 lauric	42.25	48.6	32.72
C14:0 myristic	19.20	17.8	18.38
C16:0 palmitic	11.42	8.9	13.13
C16:1 palmitoleic	0.05	-	-
C17:0 margaric	0.04	-	-
C18:0 stearic	3.23	2.2	3.60
C18:1 oleic	9.64	6.8	12.88
C18:2 linoleic	3.29	1.6	4.35
C18:3 linolenic	0.08	-	-
C20:0 arachidic	0.14	-	-
C20:1 eicosenoic	0.09	-	-
C22:0 behenic	0.05	-	-
C24:0 lignoceric	0.13	-	-

* **Source:** Jiang & Tan (2012)

** **Source:** Nakpong & Wootthikanokkhan (2010)

Table 12: Characterization of crude coconut oil

Density at 20°C	0.92 g.cm ⁻³
Molecular weight	701.79
Kinematic viscosity at 40 °C	29 mm ² .s ⁻¹
Saponification value	187 mg _{KOH} .g ⁻¹
Iodine value	18.50 gI ₂ .100sample ⁻¹
Acid value	21.05 mg _{KOH} .g ⁻¹
Peroxide value	6.81 meq.Kg ⁻¹

Factorial design

To evaluate the effect of microwave irradiation in the ethyl esters synthesis with the crude coconut oil and ethanol using lipase PS immobilized in polysiloxane–polyvinyl alcohol (SiO₂–PVA) by covalent binding as catalyst was utilized conditions previously established for biodiesel synthesis from beef tallow with ethanol under microwave irradiations with the same biocatalyst (DA RÓS et al., 2012). And in this work, was confirmed too in according with the literature that the conversion rate obtained to produce ethyl esters depend of fatty acid composition of raw materials, different sources of energy irradiation, types of biocatalyst, and others parameters (RAMOS et al., 2009; DA ROS 2012; GOG et al, 2012). A factorial design to produce biodiesel under microwave irradiation with the variables followings: temperature (40–50 °C) and oil:ethanol molar ratio (1:6–1:12) was carried out. The experimental data obtained showed maximizing region of the production of ethyl esters as well as verifying the effect of the variables and analyzing possible interactions between them. Yield of enzymatic transesterification of crude coconut oil ranged from 47.31 to 66.37 %, according to the experimental condition. When highest molar ratio (1:12) and lowest temperature (40 °C) was used in the reactions, the highest ethyl esters yield was attained (66.37 %) for 8 h (Table 13).

Table 13: Yields obtained in the enzymatic transesterification of crude coconut oil

Runs	Variables		Yield (%)
	Oil-to-Ethanol Molar Ratio	Temperature (°C)	
1	-1 (1:6)	-1 (40)	50.14
2	+1 (1:12)	-1 (40)	66.37
3	-1 (1:6)	+1 (50)	47.31
4	+1 (1:12)	+1 (50)	60.07
5	0 (1:9)	0 (45)	61.75
6	0 (1:9)	0 (45)	57.48
7	0 (1:9)	0 (45)	56.89

Tables 14 and 15 show the effects and interactions of variables for immobilized lipase as obtained from the factorial design analysis for crude coconut oil. It can be seen

that the molar ratio is the most important variable, with a positive effect, which means that an increase in the molar ratio leads to an increase in the yield.

Table 14: Regression coefficient, standard errors, and Student's t test obtained in the enzymatic transesterification of crude coconut oil according to the full 2^2 factorial design

Factor	Regression coefficient	Standard Error Pure Error	t value	P value
Mean/Interc.	55.97	1.33	42.21	0.000
Curvature	2.73	2.02	1.35	0.309
(X ₁) Molar Ratio	7.25*	1.33*	5.46*	0.032*
(X ₂) Temperature	-2.28	1.33	-1.72	0.227
X ₁ .X ₂	-0.87	1.33	-0.65	0.580

*p < 0.05

Table 15: Analysis of variance (ANOVA) for enzymatic transesterification yield (%) of crude coconut oil

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	P
Curvature	12.81	1	12.81	1.82	0.309
(X ₁) Molar Ratio	210.10*	1*	210.10*	29.87*	0.032*
(X ₂) Temperature	20.84	1	20.84	2.96	0.227
X ₁ .X ₂	3.01	1	3.01	0.43	0.580
Pure Error	14.07	2	7.03		
Total	260.83	6			

F: Statistical test for the comparison of variance tests, allowing the evaluation of the quality of fit of the model.

*Significant at 95 % confidence level.

Table 14 shows that the molar ratio was statistically significant at 95% of confidence and the interactions between the variables were not statistically significant in the range studied.

Analysis of variance (Table 16) shows that the statistical significance for the responses of the transesterification of crude coconut oil is appropriate because a high determination coefficient (R^2) of 0.95 was obtained. The values of both R^2 (0.95) and R^2 adj (0.84) of this model suggest a close agreement between the experimental data and the theoretical values predicted by the model.

In this part of the study, response surface methodology (RSM) was used as an approach for determining the region where the yield was maximized for the oil tested (Figure 14). No optimal conditions were observed in the response surface for the enzymatic transesterification of crude coconut oil. Therefore, only the identification of the region corresponding to the best response can be achieved.

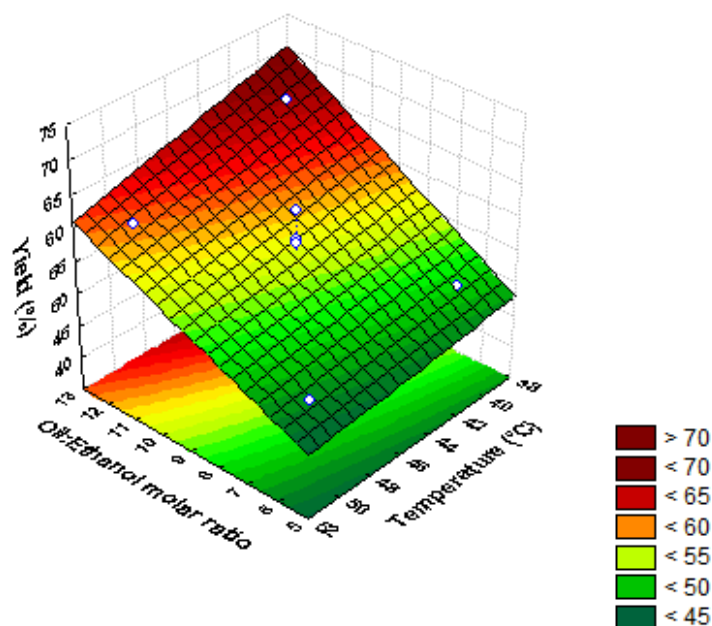


Figure 14: Response surface that represents the transesterification yield of crude coconut oil catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on epoxy SiO₂-PVA.

