

# PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS UTILIZANDO LÍPASE OBTIDA DE *Burkholderia cepacia* – UMA ANÁLISE UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS

ETHYL ESTERS PRODUCTION USING LIPASE OBTAINED FROM *Burkholderia cepacia* - AN ANALYSIS USING EXPERIMENTAL PLANNING AND ANSWERS SURFACES

JOÃO HENRIQUE DANTAS<sup>1\*</sup>, MATHEUS LOPES HARTH<sup>2</sup>, ELISSA FERRARI SOSTER<sup>2</sup>, PATRÍCIA TENALIA MARCHINI<sup>2</sup>, RICARDO ALEXANDRE QUINZIN CARMINATTI<sup>2</sup>, FLAVIO FARIA DE MORAES<sup>3</sup> GISELLA MARIA ZANIN<sup>4</sup>

1. Engenheiro Químico, Doutor em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Maringá e docente da UNINGÁ - Centro Universitário Ingá; 2. Engenheiro químico pela Universidade Estadual de Maringá; 3. Engenheira Química, Doutor em Engenharia Química pela University of Cambridge e docente do doutorado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá; 4. Engenheira Química, Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade de Campinas e docente do doutorado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá.

\*Rua José Bertão, nº 205, Bloco 09 Ap. 303, Marialva, Paraná, 86990-000. [ikedantas@yahoo.com.br](mailto:ikedantas@yahoo.com.br)

Recebido em 21/06/2016. Aceito para publicação em 11/08/2016

## RESUMO

A produção de ésteres etílicos do óleo de canola pela lipase de *Burkholderia cepacia* foi investigada por meio de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> em que a temperatura (30 – 60 °C), quantidade de enzima (5 – 10 %) e razão molar álcool:óleo (6:1 – 12:1) foram os efeitos e o rendimento em éster a variável de resposta. A tabela de análise de variância indicou que para um intervalo de confiança de 90% a temperatura (p-valor de 0,064), razão molar (p-valor de 0,089), quantidade de enzima (p-valor de 0,013) e a interação dos efeitos entre temperatura e quantidade de enzima (p-valor de 0,030) apresentaram significância. A análise da estimativa dos efeitos padronizados da variável temperatura (+2,37) indicaram que a utilização da temperatura mais alta, assim como altas quantidades de enzima (+3,75) provocaram um efeito de aumento no rendimento. O aumento na razão óleo:álcool (-2,36) provocou a redução na produção de éster. Altas concentrações de enzima no meio reacional podem provocar a formação de aglomerados enzimáticos que diminuem a atividade catalítica devido à dificuldade do substrato em atingir o sítio catalítico, no entanto, nesse trabalho o rendimento de éster apresentou aumento quando altas quantidades enzimáticas foram utilizadas. Os resultados indicam que a formação desse aglomerado enzimático provocou um efeito protetor do sítio catalítico da enzima contra efeitos deletérios causados pelo álcool e alta temperatura utilizada nos ensaios.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ésteres etílicos, enzima, planejamento fatorial, óleo de canola.

## ABSTRACT

Ethyl esters of Canola oil was made by lipase from *Burkholderia cepacia*. The production process was investigated using a 2<sup>3</sup> factorial design in which the temperature (30 - 60 °C), amount of enzyme (5 - 10 %) and the molar ratio ethanol : oil (6:1 to 12:1) were the effects and ester yield the response variable. The analysis of variance table indicated that for a 90% of interval confidence temperature (p = 0.064 ) molar ratio (p = 0.089) , amount of enzyme (p = 0.013 ) and the interaction of effects temperature and amount of enzyme (p value = 0.030) were significant . The analysis of the estimated standard effects of temperature variable was (+2.37) indicated that the use of higher temperature as well as high amounts of enzyme (+3.75) caused increasing in ester yield. The increase in the molar ratio alcohol:oil (-2.36) caused a reduction in the ester production. High enzyme concentrations in the reaction medium can cause the formation of agglomerates that reduce the enzymatic catalytic activity due to the difficulty of the substrate reaches the catalytic site. However, in this study, the yield of ester increased when high amounts enzyme was used. This results suggested that the formation of this enzyme cluster caused a protective effect of the enzyme catalytic's site against deleterious effects caused by alcohol and high temperature used in the tests.

**KEYWORDS:** Ethyl ester, enzyme, factorial design, canola oil, response surface

## 1. INTRODUÇÃO

A transesterificação de óleos vegetais, nas últimas décadas, vem se destacando como uma reação importante para a produção de alquil ésteres de ácido graxos.

