

Área: Engenharia de Alimentos

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM

Aline de Cezaro, Ariana Secco Popiolski, Claudia Mara Trentin, Helen Treichel, J. Vladimir de Oliveira, Débora de Oliveira*

Laboratório de Termodinâmica Aplicada, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

**E-mail: odebora@uricer.edu.br*

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, utilizando razão molar óleo/etanol 1:3, temperatura 70°C, potência de 40% de 132W, 20% (p/p em relação aos substratos) de enzima *Novozym 435* nos intervalos de tempo de 15, 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC - Shimadzu 2010), sendo que o tempo de 4 horas de reação apresentou a maior conversão (80,04%) em ésteres etílicos e a enzima não apresentou perda de atividade ao final de cada reação.

Palavras-chave: Biodiesel, lipase, ultrassom, atividade enzimática.

1 INTRODUÇÃO

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (Dalla-Vecchia, 2004).

As lipases são geralmente biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, baixo impacto ao ambiente, grupo funcional e estereoseletividade. As reações químicas podem ser conduzidas diretamente usando lipases em meio orgânico (Oliveira et al., 2006).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais como os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Geotrichum*; as leveduras *Tulopsis* e *Candida*; e bactérias como *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Do ponto de vista econômico e industrial, os micro-organismos são preferíveis em relação às lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento. As lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise (Dalla-Vecchia 2004, Reis et al., 2008).

A maioria das lipases apresentam uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (Ghanem, Aboul-enein, 2005). A temperatura ótima para atividade máxima entre 30 e 40°C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (Macrae; Hammond, 1985). Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo micro-organismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando a comparação difícil (Freitas, 2006).

Recentemente, as pesquisas têm sido voltadas para utilização das lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos vegetais e gordura animal (Lee et al., 2002). Os catalisadores enzimáticos como as lipases, podem catalisar eficazmente o processo de transesterificação dos triglicerídeos nos sistemas aquosos ou não aquosos, superando os problemas relacionados ao conteúdo de água presente. Em particular, o subproduto, glicerol, pode facilmente ser removido sem nenhum processo complexo, e também os ácidos graxos livres contidos nos óleos e nas gorduras podem completamente ser convertidos a ésteres (Meher et al., 2006).

O biodiesel (éster monoalquílico de ácido graxo) produzido a partir de óleos vegetais, gorduras animais e óleos de microalgas por transesterificação ou esterificação com álcoois de cadeia curta tem sido visto como promissoras fontes renováveis de combustíveis devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, renovabilidade e menor dependência de produtos petrolíferos. O biodiesel é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido comumente a partir da reação química de óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool na presença de um catalisador (reação de transesterificação). Porém, a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas

dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, sua baixa volatilidade e seu caráter poliinsaturado, que implicam em alguns problemas nos motores, bem como em uma combustão incompleta (Encinar, 1999). Visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, melhorar a qualidade de ignição e ajustar a densidade específica, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, micro-emulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com etanol ou metanol (Ma e Hanna, 1999). Porém, os três processos mais investigados a fim de sobrepor os problemas encontrados na substituição do diesel por óleos vegetais são: a pirólise, a micro-emulsificação e a transesterificação.

A transesterificação, também conhecida como alcoólise, provoca a diminuição da viscosidade do óleo vegetal assim como melhora o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel. Atualmente, o biodiesel é obtido através de reações de transesterificação entre um óleo vegetal e um álcool de cadeia curta na presença de catalisador. Com relação aos catalisadores, a transesterificação pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico, porém, ela ocorre de maneira mais rápida na presença de um catalisador alcalino que na presença da mesma quantidade de catalisador ácido, observando-se maior rendimento e seletividade. Também pode ser realizada em meio enzimático, e sem a presença de catalisadores, em reações a altas pressões e temperaturas.

Na reação de transesterificação dos óleos vegetais, um triglicerídeo reage com um álcool na presença de um catalisador (enzimático, ácido forte ou base), produzindo uma mistura de ésteres e glicerol. Diversos aspectos, incluindo o tipo de catalisador (enzimático, alcalino ou ácido), relação molar entre álcool/óleo vegetal, temperatura, pureza dos reagentes (principalmente índice de água) e de ácidos graxos livres afetam a taxa de reação (Schuchardt et al., 1998).