The model equation for the response can therefore be written as ($p < 0.05$) in the following first-order equation that describes the response surface (2):

$$\text{Yield (\%)} = 55.97 + 7.25 \cdot X_1 - 2.28 \cdot X_2 - 0.87 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2)$$

Ribeiro et al. (2012) observed results similarly to that found in this work in relation to the molar ratio studied. The authors analyzed the transesterification of raw

coconut oil catalyzed by Novozym 435 using conventional heating technique and observed that the best condition for maximizing of production alkyl esters was with molar ratio value corresponding to 1:10 oil:alcohol. This excess molar ratio is similar to the present work (1:12) which can be explained by use of the same type of residual oil and not occurrence of any additional pretreatment for both studies. As the transesterification reaction is reversible, the excess alcohol is practically used to shift the equilibrium towards the side of the product and thus increase product yield (MOTASEMI & ANI, 2012).

Ethyl esters yield was more sensitive to ethanol-to-oil molar ratio compared to temperature. Conversion of the feedstock lipidic into ethyl esters was enhanced when the temperature decreased to 50-40 °C. This result agrees with tendency that the enzyme has to be inactivated above a certain degree of the temperature. In this study, temperature had a positive effect, indicating a low energy consumption characteristic of this reaction system which makes it appealing for industrial applications.

Due to the performance obtained in the enzymatic synthesis of ethyl esters assisted by microwave was also verified the potential of others energy sources as conventional heating, ultrasound in addition to microwave with reaction times highest.

Ethyl esters synthesis under conventional heating

Using the conditions previously established for ethyl esters synthesis from crude coconut oil with ethanol by statistical analysis under microwave irradiation (40 °C and molar ratio of 1:12), reactions were performed with the immobilized systems: PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 for posterior comparison between the transesterification reaction under conventional heating and other forms of irradiation.

Almost total conversion of the fatty acid presented in the original coconut oil into ethyl esters with conventional heating (98.6 and 98.4) required 72 h of reaction for the immobilized systems with *Burkholderia cepacia* lipase: PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA and PS immobilized on diatomite, respectively. Total conversion, 100%, was obtained with Novozym 435 probably before the 24 h of reaction. Time course of the profile yields may be observed in the Figure 15.

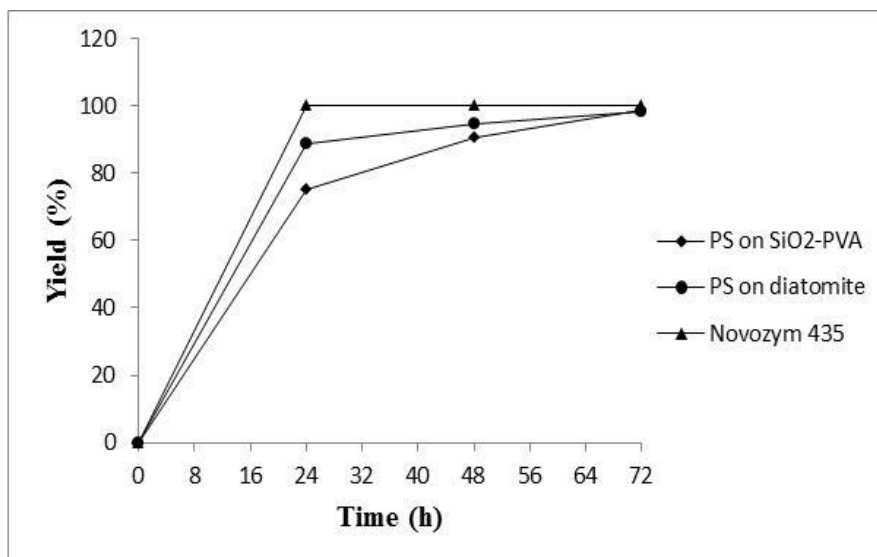


Figure 15: Time course of the transesterification yield of crude coconut oil catalysed by PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 employing conventional heating.

Su et al. (2007) studied the enzymatic transesterification of vegetable oils under conventional heating and concluded that among the tested lipases in the same amount (Novozym 435, Lipozyme IM, lipase from *Candida sp.* immobilized by adsorption on cellulose tissue, lipase from porcine pancreas Type II and *Aspergillus niger*), the Novozym 435 showed highest conversion of methyl esters in 24 h of reaction using oils different (soybean oil, rapeseed oil, corn oil, sunflower oil, cottonseed oil, peanut oil, olive oil, castor oil, sesame oil). According to Azócar et al. (2010), therefore, Novozym 435 was sturdy and stable than compared with other lipases in the presence of short chain alcohols. Therefore, studies tested several lipases in the transesterification of vegetable oil also the presence of short chain alcohols and found that the lipase PS from *Pseudomonas cepacia* in immobilized form showed the best performance for maximum yield of alkyl esters (NOUREDDINI et al., 2005; FREITAS et al., 2009; TONGBORRIBOON et al., 2010).

Ethyl esters synthesis under microwave irradiation

Reaction time is a factor that influences the biodiesel yield because the conversion rate of fatty acid esters increases with the reaction time (DUZ et al., 2011). Therefore, the best condition described by statistical analysis (40 °C and molar ratio of 1:12 oil:

ethanol, assisted by microwave) was used in new experiments under microwave irradiation with the proposal of analyze the possible increase of the transesterification yield and three immobilized systems (*Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SiO₂-PVA, Novozym 435 and *Burkholderia cepacia* immobilized on diatomite) were applied as biocatalysts for profile analysis ethyl esters yield.

Transesterification catalyzed by PS immobilized on SiO₂-PVA showed that the yield remained constant (about 65%) after 8 h (Figure 16) while the reaction with PS immobilized on diatomite maintained the constant yield between 4 and 8 h then continued to increase as verified in 10 h of reaction (78.3%). Differently, the reaction catalyzed by Novozym 435 not demonstrated any interference in the conversion of crude coconut oil reached approximately 95% ethyl esters yield for 8 h, under microwave irradiation.

Results of the transesterification reaction catalyzed by immobilized systems with *Burkholderia cepacia* lipase showed that the efficiency of biocatalysts was inhibited by the interaction between the microwaves irradiation and the characteristics of the crude coconut oil used as feedstock (high acidity - 21.05 mg_{KOH}.g⁻¹ and peroxide value - 6.81 meq.Kg⁻¹).

