

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL
CAMPUS AVANÇADO DE POÇOS DE CALDAS/MG
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

MATHEUS JARETA COSTA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO
UTILIZANDO COMO MATÉRIA-PRIMA ÓLEO DE SOJA RESIDUAL**

Poços de Caldas /MG

2019

MATHEUS JARETA COSTA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO
UTILIZANDO COMO MATÉRIA-PRIMA ÓLEO DE SOJA RESIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, necessária para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas *campus* Poços de Caldas.

Linha de Pesquisa: Processos Biotecnológicos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Battaglia Hirata
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Melina Savioli Lopes

Poços de Caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

C837p Costa, Matheus Jareta.

Produção enzimática de biodiesel via hidroesterificação utilizando como matéria-prima óleo de soja residual / Matheus Jareta Costa. -- Poços de Caldas/MG, 2019.

101 fs. –

Orientador(a): Daniela Battaglia Hirata.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.

Bibliografia.

1. Hidroesterificação. 2. Lipase. 3. Biodiesel. 4. Esterificação. 5. Hidrólise. 6. Óleo de soja - Resíduos. I. Hirata, Daniela Battaglia. II. Título.

CDD – 660.2

MATHEUS JARETA COSTA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO
UTILIZANDO COMO MATÉRIA-PRIMA ÓLEO DE SOJA RESIDUAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, necessária para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas *campus* Poços de Caldas. Linha de Pesquisa: Processos Biotecnológicos

Aprovada em: 01 de fevereiro de 2019

Prof^a: Dra. Daniela Battaglia Hirata

Instituição: UNIFAL-MG

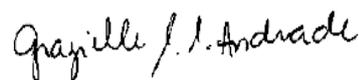
Assinatura:



Prof^a: Dra. Grazielle Santos Silva Andrade

Instituição: UNIFAL-MG

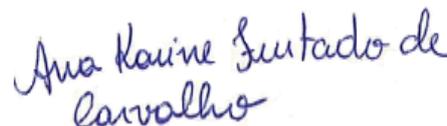
Assinatura:



Prof^a: Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho

Instituição: EEL-USP

Assinatura:



Prof^a: Dr. Ernandes Benedito Pereira

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Daniela Battaglia Hirata, bem como minha coorientadora Prof^a. Dra. Melina Savioli Lopes, pela ajuda, atenção e confiança em mim depositada.

À banca, por se prontificar a nos avaliar.

A todo o corpo docente da pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

Ao Laboratório de Bioprocessos (BioPRO) da UNIFAL-MG, Campus Alfenas, e aos laboratórios do campus de Poços de Caldas, pelas análises, equipamentos e recursos fornecidos.

Aos meus pais, irmão e avós por todo incondicional esforço, apoio e amor.

À minha família, por tudo.

Aos meus amigos, pelo apoio e amizade.

Às Repúblicas Caverna, Cutiata e Ranchão, pela irmandade estabelecida.

RESUMO

As unidades em escala industrial de produção de biodiesel empregam, na sua quase totalidade, reações de transesterificação com catálise alcalina. Esta rota é caracterizada pela necessidade da utilização de óleos refinados como matéria-prima, respondendo por 80% do custo final do biocombustível. Como alternativa, há a utilização do processo de hidroesterificação que possibilita o uso de qualquer matéria-prima graxa, desde óleos não refinados ou até mesmo residuais na síntese do biodiesel. A hidroesterificação envolve uma etapa de hidrólise seguida de esterificação, sendo que ao se utilizar lipases como catalisadores em ambas as etapas do processo de hidroesterificação, este pode apresentar alta seletividade, alta especificidade, condições brandas de operação e elevada pureza dos produtos. Portanto, a proposta deste trabalho visou à produção do biodiesel via hidroesterificação, empregando lipases como catalisadores em ambas as reações, utilizando-se o óleo residual de soja (de fritura) como matéria-prima. A lipase de *Geotrichum candidum* (LGC) foi produzida por fermentação submersa e foi aplicada na forma livre na reação de hidrólise. Para a etapa subsequente, de esterificação, foi selecionada a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF). Esta foi imobilizada por adsorção interfacial em suporte de estireno-divinilbenzeno (EDB). O óleo de soja residual, utilizado como matéria-prima, foi caracterizado e apresentou densidade de 0,92 g/mL, índices de peróxido de $9,50 \pm 0,02$ meq/kg, de acidez total $0,60 \pm 0,01$ mg/g, entre outros parâmetros estudados. A reação de hidrólise, catalisada pela LGC, foi otimizada utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis; fração de óleo residual (% m/m) e concentração de lipase (U/g de sistema). A utilização do planejamento fatorial permitiu a obtenção de uma conversão total de ácidos graxos em 60 min de reação a 40°C e 1000 rpm, para um sistema contendo 20 % (m/m) de fração de óleo de soja residual no sistema, sem o emprego de solvente ou agentes emulsificantes. A reação de esterificação, catalisada pela LPF-EDB, foi realizada com concentração máxima de ácidos graxos de 1000 mM sendo que em apenas 3 horas foi alcançada uma conversão de 80 % de biodiesel. O biodiesel produzido foi caracterizado segundo as normas da ANP, para a composição de ésteres, viscosidade e as quantidades de glicerol livre, monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG) e triacilglicerol (TAG) de ésteres.

