

Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel

Alexander Dimitrov Kroumov*, Aparecido Nivaldo Módenes e Bruno München Wenzel

Núcleo de Biotecnologia e Desenvolvimento de Processos Químicos, Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Jardim La Salle, Toledo, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: adkroumov@unioeste.br

RESUMO. Atualmente, a tecnologia de produção enzimática do biodiesel é mais uma alternativa em relação aos métodos químicos que utilizam catalisadores ácidos ou básicos. A enzima lipase utilizada como catalisador desse processo pode ser obtida de microrganismos como *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia*, *Candida antarctica*, dentre outros. Neste trabalho, propomos um mecanismo da transesterificação de triglicerídeos catalisada por enzima lipase. O processo foi formalizado em três reações consecutivas, nas quais são formados os diglicerídeos e monoglicerídeos. Outras três etapas intermediárias das reações envolvendo a lipase foram consideradas. A identificação dos parâmetros do modelo desenvolvido foi feita para condições reacionais em que a alimentação é feita na proporção estequiométrica dos reagentes. O modelo desenvolvido foi testado com dados experimentais em diversas condições operacionais encontradas na literatura. Os resultados das simulações mostram boa flexibilidade do modelo, ajustando os dados em várias condições de transesterificação enzimática para produção de biodiesel.

Palavras-chave: transesterificação, biodiesel, cinética enzimática, modelagem.

ABSTRACT. Development of the enzymatic kinetics model of vegetable oils transesterification for biodiesel production. Currently the technology of enzymatic production of biodiesel is more promising than that based on chemical methods, using acidic or basic catalysts. The enzyme lipase used as catalyst in this process can be isolated from microorganisms such as *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia*, *Candida antarctica* among others. In this work, a mechanism for the transesterification of triglycerides catalyzed by lipase for production of biodiesel is proposed. The process was modeled in three consecutive reactions where diglycerides and monoglycerides were formed. Other three intermediate stages involving lipase were considered. The identification of parameters with the developed model was performed for reaction conditions where stoichiometric amount of reagents were used. The developed model was tested for different operational conditions with experimental data found in the literature. The simulation results showed good model flexibility.

Key words: transesterification, biodiesel, enzymatic kinetics, modeling.

Introdução

A importância do estudo e desenvolvimento da tecnologia de produção do biodiesel (ésteres dos ácidos graxos) é resolver problemas energéticos, pois este pode substituir eficientemente o diesel proveniente do petróleo. Para o Brasil, o biodiesel é uma ótima alternativa visto que sua produção tem como base a transesterificação de óleos vegetais, e o país é um grande produtor de oleaginosas. O biodiesel tem recebido atenção especial por ser um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Os benefícios ambientais decorrentes de seu uso incluem também uma emissão mais baixa de material particulado e gases do efeito estufa como CO, CO₂ e SO_x (Pizarro e Park, 2003).

A utilização do biodiesel é limitada pelo alto preço do produto final, e isto se deve principalmente ao custo dos óleos vegetais (Srivastava e Prasad, 2000 e Barnwal e Sharma, 2005). Uma alternativa é a utilização de substratos mais baratos, como gorduras animais e óleos usados de restaurantes e lanchonetes. Porém esses substratos requerem pré-tratamento quando usados nos processos convencionais de produção de biodiesel que utilizam catalisadores ácidos ou básicos, pois o teor de água e ácidos graxos livres comprometem a reação e a recuperação do catalisador e do subproduto glicerol (Pizarro e Park, 2003 e Barnwal e Sharma, 2005).

Uma das tendências promissoras nessa área é aquela que utiliza de enzima lipase (Acylglycerol

acylhydrolases, EC 3.1.1.3) como catalisador da reação de transesterificação. Com o uso de lipase, a síntese do biodiesel transcorre normalmente, mesmo na presença de solventes orgânicos (Iso *et al.*, 2001; Soumanou e Bornscheuer, 2003 e Lara e Park, 2004), substratos contendo água (Kaieda *et al.*, 1999; Iso *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2002; Pizarro e Park, 2003 e Negishi *et al.*, 2003) e ácidos graxos livres, como é o caso dos óleos usados (Shimada *et al.*, 2002 e Lara e Park, 2004). A presença de ácidos graxos livres evidencia a reação de esterificação, que também está sendo muito pesquisada (Chulalaksanukul *et al.*, 1990; Tweddell *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001 e Irimescu *et al.*, 2004).

