

Catálise Enzimática: Transesterificação do Óleo de Soja e Esterificação do Ácido Oleico via Lipases¹

Isac G. Rosset², Andre L. M. Porto³

¹Aceito pra publicação no 2º Trimestre de 2015

²Departamento de Engenharias e Exatas, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, Palotina, Paraná, Brasil. rosset@ufpr.br

³Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. João Dagnone, 1100, Jd. Santa Angelina, CEP 13563-120, CP 780, São Carlos-SP, Brasil.

Resumo: O presente trabalho descreve o estudo da catálise enzimática em reações de transesterificação do óleo de soja e esterificação do ácido oleico. Foram estudadas as seguintes enzimas: *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Hog pancreas*, *Porcine pancreas*, *Rhizopus niveus* e *Pseudomonas fluorescens*. Todas as reações foram realizadas com 5,0% do biocatalisador e os rendimentos das reações foram determinados por CG-FID e os resultados expressos em percentagem (%) de conversão de ésteres. Tanto em reações de transesterificação quanto esterificação a lipase de maior eficiência foi a de *Candida antarctica* resultando em um rendimento na esterificação de 96,5% e na transesterificação o óleo de soja 84,1%. Todas as reações foram analisadas por CG-FID e RMN.

Palavras-chave: Biodiesel, biocatálise, bioenergia.

Abstract: This paper describes the study of enzymes in transesterification reactions of soybean oil and esterification of oleic acid. The following enzymes were studied: *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Hog pancreas*, *Porcine pancreas*, *Rhizopus niveus* and *Pseudomonas fluorescens*. All reactions were carried out with 5.0 % of the biocatalyst and the yields of the reactions were determined by GC-FID and the results

expressed as (%) of ester conversion. Both transesterification and esterification reactions the best lipase was *Candida antarctica* was resulting in a yield of 96.5 % in the esterification and transesterification soybean oil 84.1%. All reactions were analyzed by GC-FID and NMR.

Keywords: Biodiesel, biocatalysis, bioenergy

1. Introdução

É conhecido que o setor petroquímico é em grande parte, responsável pelos danos ambientais. No entanto, a crise do petróleo que se instaurou nas últimas décadas, aliada ao aumento de demanda por combustíveis e a crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, o que coloca a biomassa em um papel de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (SUAREZ et al. 2007).

A queima de combustíveis derivados do petróleo resulta no acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa. Também, as atividades industriais baseadas no petróleo não são autossustentáveis, seus produtos não têm como característica principal a biodegradabilidade e são fontes finitas (BASHA et al. 2009). As mudanças climáticas, induzidas em grande parte pelo uso desses combustíveis fósseis, associadas à preocupação com o desenvolvimento sustentável, tornam as fontes renováveis de energia necessárias, principalmente aquelas que causam menos danos ao meio ambiente. Nesse aspecto, a biomassa tem atraído muita atenção dos pesquisadores (SCHUCHARDT et al. 2001).

No Brasil, dentre as fontes de biomassa disponíveis para a produção de biocombustíveis encontram-se basicamente a cana-de-açúcar para a produção de etanol e os óleos vegetais para a produção de biodiesel (NONHEBEL 2005). O uso de óleos vegetais como combustíveis não é recente, pois seu uso já foi investigado antes mesmo das crises energéticas. Rudolf Diesel (1858-1913), o inventor do motor que leva o seu nome, teve interesse por esses combustíveis, o qual apresentou um motor abastecido com óleo de amendoim em uma exposição em Paris em 1900 (SHAY 1993). Diferentes alternativas têm sido consideradas para permitir o seu uso em motores a diesel sem qualquer problema operacional, tais como: micro emulsão, pirólise e reação de transesterificação com etanol ou metanol para a produção de biodiesel.

Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples, promovendo a obtenção do biodiesel com propriedades similares ao diesel de petróleo. A transesterificação tem sido largamente utilizada para redução da viscosidade dos triglicerídeos, melhorando as propriedades físico-químicas dos combustíveis para o motor diesel (KNOTHE; GERPEN 2010).