A catálise enzimática emprega enzimas como biocatalisadores efetivos por ter alta especificidade ao substrato, grupo funcional específico e estereo especificidade em meio aquoso (Mamuro et al., 2001). A maior parte das pesquisas sobre a transesterificação de óleos vegetais, para a obtenção de biodiesel, utiliza a enzima comercial pura, em diversos meios reacionais (solventes, presença de aditivos, soluções polares-íons, fluídos supercríticos) ou fazendo uso da imobilização enzimática em suportes (Celite e polímeros, principalmente) (Du et al., 2004). A transesterificação enzimática propicia temperaturas amenas de operação,

facilidade de separação do glicerol gerado como subproduto e a purificação dos ésteres produzidos é facilmente realizada (Fukuda et al., 2001).

Tem sido relatado que o ultrassom exerce um efeito significativo sobre a transesterificação enzimática. A irradiação por ultrassom vem sendo estudada para produção de biodiesel utilizando enzimas, como a *Novozym 435* (Sinisterra, 1992; Yu et al., 2010 e Lin et al., 1995), bem como, o uso de catalisadores ácidos ou básicos (Deshmane et al., Mahamuni et al., 2009). No entanto, pouca investigação tem sido feita até à data sobre a aplicações de irradiação ultrassom na produção de biodiesel catalisada por lipase.

O processo de produção de biodiesel utilizando ultrassom vem como alternativa ao processo convencional de produção, uma vez que as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio reacional) geradas pelo ultrassom aumentam a miscibilidade entre os reagentes, fornecem energia necessária para a reação, reduzem o tempo de reação, reduz a quantidade de reagentes e aumenta o rendimento e a seletividade da reação (Yu et al., 2010).

As ondas são produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável como ar, metais, isolantes, água, entre outros. Estas ondas necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo (Maia et al., 2000).

Segundo Mason (2007), o ultrassom pode ser classificado de acordo com o nível de frequência em:

- Alta frequência (2-10 MHz) e baixa potência (<1 W/cm²), utilizado em diagnóstico de imagem e análises químicas;
- Baixa frequência (20-100 KHz) e alta potência (10-1000 W/cm²), utilizado para a sonoquímica.

Existem muitos fatores que afetam a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (Raso et al., 1999).

Estudos em sistemas homogêneos indicam que existem duas regiões de reatividade. A primeira corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada *ponto quente*, onde se inicia a implosão cuja eficiência depende da volatilidade do solvente. Já a segunda, trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (Liu et al., 2008).

Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas. A irradiação por ultrassom também pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (Liu et al., 2008).

Entretanto, a temperatura pode agir como o fator limitante mais comum para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas, uma vez que as enzimas podem ser inativadas termicamente. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas. Shah e Gupta (2008) demonstraram que a irradiação com frequência de 40 kHz não alterou a estrutura secundária da lipase, mas promoveu uma perturbação em regiões com resíduos tirosina e triptofano e na estrutura terciária da enzima. Estas mudanças estruturais promoveram a ativação da lipase.

Nas reações em ultrassom também é importante considerar o solvente que será utilizado. A presença de muitas moléculas de água pode aumentar a inativação, pois ocorre aumento da energia cinética do meio, induzido pelas ondas ultrassônicas, ocasionando mudanças conformacionais. O uso de solventes orgânicos ou sistemas bifásicos funciona como um mecanismo de proteção porque as moléculas de água encontram-se em torno da enzima, desta forma não são facilmente movidas pelo ultrassom (Martinez et al., 2000).

No entanto, até o presente momento não se conhece o verdadeiro potencial do ultrassom, devido à falta de conhecimento sobre os exatos efeitos moleculares do ultrassom em enzimas e células vivas. Nas aplicações em enzimas, o ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima, bem como a longevidade de biocatalisadores enzimáticos. No entanto, uma melhor compreensão do efeito do ultrassom nas propriedades das enzimas torna-se necessária para desenvolver biocatalisadores mais eficientes com aumento da atividade e estabilidade a longo prazo (Rokhina et al., 2009).

Nos últimos anos, a tecnologia ultrassônica tem começado a ser utilizada mais largamente no campo da biotecnologia. Os cientistas têm combinado a tecnologia ultra-sônica

e biotecnologia, usando a energia física do ultrassom sobre as células para criar mudanças conformacionais na estrutura das enzimas, alterando assim a atividade da enzima (Chisti, 2003). A aplicação de ultrassom para a síntese enzimática catalisada em uma fase não aquosa pode aumentar a atividade da enzima no solvente orgânico e também pode melhorar a transferência entre o substrato e o sítio ativo da enzima.