Há um número considerável de enzimas lipase capazes de atuar na reação de transesterificação. Vários estudos acerca do assunto estão desvendando lipases propícias a cada substrato e condições reacionais. Segundo os experimentos de Iso *et al.* (2001), lipase *Pseudomonas fluorescens* imobilizada exibe elevada atividade na reação de propanol com triglicerídeos compostos de três partes do ácido oleico (trioleína). O óleo de girassol, de acordo com Srivastava e Prasad (2000), contém cerca de 79% desse ácido, por isso exibe conversões semelhantes (Iso *et al.*, 2001). Os experimentos de Shimada *et al.* (2002) indicam que a metanólise catalisada por lipase *Candida antarctica* apresenta altas conversões quando da utilização de óleos usados. Samukawa *et al.* (2000) obtiveram êxito na aplicação de pré-tratamentos da lipase *Candida antarctica* imobilizada para metanólise do óleo de soja. Vários outros trabalhos abordam a aplicação de determinadas lipases a vários substratos, como óleo de girassol, óleo de algodão, óleo de canola, mistura de óleos vegetais, entre outros. Todos os estudos do processo de transesterificação de óleos vegetais utilizando como catalisador enzima lipase apontam alta seletividade e conversões de triglicerídeos e ácidos graxos livres (AGL) à biodiesel. A utilização de óleos usados, que contêm elevadas porcentagens de AGL, não atrapalha o processo de produção de biodiesel utilizando catalise enzimática. Finalizando a análise desse processo, podemos identificar duas direções científicas fundamentais: minimização do custo da enzima, que refletirá no custo final do produto, e modelagem do processo de produção para desenvolver essa tecnologia de modo competitivo no mercado de combustíveis renováveis.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento

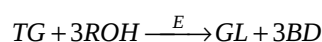
de um modelo da cinética enzimática de produção de biodiesel como base para estudos de otimização do processo. Utilizando modelagem, muitas situações experimentais podem ser simuladas e apenas os resultados finais são testados com experimentos reais.

O desenvolvimento do modelo da cinética da reação de transesterificação catalisada por enzima lipase (E) tem por base um mecanismo simples de transesterificação, no qual triglicerídeos (TG), diglicerídeo (DG) e monoglicerídeo (MG) estão envolvidos na formação de glicerol (GL) e biodiesel (BD). As condições operacionais a que será submetido o modelo são baseadas em quantidades estequiométricas entre o álcool (ROH) e TG para minimizar o efeito de inibição da atividade enzimática pelo álcool.

Material e métodos

Desenvolvimento do modelo

A estequiometria do processo de transesterificação pode ser representada da seguinte forma:

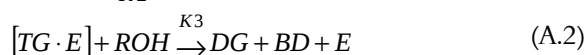
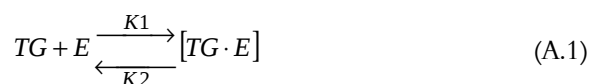


As três reações consecutivas do processo são:

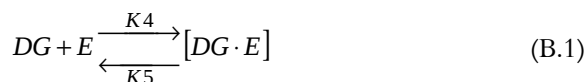


Entretanto, as reações (A), (B) e (C) não são suficientes para descrever o comportamento da reação catalisada por enzima lipase. Portanto, outras reações intermediárias elementares foram consideradas.

A reação (A) tem como reações intermediárias as reações (A.1) e (A.2) apresentadas a seguir.

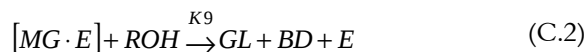
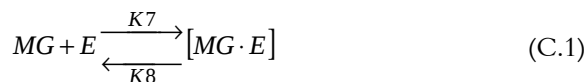


A reação (B) tem como intermediárias as reações (B.1) e (B.2).





Para a reação (C) tem-se:



No desenvolvimento do modelo, foram consideradas as seguintes hipóteses:

$$\eta_{[TG \cdot E]}(t) = \eta_{[DG \cdot E]}(t) = \eta_{[MG \cdot E]}(t) = 0 \quad (01)$$

$$C_E^t = C_E(t) + C_{[TG \cdot E]}(t) + C_{[DG \cdot E]}(t) + C_{[MG \cdot E]}(t) \quad (02)$$

As simplificações do modelo estão apresentadas pelas equações (03) a (08).

$$V \max_A(t) = K3.C_{ROH}(t).C_E^t \quad (03)$$

$$V \max_B(t) = K6.C_{ROH}(t).C_E^t \quad (04)$$

$$V \max_C(t) = K3.C_{ROH}(t).C_E^t \quad (05)$$

$$Km_A(t) = (K2 + K3.C_{ROH}(t))/K1 \quad (06)$$

$$Km_B(t) = (K5 + K6.C_{ROH}(t))/K4 \quad (07)$$

$$Km_C(t) = (K8 + K9.C_{ROH}(t))/K7 \quad (08)$$

Considerando as hipóteses, equações (01) e (02) e as simplificações, equações (03) a (08), obtemos as equações (09), (10) e (11), que representam as concentrações dos complexos enzima-substrato em função do tempo.