O biodiesel é biodegradável e não tóxico, reduz sensivelmente as emissões de material particulado, monóxido de carbono e é ausente de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Além disso, o biodiesel permite a valorização de subprodutos de atividades agroindustriais, como a soja (*Glycine max*) e o pinhão-mansão (*Jatropha curca*) e tem a vantagem de se utilizar diferentes plantas produtoras de óleo de acordo com a região de produção (NETO et al. 2000). Com relação à produção, o biodiesel pode ser obtido tanto pela reação de transesterificação de triglicerídeos presentes em óleos vegetais e gorduras animais quanto pela esterificação de ácidos graxos livres (AGLs). A esterificação de AGLs com álcoois de baixo peso molecular é usada como um pré-tratamento para a reação de transesterificação via catálise básica, para converter ácidos graxos livres em ésteres (metílicos ou etílicos) dessa forma evitando a saponificação, especialmente quando o teor de ácidos graxos livres é superior a 3% (FREEDMAN et al. 1984).

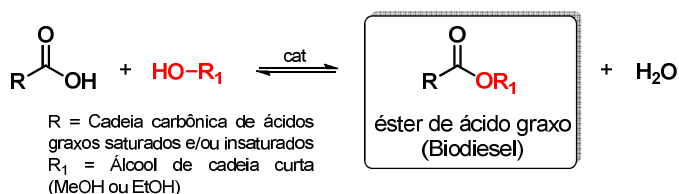


Figura 1. Reação geral de esterificação de um ácido graxo.

No caso da transesterificação para a produção de biodiesel, os triglicerídeos (ésteres presentes em óleos e gorduras) reagem com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador (geralmente homogêneo) como o NaOH para produzir novos ésteres (biodiesel) e glicerol, como subproduto (Figura 2) (ROSSET et al. 2011). Neste tipo de catálise, o catalisador está presente na mesma fase dos reagentes, assim é definida como catálise homogênea, ou seja, o catalisador está molecularmente disperso na solução reacional (LEISTEN 1964).

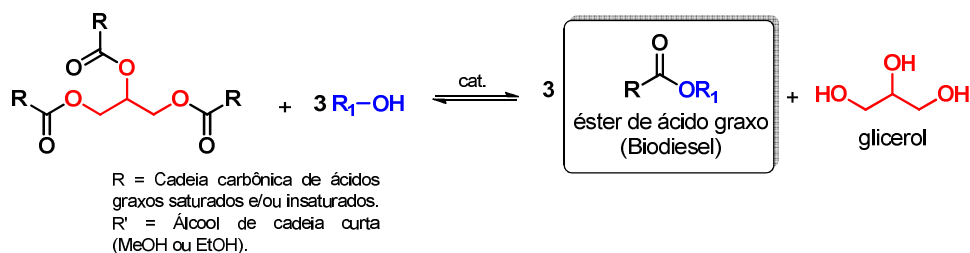


Figura 2. Reação geral de transesterificação para a preparação do biodiesel.

No entanto, as reações de transesterificação de óleos vegetais em meio alcalino têm o inconveniente de produzirem sabões, tanto pela neutralização dos ácidos graxos livres quanto pela saponificação dos glicerídeos e/ou dos ésteres monoalquílicos formados. A quantidade de ácidos graxos livres e água no meio são parâmetros importantes para determinar a viabilidade do processo de transesterificação. Quanto maior a acidez do óleo e o teor de água, menor é a eficiência da conversão, pois ocorre a formação de sabões (MEHER et al. 2006). Essas reações secundárias prejudicam o processo, pois consomem parte do catalisador, diminuindo o rendimento da transesterificação e dificultando o processo de separação do glicerol e a purificação do biodiesel (Figura 3) (SCHUCHARDT et al. 1998).

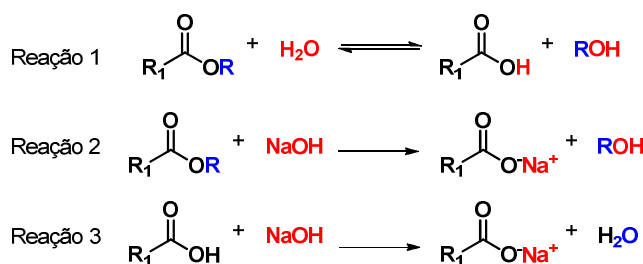


Figura 3. Reações secundárias que podem ocorrer durante a transesterificação de óleos e gorduras em meio básico: (1) hidrólise, (2) saponificação e (3) neutralização dos ácidos graxos.

