



X Oktoberfórum – PPGEQ

04 a 07 de outubro de 2011

SÍNTESE DE BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTES HIDROFÓBICOS

Jakeline Kathiele Poppe¹, Rafael Costa Rodrigues², Marco Antonio Záchia Ayub²

¹ Laboratório de Biotecnologia

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,
E-MAIL: {jakeline.poppe@enq.ufrgs.br}

² Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Rua Bento Gonçalves, 9500. CEP 91501-970 – Porto Alegre – RS – BRASIL,
E-MAIL: {mazayub@ufrgs.br, rafaelcrodrigues@ufrgs.br}

Resumo: O biodiesel é um combustível alternativo, renovável, biodegradável e não tóxico. A transesterificação dos óleos vegetais ou gordura animal com álcool é a forma mais usual de produção desse combustível. O emprego de lipases imobilizadas como biocatalisadoras apresenta-se como alternativa promissora aos catalisadores alcalinos, uma vez que reduz os problemas de separação do produto final e diminui a emissão de compostos químicos danosos ao ambiente. Além disso, a imobilização aumenta e mantém a atividade da enzima por um maior período de tempo quando comparada com a forma livre, e possibilita a regeneração do biocatalisador ao final do processo. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é apresentar o desenvolvimento de um projeto para síntese de biodiesel via reações de transesterificação utilizando lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos como biocatalisadoras, além da sua purificação e reutilização em ciclos seguintes de operação. As reações serão mantidas em erlenmeyers contendo 2,5g de óleo de soja, razão molar de álcool:óleo de 7.5:1, 15% de lipase imobilizada e 4% de água destilada, ambos em relação à quantidade de óleo. A quantificação dos produtos obtidos será realizada por cromatografia. Ao término deste projeto, almeja-se encontrar resultados satisfatórios, uma vez que se fará uso de lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos, e estas demonstram melhorar a eficiência das reações.

Palavras-chave: transesterificação, suportes hidrofóbico, lipases, biodiesel

1. Introdução

Combustíveis alternativos para motores a diesel são cada vez mais importantes devido aos problemas de poluição ambiental. O biodiesel surge como alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua produção é mais barata e a emissão de poluentes diminui muito, além de ser uma energia renovável (MACEDO & MACEDO, 2004).

Segundo a “National Biodiesel Board” (EUA), o biodiesel é definido como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, gordura animal, e óleos e gorduras residuais, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores de ciclo diesel) (NATIONAL BIODIESEL BOARD, 1998).

Quimicamente, óleos e gorduras são constituídos de moléculas de triglicerídeos que por sua vez possuem longas cadeias de ácidos graxos ligados a uma única molécula de glicerol. Estes ácidos graxos podem diferir no comprimento da cadeia carbônica, no número e posição das duplas ligações nestas cadeias (SUARES, 2007). Entre os óleos vegetais utilizados em reações de síntese de biodiesel, encontra-se o óleo de soja, e sua composição

pode ser visualizada na tabela 1 (COSTA & ROSSI, 2000). Entre os ácidos graxos, destacam-se cinco principais: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3).

Tabela 1. Composição de ácidos graxos do óleo de soja.

No. de carbonos	Ácidos graxos	Concentração (%)
C12:0	láurico	0,1 (máx.)
C14:0	mirístico	0,2 (máx.)
C16:0	palmítico	9,9 - 12,2
C16:1 (9)	palmitoléico	traços-0,2
C18:0	esteárico	3 - 5,4
C18:1 (9)	oléico	17,7 - 26
C18:2 (9,12)	linoléico	49,7 - 56,9
C18:3 (9,12,15)	linolênico	5,5 - 9,5
C20:0	araquídico	0,2 - 0,5
C20:1 (5)	gadoléico	0,1 - 0,3
C22:0	behênico	0,3 - 0,7
C22:1	erúico	0,3 (máx.)
C24:0	lignocérico	0,4 (máx.)