$$C_{[TG \cdot E]}(t) = Km_C(t).Km_B(t).C_E^t.C_{TG}(t)/[Km_A(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{TG}(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{DG}(t).Km_A(t).Km_C(t) + C_{MG}(t).Km_A(t).Km_B(t)] \quad (09)$$

$$C_{[DG \cdot E]}(t) = Km_C(t).Km_A(t).C_E^t.C_{DG}(t)/[Km_A(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{TG}(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{DG}(t).Km_A(t).Km_C(t) + C_{MG}(t).Km_A(t).Km_B(t)] \quad (10)$$

$$C_{[MG \cdot E]}(t) = Km_B(t).Km_A(t).C_E^t.C_{MG}(t)/[Km_A(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{TG}(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{DG}(t).Km_A(t).Km_C(t) + C_{MG}(t).Km_A(t).Km_B(t)] \quad (11)$$

Após as simplificações, e conhecendo-se as concentrações dos complexos, as taxas de reação de TG na reação (A), DG na reação (B) e MG na reação

(C), podem ser descritas pelas equações (12), (13) e (14) respectivamente.

$$r_{TG,A}(t) = -Km_B(t).Km_C(t).V \max_A(t).C_{TG}(t)/[Km_A(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{TG}(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{DG}(t).Km_A(t).Km_C(t) + C_{MG}(t).Km_A(t).Km_B(t)] \quad (12)$$

$$r_{DG,B}(t) = -Km_A(t).Km_C(t).V \max_B(t).C_{DG}(t)/[Km_A(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{TG}(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{DG}(t).Km_A(t).Km_C(t) + C_{MG}(t).Km_A(t).Km_B(t)] \quad (13)$$

$$r_{MG,C}(t) = -Km_A(t).Km_B(t).V \max_C(t).C_{MG}(t)/[Km_A(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{TG}(t).Km_B(t).Km_C(t) + C_{DG}(t).Km_A(t).Km_C(t) + C_{MG}(t).Km_A(t).Km_B(t)] \quad (14)$$

Aplicando o balanço molar para cada espécie e considerando a produtividade com base na estequiometria, obtemos o modelo da cinética enzimática para as diversas espécies envolvidas no mecanismo de produção de biodiesel, conforme as equações (15) a (20).

$$\frac{d}{dt}(C_{TG}(t)) = r_{TG,A}(t) \quad (15)$$

$$\frac{d}{dt}(C_{DG}(t)) = r_{DG,B}(t) - r_{TG,A}(t) \quad (16)$$

$$\frac{d}{dt}(C_{MG}(t)) = r_{MG,C}(t) - r_{DG,B}(t) \quad (17)$$

$$\frac{d}{dt}(C_{ROH}(t)) = r_{TG,A}(t) + r_{DG,B}(t) + r_{MG,C}(t) \quad (18)$$

$$\frac{d}{dt}(C_{GL}(t)) = -r_{MG,C}(t) \quad (19)$$

$$\frac{d}{dt}(C_{BD}(t)) = -r_{TG,A}(t) - r_{DG,B}(t) - r_{MG,C}(t) \quad (20)$$

Resultados e discussão

As simulações foram feitas no software Maple e todos os dados experimentais utilizados foram extraídos do trabalho de Iso *et al.* (2001). Nestes experimentos, foram utilizadas 30 g de trioleína (TG), álcool (ROH) a uma razão molar 1:3 (TG:ROH) e 0,1 g de enzima lipase imobilizada ou “livre”.

Consideramos que o substrato inicial contenha apenas trioleína, ou seja:

$$C_{DG}(0) = C_{MG}(0) = C_{GL}(0) = 0 \quad (23)$$

Assim, as condições iniciais para os diversos casos em que o modelo foi aplicado são apresentados na Tabela 1.

Em todas as figuras dispostas neste trabalho, temos: (a) dinâmica da concentração das espécies

envolvidas; (b) conversão de TG a BD, em que a curva representa a simulação do modelo proposto e os pontos dos dados experimentais.

Tabela 1. Condições iniciais para os casos em que são utilizados metanol, propanol e butanol.