Uma alternativa para reduzir os problemas associados à catálise tradicional é o emprego de lipases para as reações de esterificação de ácidos graxos (ROSSET et al. 2013) e transesterificação de triglicerídeos (ROSSET et al. 2013). As vantagens de se utilizar lipases para a produção de biodiesel são: habilidade de se trabalhar em diferentes meios, tanto na presença de solventes hidrofílicos quanto hidrofóbicos; são enzimas versáteis e robustas; muitas lipases mostram considerável atividade para catalisar reações de transesterificação com álcoois de cadeia longa ou ramificada, o que é difícil se usar catalisadores alcalinos; se a enzima for imobilizada, poderá ser reutilizada (AARTHY et al. 2014). Se faz necessário a otimização das condições de reação, para estabelecer características que as tornam disponíveis

para futuras aplicações industriais. Entretanto, uma vez otimizado o processo enzimático, este poderá apresentar vantagens em relação ao processo químico.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento de algumas lipases frente a reações de esterificação do ácido oleico e transesterificação do óleo de soja avaliando a rendimento e, no caso da transesterificação, a produção de subprodutos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Solventes: Etanol grau HPLC-UV (Tedia), *n*-hexano e acetato de etila grau PA (Quimis), clorofórmio deuterado para RMN (CIL, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). *Reagentes:* Óleo de soja (Liza[®]), ácido oleico (Quimis), hidróxido de sódio, ácido sulfúrico (Vetec), bicarbonato de sódio (Synth), sulfato de sódio anidro (Quimis), Glicerol PA (Vetec), tricaprina e 1,2,4-butanotriol (Sigma-Aldrich) como padrões internos em CG-FID e tetrametilsilano (TMS) como calibração interna para RMN, *Enzimas:* *Candida antarctica* Novozyme 435[®] (Novo Nordisk Bioindustrial) *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Hog pancreas*, *Porcine pancreas*, *Rhizopus niveus*, *Pseudomonas fluorescens* (Sigma Aldrich). *Revelador:* Vapor de iodo e placas cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄ (Whatman). *Equipamentos:* Câmara de UV (Bottom) com comprimentos de onda em 254 e 325 nm, agitador orbital horizontal (Tecnal) modelo TE-421 e agitador orbital de bancada (Nova Ética) modelo 430-RDBP. Cromatógrafo a gás (Shimadzu) modelo GC-2010 equipado com auto injetor modelo AOC-29i, detector FID e coluna cromatográfica para a análise de biodiesel *Select Biodiesel for Glycerides UltiMetal* (15 m x 0,32 mm x 0,45 µm) (Varian). Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (BRUKER) modelo AC-200 (CAQUI-IQSC-USP) operando em 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades apresentadas como: *s* (singleto), *d* (dubleto) *dd* (duplo dubleto), *t* (triplete), *q* (quarteto), *quint* (quinteto) e *m* (multiplete).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo do padrão de biodiesel etílico via catálise básica

Em um balão de três bocas de 250 mL equipado com um condensador de refluxo foi adicionado o óleo de soja refinado (50 g, 54 mL), que permaneceu em agitação magnética moderada até atingir a temperatura de 70 °C em banho de óleo. Paralelamente, foi adicionado NaOH (0,5 g, 12,5 mmol, 1,0% m/m com relação ao óleo de soja) em 10 mL de etanol e a mistura foi adicionada vagarosamente ao óleo de soja aquecido com auxílio de uma seringa de vidro. A mistura ficou em aquecimento e agitação por 60 min, sendo que a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD). Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação onde permaneceu por 24 h à temperatura ambiente para a separação das fases. A fase inferior (glicerol) foi separada e a fase superior (biodiesel) foi concentrada em evaporador rotativo, lavada com água destilada (3 x 100 mL) para retirar traços de etanol, glicerol e catalisador, seguida por lavagem com solução 10% de HCl (3 x 50 mL) e novamente com água destilada (1 x 100 mL). O resíduo de água foi removido por secagem com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) seguido por filtração simples. O produto então foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C . O rendimento da reação foi quantitativo.

2.2.2. Preparo do padrão de biodiesel etílico via catálise básica

Em um balão de 50 mL, acoplado a um condensador tipo Dean-Stark, adicionou-se o ácido oleico (2,0 g; 7,05 mmol; 2,23 mL), 6,0 mL de etanol, 20 mL de tolueno e o ácido *p*-toluenossulfônico (0,2 g; 0,11 mL; 1,0% m/m em relação à quantidade do ácido oleico). O sistema permaneceu sob refluxo por 15 horas em banho de óleo e agitação magnética. A reação foi acompanhada por CCD e os produtos revelados em vapor de iodo. Para a extração, o produto foi lavado com água destilada (3 x 10 mL), com solução de bicarbonato de sódio 10% (3 x 10 mL) e novamente com água destilada (3 x 10 mL). O álcool e o tolueno remanescente foram removidos por evaporação à pressão reduzida e o produto foi seco com Na_2SO_4 seco. O produto foi submetido à purificação por coluna cromatográfica utilizando sílica flash como fase estacionária e um sistema eluente de *n*-hexano:acetato de etila (98:02) como fase móvel.