Os alquil ésteres são valiosos intermediários para a indústria de óleo química<sup>1</sup>. Em especial, os metil ou etil ésteres são potenciais substitutos aos combustíveis de origem fósseis, como o diesel.

A reação de transesterificação geralmente é conduzida a altas temperaturas e com razões molares de álcool em relação ao óleo, elevadas, na presença de catalisadores geralmente inorgânicos e homogêneos<sup>1</sup>. Essa configuração reacional não permite a fácil separação do glicerol e do catalisador, o que exige etapas de lavagem posterior ao processo, gerando resíduos aquosos tóxicos e subprodutos de baixa qualidade.

A reação de transesterificação pode ser realizada por rota química, supercrítica, tecnologia de membranas e dentre outras, a enzimática<sup>2,3</sup>. Na rota enzimática o grau de especificidade da reação para o substrato e formação de produto é normalmente alto e ainda, têm-se as vantagens de utilizar condições reacionais mais brandas, menor gasto energético, facilidade de recuperação do glicerol, facilidade de purificação dos ésteres obtidos, evita a formação de sabões e propicia uma química mais verde<sup>4</sup>. No entanto os maiores desafios dos processos catalisados por enzimas são o alto custo e a instabilidade das enzimas aos meios reacionais a que elas são submetidas<sup>5</sup>.

As lípases têm mostrado serem catalisadores enzimáticos promissores para conduzir várias reações como a esterificação, hidrólise, transesterificação e dentre outras, a síntese orgânica em ambientes reacionais restritos de água<sup>6</sup>. A Lípase de *Burkholderia cepacia* é importante pode ser uma enzima extracelular e vem progressivamente sendo utilizada em reações de biotransformação em meios aquosos ou não. A alta potencialidade de aplicação das lípases de *Burkholderia cepacia* na produção de ésteres vem sendo amplamente estudada<sup>7,8</sup>.

Os meios reacionais de produção de ésteres utilizando lípases são conduzidos utilizando cossolventes como o t-butanol, n-hexano e dentre outro o n-heptano<sup>9</sup>. Os cossolvente, no meio reacional enzimático, tem a função de evitar a inibição das enzimas pelo substrato, entretanto torna o meio reacional mais tóxico, oneroso e menos eficiente<sup>10,11</sup>. Então o estudo de meios reacionais livre de cossolvente é uma oportunidade de encontrar uma configuração interessante para aplicação industrial de produção de ésteres. No entanto os meios livres de cossolvente são instáveis. A manipulação adequada das variáveis de processo como a temperatura, razão molar e quantidade de enzima, dentre outras variáveis pode ser uma oportunidade de tornar o sistema mais eficiente e promissor.

O excesso de álcool é empregado para assegurar uma alta conversão e minimizar os efeitos de restrições difusionais. Entretanto, na síntese enzimática, níveis excessivos de álcool podem inibir a enzima e diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação. De acordo com

Salis *et al.* (2005)<sup>12</sup>, uma alta razão álcool: substrato significa uma maior polaridade do meio que pode estar associada à inativação do biocatalisador ou ainda, à possibilidade de desestabilizar a camada de água essencial do sítio catalítico destes biocatalisadores<sup>12,13,14</sup>. Com o intuito de minimizar os efeitos da desativação enzimática pelo excesso de álcool pode-se promover sua adição em etapas distintas no meio reacional<sup>15</sup>.

A temperatura é uma variável importante no estudo de reações enzimáticas. O uso de temperaturas muito baixas permite estabilidade da enzima, mas provoca velocidades reacionais menores e problemas difusionais pela baixa solubilidade do álcool no óleo. Temperaturas superiores podem aumentar a exposição do sítio ativo da enzima que propiciariam reações mais rápidas, no entanto também pode causar inativação da enzima.

O rendimento da reação enzimática pode ser aumentado utilizando tempos reacionais longos ou ainda utilizando altas quantidades de enzima no meio reacional<sup>16</sup>. Mas altas quantidades de enzima podem provocar um efeito microscópico de aglomeração da enzima que provocaria um efeito redutor da atividade enzimática e que pode reduzir o rendimento da reação<sup>17</sup>.