Álcool	$C_{TG}(0)$ (mol kg ⁻¹)	C_E^t (g _E kg ⁻¹)	$C_{ROH}(0)$ (mol kg ⁻¹)
Metanol	1,019	3,007	3,056
Propanol	0,938	2,769	2,815
Butanol	0,903	2,664	2,708

Os parâmetros do modelo foram estimados pela técnica dos mínimos quadrados (equação 21) usando o método de Levenberg-Marquardt com BFGS (Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno) atualizando a matriz Hessiana; e uma tolerância relativa do erro de 10^{-4} para as variáveis e para a função objetivo.

$$R = \sum_{k=1}^n \left[\frac{X_{\text{exp}}(t) - X(t)}{\max(X_{\text{exp}})} \right]^2 \quad (21)$$

Onde:

$$X(t) = 100 \left[\frac{C_{BD}(t) - C_{BD}(t=0)}{3C_{TG}(t=0)} \right] \quad (22)$$

O sistema de equações diferenciais ordinárias foi integrado pelo método BDF (Brenan *et al.*, 1989), com tolerância relativa do erro 10^{-4} e erro absoluto de tolerância 10^{-6} .

A validação do modelo foi verificada para diversas condições operacionais do processo enzimático de transesterificação da trioleína. As simulações apresentadas nas Figuras 1 a 8 mostram a resposta do sistema para condições específicas de temperatura, estado da enzima lipase (imobilizada ou livre), concentração de lipase e razão molar TG:ROH.

A Figura 1 apresenta um processo no qual o metanol é usado como substrato. Este não apresenta uma dissolução satisfatória com trioleína (TG) e torna-se necessária a utilização de solvente (1,4 dioxano). Como resultado, a conversão de TG a BD é relativamente baixa, 70,23% em 80 horas, conforme apresentamos na Figura 1b. Soumanou e Bornscheuer (2003) compararam a atividade da lipase imobilizada na reação de metanólise em vários solventes orgânicos e concluíram que em solventes apolares obtêm-se maiores conversões. Para termos maior conversão, necessitamos de uma dissolução eficiente do metanol no sistema reacional; isto torna-se possível com alimentação (estequiométrica) em duas ou três etapas, como procederam

Samukawa *et al.* (2000), Shimada *et al.* (2002) e Du *et al.* (2004). Shimada *et al.* (2002) determinaram que em razões molares maiores que 1,5/1 (metanol/óleo vegetal) sem a presença de solventes a homogeneização do sistema reacional fica comprometida, juntamente com a conversão. Todavia, Köse *et al.* (2002) indicam máximas conversões em razões molares 4/1 (metanol/óleo de algodão), evidenciando inibição desprezível da lipase *C. antarctica* imobilizada nestas condições.

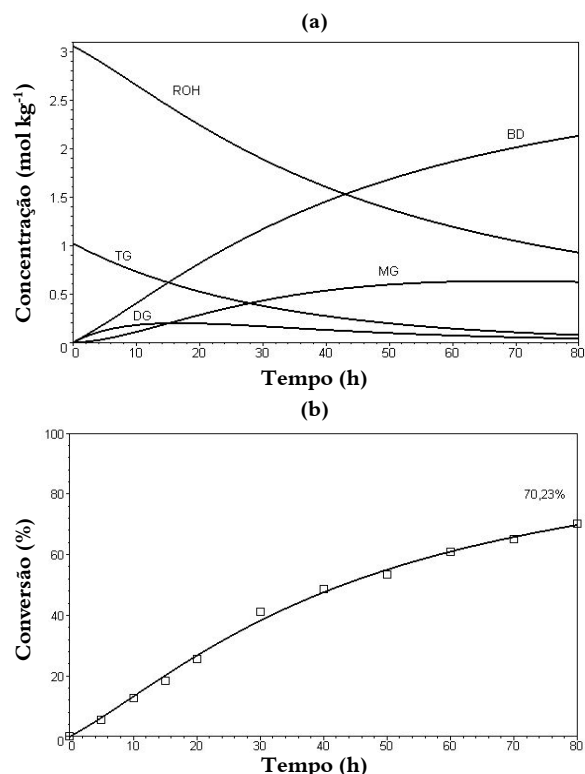


Figura 1. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando metanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; solvente 1,4 dioxano à 90%, temperatura de 50°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

No processo utilizando propanol (não requer o uso de solvente), enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens* e temperatura de 50°C, podemos observar na Figura 2b conversão de 99% em, aproximadamente, 7 horas.

Utilizando butanol como substrato, observamos uma diminuição da taxa de reação em relação ao caso apresentado na Figura 2 para alcançar conversão de 98,31% em 25 horas, conforme a Figura 3.