2.2.3. Transesterificação e esterificação enzimática

As reações enzimáticas foram realizadas em tubos *Eppendorf*[®], onde, tanto a esterificação do ácido oleico quanto a transesterificação do óleo de soja refinado, foram adicionados o ácido oleico para a esterificação (250 mg; 280 µL; 0,88 mmol) ou óleo de soja para a transesterificação (250 mg, 270 µL), etanol (750 µL) e as lipases (25 mg, 5,0% m/m em relação à quantidade do ácido oleico ou do óleo de soja). As reações foram executadas em agitador orbital de bancada à temperatura de 32°C e 130 rpm por 24 h. Para a extração, os produtos foram lavados com água destilada (3 x 1 mL), secos com Na₂SO₄ anidro, filtrados e o excesso de álcool foi retirado por evaporação a pressão reduzida. Os rendimentos das reações foram determinados por CG-FID utilizando a tricaprina como padrão interno e os resultados expressos em % de conversão de ésteres.

2.3. Análises

A CG-FID foi empregada na quantificação de todas as reações realizadas nesse trabalho. Para isso, foi desenvolvido um método cromatográfico usado tanto na quantificação das reações de esterificação do ácido oleico quanto na quantificação dos ésteres produzidos nas reações de transesterificação do óleo de soja bem como o glicerol remanescente. Assim, foi possível comparar os tempos de retenção dos componentes em vários tipos de amostras. O método foi desenvolvido de acordo com as seguintes condições: nitrogênio como gás de arraste, razão de *split* 1:20, volume de injeção de 1 µL, temperatura do injetor de 270°C e do detector de 350°C, temperatura inicial da coluna de 100°C permanecendo por 1 min, taxa de aquecimento de 15°C/min até 180°C, posteriormente aquecimento a uma taxa de 7°C/min até 225°C e 30°C/min até 350°C permanecendo nessa temperatura por 5 min, resultando em um tempo total de análise de 21 min e 56 s. A coluna utilizada foi a *Select Biodiesel for Glycerides UltiMetal* (Varian). A RMN ¹H foi utilizada para a análise qualitativa dos subprodutos produzidos nas reações de transesterificação enzimática do óleo de soja. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente e usando o TMS como calibração interna. Os tempos de relaxação foram medidos para todas as amostras usando uma sucessão de pulso inversão-recuperação. Os parâmetros usados foram: largura espectral, 2604 Hz; tempo de repetição, 3,14 s; largura de pulso, 5 µs (62,5°) e número de varreduras de 64.

3. Resultados e Discussão

A lipase que apresentou o melhor desempenho nas duas reações (transesterificação e esterificação) foi a lipase de *C. antarctica* (Novozyme 435[®]) (Figura 4). Várias enzimas já foram reportadas na literatura para a produção de biodiesel com diversos óleos e álcoois em condições reacionais variadas. Estudos semelhantes mostram que a lipase de *C. antarctica* em reações de transesterificação forneceu altos rendimentos (79,1%) empregando óleo de girassol (MITTELBAACH 1990); (DENG et al. 2005), pinhão-manso (91,3%) (MODI et al. 2007) e óleo de peixe (100%) (BREIVIK et al. 1997).

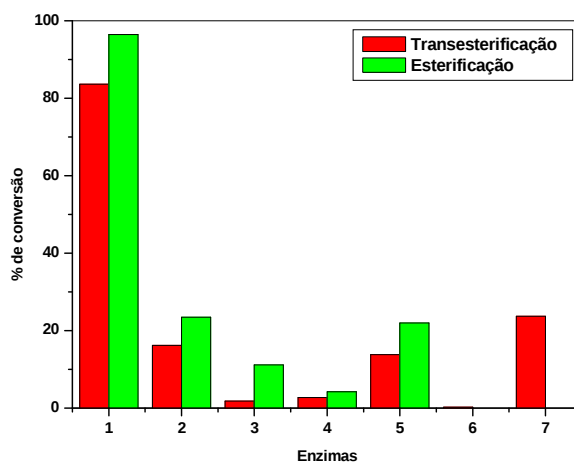


Figura 4. Rendimentos obtidos por CG-FID das reações de transesterificação e esterificação do óleo de soja e do ácido oléico com várias enzimas (1. *C. antarctica*; 2. *C. rugosa*; 3. *C. cylindracea*; 4. *P. pancreas*; 5. *H. pancreas*; 6. *R. niveus* e 7. *P. fluorescens*).