Uma oportunidade de investigar a influência de cada variável, temperatura, razão molar e quantidade de enzima e suas interações sobre a reação de transesterificação enzimática é a utilização de um planejamento fatorial com análise das superfícies de resposta. A superfície de resposta é a junção entre as técnicas estatísticas e matemática com grande aplicação na química e bioquímica com a finalidade de desenvolver processos diminuindo a quantidade de experimento e aumentando a confiabilidade maximizando resultados (Domingos *et al.*, 2008).

No presente trabalho foi estudada a influência das variáveis temperatura, quantidade de enzima e razão molar álcool:óleo e suas interações de segunda e terceira ordem sobre o rendimento de produção de éster do óleo de canola em meios isentos de cossolvente utilizando lípase de *Burkholderia cepacia*. As variáveis foram avaliadas em dois níveis com quatro repetições no ponto central. Os resultados foram descritos em função da análise de variância e superfícies de respostas afim de mostrar quais as variáveis mais importantes e suas influências na produção de ésteres etílicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

A enzima lípase de *Burkholderia cepacia* foi adquiridas da Sigma Co, St. Louis, MO, EUA. O etanol absoluto P.A. empregado foi da marca Cinética, Brasil. O n-hexano, o álcool n-propílico (Mallinckrodt Chemicals) e a acetonitrila (J.T. Baker). O óleo de canola foi comprado em um mercado local com características de

óleo refinado.

## Métodos

**Reação de transesterificação:** Os ensaios para a síntese de ésteres etílicos foram conduzidos em reatores de 50 mL, acoplados a condensadores. Os reatores e condensadores foram mantidos em temperatura e agitação constantes utilizando banhos termostatzados e agitadores magnéticos. A temperatura de reação (40, 50 e 60°C), quantidade de enzima (5; 7,5 e 10%) razão molar óleo:álcool (1:6; 1:9 e 1:12) e tempo de reação (0 - 72 horas) e as retiradas das amostras foram pré-determinados na execução do planejamento experimental.

**Cálculo do rendimento em éster:** O rendimento em éster das amostras foram calculados como descrito pela equação (1), Em que mol de componentes *i* formados é o número de mol de éster formados no meio reacional até o momento da retirada da amostra e mol de componente *i* possíveis de serem formados é a quantidade máxima possível de ser obtida, calculada partindo da quantidade de triacilglicerídeos presente no meio reacional no início do ensaio<sup>18</sup>.

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{mol de componentes } i \text{ formados}}{\text{mol de componente } i \text{ possíveis de serem formados}} \times 100$$

**Análise das Amostras:** Para identificação dos triacilglicerídeos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres em CLAE foi utilizado o método de gradiente combinado linear aquoso-orgânico/não aquoso. Este método consiste na construção de um gradiente ternário com tempo total de 42 minutos. A condição inicial foi de 30 % de A + 70 % de B, 100 % de B em 15 min, 50 % de B + 50 % de C em 24 min, seguida por 12 min de eluição isocrática de 50 % de B e 50 % de C. Nos últimos 6 min foi retomado o gradiente inicial (30 % de A + 70 % de B), para restabelecer as condições iniciais de operação da coluna. A coluna foi operada a 40 °C, com detecção UV-VIS a 210nm, com injeção de 20 µL e vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições consecutivas das misturas de padrões de trioleína, 1,2-dioleína, 1-monooleína e oleato de etila e a quantificação foi realizada somando as áreas relativas das espécies químicas comuns, submetidas à curva de calibração.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

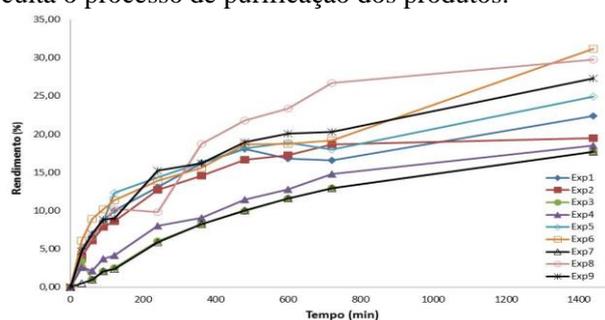
Os resultados de rendimento em éster em função dos experimentos delineados no planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com as condições operacionais estão descritos na Ta-

bela 1. Os maiores rendimentos alcançados para o tempo de 1440 minutos foram obtidos nas condições impostas pelos experimentos 6 e 8, em que, respectivamente os rendimentos foram 31,18 e 29,80%.