Os processos de obtenção de biodiesel comumente utilizados são com óleos vegetais e gorduras animais, por catálise homogênea em meio básico ou ácido, com álcool metílico ou etílico, e este processo é chamado de transesterificação ou alcoólise, sendo o metanol o mais utilizado por ter melhor rendimento na reação (CRUZ, 2007).

Na transesterificação, três moléculas de álcool reagem seqüencialmente na presença do catalisador (de origem química ou biológica), com uma molécula de triglicerídeo, fornecendo inicialmente o diglicerídeo, posteriormente o monoglicerídeo e por último o glicerol, bem como, três moléculas de monoéster (biodiesel) (FUKUDA *et al.*, 2001; TURKAN & KALAY, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010) (Figura 1). Todas as etapas reacionais são reversíveis sendo que o equilíbrio total favorece a formação dos produtos.

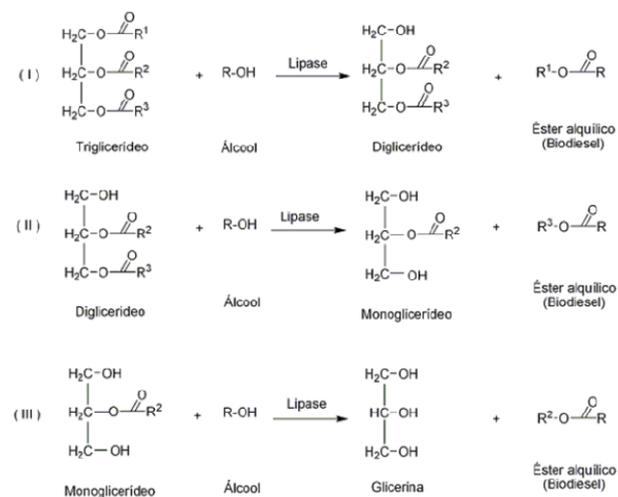


Figura 1. Etapas da reação de transesterificação de triglicerídeos por lipases com formação dos intermediários: monoglicerídeo, diglicerídeo e glicerina (glicerol).

A reação de transesterificação pode ser realizada de diversas formas, como o uso de catalisadores alcalinos, catalisadores ácidos, biocatalisadores, catalisadores heterogêneos ou usando alcoóis nos seus estados supercríticos. Entre todos os métodos mencionados para produção de biodiesel, apenas o processo alcalino é utilizado em escala industrial. É um processo com menor custo efetivo e altamente eficiente. Porém surgem problemas nas operações de *downstream*, incluindo a separação do catalisador e o álcool não reagido do biodiesel. A remoção do catalisador envolve muitas complicações e o biodiesel requer repetidas lavagens para atingir a pureza necessária (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Atualmente, a opção pelo uso de catalisadores enzimáticos na síntese de biodiesel surge como uma alternativa a catálise alcalina devido às vantagens que este processo oferece tais como: condições brandas de operação, facilidade na remoção do catalisador do meio onde se encontra o produto e possibilidade de reutilização do mesmo em vários ciclos reacionais (PAQUES & MACEDO, 2006; LECA *et al.*, 2010). Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições

de reação, de modo a lhes conferir características que os tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais.

As lipases são enzimas comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, nos quais preenchem um papel chave na modificação biológica de lipídios (XIAO *et al.*, 2009). Essas moléculas também podem ser produzidas pela fermentação de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, leveduras de *Tulopsis sp* e *Cândida sp*, e bactérias *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp* (BISEN *et al.*, 2010).

As lipases possuem a função biológica de catalisar hidrólise de gorduras e óleos, com a subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e glicerol livre. Sob condições adequadas, também podem atuar como catalisadoras de reações de acidólise, aminólise, esterificação, transesterificação (ou alcoólise) e interesterificação (XIAO *et al.*, 2009). Contudo, para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação e que poderia provocar a inativação, impossibilitando o andamento da reação (RODRIGUES *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2010). Frente a este problema, a técnica de imobilização é utilizada para fornecer estabilidade térmica e química às enzimas e facilitar sua recuperação e posterior reutilização em outros processos (VILLENEUVE *et al.*, 2000; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009).