Muitos trabalhos demonstram que dentre todas as lipases usadas em reações de transesterificação nos mais diferentes tipos de óleos e gorduras (soja, girassol, babaçu, pinhão-manso, palma, coco, algodão, farelo de arroz, peixe, óleo de fritura e gordura animal) empregando diversos álcoois (metanol, etanol, propanol, 2-propanol, butanol, *t*-butanol), as lipases do gênero *Candida* (*C. antarctica*, *C. rugosa*, *C. cylindracea* e *Candida sp.*) são as que apresentaram os melhores rendimentos para conversão em mono ésteres (FJERBAEK et al. 2009).

Com relação à reação de esterificação do ácido oleico, todas as enzimas utilizadas (com exceção da *P. fluorescens*) apresentaram melhores conversões para o éster etílico do ácido oleico (oleato de etila) do que nas transesterificações do óleo de soja. Novamente, a lipase de *C. antarctica* mostrou maior eficiência na conversão do ácido oleico para oleato de etila frente as outras enzimas (96,5%) (Figura 4). Os rendimentos estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimentos das reações de esterificação do ácido oleico com várias enzimas.

Enzima	Conversão para oleato de etila (%) ^a
<i>Candida antarctica</i>	96,5
<i>Candida rugosa</i>	23,4
<i>Candida cylindracea</i>	11,1
<i>Porcine pâncreas</i>	4,2
<i>Hog pâncreas</i>	22
<i>Rhizopus niveus</i>	nd
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	nd

^aQuantificado por CG-FID. nd = não detectado.

Já na reação de transesterificação do óleo de soja, a análise dos subprodutos produzidos foi realizada por CG-FID. Pelo gráfico da Figura 5 pode-se observar que a lipase de *C. antarctica* (1) apresentou melhor conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) (83,6%), os restantes (16,3%) são mono- e diglicerídeos formados e uma pequena quantidade triglicerídeos remanescentes (0,1%) e não foi detectado glicerol após lavagem do produto. Todas as outras lipases apresentaram menores rendimentos de biodiesel (<25%) sendo que dentre as outras lipases a de *P. fluorescens* (7) apresentou um maior rendimento de biodiesel (23,7%), porém restou uma grande quantidade de triglicerídeos que não sofreram transesterificação (40,7%) (Tabela 2). Um estudo realizado por Deng e colaboradores em 2005 demonstrou que essa mesma lipase forneceu um rendimento de 45,3% na transesterificação do óleo de girassol com isobutanol e que essa lipase prefere álcoois alifáticos de maior caráter hidrofóbico (DENG et al. 2005).

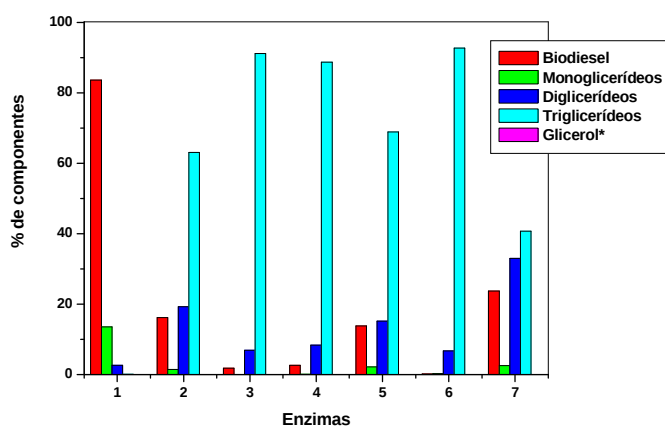


Figura 5. Componentes presentes nos produtos (biodiesel, mono-, di-, triglicerídeos e glicerol) nas reações de transesterificação empregando várias enzimas (1. *C. antarctica*; 2. *C. rugosa*; 3. *C. cylindracea*; 4. *P. pancreas*; 5. *H. pancreas*; 6. *R. niveus* e 7. *P. fluorescens*). * Glicerol não detectado após lavagem dos produtos.