A consecução de reações enzimáticas em ultrassom pode ser considerada uma tecnologia relativamente nova, não havendo muitos estudos acerca do comportamento das enzimas neste sistema.

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom. Existem poucos estudos sobre o efeito do ultrassom sobre as enzimas e têm sido relatados resultados contraditórios de inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada com α -amilase, peroxidase de raiz forte, lacase e fosfatase alcalina (Özbek e Ö Ülgen, 2000; Basto et al., 2007).

Além disso, forças de cisalhamento que ocorrem no fluido durante a irradiação do ultrassom também podem ter um papel significativo na inativação da enzima (Özbek e Ö Ülgen, 2000).

Diversos trabalhos relatam a realização de síntese enzimática em ultrassom em sistemas reacionais livres de solvente e sistemas com solventes (Liu et al., 2008; Babicz et al., 2010; Ceni et al., 2010), mostrando que o sistema reacional tem grande influência na síntese enzimática.

Com o avanço de novas tecnologias em química orgânica, surgem novas e eficientes formas de transferência de energia. Uma delas é o uso do ultrassom, onde os efeitos físicos como o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória devem ser considerados para a utilização em processos biotecnológicos. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (Martinez et al., 2000).

Neste trabalho foi realizado um estudo preliminar visando à possibilidade de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, nas reações de transesterificação utilizou-se como substratos óleo de soja comercial (Marca Soya) sem nenhum tratamento prévio, álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e a enzima comercial *Novozym 435*, produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR.

Na quantificação dos produtos da reação, foram usados padrões comerciais dos ésteres majoritários do biodiesel de soja e o padrão interno heptadecanoato de metila, com procedência Sigma-Aldrich e como solvente n-heptano (Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza).

Para a determinação da atividade enzimática os seguintes reagentes/solventes: acetona P.A ACS (Vetec, 99,5%), álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e hexano (Nuclear, P.A). Ácido láurico (Vetec, 98% CG) e álcool n-propílico normal (Nuclear, P.A 99,5%) foram utilizados como substratos para dosagem da atividade de esterificação das lipases.

2.1.1 Procedimento Experimental

Os testes preliminares para produção enzimática de biodiesel foi realizado em um banho de ultrassom (Unique ultraSonic Cleaner, modelo: USC-1800A, frequência US: 40KHz, potência US: 132W). Os experimentos foram realizados em um balão de 50mL, onde foi colocado 20% (p/p em da enzima *Novozym 435*, em relação à massa de substratos) na razão molar óleo/etanol de 1:3, temperatura de 70°C e potência de ultrassom correspondente à 40% da capacidade máxima do equipamento (132W). Experimentos destrutivos foram realizados, sendo a amostragem realizada nos tempos de 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 6 e 8 horas de reação, em meio reacional livre de solvente orgânico.

Para recuperar a enzima ao final de cada reação, o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração com papel de filtro. Em seguida, realizou-se duas lavagens com 10mL de hexano e filtrou-se a vácuo a suspensão obtida. Este procedimento é uma variação do método desenvolvido por Castro e Anderson (1995), que utiliza heptano.

Após este procedimento a amostra foi evaporada no rotavapor (marca Fisatom, modelo 550). Posteriormente secou-se a enzima em estufa (modelo JP 101, marca J. Prolab) a 40°C durante 1 hora. A enzima recuperada foi mantida em dessecador por 24 horas. Após este período, a atividade da mesma foi determinada para verificar possíveis perdas durante a reação e torná-la apta para a reutilização.

A medida de atividade foi realizada no início e no final das reações com a enzima recuperada. Antes de iniciar o procedimento de medida de atividade, as enzimas imobilizadas foram secas em estufa a 40°C durante 1 hora (Oliveira et al., 2006), para eliminação de possível umidade livre.

2.1.2 Determinação da atividade enzimática de lipases

O procedimento adotado para a determinação da atividade da enzima *Novozym 435*, foi descrita por Feirhmann (2005). Sucintamente, a atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e álcool N-propílico, à temperatura de 60°C, com a enzima (0,195g) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto de 20ml, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Alíquotas de 150µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20ml de acetona-etanol (1:1) com finalidade de cessar a reação e a extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1mmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A seguinte equação foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$\text{Atividade (U/g)} = (V_0 - V_{40}) * N * 1000 / t * m$$

Onde:

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio (NaOH)

V₀ = volume de (NaOH) gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL)

V₄₀ = volume de NaOH gasto na titulação da amostra após 40 min de reação (mL)

m = massa de enzima utilizada na reação (g)

t = tempo de reação (min)

2.1.3 Análise cromatográfica para determinação do teor de ésteres etílicos de ácidos graxos

Após a coleta das amostras procedia-se a evaporação do álcool etílico não reagido e do hexano utilizado para lavar a enzima em rotavapor (Marca Fisatom, modelo 550) na temperatura de 60°C.