Palavras-chave: Hidroesterificação. Lipase. Biodiesel. Esterificação. Hidrólise. Resíduo.

ABSTRACT

Almost all of the industrial units use transesterification reactions catalyzed by alkaline to produce biodiesel. This route of production is characterized by the need to use refined oils as raw material. The oil refining in this case corresponds to 80% of the final cost of the biofuel. As an alternative, there is the possibility to use the hydro-esterification route, which allows the use of unrefined or even residual oils in the synthesis of biodiesel. This route represents the most in-depth alternative in the production of biodiesel. The hydro-esterification involves two steps: reaction of hydrolysis followed by esterification. The use of the lipase catalyst in both steps of the hydro-esterification should result for the process high selectivity, high specificity, mild operating conditions and high purity of the products. Therefore, the main of this project was to produce biodiesel via hydro-esterification route catalyzed by immobilized lipase using residual soybean oil (frying) as raw material. The lipase of *Geotrichum candidum* (*GCL*) was produced by submerged fermentation and applied in its free form in the hydrolysis reaction. The subsequent esterification step was catalyzed by the lipase of *Pseudomonas fluorescens* (*PFL*), a commercial lipase. The *PFL* was immobilized by styrene-divinylbenzene (Sty-DVB) using interfacial adsorption method. The residual soybean oil (waste cooking oil) used was characterized and it showed a density of 0.92 g/ml (25 ° C), peroxide indices of 9.50 ± 0.02 meq/kg, total acidity of 0.60 ± 0.01 mg/g, and others studied parameters. The hydrolysis reaction catalyzed by the *GCL* was optimized using a central composite rotational design (CCRD) for two variables: fraction of residual oil (% m / m) and lipase concentration (U / g system). The use of factorial design allowed obtaining a total fatty acids conversion in 60 min of reaction at 40 ° C and 1000 rpm. The system was compounded by a residual soybean oil fraction of 20% (m / m), without the use of solvents or emulsifying agents. The esterification reaction was catalyzed by *PFL*-Sty-DVB and performed with a maximum concentration of free fatty acids of 1000 mM. The conversion to biodiesel reached was 80% in only 3 hours of reaction. The biodiesel produced was characterized according to ANP standards for the composition of esters, viscosity and the amounts of free glycerol, monoacylglycerol (MAG), diacylglycerol (DAG) and triacylglycerol (TAG) of esters.

Keywords: Hydro-esterification. Lipase. Biodiesel. Esterification. Hydrolysis. Residue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Projeção da demanda de energia mundial até 2015	20
Figura 2 – Oferta Mundial de Energia por combustível em 2015. Total: 13.647 milhões de toneladas equivalentes de petróleo.....	21
Figura 3 – Produção mensal de biodiesel (B100) no Brasil nos períodos de 2005-2018.....	23
Figura 4 – A estrutura química de uma molécula de triglicerídeo	25
Figura 5 – Reação de Transesterificação.....	30
Figura 6 – Etapas do processo de Transesterificação.....	30
Figura 7 – Etapas do processo de Hidroesterificação.....	31
Figura 8 – Reação de Hidrólise	32
Figura 9 – Reação de Esterificação	32
Figura 10 – Principais reações catalisadas por lipase.....	34
Figura 11 – Ativação Interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas.....	36
Figura 12 – Mecanismo proposto para a reação de hidrólise de éster catalisado por lipase ..	38
Figura 13 – Diferentes métodos de imobilização de enzimas	40
Figura 14 – Atividade hidrolítica relativa no sobrenadante resultante da imobilização da <i>LPF</i> em EDB (●) à 25 °C, pH 7,0 (tampão de fosfato de sódio 5 mM), e na solução controle (○)	62
Figura 15 – Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica da <i>LPF</i> livre (●) e imobilizada (□) em EDB. (a) pH (reações realizadas a 37°C); (b) Temperatura (reações realizadas em pH 7).....	64
Figura 16 – Determinação da energia de ativação, utilizando a equação de Arrhenius, para a <i>LPF</i> imobilizada. O coeficiente de determinação (R^2) para o ajuste foi acima de 0,94.....	65
Figura 17 – Efeito da concentração de ácidos graxos livres (AGL) para a <i>LPF</i> livre (●) e imobilizada em EDB (□). As reações foram realizadas a 45°C e pH 7, utilizando-se óleo de oliva emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min	66
Figura 18 – Isoterma de Langmuir ajustada aos dados experimentais para a adsorção da <i>LPF</i> em EDB a 25° C em tampão fosfato (5 mM, pH 7,0).....	69