Com a utilização de enzima lipase obtida de *Pseudomonas cepacia* e demais condições idênticas às apresentadas no caso da Figura 2, observamos uma diminuição brusca da conversão (aproximadamente 32 % em 25 horas). Isto é o que indica a Figura 4.

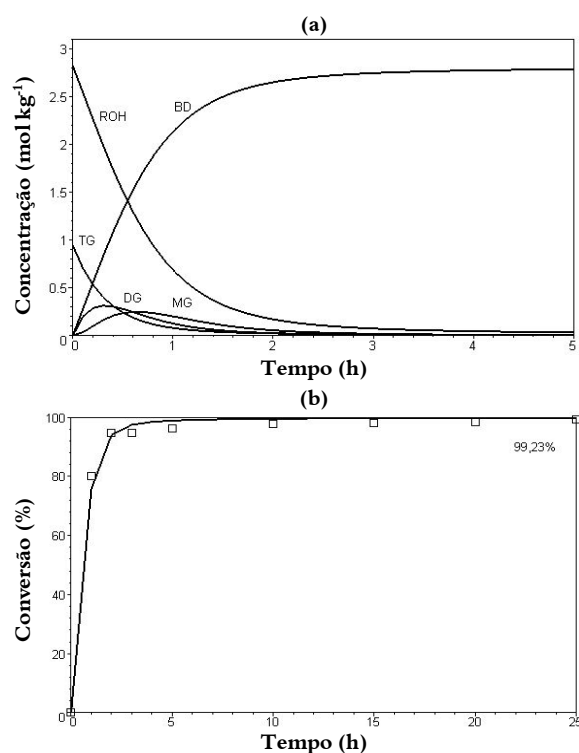


Figura 2. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando propanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 50°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

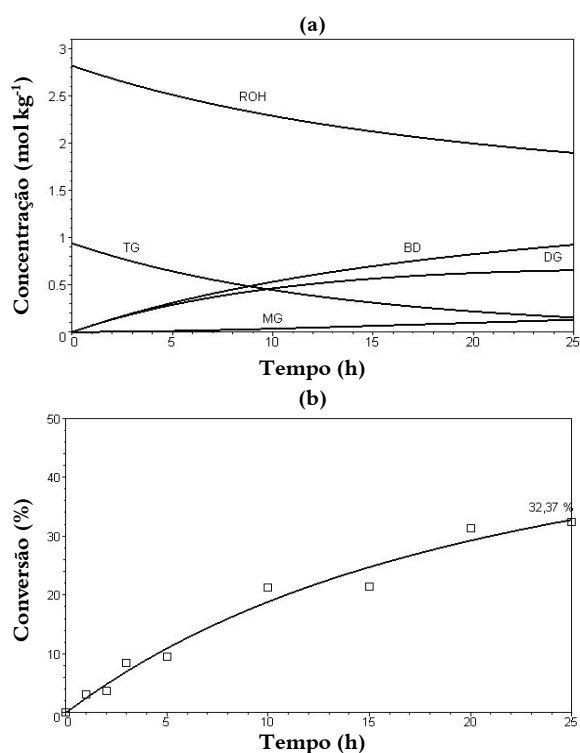


Figura 4. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando propanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 50°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas cepacia*.

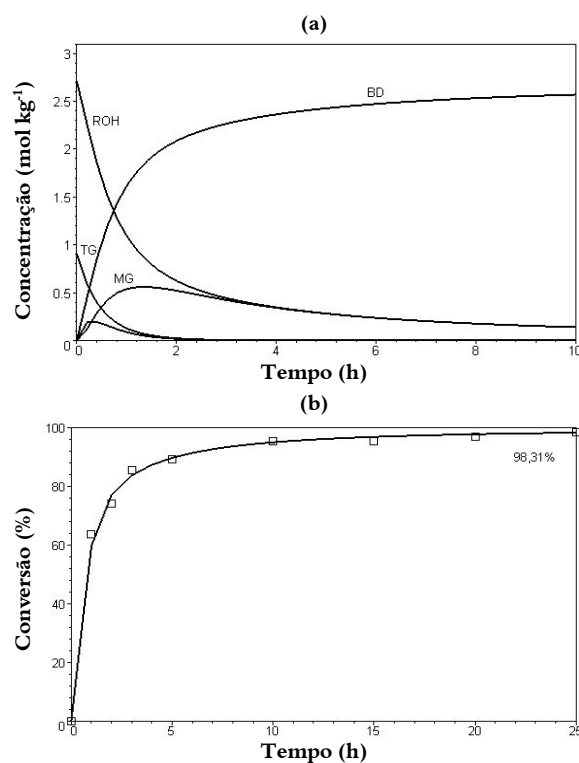


Figura 3. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando butanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 50°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