A Tabela 2 a seguir mostra as quantidades de todos os produtos formados durante a reação de transesterificação enzimática.

Tabela 2. Rendimentos das reações de transesterificação do óleo de soja com várias enzimas.

Enzima	Biodiesel (%) ^a	Monoglicerídeos (%)	Diglicerídeos (%)	Triglicerídeos (%)	Glicerol (%) ^{b,c}
<i>C. antarctica</i>	83,6	13,6	2,7	0,1	nd
<i>C. rugosa</i>	16,2	1,5	19,3	63,1	nd
<i>C. cylindracea</i>	1,8	nd	6,9	91,2	nd
<i>P. pancreas</i>	2,7	0,1	8,4	88,7	nd
<i>H. pancreas</i>	13,8	2,2	15,2	68,9	nd
<i>R. niveus</i>	0,2	0,3	6,7	92,7	nd
<i>P. fluorescens</i>	23,7	2,6	33,0	40,7	nd

^aQuantificado com o uso do P. I. tricaprina. ^bQuantificado com o uso do P. I. 1,2,4-butenotriol. ^cRendimento calculado após lavagem do produto com água. nd = não detectado.

A grande maioria dos trabalhos na literatura apresenta resultados de transesterificações de óleos e gorduras frente a diversos álcoois, porém, trabalhos referentes às reações de esterificação enzimáticas de ácidos graxos livres não são comumente explorados. Um único trabalho empregando a lipase de *C. antarctica* na esterificação do ácido oleico foi descrito.

Nele, a lipase de *C. antarctica* forneceu um rendimento de 95% de oleato de etila em condições semelhantes (MARCHETTI; ERRAZU 2008).

No espectro de RMN ^1H do biodiesel produzido através da catálise enzimática (Espectro C,

Figura 6) é possível observar a presença de sinais característicos de mono- e diglicerídeos. Esses sinais são: d, 2H, δ 3,73 ppm, $J = 4,77$ Hz (k); d, 4H, 3,83 ppm, $J = 4,77$ Hz (n); quint, 1H, 4,93 ppm, $J = 4,77$ Hz (o); quint, 1H, 5,08 ppm, $J = 4,77$ Hz (l).