Figura 19 – Superfície de resposta em função da fração de óleo e da concentração enzimática no sistema.....	73
Figura 20 – Acompanhamento da reação de hidrólise do óleo de soja residual com tempo, utilizando a <i>LGC</i>	74
Figura 21 – Efeito da concentração de ácidos graxos na síntese de ésteres etílicos. As reações foram realizadas na proporção equimolar para ácido graxos e etanol, e a temperatura de 40°C e 200 rpm	75
Figura 22 – Estabilidade operacional (reutilização) do <i>LPF</i> -EDB para a síntese de biodiesel a partir de 1000 mM de ácidos graxos e etanol (equimolar), em meio contendo hexano. Os ensaios foram realizados a 40°C e 200 rpm.....	77
Figura 23 – Perfil da composição dos ésteres etílicos para as amostras analisadas; óleo de fritura, ácidos graxos livres hidrolisados pela <i>LGC</i> , reações de esterificação utilizando 1000 mM de ácidos graxos em 3 h de reação, 1000 mM de ácidos graxos em 6 h de reação	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel	24
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do biodiesel comparadas ao diesel derivado do petróleo	26
Tabela 3 – Composição de ácidos graxos para óleos comestíveis e não comestíveis	26
Tabela 4 – Pesquisas literárias sobre rota enzimática para a produção de biodiesel	29
Tabela 5 – Diferentes métodos de imobilização de lipase para a síntese de biodiesel	42
Tabela 6 – Níveis para as variáveis do DCCR: fração de óleo residual no sistema e concentração de lipase	51
Tabela 7 – Propriedades físico-químicas calculadas para o óleo de soja residual e sua comparação com valores de referência (óleo de soja comercial) e encontrados na literatura	55
Tabela 8 – Parâmetros de imobilização obtidos na imobilização das diferentes lipases (<i>LGC</i> , <i>LTL</i> e <i>LPS</i>) em três suportes distintos (PMA, EDB e PPS)	59
Tabela 9 – Resultados obtidos após 150 min para a reação de esterificação do oleato de etila, utilizando os derivados obtidos pela combinação das lipases (<i>LGC</i> , <i>LTL</i> e <i>LPS</i>) imobilizadas em três suportes distintos (PMA, EDB e PPS)	61
Tabela 10 – Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a <i>LPF</i> livre e imobilizada em EDB em reações de hidrólise utilizando óleo de oliva emulsificado	66
Tabela 11 – Influência do carregamento inicial de proteína nas propriedades catalíticas da <i>LPF</i> imobilizada em EDB	68
Tabela 12 – Matriz do DCCR 22 para a hidrólise do óleo de soja residual, utilizando a <i>LGC</i> . A resposta do planejamento foi a porcentagem de ácidos graxos livres obtida após 40 min de reação	70
Tabela 13 – Estudos referentes a hidrólise do óleo de soja utilizando diferentes tipos de lipases	71
Tabela 14 – Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR	72
Tabela 15 – ANOVA para a resposta do DCCR 22, porcentagem de hidrólise do óleo de soja residual após 40 min de reação	72

Tabela 16 – Estudos referentes a esterificação dos ácidos graxos hidrolisados e processos de transesterificação utilizando diferentes tipos de lipases	76
Tabela 17 – Propriedades e composição dos ésteres etílicos produzido enzimaticamente a partir do óleo residual de fritura, para o ensaio no qual foi utilizado 1000 mM de ácidos graxos livres, e razão molar de 1:1 para o álcool etílico.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AD	Atividade desaparecida
AGL	Ácidos graxos livres
AH	Atividade hidrolítica
AIE	Agência Internacional de Energia
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Atividade oferecida
AOCS	American Oil Chemist's Society
AR	Atividade recuperada
ASTM	American Society for Testing and Materials
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
B10	Mistura de 10% de biodiesel
B100	Biodiesel puro
B30	Mistura de 30% de biodiesel
BSA	Albumina sérica bovina
<i>C. antártica</i>	<i>Candida antártica</i>
<i>C. rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>
CCRD	Central composite rotatinal design
CEN	Comité Européen de Normalisation
CLECs	Cross-linked enzyme crystals
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DAG	diacilglicerol
DCCR	Delineamento composto central rotacioanl
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ea	Energia aparente de ativação
EDB	Estireno-divinilbenzeno
ES	Complexo enzima substrato
FES	Fermentação em estado sólido
FSM	Fermentação submersa