**Tabela 1.** Resultados dos rendimentos em éster alcançados em função dos experimentos do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

Experimento	Temperatura (°C)	Razão Molar (álcool:óleo)	Quantidade de Enzima (%)	Rendimento em Éster (%)
Exp1	40	6	5	22,45
Exp2	60	6	5	19,52
Exp3	40	12	5	17,76
Exp4	60	12	5	18,52
Exp5	40	6	10	24,98
Exp6	60	6	10	31,18
Exp7	40	12	10	17,75
Exp8	60	12	10	29,80
Exp9	50	9	7,5	27,29
Exp10	50	9	7,5	25,81
Exp11	50	9	7,5	22,43
Exp12	50	9	7,5	25,18

A transesterificação do óleo de girassol realizada por um fermentado liofilizado contendo lipase obtida da bactéria *Burkholderia cepacia* apresentou rendimentos de 40% em 48 horas e 100% em 96 horas, utilizando heptano como co-solvente<sup>8</sup>. Royon *et al.* (2007)<sup>11</sup> utilizando óleo de algodão e metanol como substrato para a lipase obtida de Candida antártica imobilizada apresentou rendimento de 90% em 10 (1) horas de reação, no entanto t-butanol foi utilizado como co-solvente. Em condições livres de co-solvente a enzima foi totalmente inibida e não ocorreu reação<sup>11</sup>. Esses resultados demonstram a potencialidade de uso da *Burkholderia cepacia*, que apresenta rendimentos interessantes sem a utilização de co-solvente que aumentam o custo do processo produtivo e ainda dificultam o processo de purificação dos produtos.



**Figura 1.** Produção de ésteres de etila pela lipase de *Burkholderia cepacia*.

A Figura 1 mostra o rendimento de produção de éster ao longo da reação. É possível identificar a rápida produção de éster nos primeiros instantes de reação indicando o potencial de produção de ésteres etílicos utilizando lipase de *Burkholderia cepacia*, com exceção dos

experimentos 3, 4 e 7 em que a velocidade inicial de reação foi menor.

A superfície de resposta para o rendimento de produção de éster em função da razão molar e temperatura é mostrada na Figura 2, e demonstra que o rendimento de éster aumenta quando a razão molar utilizada nos experimentos está no nível mais baixo. A utilização de razões molares elevadas é comumente utilizada para garantir um alto rendimento devido ao deslocamento do equilíbrio em favor da formação de produtos e ainda minimizar os efeitos de restrições difusionais. Entretanto, na síntese enzimática, altas razões molares álcool:óleo pode causar um efeito inibidor na enzima.

está descrita a análise de variância para o rendimento de éster do óleo de canola pela enzima *Burkholderia cepacia*. Analisando o *p*-valor associado aos efeitos estudados foi possível verificar que a temperatura, a quantidade de enzima e a interação entre esses efeitos foram as variáveis que mais fortemente influenciaram no rendimento de produção de éster pela lipase de *Burkholderia cepacia* em meio livre de solvente no intervalo de confiança de 90%.

O valor do  $R^2$  apresentado pelo modelo estatístico de regressão foi de 0,88, o erro experimental associado aos dados foi de 6,22% indicando boa confiabilidade no modelo de regressão dos dados que é descrito pela Equação (2).

**Tabela 2.** Análise de variância para rendimento de éster do óleo de

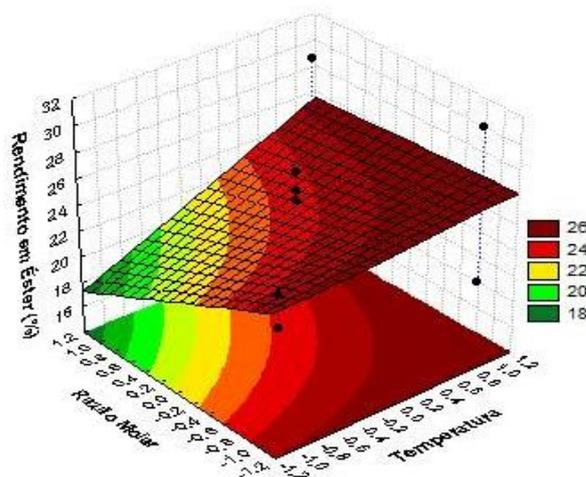
	Soma Quadrática	Gráus de Liberdade	Média Quadrática	F <sub>calc</sub>	<i>p</i> -valor
Temperatura (°C)	32,36	1	32,36	4,58	0,099
Razão Molar (álcool:óleo)	25,63	1	25,63	3,63	0,129
Quantidade de Enzima (%)	81,05	1	81,05	11,48	0,028
Temperatura (°C) x Razão Molar (álcool:óleo)	11,37	1	11,37	1,61	0,273
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	52,10	1	52,10	7,38	0,053
Razão Molar (álcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	1,07	1	1,07	0,15	0,717
Temperatura (°C) x Razão Molar (álcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	0,59	1	0,59	0,08	0,788
Erro	28,23	4	7,06		
Total SS	232,39	11			