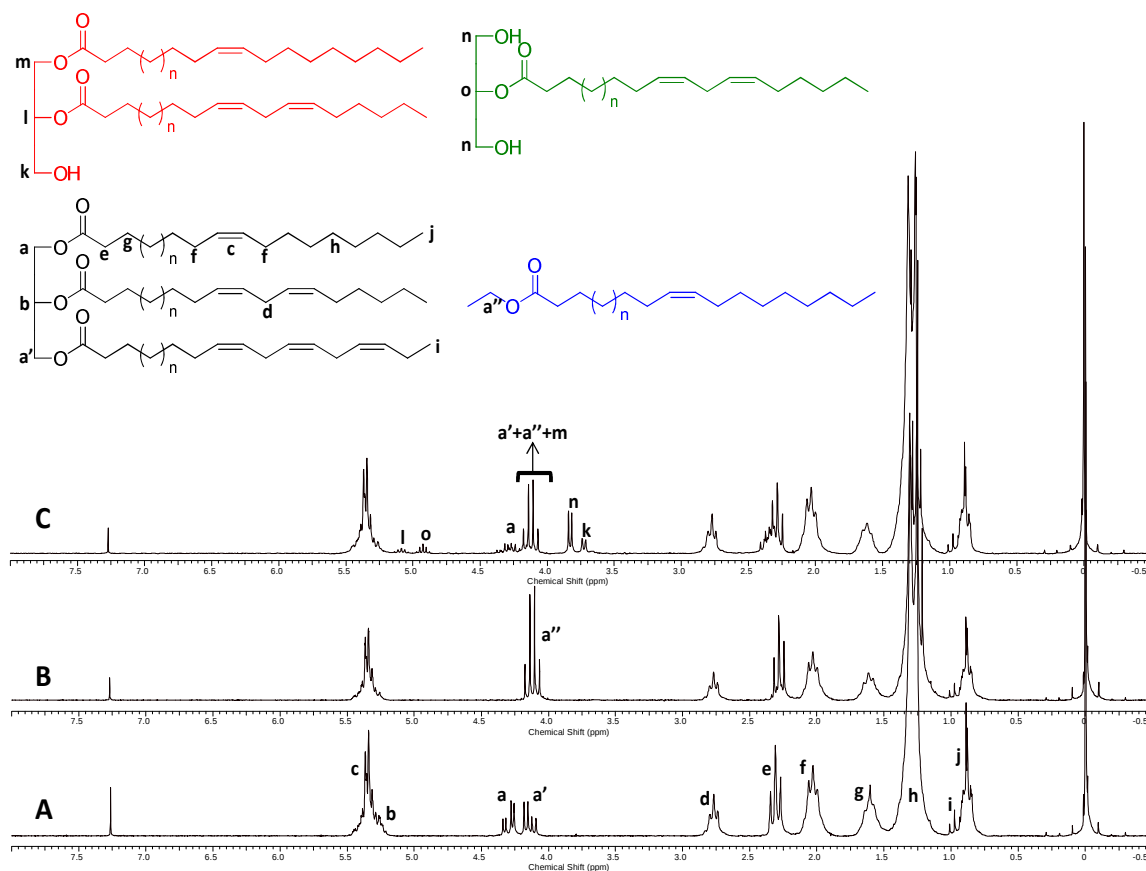


Figura 6. Comparação dos espectros de RMN ^1H . (A) Óleo de soja (triglicerídeos); (B) Padrão do biodiesel produzido por catálise básica; (C) Reação de transesterificação enzimática.

A ampliação do espectro C está mostrada na Figura 7.

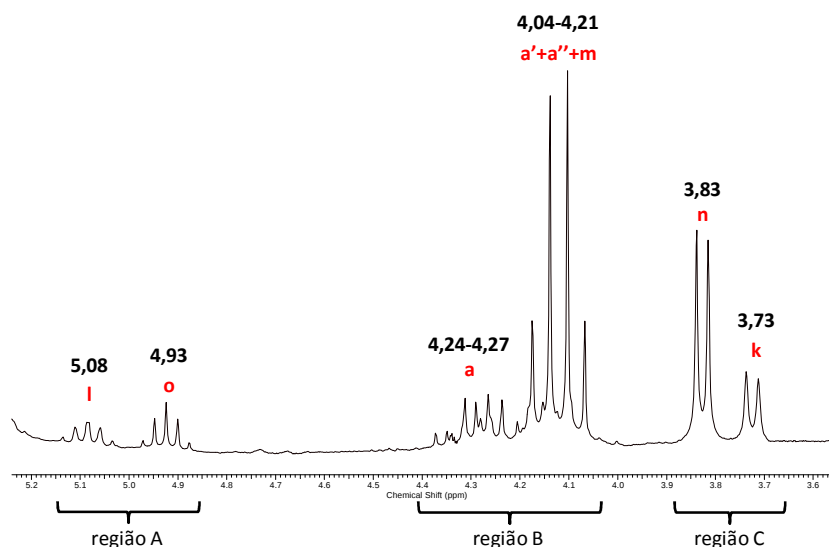


Figura 7. Ampliação do espectro de RMN ^1H entre δ 3,55-5,24 ppm do produto reação de transesterificação enzimática destacando as regiões dos quintetos *l* e *o*, dos multipletos *a* e *a'+a''+m* e dos dupletos *n* e *k*.

Em todas as reações de transesterificação de óleos e gorduras o principal subproduto é o glicerol, porém, nas reações de transesterificação enzimática, não foi observado a presença do glicerol após lavagem dos produtos, tanto por CG-FID quanto por RMN ^1H e ^{13}C . Um estudo mais detalhado mostrou que o simples processo de lavagem com água destilada eliminou o glicerol livre. Como descrito no procedimento experimental, as amostras de biodiesel com e sem lavagem obtido via catálise enzimática com lipase de *C. antarctica* foram analisadas por CG-FID e os cromatogramas estão mostrados na Figura 8.