<i>G. candidum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
GCL	<i>Geotrichum candidum</i> lipase
HPAs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ISSO	International Organization for Standardization
<i>J. curcas</i>	<i>Jatropha curcas</i>
LGC	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>
LGC-EDB	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em estireno-divinilbenzeno
LGC-PMA	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em polimeacrilato
LGC-PPS	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em polipropileno
LPF	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
LPF-EDB	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em estireno-divinilbenzeno
LPF-EDB	Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em estireno-divinilbenzeno
LPF-PMA	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em polimeacrilato
LPF-PPS	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em polipropileno
LPS	Lipase pancreática de suínos
LPS-EDB	Lipase pancreática de suínos imobilizada em estireno-divinilbenzeno
LPS-PMA	Lipase pancreática de suínos imobilizada em polimeacrilato
LPS-PPS	Lipase pancreática de suínos imobilizada em polipropileno
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
LTL-EDB	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em estireno-divinilbenzeno
LTL-PMA	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em polimeacrilato
LTL-PPS	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em polipropileno
MAG	monoacilglicerol
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEA	<i>Malte Extract Agar</i>
<i>P. cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipase

PFL-Sty-DVB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> immobilized by styrene-divinylbenzene
PI	Proteína imobilizada
PMA	polimeacrilato
PPS	polipropileno
Pró-álcool	Programa Nacional do Álcool
<i>R. communis</i>	<i>Ricinus communis</i>
<i>R. miehei</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
RI	Rendimento de iobilização
RNA	Ácido ribonucleico
STI/MIC	Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério da Indústria e Comércio
Sty-DVB	<i>styrene-divinylbenzene</i>
<i>T. lanuginosus</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
TAG	triacilglicerol
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVO	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	REVISÃO	20
4.1	BIODIESEL E O CENÁRIO ENERGÉTICO MUNDIAL	20
4.2	HISTÓRICO E CARACTERIZAÇÃO DO MERCADO BRASILEIRO	21
4.3	PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO BIODIESEL	23
4.4	MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DO BIODIESEL	24
4.4.1	Utilização do óleo de soja residual de fritura para a produção de biodiesel	27
4.5	FORMAS DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL	28
4.5.1	Produção de biodiesel: hidroesterificação <i>versus</i> transesterificação	30
4.6	LIPASES	33
4.6.1	Mecanismo da Reação de Hidrólise	37
4.6.2	Métodos para imobilização de lipases	39
5	METODOLOGIA	43
5.1	MATERIAIS	43
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE FRITURA	43
5.3	PRODUÇÃO DA LIPASE DE <i>Geotrichum candidum</i> (LGC)	44
5.3.1	Meios de manutenção e de reativação	44
5.3.2	Inoculação e fermentação submersa	44
5.3.3	Purificação da LGC produzida	45
5.4	SELEÇÃO DE LIPASES PARA A ETAPA DE ESTERIFICAÇÃO	45
5.4.1	Procedimentos de imobilização	46

5.4.2	Ensaio prévios para a esterificação enzimática.....	46
5.5	CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
5.5.1	Imobilização da <i>LPF</i>	48
5.5.2	Efeito do pH e da Temperatura.....	48
5.5.3	Efeito do substrato e determinação dos parâmetros cinéticos	49
5.5.4	Efeito do carregamento de proteína.....	50
5.6	PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO.....	50
5.6.1	Otimização da hidrólise enzimática em reator de tanque agitado	50
5.6.2	Esterificação enzimática	52
5.6.2.1	Estabilidade operacional.....	52
5.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	53
5.7.1	Determinação da atividade hidrolítica.....	53
5.7.2	Determinação da quantidade de proteína.....	54
5.7.3	Caracterização do biodiesel produzido.....	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA	55
6.2	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>Geotrichum candidum</i> (<i>LGC</i>) VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	58
6.3	SELEÇÃO DE LIPASES PARA A ETAPA DE ESTERIFICAÇÃO	58
6.3.1	Ensaio prévios para a esterificação enzimática.....	60
6.4	CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> (<i>LPF</i>)	62
6.4.1	Imobilização da <i>LPF</i>	62
6.4.2	Efeito do pH e da temperatura.....	63
6.4.3	Efeito do substrato e determinação dos parâmetros cinéticos	65
6.4.4	Efeito do carregamento da proteína.....	67
6.5	PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO.....	69
6.5.1	Otimização da hidrólise enzimática em reator de tanque agitado	69

6.5.2	Esterificação enzimática	74
6.5.2.1	Estabilidade operacional.....	77
6.6	CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS	78
7	CONCLUSÕES	81
8	SUGESTÕES PARA ENSAIOS FUTUROS	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE	96

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e pesquisa de combustíveis alternativos que possam ser utilizados em substituição aos derivados do petróleo demandam fortes investimentos, uma vez que as exigências e buscas por fontes renováveis de energia crescem em todo o mundo. Dentre estes combustíveis, o biodiesel, que é obtido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, surgiu como uma alternativa ao diesel, pois possui propriedades semelhantes, podendo até mesmo ser utilizado em motores a diesel sem a necessidade de modificações mecânicas ou despesas de manutenção extensas (CAVALCANTE et al., 2010).