Para determinar o teor de ésteres de ácidos graxos, as amostras foram previamente preparadas, transferindo-se 250mg da amostra para um balão volumétrico de 10mL, em seguida completava-se o volume até o menisco com n-heptano. Após, transferia-se uma alíquota de 50µL desta solução para um balão volumétrico de 1mL e adicionava-se 50µL de padrão interno de heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000mg/L e completava-se o volume com n-heptano.

A solução foi injetada (1µL) em triplicata de amostra em um cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) nas condições cromatográficas descritas pela norma nº 14103, do Comitê Europeu para Padronizações (EN 2001). A temperatura inicial da coluna de 120°C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, aumentando-se a temperatura a uma taxa de 15°C/minuto até 180°C, permanecendo assim por 2 minutos, e aumentando novamente a uma taxa de 5 °C/min até 250°C permanecendo 2 minuto nesta condição. Ar sintético e nitrogênio foram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250°C e a taxa de split de 1:50.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas reações de transesterificação enzimática em ultrassom foi avaliado o teor de ésteres etílicos produzidos, nas condições experimentais citadas anteriormente.

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos durante a avaliação cinética do processo. De acordo com a Figura 1 pode-se observar que o teor de ésteres etílicos foi de 37,60% em 15 minutos, 62,98% em 30 minutos, 68,38% em 1 hora, 73,10% em 2 horas, 80,04% em 4 horas, 76,56% em 6 horas e 73,59% em 8 horas. O tempo de 4 horas de reação, apresentou o maior teor de ésteres etílicos. Já nos intervalos de tempos de 6 e 8 horas observa-se uma pequena queda em relação ao teor de ésteres, sendo 76,56% e 73,59% respectivamente.

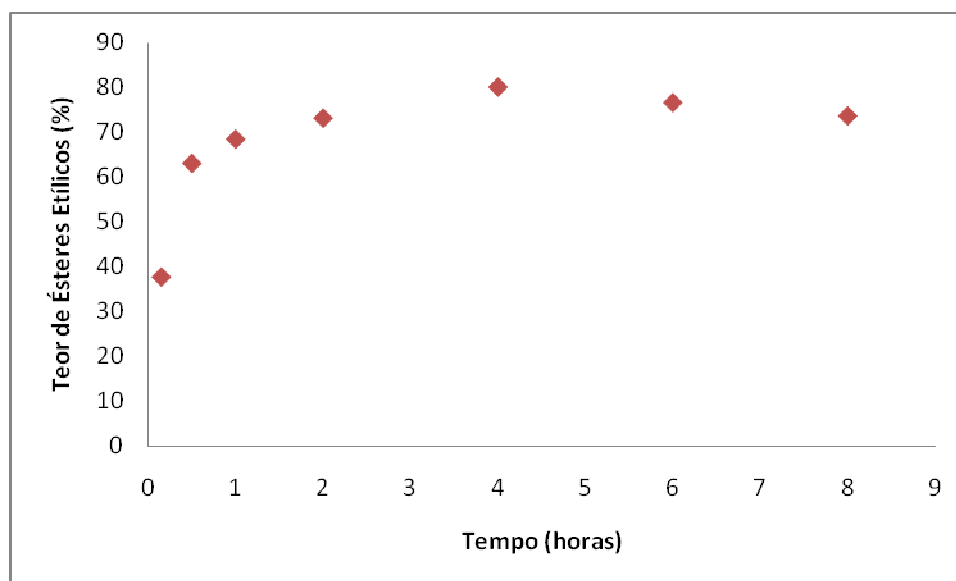


Figura 1: Teor de ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática em ultrassom.