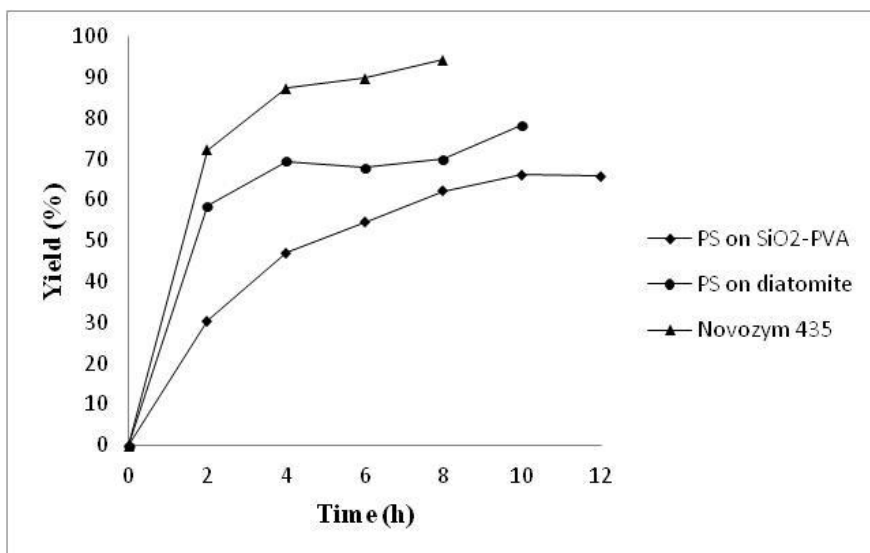


Figure 16: Time course of the transesterification yield of crude coconut oil catalysed by PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 employing microwave irradiation.

According to Ibrahim et al. (2007) the recommended limit of the peroxide value for use oil as feedstock in enzymatic reactions in the order of 5 meq.Kg⁻¹. Polymerization of lipase occurs due to the presence of hydroperoxides, which lead to deactivation of lipase. Thus, peroxide values higher than 5 meq.Kg⁻¹ were designed as inhibitors of enzyme activity. Moreover, the peroxide value of crude coconut oil (6.81 meq.Kg⁻¹) may have influenced the yield of enzymatic transesterification depending on the immobilized system tested or reaction rate in the following ascending order: PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA > PS immobilized on diatomite > Novozym 435.

Ethyl esters synthesis under ultrasound irradiations

The potentiality of PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 was also evaluated in transesterification of crude coconut oil assisted by ultrasound. Tests for all enzymes were performed with molar ratio of 1:12 (oil:ethanol) and the reaction time was fixed at 8 h, 30% spread and pulse irradiation of ultrasonic 0.7 cycle per second that maintained the temperature around 54°C.

Yield profile of the transesterification of crude coconut oil under ultrasound irradiations catalyzed by PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite or Novozym 435 are showed in Figure 17. The reaction with PS on SiO₂-PVA reached 100% ethyl esters yield for 8 h. Conversion profile demonstrates that crude coconut oil with the transfer of energy from the ultrasound probe did not interfere negatively in experiment catalyzed by PS on SiO₂-PVA unlike of the reactions carried out in a microwave reactor. When the reaction was catalyzed by PS immobilized on diatomite the yield remained constant between 4 and 6 h and reaching a maximum yield transesterificação of 72.32% in the end of the experiment. This observed effect was probably due the form of immobilization of lipase and/or the support used that interacted negatively with the phenomenon of cavitation losing the characteristic of stability of the biocatalyst. The response obtained with the biocatalyst Novozym 435 was of total conversion of the feedstock for 6 h. The increase in the rate of ethyl ester formation under conditions of ultrasonic mixing is the result of factors such as emulsification and efficient mass transfer induced by conditions of turbulence and by circulating the liquid in the reactor (KELKAR et al., 2008; HSIAO et al., 2010).

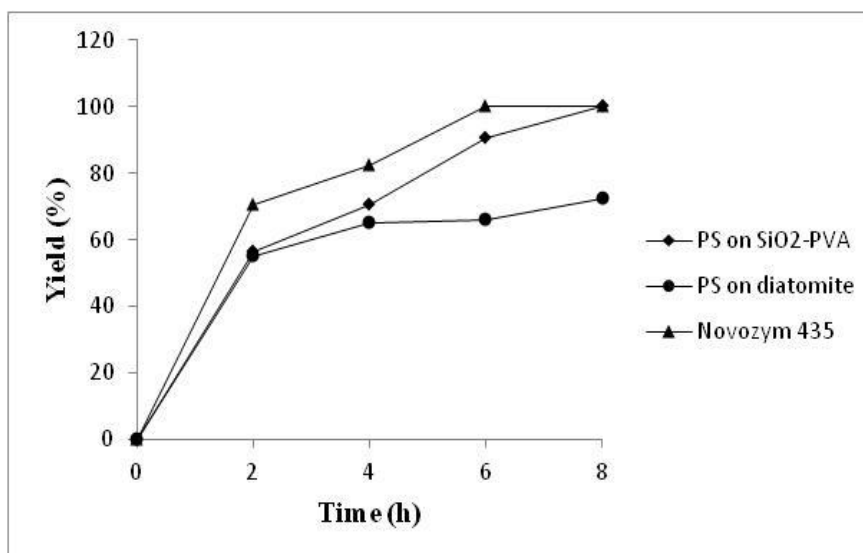


Figure 17: Time course of the transesterification yield of crude coconut oil catalysed by PS immobilized on epoxy SiO₂-PVA, PS immobilized on diatomite and Novozym 435 employing ultrasound irradiation.

According to Veljkovic et al. (2012) the enzymatic activity of the biocatalyst Novozym 435 in transesterification reactions was enhanced by irradiation of the ultrasound. Operational stability of the Novozym 435 in the producing biodiesel from soybean oil under ultrasound irradiation with vibration was studied by Yu et al. (2010) and did not shows any obvious loss in activity after five cycles where can to suggest that this enzyme is stable under the condition of irradiation with ultrasonic vibration.

Ultrasound as sources of energy in the enzymatic transesterification of crude coconut oil to producing biodiesel with *Burkholderia cepacia* immobilized on SiO₂-PVA reduced the processing time of conventional heating of 72 h for only 8 h. Reaction rate increased in nine-fold using SiO₂-PVA. For Novozym 435 the increase was almost 4 times compared with ethyl esters yield found using ultrasound probe and conventional heating. According to Kumar et al. (2011) in enzymatic catalysis where the catalyst is in a different phase to the reactants, ultrasonic dispersion increases the surface area available for reactants and essentially the cavitation increases the efficiency of the catalyst for achieving optimal conversion.

The performance of Novozym 435 in this work can be considered excellent and efficient when compared with the study of Ribeiro et al. (2012). The authors obtained as best result 80.5% conversion of raw coconut oil in ethys esters in 24 h with Novozym 435 at 60 °C and molar ratio of 1:10 used conventional heating while in this work has

achieved 100% in 24 h of reaction used conventional heating, approximately 95% in 8 h used microwave irradiation and 100% in 6 h used ultrasound irradiation with the same biocatalyst and the same coconut oil.