As unidades em escala industrial de produção de biodiesel empregam, na sua quase totalidade, a rota química com catalisador alcalino. Nesta rota é necessário o emprego de óleos refinados como matéria-prima, que chegam a representar quase 80 % do custo final do biodiesel produzido (VESCOVI et al., 2016).

Na produção de biodiesel via hidrosterificação ocorrem duas reações distintas, onde numa primeira etapa tem-se a hidrólise dos ácidos graxos dos triacilgliceróis, seguida por uma segunda etapa na qual os ácidos graxos livres são convertidos em alquil ésteres via esterificação. Nessa rota, os óleos residuais ou não refinados podem ser empregados diminuindo-se, assim, o custo final do biodiesel produzido (VESCOVI et al., 2016).

A utilização de catalisadores biológicos como as lipases para a catálise da reação de hidrólise, é uma alternativa muito vantajosa aos catalisadores químicos, pois além de não requerer cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, a pressão ambiente e a baixas temperaturas. Os catalisadores enzimáticos permitem que óleos não refinados ou residuais também sejam utilizados como matéria-prima na síntese do biodiesel, e ainda são considerados processos tecnologicamente limpos, pois não há a formação de subprodutos indesejados, devido à elevada seletividade das enzimas (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010). Contudo, o elevado custo das lipases ainda é o principal obstáculo em relação à exploração total de seu potencial. O valor de mercado de uma enzima é determinado pela quantidade de enzima produzida, pelo processo de purificação empregado e por sua estabilidade operacional (GUPTA et al., 2004; HANSAN et al., 2006).

Outra preocupação inerente mostra-se quanto ao problema da crescente produção de óleos de fritura residuais de fontes domésticas e industriais. Geralmente, os despejos destes resíduos são realizados de maneira incorreta e parte destes óleos são encaminhados a rede de esgoto, aterros sanitários, solos, lixões e cursos d'água, trazendo como consequência

problemas, tanto para fauna quanto para a flora, tornando-se diretamente causa potencial de problemas de saúde humana (COSTA et al., 2000). Para que tal ocorrência diminua existem alternativas para o uso final deste resíduo; estes podem ser utilizados como matéria-prima desde a produção de sabões caseiros à energia por digestão anaeróbia por craqueamento térmico (ZACHER, 2003) e na produção de biodiesel, que é consideravelmente menos poluente que o óleo diesel (FELIZARDO et al., 2005).

Assim, pelos motivos expostos, a proposta deste trabalho consistiu na utilização da rota de hidroestricificação para produzir o biodiesel, empregando o óleo residual de soja como matéria-prima, diminuindo dessa forma o custo para a produção deste. Ainda, em ambas as etapas desta rota (hidrólise e esterificação) foram empregadas lipases como catalisadores destas reações, visando tornar o processo tecnologicamente limpo e não agressivo ao meio ambiente.

2 JUSTIFICATIVA

A produção de biodiesel atende aos apelos para o uso de recursos renováveis que possam substituir combustíveis derivados do petróleo. Seu custo final pode ser afetado dependendo da rota de produção em até 25% e em mais 80% devido ao preço de preparo da matéria-prima (SHARMA et al 2008; AIE, 2018). Os métodos convencionais de produção de biodiesel que utilizam catalisadores homogêneos demonstram restrições quanto ao uso de matérias-primas de alta acidez e teor de água (KUSS et al., 2015; PARENTE, 2003). A utilização de matérias-primas de baixo custo, que geralmente apresentam alta acidez e teor de água, como óleo residual de fritura, representam uma alternativa para a diminuição final do preço do biodiesel, além de seguir os princípios da química verde. Entretanto, tornar viável a produção nacional do biodiesel requer mais do que somente utilizar matérias-primas mais econômicas. O método de produção e tipos de catalisadores utilizados também devem ser revisados a fim de se obter um processo industrial com elevada eficiência, menores impactos ambientais e a um menor custo de produção.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de biodiesel via hidroesterificação enzimática utilizando o óleo de soja residual como matéria prima.

A hidroesterificação é constituída por duas etapas: hidrólise e esterificação.

Na etapa de hidrólise enzimática o principal objetivo foi utilizar um biocatalizador homogêneo com baixo custo (Lipase de *Geotrichum candidum* produzida por fermentação submersa).

Para etapa de esterificação o objetivo foi utilizar um biocatalizador heterogêneo (Lipase comercial de *Pseudomonas fluorescens*) e determinar as condições operacionais para esta etapa, favorecendo a utilização da matéria-prima escolhida, contribuindo para o desenvolvimento da matriz energética brasileira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dessa forma os objetivos específicos, podem ser escritos como:

- I. Caracterização do óleo de soja residual;
- II. Produção e purificação da LGC via fermentação submersa;
- III. Seleção de lipases para aplicação na reação de esterificação;
- IV. Imobilização de diferentes lipases em suportes distintos;
- V. Caracterização das propriedades biocatalíticas da lipase comercial livre e imobilizada;
- VI. Aplicação e otimização da lipase produzida na reação de hidrólise do óleo de soja residual utilizando um delineamento experimental;
- VII. Aplicação do derivado nas reações de esterificação usando os ácidos graxos obtidos previamente na hidrólise do óleo residual;
- VIII. Caracterização do biodiesel obtido.