Liu et al. (2008) estudaram o efeito do ultrassom na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, utilizando lipase de *Candida lipolytica*. Os autores relataram que, comparando com a reação conduzida em shaker, as taxas de reação aumentaram em 94% para a reação realizada em 1 hora, 64% na reação de 2 horas, 58% na reação de 3 horas, 41% na reação em 4 horas e de 34% na reação de 5 horas. A taxa de reação em 5 horas em banho ultrassônico foi 2,3 vezes maior que a obtida em 12 horas de reação em shaker.

A enzima não apresentou perdas de atividade no final de cada reação, conforme Figura 2, onde obteve-se aproximadamente 52,7 U/g em 4 horas, 51,2 U/g em 6 horas e 50 U/g em 8 horas de reação, podendo ser reutilizada em ciclos. Já para a atividade inicial obteve-se aproximadamente 46,9 U/g. Após 8 horas de irradiação pode-se observar uma pequena perda a atividade enzimática devido a provável colapso cavitacional.

Yu et al. (2010) estudaram a produção de biodiesel com óleo de soja e metanol em sistema de ultrassom utilizando como catalizador a enzima *Novozym 435*. Os autores obtiveram, nas condições ótimas (50% da energia ultrassônica, 50% de vibração, teor de água 0,5%, razão molar de 1:1 álcool terc-amílico/volume de óleo, razão molar 6:1 metanol / óleo, 6% de *Novozym 435* e 40°C), 96% de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos e a enzima não apresentou perdas de atividade durante os ciclos.

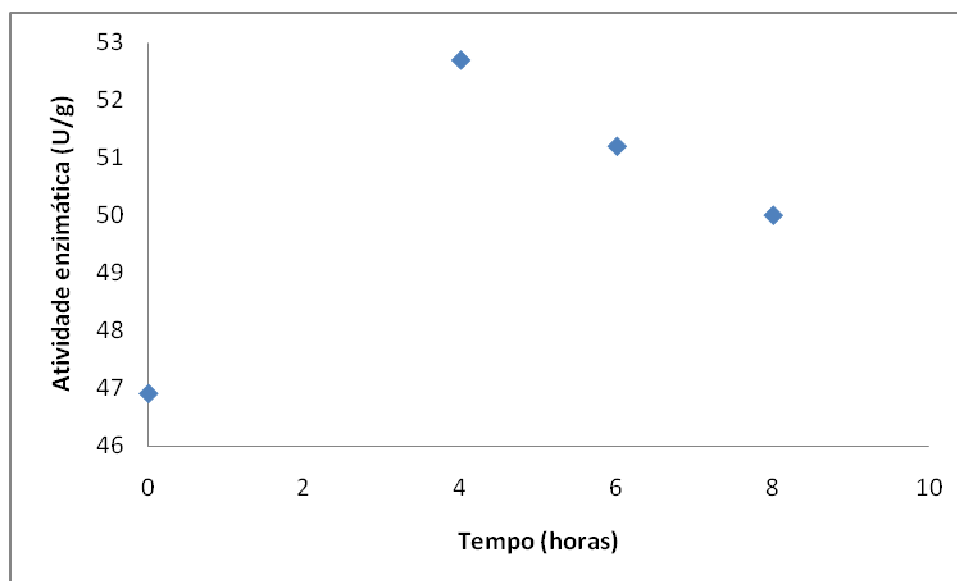


Figura 2: Atividade de esterificação da *Novozym 435* após cada ponto experimental.

Shishir et al. (2010) compararam a conversão de metil ésteres utilizando a ponteira ultrasonica e o método de agitação convencional. Para tanto foi utilizado como catalizador hidróxido de potássio 1%, razão molar metanol/óleo 6:1, potência do ultrassom de 200W, agitação de 1000rpm e 40 minutos de reação, onde foi obtido com o sistema de ultrassom 89,5% de conversão e com o método convencional 57,5%.

Comparando este trabalho com o teste preliminar realizado, onde utilizou-se razão molar etanol/óleo 3:1, potência do ultrassom 40% de 132W e 30 minutos e 1 hora de reação, obteve-se um teor de ésteres etílicos de 62,98% e 68,38%, respectivamente, demonstrando desta maneira que em menores níveis de razão molar e potência de ultrassom, resultados promissora também foram obtidos.

Santos et al. (2010) avaliaram a produção de éster metílico a partir de óleo de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e metanol, utilizando ultrassom. Os autores relataram 98% de conversão após 90 minutos com frequência de 40kHz e temperatura de 30°C. Hanh et al. (2009) estudaram a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos. A condição ótima do processo de esterificação foi com razão molar de álcool e ácido oléico de 3:1, 5% de ácido sulfúrico a 60°C de temperatura por 2 horas de reação. Foram obtidas conversões de cerca de

80% utilizando n-propanol, cerca de 70% utilizando n-butanol e cerca de 60% utilizando 2-propanol como solvente.