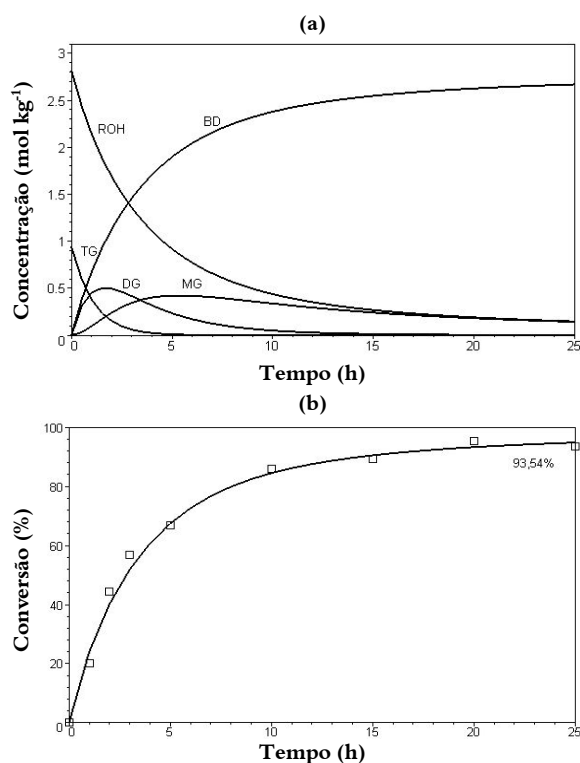


Figura 5. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando propanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 50°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

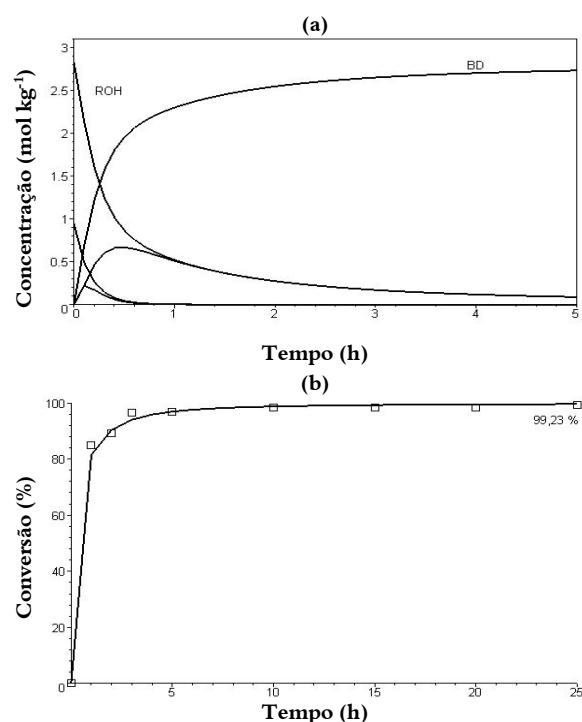


Figura 6. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando propanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 60°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

Poderemos notar um fenômeno interessante visualizando as Figuras 2 e 5, que comparam o processo no qual utiliza-se a enzima lipase no seu estado livre e imobilizado. Para o mesmo substrato (propanol) e as mesmas condições, a conversão de TG à BD diminui 4,5 pontos percentuais e o tempo de reação aumenta em 18 horas.

Utilizando-se temperatura de 60°C e as demais condições utilizadas no caso apresentado na Figura 2, observamos na Figura 6b que a conversão é praticamente idêntica: em 7 horas de reação temos aproximadamente 98%.

As Figuras 7 e 8 apresentam a influência da temperatura como um parâmetro crucial do processo e a diminuição da atividade enzimática quando ela varia em aproximadamente 10°C da temperatura ótima, que está entre 50 e 60°C.

Na Tabela 2, indicamos a estimativa dos valores das constantes cinéticas que minimizam a diferença entre o modelo desenvolvido e os dados experimentais para condições reacionais diferentes e enzima lipase (livre ou imobilizada). Para todos os casos apresentados, da Figura 1 a 8, a resposta do modelo ajusta bem o perfil de conversão de triglicerídeos à biodiesel. Esse fato não nos garante que as constantes cinéticas estão rigorosamente corretas, pois para isto deveríamos obter perfis experimentais de concentração por tempo para todas espécies presentes, em várias temperaturas e

condições operacionais.