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos (GIRELLI & MATTEI, 2005), e estes podem ser de natureza orgânica ou inorgânica (PETKAR *et al.*, 2006).

Quando imobilizadas, estas enzimas possibilitam que se atinja o produto de interesse em via direta, além de tornar o processo de obtenção mais “limpo”, ou seja, não há necessidade da eliminação de produtos laterais de reação ou ajuste de pH através de tratamento químico, nem necessidade de etapas exaustivas de lavagem ou extração do produto com auxílio de solventes orgânicos, sendo estas responsáveis por grande parte da geração de resíduos (KNOTHE *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008). Além disso, lipases imobilizadas podem ser recuperadas ao final do processo, sendo reutilizadas em novas reações, o que pode vir a se tornar viável a sua aplicação a nível industrial.

Com base nestes aspectos, é de extrema importância a obtenção de soluções práticas e viáveis economicamente para o controle de bioprocessos industriais, tais como a produção de biocombustíveis, especialmente quando este apresenta um grave problema em escala industrial. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é o uso de lipases comerciais de origem microbiana imobilizadas em suportes hidrofóbicos como catalisadoras em reações de transesterificação de biodiesel, e a possibilidade de sua recuperação e reutilização em ciclos seguintes de operação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Enzimas e reagentes

Serão utilizadas lipases de origem microbiana adquiridas da empresa Novozymes. As enzimas serão de três fontes: *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*. As lipases se encontram na forma livre, sendo imobilizadas esferas de estireno de vinil benzeno (MCI GEL CHP20P) através de colaboração com o Prof. Roberto Fernandez-Lafuente, do ICP/CSIC de Madri.

O óleo de soja refinado será comprado no comércio local e usado sem qualquer tratamento prévio. Metanol e hexano serão de grau analítico, e os padrões cromatográficos de classe HPLC.

2.2 Reação de transesterificação

Para o desenvolvimento das reações, serão utilizadas as seguintes quantidades:

2,5 g de óleo;

Razão molar de 7.5:1 álcool: óleo;

15% de lipase imobilizada em relação à quantidade de óleo;

4% de água destilada em relação à quantidade de óleo.

As reações serão mantidas em agitador orbital (200 rpm) a 30 ° C por 6 h e acondicionadas em *erlenmeyers* de 50 mL. As condições de operação, bem como as quantidades de óleo de soja, álcool, água e enzimas para as reações foram determinadas de acordo com Rodrigues *et al.* (2008). Contudo, no decorrer do desenvolvimento do projeto algumas modificações necessárias no protocolo poderão ser realizadas.

2.3 – Recuperação e reuso da enzima imobilizada.

Esta metodologia de reciclo será desenvolvida conforme RODRIGUES *et al.* (2008). Após a reação de transesterificação, a enzima imobilizada será separada do meio reacional por filtração e submetida a lavagens com solvente n-hexano. Após limpeza, a enzima será secada por 24 horas a 40 ° C, e será submetida ao reuso em novos ciclos de reações.

2.4 – Análises cromatográficas.

A caracterização de todos os padrões e a quantificação dos produtos obtidos poderá ser realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), ou por cromatografia gasosa (CG). A concentração de glicerol remanescente será determinada conforme metodologia de RODRIGUES *et al.* (2008). Alternativamente, os parâmetros e metodologia de operação para quantificação dos ésteres formados (biodiesel) será determinado ao longo do projeto.

3. Perspectivas

No intuito de reduzir a geração de resíduos e aperfeiçoar os processos de produção de biodiesel, a catálise enzimática vem sendo estudada e desenvolvida por vários autores, onde se referencia tanto o uso de lipases

imobilizadas disponíveis comercialmente (KROUMOV *et al.*, 2007; LECA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010), como solúveis previamente imobilizadas em suportes (COSTA & ROSSI, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2008; WINAYANUWATTIKUN *et al.*, 2011). Desse modo, assim como nos trabalhos estudados, também se espera encontrar resultados semelhantes e satisfatórios no desenvolvimento deste projeto, uma vez que se fará uso de lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos, e estas demonstram melhorar a eficiência das reações (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009^a; HERNANDES *et al.*, 2011).