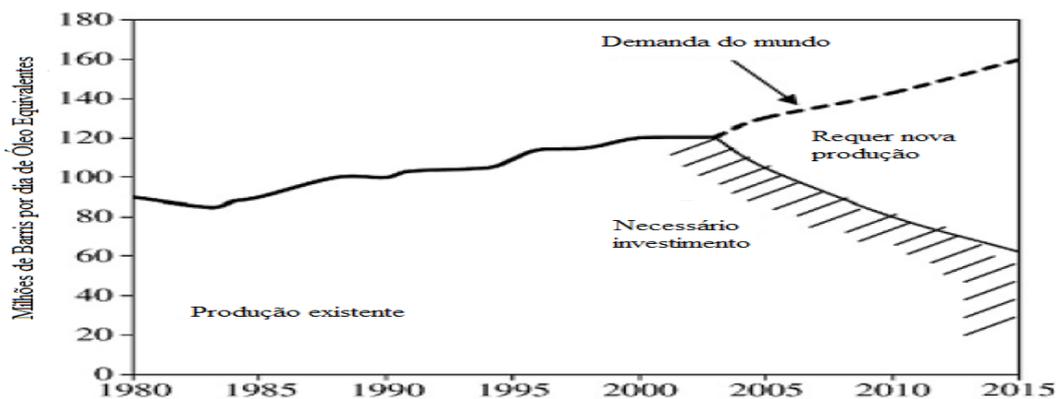
4 REVISÃO

4.1 BIODIESEL E O CENÁRIO ENERGÉTICO MUNDIAL

Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), por meio do Regulamento nº 07/2008, o biodiesel é um “combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos oriundos de óleos vegetais ou gorduras animais, designado por B100 (biodiesel puro)” para uso de motores de combustão interna proveniente de biomassa renovável que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil. Este emite menos poluentes atmosféricos do que o diesel, derivado do petróleo, podendo até mesmo substituí-lo, sem a necessidade de modificações mecânicas ou despesas de manutenção extensas, uma vez que apresentam propriedades semelhantes (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

Juntamente com as fontes de energia renováveis como a energia solar, hídrica, eólica, da biomassa e dos resíduos, o biodiesel tem sido alvo de intensas pesquisas nos últimos dez anos devido ao seu potencial de substituição ao diesel, limitando assim o uso de combustíveis fósseis, uma vez que, conforme mostra a Figura 1, a necessidade de se encontrar novas formas de energias renováveis para garantir a segurança energética mundial é urgente desde o ano de 2015 (LAM, 2010).

Figura 1 – Projeção da demanda de energia mundial até 2015

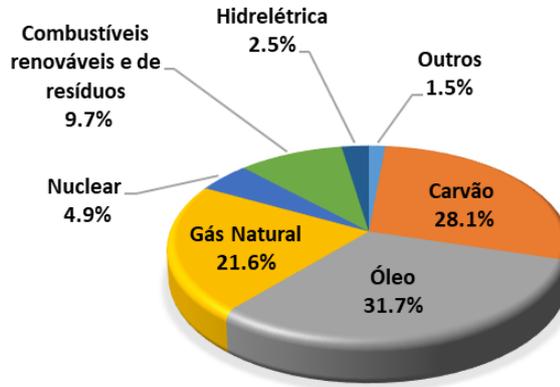


Fonte: (LAM et al., 2010, p. 508).

Estudos da Agência Internacional de Energia (AIE) mostraram que somente a energia produzida por fontes renováveis e de resíduos possui maior potencial entre outros recursos renováveis, representado na Figura 2. Os combustíveis renováveis e resíduos representam 9,7%, em comparação a 2,5% e 1,5% de energia hidrelétrica e outros (eólica, solar, calor e

geotérmica), respectivamente, prevendo-se desta forma uma intensa entrada da energia renovável, como o biodiesel, no mercado para diversificação das fontes de energia global.

Figura 2 – Oferta Mundial de Energia por combustível em 2015. Total: 13.647 milhões de toneladas equivalentes de petróleo



Fonte: (AIE, 2017, p. 6).

Além disso, o biodiesel segundo Talebian-Kiakalaieh e seus colaboradores (2012), apresenta como vantagem uma significativa redução de emissões de gases poluentes por ignição. O uso do biodiesel reduz em 68% a emissão de hidrocarbonetos não queimados, 44% em monóxido de carbono, 100% óxido de enxofre, e em 80-90% os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), quando comparado ao diesel.