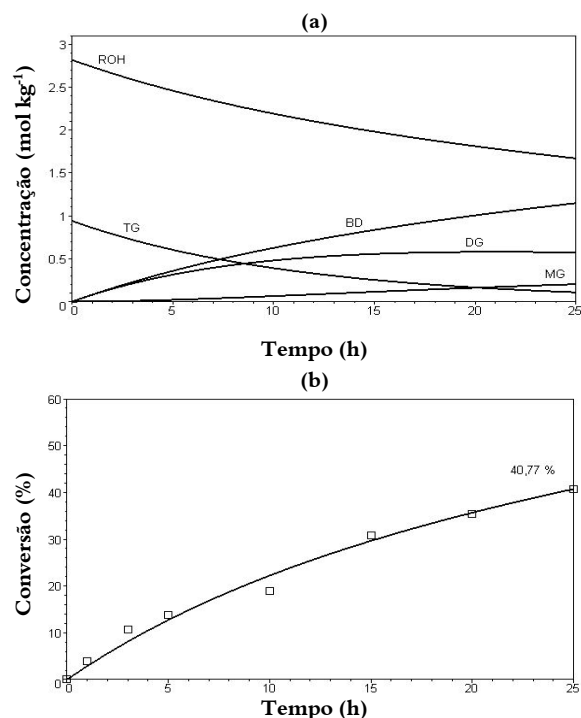


Figura 7. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando propanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 70°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

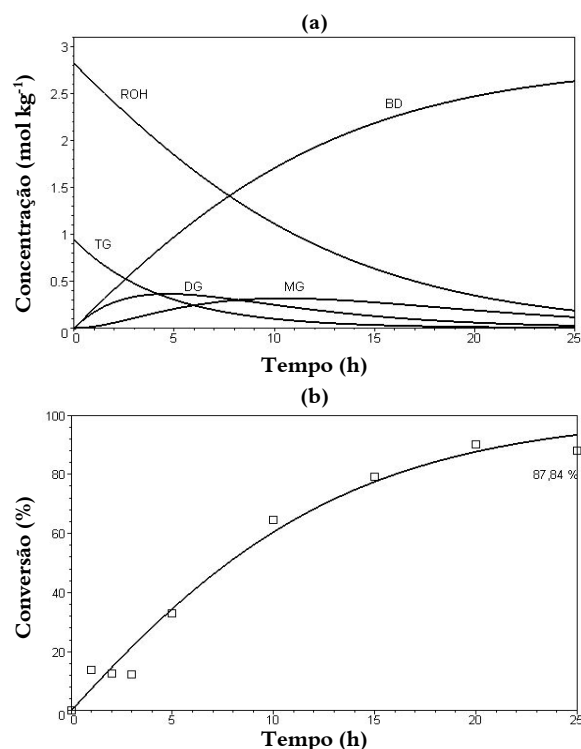


Figura 8. Transesterificação da trioleína (TG) utilizando propanol (ROH) a uma razão molar 3:1 de ROH:TG; temperatura de 40°C e enzima lipase imobilizada obtida de *Pseudomonas fluorescens*.

Tabela 2. Constantes cinéticas ajustadas aos respectivos casos de cada Figura. K1, K3, K4, K6, K7 e K9 expressas em $[\text{kg g}_E^{-1} \text{h}^{-1}]$ e K2, K5 e K8 em $[\text{mol g}_E^{-1} \text{h}^{-1}]$.

	Figura 1	Figura 2	Figura 3	Figura 4	Figura 5	Figura 6	Figura 7	Figura 8
K1	0.0129	1.3902	0.9121	0.0330	0.4152	3.9105	0.0378	0.0877
K2	0.0073	2.2748	0.5067	0.0015	0.0903	0.6861	0.0228	0.0542
K3	0.0439	3.7913	3.3781	0.0650	0.5958	2.5384	0.1190	0.6340
K4	0.0379	1.4091	2.2521	0.0131	0.1805	8.2326	0.0131	0.0758
K5	0.0200	1.5797	2.2521	0.0279	0.1805	0.6861	0.0357	0.0542
K6	0.1317	11.374	9.7965	0.0088	0.6499	4.1163	0.0422	3.8997
K7	0.0029	1.2638	0.3378	0.0069	0.1805	0.6174	0.0127	0.0555
K8	0.0020	0.6319	0.6351	0.0109	1.3992	0.5488	0.0307	0.0016
K9	0.0918	7.5827	0.6756	0.0012	0.9749	1.2349	0.0586	1.6284
R	0.0035	0.0043	0.0030	0.0256	0.0075	0.0021	0.0130	0.0230