In this sense, was observed in this work that the performance of the biocatalysts *Burkholderia cepacia* immobilized on epoxy SiO₂-PVA and Novozym 435 in the transesterification reaction of crude coconut oil was increased by ultrasound irradiation in comparison with the processes established by the others energy sources (conventional heating and microwave irradiation).

CONCLUSION

Optimum region of enzymatic synthesis from crude coconut oil performed in the microwave reactor revealed that the formation of ethyl esters was influenced by the molar ratio variable at the 95% of confidence level using lipase PS immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol (SiO₂–PVA) by covalent binding. The highest yield (66.37%) obtained by transesterification reactions that employed the full 2² factorial design occurred with 40°C and excess alcohol corresponding to molar ratio of 1:12. The data presented in this work demonstrated that the reaction medium when submitted to the ultrasound irradiation promoted a reduction in the reaction time, compared to the other heating systems: conventional means and microwave assisted. Therefore, crude coconut oil was converted into 100% biodiesel in reaction that required 8 h catalyzed by PS immobilized on epoxy SiO₂–PVA and 6 h by Novozym 435.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support and scholarship for Maria Vanessa Souza Oliveira from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. AOCS Press, 2004. 5th Edition.

ANITESCU, G.; BRUNO, T. J. **Fluid properties needed in supercritical transesterification of triglyceride feedstocks to biodiesel fuels for efficient and clean combustion – A review.** Journal of Supercritical Fluids (63) 133–149, 2012.

AZEVEDO, P. V.; SOUSA, F. I.; SILVA, B. B.; SILVA, V. P. R. **Water-use efficiency of dwarf-green coconut (Cocos nucifera L.) orchards in northeast Brazil.** Agricultural Water Management (84) 259–264, 2006.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H. J.; MUÑOZ, R.; NAVIA, R. **Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock.** Journal of Bioscience and Bioengineering (109) 609–614, 2010.

CENI, G.; SILVA, P. C.; LERIN, L.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. **Ultrasound-assisted enzymatic transesterification of methyl benzoate and glycerol to 1-glyceryl benzoate in organic solvent.** Enzyme and Microbial Technology (48) 169–174, 2011.

CHEN, K-S.; LIN, Y-C.; HSU, K-H.; WANG, H-K. **Improving biodiesel yields from waste cooking oil by using sodium methoxide and a microwave heating system.** Energy (38) 151-156, 2012.

CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. **Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (15) 4378– 4399, 2011.

CINTAS, P.; MANTEGNA, S.; GAUDINO, E. C.; CRAVOTTO, G. **A new pilot flow reactor for high-intensity ultrasound irradiation. Application to the synthesis of biodiesel.** Ultrasonics Sonochemistry (17) 985–989, 2010.

DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, H. F.; CARVALHO, A. K. F.; SOARES, C. M. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (39) 529-536, 2012.

DEMIRBAS, A. **Importance of biodiesel as transportation fuel.** Energy Policy (35) 4661-4670, 2007.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; BULENT KESKINLER, B. **Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer.** Bioresource Technology (100) 1983–1991, 2009.

DUZ, M. Z.; SAYDUT, A.; OZTURK, G. **Alkali catalyzed transesterification of safflower seed oil assisted by microwave irradiation**. Fuel Processing Technology (92) 308–313, 2011.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; MARTÍNEZ, G.; SÁNCHEZ, N.; PARDAL, A. **Soybean oil transesterification by the use of a microwave flow system**. Fuel (95) 386–393, 2012.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. **An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya* sp)**. Process Biochemistry (44)1068-1074, 2009.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOŞA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. **Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives**. Renewable Energy (39) 10–16, 2012.

GOMES, F. M.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. **Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis**. Biomacromolecules (5) 17–23, 2004.

HSIAO, M-C.; LIN, C-C.; YUNG-HUNG CHANG, Y-H.; CHEN, L-C. **Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil**. Fuel (89) 3618–3622, 2010.

BRAZIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Available from:<http://www.biofuelsystems.com/specification.htm>. Accessed December 2012.

IBRAHIM, N. A.; NIELSEN, S. T.; WIGNEWARAN, V.; ZHANG, H.; XU, X. **Online pre-purification for the continuous enzymatic interestification of bulk fats containing omega-3 oil**. Journal of the American Oil Chemist's Society (85) 95-98, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo, 1985. 3a. ed., 533p., v. 1.

JIANG, J.; TAN, C. **Biodiesel production from coconut oil in supercritical methanol in the presence of cosolvent**. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers (43) 102–107, 2012.

KANITKAR, A.; BALASUBRAMANIAN, S.; LIMA, M.; BOLDOR, D. **A critical comparison of methyl and ethyl esters production from soybean and rice bran oil in the presence of microwaves**. Bioresource Technology, 2011.

KELKAR, M. A.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. **Intensification of esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation.** Ultrasonics Sonochemistry (15) 188–194, 2008.

KUMAR, G.; KUMAR, D.; POONAM, JOHARI, R.; SINGH, C. P. **Enzymatic transesterification of Jatropha curcas oil assisted by ultrasonication.** Ultrasonics Sonochemistry (18) 923–927, 2011.

MOTASEMI, F.; ANI, F. N. **A review on microwave-assisted production of biodiesel.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (16) 4719–4733, 2012.

NAKPONG, P.; WOOTHIKANOKKHAN, S. **High free fatty acid coconut oil as a potential feedstock for biodiesel production in Thailand.** Renewable Energy (35) 1682–1687, 2010.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; JUNIOR, P. A. M. FÉLIX, R. C.; PINTO, J. C.; NELE, M. **Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (67) 117–121, 2010.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. **Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil.** Bioresource Technology (96) 769–777, 2005.

OLIVEIRA, J. F. G.; LUCENA, I. L.; SABOYA, R. M. A.; RODRIGUES, M. L.; TORRES, A. E. B.; FERNANDES, F. A. N.; CAVALCANTE JR., C. L.; PARENTE JR, E. J. S. **Biodiesel production from waste coconut oil by esterification with ethanol: The effect of water removal by adsorption.** Renewable Energy (35) 2581–2584, 2010.

PAULA, A.V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. **Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology (82) 281–288, 2007.

QIUL, J.; FAN, X.; ZOU, H. **Development of biodiesel from inedible feedstock through various production processes.** Chemistry and Technology of Fuels and Oils (47), 2011.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. **Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties.** Bioresource Technology (100) 261–268, 2009.

REJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M-D.; BESSON, T. **Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry.** Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (22) 518–526, 2007.

RIBEIRO, L. M. O.; SANTOS, B. C. S.; RENATA M.R.G. ALMEIDA, R. M. R. G. **Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst.** Biomass and bioenergy (47) 498–503, 2012.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art.** Trends in Biotechnology (27) 298–306, 2009.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica.** Applied Biochemistry and Biotechnology (77–9) 745–757, 1999.