4.2 HISTÓRICO E CARACTERIZAÇÃO DO MERCADO BRASILEIRO

Desde o surgimento do movimento ambientalista no Brasil e, principalmente, após a crise do petróleo da década de 1970, vem-se discutindo alternativas energéticas em substituição às fontes de origem fóssil (TAPANES, 2013).

O Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool) foi estabelecido em 1975, sendo este um programa de substituição em larga escala dos combustíveis veiculares derivados de petróleo por álcool combustível financiado pelo governo. Durante sua implantação, inseriu-se, no país na década de 80, criado pelo Conselho Nacional de Energia e o Programa OVEG (Programa Nacional de Alternativas Energéticas Renováveis de Origem Vegetal), o Programa Nacional de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Pró-óleo), instituído pela Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério da Indústria e Comércio (STI/MIC) (MOREIRA et al., 1999).

O Pró-óleo tinha como metas iniciais o incentivo à produção de óleos vegetais para fins energéticos, a mistura de 30% (B30) de biodiesel ao óleo diesel e a gradual substituição total do diesel de petróleo pelo diesel vegetal. A ênfase à produção de biodiesel se deu primeiramente a partir do óleo de soja, e, posteriormente os óleos de amendoim, colza, girassol e dendê começaram a ser empregados (POUSA et al., 2007).

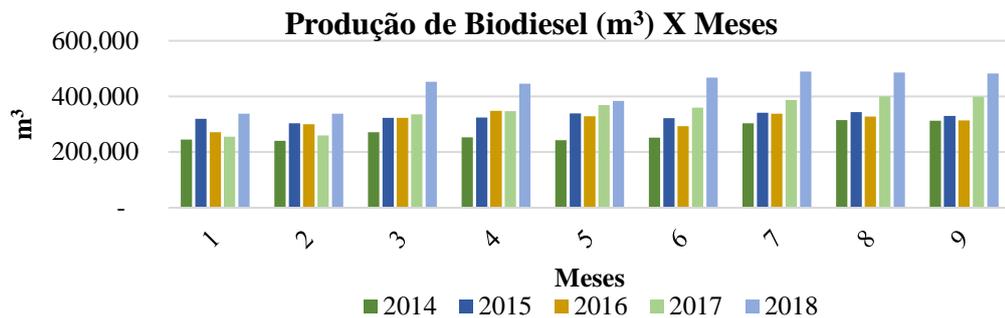
Entretanto, devido ao baixo preço do diesel as atividades de pesquisa e produção de biodiesel cessaram. O governo então retornaria o interesse pelo biodiesel quando a produção deste começou a crescer na Europa, vislumbrando uma forma de fortalecer a agricultura familiar e assim melhorar a inclusão social no país (POUSA et al., 2007).

Em 2002, a Portaria nº 720, de 30 de outubro de 2002, instituiu o Programa Brasileiro de Biodiesel (Pró-biodiesel). Posteriormente, em 06 de dezembro de 2004, foi lançado oficialmente o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que é um programa responsável por promover estudos a respeito da viabilidade de utilização de óleos vegetais para fins energéticos, implantando um desenvolvimento sustentável e promovendo a inclusão social. Dentro deste programa está contida a Lei nº. 11.097/05 conversão da Medida Provisória nº. 214/2004, que determina a produção e o consumo de biodiesel no Brasil estabelecendo a obrigatoriedade da adição de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel comercial, podendo esta ser considerada um marco no histórico do biodiesel no Brasil, sendo que a partir desta o biodiesel passa a ter apoio também jurídico (RAMOS et al., 2017).

De acordo com o PNPB, em janeiro de 2008, a mistura obrigatória determinada por lei foi de 2% (B2), em todo o território nacional. Tal porcentagem sofreu ampliações sucessivas pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) e hoje encontra-se em atuais 10% (B10), estabelecidos pelo governo federal no dia 01 de março de 2018. Tal elevação porcentual dos anteriores 8% para 10% representarão uma demanda adicional pelo biocombustível de 1,3 milhão de metros cúbicos, ainda em 2018, o que em receita equivale a R\$ 3,5 bilhões (MME, 2018).

A evolução na produção de biodiesel pode ser observada no gráfico da Figura 3 em que a produção de biodiesel puro B100 é relatada mensalmente durante o período dos anos de 2014 a 2018.

Figura 3 – Produção mensal de biodiesel (B100) no Brasil nos períodos de 2005-2018



Fonte: (ANP, 2018).

4.3 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO BIODIESEL

Para que o biodiesel possa ser utilizado como biocombustível este deve apresentar uma série de especificações em relação a suas propriedades físico-químicas atendendo as condições de uso para que integridade dos motores seja preservada. Os padrões de qualidade utilizados para a produção e uso do biodiesel no território nacional estão presentes e regulamentados na resolução ANP N° 45, de 25 de agosto de 2014, junto com as metodologias utilizadas para especificação do biodiesel de acordo com normas nacionais (Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT) e internacionais (*American Society for Testing and Materials - ASTM*, *International Organization for Standardization - ISO* e *Comité Européen de Normalisation - CEN*) (ANP, 2018).