Canola utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* em meio livre de solvente.

$$\text{Rendimento} = 23,56 + 2,01 * T + 3,18 * Q - 1,78 * R + 1,19 * R * T + 2,55 * T * Q - 0,37 * R * Q + 0,27 * T * R * Q \quad (2)$$

A superfície de resposta para o rendimento de produção de éster em função da razão molar e temperatura é mostrada na Figura 2, e demonstra que o rendimento de éster aumenta quando a razão molar utilizada nos experimentos está no nível mais baixo. A utilização de razões molares elevadas é comumente utilizada para garantir um alto rendimento devido ao deslocamento do equilíbrio em favor da formação de produtos e ainda minimizar

os efeitos de restrições difusionais. Entretanto, na síntese enzimática, altas razões molares álcool:óleo pode causar um efeito inibidor na enzima.



**Figura 2.** Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e temperatura.

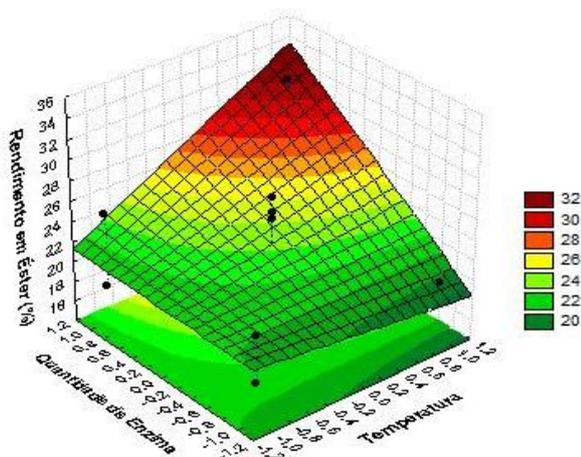
De fato, esse efeito pode provocar uma diminuição na sua atividade catalítica como descrito por Salis *et al.* (2005)<sup>12</sup>, Kose *et al.* (2002)<sup>13</sup> e Yang *et al.* (2004)<sup>14</sup> que dizem poder existir uma mudança na polaridade do microambiente reacional quando uma alta razão molar é utilizada e que essa mudança pode provocar a desestabilização da camada de água essencial do sítio catalítico da lipases que leva a inativação<sup>12,13,14</sup>.

Quando a temperatura do meio reacional mais alta é utilizada, também se verifica aumento no rendimento. No entanto foi possível perceber, que também, rendimentos elevados foram obtidos quando baixos valores de temperatura foram utilizados, mostrando que para a superfície de resposta de rendimento em função da temperatura e quantidade de enzima os efeitos de interação entre as duas variáveis são mais importantes que os efeitos puros.

A superfície de resposta em função da quantidade de enzima e temperatura é mostrado na Figura 3 e demonstram que maiores rendimentos de produção de ésteres são alcançados quando a temperatura do meio reacional foi utilizada no nível mais alto e que quando altas concentrações de enzima estão presentes no meio reacional. De acordo com Fu *et al.* (1995)<sup>16</sup> o rendimento de um produto enzimático pode ser aumentado se tempos de reação mais longos forem utilizados ou se maiores quantidades de enzima sejam adicionados ao meio reacional<sup>16</sup>. Por outro lado, Prazeres *et al.* (1992)<sup>17</sup> afirma que alta concentração de enzima no meio reacional pode provo-