STAMENKOVIC, O. S.; VELIC`KOVIC', A. V.; VELJKOVIC, V. B. **The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolsis: Current state and perspectives.** Fuel (90) 3141–3155, 2011.

SU, E.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; GAO, J.; WEI, D. **Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor.** Biochemical Engineering Journal (36) 167–173, 2007.

TONGBORIBOON K, CHEIRSILP B, H-KITTIKUN A. **Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system.** J Mol Catal B Enzym (67) 52–59, 2010.

URIOSTE D, CASTRO M. B. A, BIAGGIO F. C, CASTRO H. F. **Synthesis of chromatographic standards and establishment of a method for the quantification of the fatty ester composition of biodiesel from babassu oil.** Quimica Nova (31) 407–412, 2008.

VELJKOVIC, V. B.; AVRAMOVIC, J. M.; STAMENKOVIC, O. S. **Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (16) 1193–1209, 2012.

WANG J-X, HUANG Q-D, HUANG F-H, WANG J-W, HUANG Q-J. **Lipase-catalysed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant.** Chin J Biotechnol (23) 1121–1128, 2007.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. **Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435**. *Process Biochemistry* (45) 519–525, 2010.

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho, no estudo do emprego de diferentes fontes de irradiação de energia na etanólise enzimática de óleos vegetais para síntese de biodiesel são apresentadas a seguir, separadas por assunto desenvolvido nos artigos I e II.

ARTIGO I:

- No sistema reacional empregando óleo de babaçu e etanol sob aquecimento convencional foi utilizado como estratégia o planejamento fatorial 2^2 utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* (PS) encapsulada por meio da técnica sol-gel utilizando como aditivo o líquido iônico prótico. A variável temperatura foi significativa ($p < 0,01$), e a obtenção do maior rendimento em ésteres etílicos, que foi de 51,9%, ocorreu na razão molar de 1:7 e 40°C no tempo reacional de 48 h;

- Após o aumento do carregamento da lipase *Burkholderia cepacia* encapsulada na presença do líquido iônico foi atingido rendimentos em ésteres etílicos mais elevados, acima de 98 %, na razão molar de 1:7 e 40 °C no tempo reacional de 96 h;

- A amostra contendo 98% de rendimento apresentou viscosidade em concordância com as normas de especificações de biodiesel (ASTM, Européia e ANP).

ARTIGO II:

- O sistema reacional composto pelo óleo de coco bruto e etanol assistida por irradiação de micro-ondas foi estudado a partir do planejamento fatorial 2^2 utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO_2 -PVA por ligação covalente e verificou-se a influência significativa da variável razão molar ($p < 0,05$), na qual a reação favorecida com o maior rendimento obtido foi de 66,37 % na razão molar de 1:12 e 40 °C no tempo reacional de 8 h.

- O óleo de coco bruto que apresentou índice de acidez e de peróxido elevados (21,05 $\text{mg}_{\text{KOH}}\cdot\text{g}^{-1}$ e 6,81 $\text{meq}\cdot\text{Kg}^{-1}$) foi utilizado como matéria-prima nas reações de

transesterificação, e esta característica possivelmente afetou negativamente a atuação dos biocatalisadores compostos pela lipase de *Burkholderia cepacia* sob irradiação de micro-ondas. No entanto, foi demonstrado que o óleo de coco bruto pode ser utilizado como matéria-prima nas reações de síntese de biodiesel sem a necessidade de nenhum pré-tratamento, quando aplicado o conjunto de fatores adequados.

- A transesterificação enzimática assistida por ultrassom, apresentou uma eficiente conversão de 100 % dos ácidos graxos da matéria-prima lipídica (óleo de coco bruto) quando utilizados como biocatalisadores a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA e Novozym 435 em tempos curtos de reação, 8 e 6 horas, respectivamente. Comparativamente, a conversão de biodiesel utilizando aquecimento convencional e irradiação micro-ondas obtiveram tempos reacionais inferiores ao da transesterificação enzimática assistida por ultrassom.

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados, ressaltando que o estudo do emprego de diferentes fontes de energia na etanólise enzimática de óleos vegetais para síntese de biodiesel ainda não é tão difundida na literatura.

Nesse aspecto, a preocupação com o desenvolvimento de tecnologias que aproveitem matérias-primas nacionais de modo a agregar valor ao agronegócio, associados a processos auto-sustentáveis, ambientalmente limpos foram atingidos.

A avaliação dos biocatalisadores produzidos em biorreatores e sua caracterização será objeto de estudos futuros. A principal grande contribuição deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo de produção de biodiesel que poderá substituir com sucesso os processos convencionais.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente estudo é integrado a linha de pesquisa desenvolvida pelo Programa de Pósgraduação em Engenharia de Processos e a Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) e embora nossos resultados tenham sido promissores é fundamental uma investigação mais profunda para complementação dos estudos realizados, como as seguintes recomendações:

1. Determinar a estabilidade operacional dos biocatalisadores sob aquecimento convencional, micro-ondas e ultrassom;
2. Avaliar a possibilidade de emprego de outras configurações de reatores para a síntese de biodiesel;
3. Investigar a influência das micro-ondas e da sonicação nos biocatalisadores;
4. Avaliar a viabilidade econômica desenvolvida em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTAL, L. T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores.** Quimica Nova (25) 835-841, 2002.
- ALMEIDA, R. R.; LACERDA, L. G.; MURAKAMI, F. S.; BANNACH, G.; IVO DEMIATE, I. M.; SOCCOL, C. R.; CARVALHO FILHO, M. A. S.; SCHNITZLER, E. **Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis.** Thermochemica Acta (519) 50–54, 2011.
- ÁLVAREZ V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTORD, M.; AZNARB, M.; IGLESIAS, M. **Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion.** Fluid Phase Equilibr. (299) 42–50, 2010a.
- ÁLVAREZ, V. H.; DOSIL, N.; GONZALEZ-CABALEIRO, R.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTORD, M.; IGLESIAS, M.; NAVAZA, J. M. **Brønsted ionic liquids for sustainable processes: Synthesis and physical properties.** J Chem. Eng. (55) 625–632, 2010b.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. **Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (84) 183– 188, 2012.
- ANITESCU, G.; BRUNO, T. J. **Fluid properties needed in supercritical transesterification of triglyceride feedstocks to biodiesel fuels for efficient and clean combustion – A review.** J. of Supercritical Fluids (63) 133–149, 2012.
- ANOUTI, M.; JACQUEMIN, J.; LEMORDANT, D. **Transport properties of protic ionic liquids, pure and in aqueous solutions: Effects of the anion and cation structure.** Fluid Phase Equilibria (297) 13–22, 2010.
- ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.** Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>. Acesso em Dezembro de 2012.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. **Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process.** Renewable Energy (34) 1185–1194, 2009.
- ANVISA. **Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acesso em Junho de 2012.
- ASAKUMA, Y.; OGAWA, Y.; MAEDA, K.; FUKUI, K.; KURAMOCHI, H. **Effects of microwave irradiation on triglyceride transesterification: Experimental and theoretical studies.** Biochemical Engineering Journal (58– 59) 20– 24, 2011.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. R. A.; SULAIMAN, N. M. N. **Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (16) 3275– 3285, 2012.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. **Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (62) 9-14, 2010.