3 CONCLUSÃO

Com a avaliação do teste preliminar, verificou-se que o maior teor de ésteres etílicos (80,04%) foi encontrado na condição de 4 horas de reação a 70°C, potência de 40% de 132W, 20% (p/p) de enzima e razão molar óleo/etanol de 1:3. Foi verificado que a enzima não perde atividade após cada reação, sendo possível a reutilização do catalisador.

REFERÊNCIAS

- BABICZ, I.; LEITE, S.G.F.; SOUZA, R.O.M.A.; ANTUNES, O.A.C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17 pp. 4–6, 2010.
- BASTO, C.; SILVA, C. J.; GÜBITZ, G.; CAVACO-PAULO, A. Stability and decolourization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, pp. 355-362, 2007.
- CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. *Química Nova*, v. 18, p. 544-554, 1995.
- CENI, G.; SILVA, P. C.; LERIN L.; CHARIN, R. M.; OLIVEIRA, J. V.; TONIOZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Enzyme-catalyzed production of 1-glyceryl benzoate in compressed n-butane. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, pp. 513-519, 2010.
- CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*. v. 21, pp. 89-93, 2003.
- DALLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n.4, 623-630, 2004.
- DESHMANE, V.G.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from palm fatty acid distillate. *Ind Eng Chem Res*. 48(17): 7923–7, 2009.
- DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, pp. 125-129, 2004.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRIGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol. *Energy and Fuels*, v. 16, pp. 443-450, 2002.

FEIHRMANN, A.F. Avaliação da atividade enzimática de lipase imobilizadas em fluidos pressurizadas. Dissertação de Mestrado. Universidade Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2005.

FUKUDA H.; KONDO, A; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, pp. 405-416, 2001.

FREITAS, L. Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel. Mestrado em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – Lorena SP, 2006.

GRANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, v.17, p.1-15, 2005.

HANH, H. D.; DONGB, N.; OKITSUA, K.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition. *Renewable Energy*, v. 34, pp. 780-783, 2009.

LIN, G.; LIU, H. Ultrasound promoted lipase catalyzed reactions. *Tetrahedron Lett* 36(34):6067–8, 1995.

LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.15, p. 402-407, 2008.

LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *JAOCS*, v.79, 191-195, 2002.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 70, pp. 1-15, 1999.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Reviews*, 3, Intercept Ltd., 1985.

MAIA, D.J.; DEPAOLI, M.A.; ALVES, O.L. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. *Química Nova*, v. 23, p. 204-215, 2000.

MAMURO, I.A.; CHENB, B.; EGUCHI, M. KUDO, T.; SUREKHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, pp. 53-58, 2001.

MAHAMUNI, N.N.; ADEWUYI, Y.G. Optimization of the synthesis of biodiesel via ultrasound-enhanced base-catalyzed transesterification of soybean oil using a multifrequency ultrasonic reactor. *Energy Fuels* 2009;23:2757–66.

MARTINES, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JÚNIOR, M.J. O efeito do ultra-som em reações químicas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MASON, T.J. Developments in ultrasound – non-medical. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 93, p. 166-175, 2007.

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

ÖZBEK, B.; Ö ÜLGEN, K. The stability of enzymes after sonication Original Research Article *Process Biochemistry*, v. 35, pp. 1037-1043, 2000.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, v.38, 373–382, 2006.

RASO, J.; MANAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 5, p. 157-162, 1999.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M. e POLING, B. E. *The Properties of Gases and Liquids*. McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 1987.

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

SANTOS, F.F.P.; MALVEIRA, J. Q.; CRUZ, M.G.A.; FERNANDES, F.A.N. Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil. *Fuel* v. 89, pp. 275–279, 2010.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.9, p.199-210, 1998.

SHAH, S.; GUPTA, M.N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochem* 2007;42:409–14.

SHISHIR, M.; HINGU PARAG, R.; VIRENDRA, G.; RATHOD, K. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors, *Ultrasonics Sonochemistry* v.17, 827–832, 2010.

SINISTERRA, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, v. 30, p. 180-184, 1992.

STANDARD UNE-EN 14103. Fat and oil derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid, 2001.

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*, v. 45, pp. 519–525, 2010.