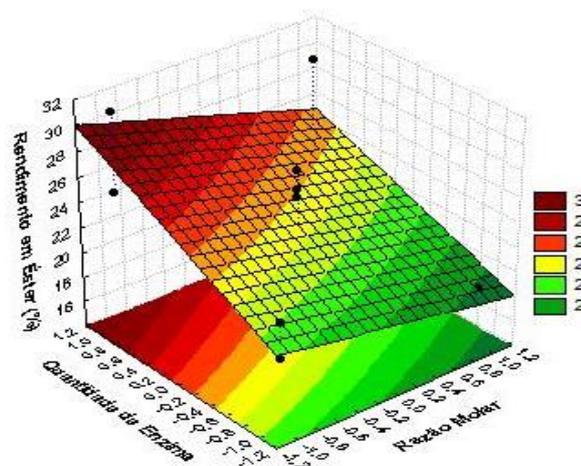
car um efeito de aglomeração das enzimas que pode diminuir a atividade catalítica da enzima<sup>17</sup>. A utilização de altas quantidades de enzimas pode ter provocado a diminuição da atividade catalítica, no entanto, o aumento da temperatura compensou o efeito de diminuição da atividade provocada pela alta quantidade e enzima do meio reacional.

Para esse caso foi possível observar que a utilização de altas quantidades de enzima no meio reacional apresentou um efeito de aumento do rendimento. Enquanto que a alta razão molar provocou a diminuição o rendimento produção de éster, mas quando valores elevados de quantidade de enzima foram usados os rendimentos também foram relativamente altos, mesmo quando altas razões molares foram utilizadas.



**Figura 3.** Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e temperatura.

A superfície de resposta descrita pela Figura 3 demonstra a influência que a quantidade de enzima e a razão molar têm sob o rendimento em éster.



**Figura 4.** Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de

Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função quantidade de enzima e razão molar.

## 4. CONCLUSÃO

Os maiores resultados de rendimento em éster encontrados foram de 31,18% nas condições de 60 °C de temperatura, razão molar álcool: óleo de 6:1 e 10% de enzima em relação meio reacional. A temperatura, quantidade e enzima e a interação desses efeitos foram as variáveis que mais fortemente influenciaram no rendimento de produção de éster para um intervalo de confiança de 90%. As superfícies de respostas indicaram que maiores rendimentos podem ser obtidos quando a temperatura e quantidade de enzima são maximizados no meio reacional por um possível efeito de proteção causado pela alta concentração de enzima no meio reacional e que altas razões molares provocaram um efeito de redução do rendimento.

## REFERÊNCIAS

- [1] Mittelbach M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67. 168-70. 1990.
- [2] Han H, Cao W, Zhang J. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO<sub>2</sub> as co-solvent. *Process Biochemistry*. 2005; 40(9):3148-3151.
- [3] Ma F, Hanna MA. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, 70 American Chemical Society (ACS). 1999; 1-15.
- [4] Knothe G, Van Gerpen J, Krahl J. *Manual do biodiesel*. Edgard Blucher, São Paulo. 2006.
- [5] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002; 17(3-5):133-142.
- [6] Berglund P, Hult K. *Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases*. Marcel Dekker, Inc. 2000; 633-657.
- [7] Da Ros, PCM., Silva GAM, Mendes AA, Santos JC, De Castro HF. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2010; 101(14):5508-5516.
- [8] Salum TFC, Villeneuve P, Barea B, Yamamoto CI, Côcco LC, Mitchell DA, Krieger N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*. 2010; 45(8):1348-1354.
- [9] Chen Y, Xiao B, Chang J, Fu Y, Lv P, Wang X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*. 2009; 50(3):668-73.
- [10] Hama S, Yamaji H, Fukumizu T, Numata T, Tamalampudi S, Kondo A, Noda H, Fukuda H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized

- within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*. 2007; 34(3):273-278.
- [11] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*. 2007; 98(3):648-653.
- [12] Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*. 2005; 119(3):291-299.
- [13] Köse Ö, Tüter M, Aksoy HA. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*. 2002; 83(2):125-129.
- [14] Yang L, Dordick JS, Garde S. Hydration of Enzyme in Nonaqueous Media Is Consistent with Solvent Dependence of Its Activity. *Biophysical Journal*. 2004; 87(2):812-821.
- [15] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *Journal of the American Chemists' Society*. 2001; 78:703-707.
- [16] Fu X, Zhu X, Gao K, Duan J. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *J. Am. Oil Chem. Soc., American Chemical Society (ACS)*. 1995; 72:527-31.
- [17] Prazeres DMF, Garcia FAP, Cabral JMS. Batch and continuous lipolysis/product separation in a reversed micellar membrane bioreactor. *Prog. Biotechnol*. 1992; 7:13-18.
- [18] Fogler HS. *Elements of Chemical Reaction Engineering*. 4 ed. LTC. 2009.
- [19] Domingos AK, Saad EB, Wilhelm HM, Ramos LP. Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2008; 99(6):1837-1845.