BALAT, M. **Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work.** Energy Conversion and Management (52) 1479-1492, 2011.

BARROS, A. E. LIMA.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; AZEVEDO, W. M. **Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research (35) n. 4, 459-463, 2002.

BATISTELLA, L.; LERIN, L. A.; BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, A. J.; TRENTIN, C. M.; POPIOLSKI, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. **Débora de Oliveira. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system.** Ultrasonics Sonochemistry (19) 452–458, 2012.

BAYRAMOGLU, G.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. **Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix.** Journal of Food Engineering (52) 367-374, 2002.

BAYRAMOGLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAS, B.; ARICA, M. Y. **Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis.** Process Biochemistry (46) 372–378, 2011.

BENVENUTTI, E V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H.; GALLAS, M. R. **Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel.** Quím. Nova (32), 2009.
BERRIOS, M.; SKELTON, R. L. **Comparison of purification methods for biodiesel.** Chemical Engineering Journal (144) 459-465, 2008.

BIRGIT, S.; ANNIE, R.; ABEL, P. U. **Influence of polymerization parameters and entrapment in poly(hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (7) 85–91, 1999.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** 1ª Ed, Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial Volume I.** 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**. Academic Press, Inc.: San Diego, 1990.

BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. **Use of bioethanol for biodiesel production**. Progress in Energy and Combustion Science (38) 283-301, 2012.

CAMBON, E.; BOURLIEU, C.; SALUM, T. F. C.; PIOMBO, G.; DUBREUCQ, E.; VILLENEUVE, P. **Ability of *Vasconcellea heilbornii* lipase to catalyze the synthesis of alkyl esters from vegetable oils**. Process Biochemistry (44) 1265–1269, 2009.

CAO, X.; YANG, J.; LEI SHU, L.; YU, B.; YAN, Y. **Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues**. Process Biochemistry (44) 177–182, 2009.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. **Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos**. Revista Analytica. 23, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Quim. Nova (27) 146-156, 2004.

CENI, G.; SILVA, P. C.; LERIN, L.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. **Ultrasound-assisted enzymatic transesterification of methyl benzoate and glycerol to 1-glyceryl benzoate in organic solvent**. Enzyme and Microbial Technology (48) 169–174, 2011.

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. **Microwave Material Processing—A Review**. American Institute of Chemical Engineers jornal (58) 330-363, 2012.

CHEN, G-J.; KUO, C-H.; CHEN, C-I.; YU, C-C.; SHIEH, C-J.; LIU1, Y-C. **Effect of membranes with various hydrophobic/hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability**. Journal of Bioscience and Bioengineering (113) n. 2, 166–172, 2012a.

CHEN, K.; LIN, Y.; HSU, K.; WANG, H. **Improving biodiesel yields from waste cooking oil by using sodium methoxide and a microwave heating system**. Energy (38) 151-156, 2012b.

CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. **Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews (15) 4378– 4399, 2011.

CINTAS, P.; MANTEGNA, S.; GAUDINO, E. C.; CRAVOTTO, G. **A new pilot flow reactor for high-intensity ultrasound irradiation. Application to the synthesis of biodiesel**. Ultrasonics Sonochemistry (17) 985–989, 2010.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras.** Química nova (23) 531-537, 2000.

DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, H. F.; CARVALHO, A. K. F.; SOARES, C. M. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (39) 529-536, 2012.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. **Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks.** Bioresource Technology (101) 5508–5516, 2010.

DEKA, D. C.; BASUMATARY, S. **High quality biodiesel from yellow oleander (Thevetia peruviana) seed oil.** Biomass and Bioenergy (35) 1797-1803, 2011.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods.** Progress in Energy and Combustion Science (31) 466-487, 2005.

DEMIRBAS, A. **Importance of biodiesel as transportation fuel.** Energy Policy (35) 4661-4670, 2007.

DUZ, M. Z.; SAYDUT, A.; OZTURK, G. **Alkali catalyzed transesterification of safflower seed oil assisted by microwave irradiation.** Fuel Processing Technology (92) 308–313, 2011.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; MARTÍNEZ, G.; SÁNCHEZ, N.; PARDAL, A. **Soybean oil transesterification by the use of a microwave flow system.** Fuel (95) 386–393, 2012.

ENWEREMADU, C. C.; MBARAWA, M. M. **Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (13) 2205–2224, 2009.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: A Textbook.** 3. ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, Cap. 1, 2, 3, 1997.

FANG, Y.; HUANG, W.; XIA, Y. **Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification.** Process Biochemistry (43) 306–310, 2008.

FERNANDEZ, R. E.; BHATTACHARYA, E.; CHADHA, A. **Covalent immobilization of Pseudomonas cepacia lipase on semiconducting materials.** Applied Surface Science (254) 4512–4519, 2008.

FRANKEN, L.; SANTOS, L. S.; CARAMÃO, E. B.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V. **Xerogel p-anisidinapropilsilica. estudo da estabilidade térmica e da resistência à lixiviação com solventes.** Química Nova (25), 2002.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. **An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya* sp).** Process Biochemistry (44)1068-1074, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. **Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils.** Journal of bioscience and bioengineering (92) 405-416, 2001.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. **Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica.** Química Nova (30) 1369-1373, 2007.

GOGATE, P. R.; TAYAL, R. K.; PANDIT, A. B. **Cavitation: A technology on the horizon.** Current science (91) 35-46, 2006.

GOLE, V. L.; GOGATE, P. R. **A review on intensification of synthesis of biodiesel from sustainable feed stock using sonochemical reactors.** Chemical Engineering and Processing (53) 1– 9, 2012.

GUARTE, R. C.; MUHLBAUER, W.; KELLERT, M. **Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil.** Postharvest Biology and Technology (9) 361-372, 1996.

GUISAN, J. M. (editor). **Immobilization of Enzymes and Cells.** 2^a Ed, Totowa-New Jersey: Humana Press, 2006.

GUPTA, M. N.; ROY, I. **Enzymes in organic media: Forms, functions and applications.** European Journal Biochemistry (271) 2575-2583, 2004.

GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K. **Entrapment of biomolecules in sol–gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects.** Biosensors and Bioelectronics (22), 2387-2399, 2007.

HARA, P.; HANEFELD, U.; KANERVA, L. T. **Sol–gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (50) 80–86, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review.** Biotechnology Advances (27) 782–798, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍÍN, E.; OTERO, C. **Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM.** Bioresource Technology (99) 277–286, 2008.

HERNANDO, J.; LETON, P.; MATIA, M. P.; NOVELLA, J. L.; ALVAREZ-BUILLA, J. **Biodiesel and FAME synthesis assisted by microwaves: Homogeneous batch and flow processes.** Fuel (86) 1641–1644, 2007.

HSIAO, M-C.; LIN, C-C.; CHANG, Y-H. **Microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil to biodiesel catalyzed by nanopowder calcium oxide.** Fuel (90) 1963–1967, 2011.

HSIAO, M-C.; LIN, C-C.; YUNG-HUNG CHANG, Y-H.; CHEN, L-C. **Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil.** Fuel (89) 3618–3622, 2010.

HUANG, W.; XIA, Y-M.; GAO, H.; FANG, Y-J.; WANG, Y.; FANG, Y. **Enzymatic esterification between *n*-alcohol homologs and *n*-caprylic acid in non-aqueous medium under microwave irradiation.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (35) 113–116, 2005.

HUANG, X. J., GE, D., XU, Z. K.: **Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization.** Eur. Polym. J. (43) 3710–3718, 2007.

JEGANNATHAN, K. R.; JUN-YEE, L.; CHAN, E.; RAVINDRA, P. **Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in j-carrageenan.** Fuel (89) 2272–2277, 2010.

JERONIMO, C. E. M. **Tecnologias limpas aplicadas a gestão dos resíduos do coco.** Revista Qualidade Emergente (3) 20-29, 2012.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. S. A. **Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações.** Quim. Nova (28) 281-288, 2005.

KANDIMALLA, V. B.; TRIPATHI, V. S.; JU, H. **Immobilization of Biomolecules in Sol–Gels: Biological and Analytical Applications.** Critical Reviews in Analytical Chemistry (36) 73–106, 2006.

KANITKAR, A.; BALASUBRAMANIAN, S.; LIMA, M.; BOLDOR, D. **A critical comparison of methyl and ethyl esters production from soybean and rice bran oil in the presence of microwaves.** Bioresource Technology, 2011.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. **Lipase promiscuity and its biochemical applications.** Process Biochemistry (47) 555–569, 2012.

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. **Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol–gel reactions in ionic liquids.** Journal of the Ceramic Society of Japan (119) 140-143, 2011.

KATO, R.; GMEHLING, J. **Activity coefficients at infinite dilution of various solutes in the ionic liquids [MMIM]⁺[CH₃SO₄][−], [MMIM]⁺[CH₃OC₂H₄SO₄][−],**

[MMIM]⁺[(CH₃)₂PO₄]⁻, [C₅H₅NC₂H₅]⁺[(CF₃SO₂)₂N]⁻ and [C₅H₅NH]⁺[C₂H₅OC₂H₄O SO₃]⁻. Fluid Phase Equilibria (226) 37–44, 2004.

KELKAR, M. A.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. **Intensification of esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation.** Ultrasonics Sonochemistry (15) 188–194, 2008.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. **Nanostructures for enzyme stabilization.** Chemical Engineering Science (61) 1017–1026, 2006.

KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. **The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor.** Structure (5) 173–185, 1997.
KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**, 1^a ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. **Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(2): 287–292, abr.-jun. 2004.

KRISHNA A.G. G.; GAURAV R.; BHATNAGAR, A. S.; KUMAR P.K. P.; CHANDRASHEKAR, P. **Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review.** Indian Coconut Journal, 2010.

KUMAR, D.; KUMAR, G.; POONAM, SINGH, C. P. **Fast, easy ethanolysis of coconut oil for biodiesel production assisted by ultrasonication.** Ultrasonics Sonochemistry (17) 555–559, 2010.

KWIATKOWSKA, B.; BENNETT, J.; AKUNNA, J.; WALKER, G. M.; BREMNER, D. H. **Stimulation of bioprocesses by ultrasound.** Biotechnology Advances (29) 768–780, 2011.

LAI, C.; ZULLAIKAH, S.; VALI, S. R.; JU, Y. **Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology (80) 331–337, 2005.

LEE, S. H.; DOAN, T. T. N.; HA, S. H.; CHANG, W.-J.; KOO, Y.-M. **Influence of ionic liquids as additives on sol-gel immobilized lipase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (47) 129–134, 2007.

LEUNG, D. Y. C.; XUAN WU, X.; LEUNG, M.K.H. **A review on biodiesel production using catalyzed transesterification.** Applied Energy (87) 1083–1095, 2010.

LI, S. F., CHEN, J. P., WU, W. T. **Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization.** J. Mol. Catal. B: Enzym., (47) 117–124, 2007.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS JR., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, Z. V. R. **Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica.** Quimica. Nova (30) 600-603, 2007.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C. G; AMUNDSON, C. H. **Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A Review.** Journal American Oil Chemist´ Society (67) 890-910, 1990.

MARINHO, F. J. L.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D.; HOLANDA, J. S.; E FERREIRA NETO, M. **Cultivo de coco 'Anão Verde' irrigado com águas salinas.** Pesquisa agropecuária brasileira (41) 1277-1284, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** Enzyme and Microbial Technology (40) 1451–1463, 2007.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (10) 248–268, 2006.

MEHNERT, C. P.; COOK, R. A.; NICHOLAS C. DISPENZIERE, N. C.; AFEWORKI, M. **Supported Ionic Liquid Catalysis - A New Concept for Homogeneous Hydroformylation Catalysis.** J. AM. CHEM. SOC. (124) 12932-12933, 2002.

MISRA, R. D.; MURTHY, M. S. **Blending of additives with biodiesels to improve the cold flow properties, combustion and emission performance in a compression ignition engine—A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (15) 2413-2422, 2011.

MORENO-PIRAJÀN, J. C.; GIRALDO, L. **Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry.** Arabian Journal of Chemistry (4) 55–62, 2011.

MOSER, B. R. **Biodiesel production, properties, and feedstocks.** In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant, (45) 229–266, 2009.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; JUNIOR, P. A. M. FÉLIX, R. C.; PINTO, J. C.; NELE, M. **Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (67) 117–121, 2010.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. **Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil.** Bioresource Technology (96) 769-777, 2005.

OGHBAEI, M.; MIRZAEI, O. **Microwave versus conventional sintering: A review of fundamentals, advantages and applications.** Journal of Alloys and Compounds (494) 175–189, 2010.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. **Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology**. Current Opinion in Biotechnology (14) 432–437, 2003.