Segundo HERNANDES *et al.* (2011), a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos reduz a sua exposição a ataques de substâncias degradantes, como o peróxido de hidrogênio. O ambiente hidrofóbico ao redor do centro ativo dessas preparações tem a capacidade de aumentar a especificidade da enzima em relação a substratos hidrofóbicos e melhorar a reação de hidrólise, além de fazer com que a enzima sofra um ataque menos intenso a agentes químicos, mantendo sua atividade. Com isso, espera-se que na reação de transesterificação, este tipo de biocatalisador apresente desempenhos semelhante, principalmente quanto ao uso repetido, já que o suporte hidrofóbico pode ajudar para que substratos e produtos, não fiquem próximos ao sítio ativo, após a reação, e desta forma a reação ocorra de maneira mais efetiva, obtendo-se uma maior vida útil do biocatalisador.

A enzima imobilizada em um suporte adequado é sempre mais ativa que a livre em condições reacionais comparáveis. Isto se deve a maior eficácia do sistema heterogêneo e a maior disponibilidade dos sítios ativos das enzimas quando confinadas nos poros do sólido, uma vez que em sistema homogêneo ocorre a formação de agregados, ficando os sítios não disponíveis no interior dos mesmos (De CASTRO *et al.*, 2004; HA *et al.*, 2007). Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

Embora o uso da biocatálise empregando lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, além da facilidade de recuperação e reutilização da enzima, alguns problemas ainda precisam ser resolvidos. A produção do biodiesel em escala industrial utilizando lipases ainda não tem sido adotada principalmente devido ao alto custo do biocatalisador, especialmente quando são utilizadas enzimas comerciais (RANGANATHAN *et al.*, 2008; PESSOA *et al.*, 2010).

Por este motivo, encontrar métodos que reduzam o custo de aplicação do processo enzimático torna-se importante, sendo necessário ter conhecimento a respeito das relações entre importantes variáveis da reação de transesterificação, e estes parâmetros devem ser otimizados para que assim haja a maior eficiência no desenvolvimento das reações, e o custo das enzimas possa ser compensado ao fim do processo. Desta forma, este projeto fará uso de parâmetros mais satisfatórios de operação já analisados por outros autores (RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009^b), visando assim

obter altas taxas de conversão de biodiesel. Entre alguns desses parâmetros destacam-se a quantidade de água, tempo e temperatura da reação, razão molar óleo:álcool e concentração/quantidade de enzima (NIE *et al.*, 2006; HERNANDEZ-MARTIN & OTERO, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009^b; LEUNG *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010; PESSOA *et al.*, 2010).

Biocatalisadores freqüentemente requerem uma quantidade de água presente para manter sua atividade (JEGANNATHAN *et al.*, 2008). Esse é um importante fator em reações de transesterificação e esterificação quando catalisadas enzimaticamente. A água é essencial para manter a estrutura tridimensional específica da enzima e sua total remoção pode levar a mudanças irreversíveis em sua estrutura (LU *et al.*, 2009). Entretanto, segundo RODRIGUES *et al.* (2009^b), a água participa de muitos mecanismos que causam a inativação da enzima, podendo promover a hidrólise do substrato e limitar a difusão, diminuindo assim o rendimento da reação. Portanto, a maior eficiência nas reações utilizando lipases será uma combinação do conteúdo ótimo de água, visando à minimização de reações de hidrólise e maximização da atividade da enzima nas reações de transesterificação.

Tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações com enzimas aumenta, geralmente, com a temperatura, dentro de um certo limite na qual elas são estáveis e mantêm a sua atividade. Uma temperatura de reação superior pode diminuir a viscosidade dos óleos e resultar num aumento da taxa de reação e num tempo de reação menor, entretanto, esta deve ser inferior ao ponto de ebulição do álcool para garantir a ausência de perdas de álcool por vaporização, e evitar a desnaturação da enzima (NIE *et al.*, 2006). Assim, por razões econômicas, o melhor processo é aquele que ocorre na temperatura mais baixa e atinge as maiores taxas de conversão (HERNANDEZ-MARTIN & OTERO, 2008).

A razão molar óleo:álcool é igualmente um fator importante a ser levado em conta nas reações enzimáticas, pois altas concentrações podem levar a um efeito inibitório sobre certas lipases (AKOH *et al.*, 2007). Essa inibição pode ser causada devido ao contato da enzima com a fase orgânica polar formada, ou a incompleta solubilidade do álcool na fase óleo (HERNANDEZ-MARTIN & OTERO, 2008). Entretanto, alguns autores sugerem que não existe consenso em relação à ótima razão molar óleo:álcool a ser usada em reações de transesterificação enzimática, e este fato está diretamente relacionado com diversos fatores, como: matéria-prima, tipo de álcool, natureza da enzima e temperatura de reação, entre outros (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Visto que a enzima utilizada em transesterificações apresenta um custo muito elevado, é importante determinar a quantidade adequada a ser utilizada. O teor de enzimas mostra um efeito positivo na reação de transesterificação, indicando um aumento no rendimento de conversão com o aumento da quantidade de enzima. No entanto, deve-se levar em consideração a existência de um limite, no qual o aumento no teor de enzimas não afete a formação de produto e a taxa de reação permaneça constante (RODRIGUES *et al.*, 2009^b).

Outro aspecto importante estudado, e que reduz o custo de aplicação da via de transesterificação enzimática, é a possibilidade de recuperação das enzimas, uma vez que

as lipases podem ser separadas por processos de decantação, após o término da reação e não necessitam de métodos especiais de separação (ISO *et al.*, 2001), além de serem reutilizadas após lavagem com solvente (RODRIGUES *et al.*, 2009^b). Conforme RODRIGUES *et al.* (2008), quando é utilizada no primeiro ciclo, alguma quantidade de enzima pode ser desorvida, entretanto, após vários usos repetidos, ocorre uma diminuição do fenômeno da desorção e há uma tendência à estabilidade da lipase, fazendo com que haja um equilíbrio do tempo de vida útil da enzima após múltiplos ciclos de reutilização.

Nesse mesmo sentido, com a finalidade de manter a atividade da enzima, este projeto também abordará a recuperação e a possibilidade de reutilização destas enzimas, visando encontrar resultados análogos aos encontrados nos trabalhos estudados (WATANABE *et al.*, 2000; ISO *et al.*, 2001; NOUREDDINI *et al.*, 2005; YAGIZ *et al.*, 2007; FJERBAEK *et al.*, 2009).

Os bicomustíveis são hoje parte da malha energética nacional e no futuro próximo esta importância aumentará e seguramente atingirá outros mercados. No entanto, existe a necessidade de melhorar os processos industriais para torná-los ainda mais ecologicamente corretos e rentáveis. O biodiesel, que normalmente é produzido pelo tratamento químico, gera como subprodutos um grande número de compostos danosos ao meio ambiente. A via enzimática para a produção de biodiesel é uma alternativa menos custosa ambientalmente, mais ainda não existem protocolos industriais para a sua utilização e se hoje fossem implantados, possivelmente o custo de sua utilização seria proibitivo devido ao alto valor das lipases. Faz-se então necessário o desenvolvimento de pesquisas para tornar o método de catalise enzimático menos oneroso e mais competitivo frente aos processos químicos.