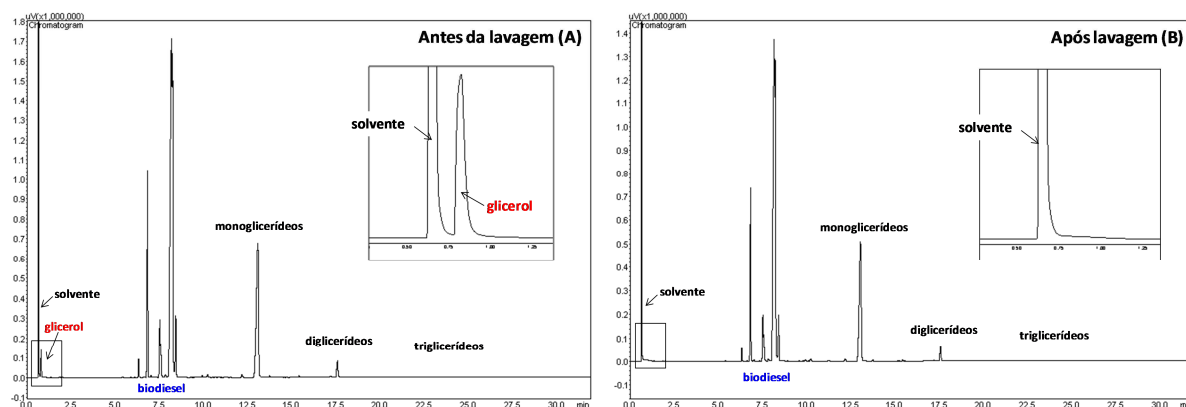


Figura 8. Comparação entre os processos de extração do biodiesel enzimático para a remoção do glicerol. Cromatograma (A) antes da lavagem com água destilada e Cromatograma (B) após lavagem com água destilada.

Pode-se observar pelos cromatogramas da Figura 8, que um simples processo de lavagem com água destilada foi suficiente para retirar o glicerol remanescente no biodiesel. A composição total de glicerol está descrita Tabela 2, o qual não foi detectado em todas as análises realizadas. Dessa forma que a catálise enzimática facilita o processo de extração do biodiesel e o glicerol é produzido com alta pureza e em baixa quantidade, sendo também uma vantagem da catálise enzimática sobre a catálise alcalina, pois esta última requer sucessivas lavagens com água para a purificação do biodiesel.

4. Conclusões

Foi possível preparar o biodiesel empregando a biocatálise via reações de esterificação do ácido oleico e transesterificação do óleo de soja refinado. Tanto para a reação de esterificação quanto transesterificação a lipase de *C. antarctica* se apresentou mais eficiente. Conclui-se que a biocatálise, através da utilização de lipases é uma metodologia promissora para a obtenção de biodiesel em escala laboratorial e que futuramente poderá ser aplicada industrialmente, especialmente no caso da etanolise com óleo de soja, com a fácil remoção do glicerol obtido, diminuindo os custos do processo. Através de análises detalhadas dos produtos formados em reações enzimáticas por RMN e CG-FID, é possível entender mais profundamente as etapas envolvidas no processo e, dessa forma, aprimorar os métodos de produção, tornando-o mais eficiente e garantindo uma melhor qualidade do produto.

5. Bibliografia

- AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M. K.; ROSE, C.; KAMINI, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, Green Processes and Eco-technologies – Focus on Biofuels., v. 92, n. 8, p. 1591–1601, 2014.
- BASHA, S. A.; GOPAL, K. R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1628–1634, 2009.
- BREIVIK, H.; HARALDSSON, G. G.; KRISTINSSON, B. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 11, p. 1425–1429, 1997.

- DENG, L.; XU, X.; HARALDSSON, G. G.; TAN, T.; WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, p. 341–347, 2005.
- 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.
- FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1638–1643, 1984.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V. (ORGS.). **The Biodiesel Handbook, Second Edition**. 2 edition ed. Urbana, Ill: AOCS Publishing, 2010.
- LEISTEN, J. A. Homogeneous catalysis: A reexamination of definitions. **Journal of Chemical Education**, v. 41, n. 1, p. 23, 1964.
- MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Comparison of different heterogeneous catalysts and different alcohols for the esterification reaction of oleic acid. **Fuel**, v. 87, n. 15–16, p. 3477–3480, 2008.
- MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.
- MITTELBAACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 3, p. 168–170, 1990.
- MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1260–1264, 2007.
- NETO, C.; R, P.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.
- NONHEBEL, S. Renewable energy and food supply: will there be enough land? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, n. 2, p. 191–201, 2005.

ROSSET, I. G.; CAVALHEIRO, M. C. H. T.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* lipase. **Catalysis Letters**, v. 143, n. 9, p. 863–872, 2013.

ROSSET, I. G.; M ASSAF, E.; LM PORTO, A. Biocatalytic production of ethyl esters (biodiesel) by enzymatic transesterification from synthetic triolein. **Current Catalysis**, v. 2, n. 1, p. 53–61, 2013.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ^1H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1–2, p. 136–142, 2011.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247–251, 2001.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199–210, 1998.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227–242, 1993.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: some applications of catalysis in oleochemistry. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 667–676, 2007.