PARKER, M.; BESSON, T.; LAMARE, S.; LEGOY, M. **Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalysed reactions in organic media**. Tetrahedron Letters (37) 8383-8386, 1996.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. **Comparação do desempenho da lipase de *candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias**. Química Nova (31) n.1, 35-40, 2008

PAULA, A.V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. **Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology (82) 281–288, 2007.

PINHEIRO, R. C.; SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Influence of gelation time on the morphological and physico-chemical properties of the sol–gel entrapped lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (52–53) 27–33, 2008.

QIUL, J.; FAN, X.; ZOU, H. **Development of biodiesel from inedible feedstock through various production processes**. Chemistry and Technology of Fuels and Oils (47), 2011.

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

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. **Efficient Immobilization of Lipases by Entrapment in Hydrophobic Sol-Gel Materials**. Biotechnology and Bioengineering (49) 527-534, 1996.

RÉJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M.; BESSON, T. **Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation**. Organic & Biomolecular Chemistry (2) 1086-1089, 2004.

RIBEIRO, L. M. O.; SANTOS, B. C. S.; RENATA M.R.G. ALMEIDA, R. M. R. G. **Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst**. Biomass and bioenergy (47) 498-503, 2012.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARD, U. **Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral**. Química Nova (30) 1374-1380, 2007.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A Z. **Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil.** Process Biochemistry (46) 682–688, 2011.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art.** Trends Biotechnol. (27) 298-306, 2009.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. **Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate.** International Journal of Biological Macromolecules (47) 5–9, 2010.

SAHIN, O.; ERDEMIR, S.; UYANIK, A.; YILMAZ, M. **Enantioselective hydrolysis of (R/S)-Naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in presence of calix[n]arene derivatives.** Applied Catalysis A: General (369) 36–41, 2009.

SAKAI-KATO, K.; ISHIKURA, K. **Integration of Biomolecules into Analytical Systems by Means of Silica Sol-Gel Technology.** Analytical sciences august (25) 969-978, 2009.

SALAMATINIA, B.; ABDULLAH, A. Z.; BHATIA, S. **Quality evaluation of biodiesel produced through ultrasound-assisted heterogeneous catalytic system.** Fuel Processing Technology (97) 1–8, 2012.

SANSEVERINO, A. M. **Microondas em síntese orgânica.** Química Nova (25) 660-667, 2002.

SANTOS, F. F. P.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. **Optimization of the production of biodiesel from soybean oil by ultrasound assisted methanolysis.** Fuel processing technology (90) 312–316, 2009.

SANTOS, J. C.; MIJONE, P. D.; NUNES, G. F. M.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. **Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (61) 229–236, 2008a.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; CASTRO, H. F. ***Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (52–53) 49–57, 2008b.

SANTOS, T.; VALENTE, M. A.; MONTEIRO, J.; SOUSA, J.; COSTA, L. C. **Electromagnetic and thermal history during microwave heating.** Applied Thermal Engineering (31) 3255-3261, 2011.

SAXENA, R. K.; ISAR, J.; SARAN, S.; KAUSHIK, R.; DAVIDSON, W. S. **Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase.** Current science (89) 1000-1003, 2005.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. **Purification strategies for microbial lipases.** Journal of Microbiological Methods (52) 1-18, 2003.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. **The open conformation of a *Pseudomonas* lipase.** Structure (5) 187-202, 1997.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEEA, U. C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnology Advances (19) 627–662, 2001.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C. GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies.** Biochemical Engineering Journal (60) 16– 24, 2012.

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. **Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico.** Química Nova (26) 832-838, 2003.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; OLIVO, J. E.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol–gel encapsulated lipase activity.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (29) 69-79, 2004.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. P.; CONCEIÇÃO, T. G. C.; CARVALHO, N. B.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A.; FREITAS, L. S.; SILVA, S. M.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Production of ethyl esters and emulsifiers using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase with protic ionic liquid as additives.** Enzyme and Microbial Technology, in Press 2013.

SOUZA, R. L.; RESENDE, W. C.; BARÃO, C. E.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SANTOS, O. A. A.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol–gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (84) 152-159, 2012.

STAMENKOVIC', O. S.; VELIC'KOVIC', A. V.; VELJKOVIC', V. B. **The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives.** Fuel (90) 3141–3155, 2011.

TAIPA, M. A.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. **Purification of lipases.** Journal of Biotechnology (26) 111-142, 1992.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. **Biodiesel production with immobilized lipase: A review.** Biotechnology Advances (28) 628–634, 2010.

TEIXEIRA, M. A. **Babassu—A new approach for an ancient Brazilian biomass.** Biomass and bioenergy (32) 857 – 864, 2008.

THOSTENSON, E. T.; CHOU, T. W. **Microwave processing: fundamentals and applications.** Composites: Part A (30) 1055–1071, 1999.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. **Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (67) 52–59, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** Tradução atual por Roberta Marchiori Martins. 8ª Ed, Porto Alegre: Artmed, 2005.

VELJKOVIC, V. B.; AVRAMOVIC, J. M.; STAMENKOVIC, O. S. **Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives.** Renewable and Sustainable Energy Reviews (16) 1193–1209, 2012.

VIDINHA, P.; AUGUSTO, V.; ALMEIDA, M.; FONSECA, I.; FIDALGO, A.; ILHARCO, L.; CABRAL, J. M. S.; BARREIROS, S. **Sol-gel encapsulation: An efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media.** Journal of Biotechnology (121). 23–33, 2006.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (9) 113-148, 2000.

VIOUX, A.; VIAU, L.; VOLLAND, S.; BIDEAU, J. L. **Use of ionic liquids in sol-gel; ionogels and applications.** Comptes Rendus Chimie (13) 242-255, 2010.

WANG J-X, HUANG Q-D, HUANG F-H, WANG J-W, HUANG Q-J. **Lipase-catalysed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant.** Chin J Biotechnol (23) 1121–1128, 2007.

YADAV, G. D.; PAWAR. S. V.; **Synergism between microwave irradiation and enzyme catalysis in transesterification of ethyl-3-phenylpropanoate with n-butanol.** Bioresour Technol. (109) 1-6, 2012.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. **Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions.** Enzyme and Microbial Technology (38) 814-820, 2006.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. **Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol-gel materials.** Bioresource Technology (100) 4311–4316, 2009.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. **Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol–gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (62) 162–168, 2010.

ZARCULA, C.; CORICI, L.; CROITORU, R.; URSOIU, A.; PETER, F. **Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol–gel method.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (65) 79–86, 2010.

ZHANG, K-P.; LAI, J-Q.; HUANG, Z-L.; YANG, Z. **Penicillium expansum lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids.** *Bioresource Technology* (102) 2767–2772, 2011.