4. Referências

- AKOH, C.C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 22, 2007.
- BISEN, P. S.; SANODIYA, B.; THAKUR, G.S.; BAGHEL, R. K.; PRASAD, G. B. K. S. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 1019-1030, 2010.
- COSTA, P. R. N., ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, n. 3, 2000.
- CRUZ, A. J. *Imobilização de lipase de Candida antarctica B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona*. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2007.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

- De CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J.M.; GUIBAN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties, *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1061-1067, 2008.
- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p. 405-416, 2001.
- GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*, v. 819, n. 1, p. 3-16, 2005.
- HA, S.H.; LAN, M.N.; LEE, S.H.; HWANG, S.M.; KOO, Y. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 480-483, 2007.
- HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 49, p. 72-78, 2011.
- HERNANDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym-435 and Lipzyme- TL IM. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 277-286, 2008.
- ISO, M.; CHENB, 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.
- JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase: A critical review. *Critical Review Biotechnology*, v. 28, p. 253-264, 2008.
- KNOTHE, G. Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v. 44, p. 193, 2001.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V. *The biodiesel handbook*. AOCS Publishing, Illinois, 2005.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. *Manual do Biodiesel*. 1ªed, Edgard Blucher, São Paulo, 2006.
- KROUMOV, A.D.; MÓDENES, A.N.; WENZEL, B.M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. *Acta Scientiarum Technology*, v.29, n.1, p.9-16, 2007.
- LECA, M.; TCACENCO, L.; MICUTZ, M.; STAICU, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n. 5, 2010.
- LEUNG, D.YC.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, p. 1083-1095, 2010.
- LIU, Y.; TAN, H.; ZHANG, X.; YAN, YUNJUN.; HAMEED, B.H. Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, v. 157, p. 223-229, 2010.
- LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol tioletate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp.* *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v. 56, p. 122-125, 2009.
- MACEDO, G. A.; MACEDO, J.A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 32, p. 28-43, 2004.
- NATIONAL BIODIESEL BOARD. Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos, 1998, Curitiba, Anais.
- NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, p. 142-147, 2006.
- 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.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetal: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PESSOA, F.M.; MAGALHÃES, S.P.; FALCÃO, P.W.C. Production of Biodiesel via Enzymatic Ethanolysis of the Sunflower and Soybean Oils: Modeling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p.238-244, 2010.
- PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for nonaqueous synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.
- RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic

production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RODRIGUES, R. C., VOLPATO, G., WADA, K. AND AYUB, M. A. Z. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 85, n.10, p. 925-930, 2008.

RODRIGUES, D.S.; MENDES, A.A.; ADRIANO, W.S.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, R. C.; BOLIVAR, J. M. A.; PALAU-ORSA, A.; VOLPATO, G.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. A. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 386-393, 2009^a.

RODRIGUES, R.C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M.A.Z. Improved enzyme stability in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 152, p. 394-404, 2009^b.

RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B.C.C. C.; VOLPATO, GIANDRA; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M.A.Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, v. 45, p.1268-1273, 2010.

SUARES, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70 Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. *Química Nova*, v. 30, p. 2068-2071, 2007.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TURKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. *A Journal of Chromatography*, v. 1127, p. 34-44, 2006.

UOSUKAINEN, E.; LINKO, Y.; LAMSA, M. Transesterification of trimethylolpropane and rapessed oil methyl ester to environmentally acceptable lubricants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 75, p. 1557-1563, 1998.

URGEL, A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1^a ed., v. 3, Edgard Blucher, São Paulo, 2001.

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*, v. 9, p. 113-148, 2000.

XIAO, M.; MATHEW, M.; OBBARD, J.P. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. *GCB Bioenergy*, v.1, p. 115-125, 2009.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, p. 355-360, 2000.

WINAYANUWATTIKUN, P.; KAEWPIBOON, C.; CHULALAKSANANUKUL, K.P.W, YONGVANICH, T.; SVASTI, J. Immobilized lipase from potential lipolytic microbes for catalyzing biodiesel production using palm oil as feedstock. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 9, p. 1666-1673, 2011.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chemical Engineering Journal*, v. 134, p. 262-267, 2007.