Conclusão

Desenvolvemos um modelo da cinética enzimática de transesterificação de óleos vegetais aplicando o mecanismo das reações simples, três estágios e três sub-estágios que incluem a transformação de triglicerídeo a diglicerídeo, diglicerídeo a monoglicerídeo e monoglicerídeo a glicerol, e formação de biodiesel para cada uma delas. O resultado das simulações com o modelo desenvolvido mostra a dinâmica das concentrações para diferentes conversões à biodiesel e condições operacionais. A validação do modelo e identificação dos parâmetros foram obtidas utilizando dados experimentais em várias condições operacionais (temperatura, álcool e enzima). Analisando os resultados das simulações com o modelo desenvolvido, acreditamos que este pode ser aplicado no planejamento de experimentos para verificação das hipóteses propostas e otimização do processo de transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel.

Nomenclatura

TG	Triglicerídeo
DG	Diglicerídeo
MG	Monoglicerídeo
BD	Biodiesel
GL	Glicerol
ROH	Álcool
E	Enzima lipase
TG·E	Complexo enzima-triglicerídeo
DG·E	Complexo enzima-diglicerídeo
MG·E	Complexo enzima-monoglicerídeo
A	Respectivo à reação A
B	Respectivo à reação B
C	Respectivo à reação C
$r_{i,j}$	Taxa de reação de i na reação j ($\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)
K1,K3	
K4,K6,	Constantes da velocidade das reações no sentido direto
K7,K9	($\text{kg g}_E^{-1} \text{h}^{-1}$)
K2,K5,	Constantes da velocidade das reações no sentido reverso
K8	($\text{mol g}_E^{-1} \text{h}^{-1}$)
C_i	Concentração de i (mol kg^{-1})
C_E	Concentração de enzima ativa ($\text{g}_E \text{kg}^{-1}$)
C_E^t	Concentração total de enzima ($\text{g}_E \text{kg}^{-1}$)

$V_{\max j}$	Velocidade específica máxima da reação j, definida pelas equações de 3 a 5 ($\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Km_j	Variável definida pelas equações de 6 a 8 (mol kg^{-1})
R	Função objetivo dos mínimos quadrados (adimensional)
X	Conversão de TG à BD prevista pelo modelo, definida pela equação 22 (%)
X_{exp}	Conversão de TG à BD experimental (%)
t	Tempo (h)

Referências

- BARNWAL, B.K.; SHARMA, M.P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renew. Sustain. Energ. Rev.*, Colorado, v. 9, p. 363-378, 2005.
- BRENAN, K. *et al.* Numerical solution of initial-value problems in differential algebraic equations. New York: Elsevier, 1989.
- CHULALAKSANANUKUL, W. *et al.* Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Letters*, Heidelberg, v. 276, n. 1-2, p. 181-184, 1990.
- DU, W. *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, Amsterdam, v. 30, p. 125-129, 2004.
- IRIMESCU, R. *et al.* Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, Amsterdam, v. 27, p. 69-73, 2004.
- ISO, M. *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, Amsterdam, v. 16, p. 53-58, 2001.
- KAIEDA, M. *et al.* Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by *Rhizopus oryzae* Lipase in a Water-Containing System without an Organic Solvent. *J. Biosc. Bioeng.*, Osaka, v. 88, n. 6, p. 627-631, 1999.
- KÖSE, Ö. *et al.* Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Biores. Technol.*, Fayetteville, v. 83, p. 125-129, 2002.
- LARA, P.V.; PARK, E.Y. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 34, p. 270-277, 2004.
- NEGISHI, S. *et al.* Activation of powdered lipase by cluster water and the use of lipase powders for commercial esterification of food oils. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 32, p. 66-70, 2003.
- PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochem.*, Orlando, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
- SAMUKAWA, T. *et al.* Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J. Biosc. Bioeng.*, Osaka, v. 90, n. 2, p. 180-183, 2000.
- SHIMADA, Y. *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, Amsterdam, v. 17, p. 133-142, 2002.

SOUMANOU, M.; BORNSCHEUER, U.T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 33, p. 97-103, 2003.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew. Sustain. Energ. Rev.*, Colorado, v. 4, p. 111-133, 2000.

TWEDDELL, R.J. et al. Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 22, p. 439-445, 1998.

ZHOU, G. et al. Kinetic studies of lipase-catalyzed esterification in water-in-oil microemulsions and the catalytic behavior of immobilized lipase in MBGs. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, Amsterdam, v. 194, p. 41-47, 2001.

Received on March 03, 2005.

Accepted on February 09, 2007.