Dentre as propriedades físico-químicas do biodiesel destacam-se (CANAKCI; SANLI, 2008):

- Propriedades fluidodinâmicas (viscosidade e densidade), que influenciam na circulação e injeção do biodiesel nos motores movidos a óleo diesel;
- Lubricidade, que é em função de várias propriedades físicas como viscosidade e tensão superficial sendo necessária para lubrificação da bomba nos motores;
- Índice de cetano, que é relacionado a capacidade de combustão do biodiesel;
- Poder calorífico, que indica a quantidade de energia por unidade de massa do biodiesel ao ser queimado;
- Pontos de névoa e fluidez, que caracterizam a temperatura ambiente de utilização e armazenagem do biodiesel;
- Ponto de fulgor, que assume importância na segurança no armazenamento, manuseio e transporte do biodiesel;

- Acidez, que mede a presença de ácidos graxos livres o que pode causar corrosão ao motor;
- Teor de enxofre, que é totalmente isento no biodiesel, uma vez que a matéria-prima (óleos vegetais e animais) não possui enxofre;
- Biogradabilidade e toxicidade, com alta biogradabilidade e baixa toxicidade comparadas ao diesel derivado do petróleo.

4.4 MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DO BIODIESEL

Os óleos e gorduras de origem tanto animais quanto vegetais representam as principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel. Segundo Kuss e seus colaboradores (2015), qualquer substância que contenha triglicerídeos em sua composição pode ser utilizada como matéria-prima na produção de biodiesel, uma vez que todos os óleos e gordura, sendo estes residuais ou não, são triglicerídeos de ácidos graxos que podem ser transformados em biodiesel. Estes podem ser encontrados, por exemplo, tanto em óleos vegetais (algodão, amendoim, palma, girassol, mamona, colza e soja), os quais são constituídos principalmente por glicerídeos e outros lipídeos em pequenas quantidades, quanto em gorduras animais, além também, de óleos residuais, que são óleos vegetais utilizados no processo de fritura de alimentos. A Tabela 1 apresenta algumas matérias-primas que são utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil e no mundo.

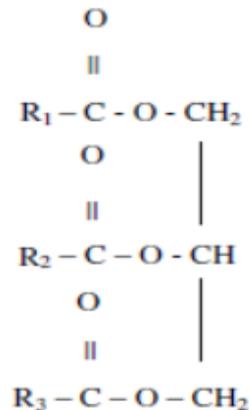
Tabela 1 – Diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel

Matérias-Primas biodiesel		
Mahua	Soja	Banha
Tilápia do Nilo	Colza	Sebo
Palma	Canola	Óleo de peixe
Semente de tabaco	Babaçu	Bactéria
Planta de borracha	Copra	Algas
Farelo de arroz	Amendoim	Fungos
Sésamo	Abóbora	Látex
Girassol	Semente de Algodão	Manga do mar
Cevada	Oliva	Quiabo
Coco	Camelina	
Milho	Mamona	
Óleos de cozinha usado	Mostarda	
Linhaça		

Fonte: (TALEBIAN-KIAKALAEH et al., 2012).

Os triglicerídeos correspondem cerca de 90-98% da massa total de óleos e gorduras (SRIVASTAVA et al., 2000). Segundo Canakci e Sanli (2008), em sua composição química os triglicerídeos são compostos por três ácidos graxos (R-COOH) e um glicerol [C₃H₅(OH)₃], sua estrutura química pode ser observada na Figura 4, em que R1, R2 e R3 representam radicais de ácidos graxos que compreendem cerca de 94-96 % (m/m) de uma molécula de triglicerídeo.

Figura 4 – A estrutura química de uma molécula de triglicerídeo



Fonte: (CANAKCI; SANLI, 2008, p. 432).

A molécula de ácido graxo varia em relação ao comprimento de sua cadeia de carbono e ao número de ligações duplas, sendo estas responsáveis na determinação das propriedades físicas e químicas do óleo vegetal (GUI et al., 2008).

Segundo Sharma e seus colaboradores (2008), a escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel pode contribuir com até 80% de seu custo final. Portanto, uma forma direta para a diminuição do custo deste biocombustível é a utilização de matérias-primas com baixo custo. Além disso, Gui e seus colaboradores (2008) afirmaram que as propriedades do biodiesel variam de acordo com a composição de ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados como matéria-prima para produção do mesmo.

A Tabela 2 representa comparações utilizadas entre propriedades físicas e químicas do biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas com o diesel derivado de petróleo.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do biodiesel comparadas ao diesel derivado do petróleo

Parâmetros	Óleos não comestíveis		Óleos comestíveis			Derivados de petróleo diesel
	Mamona	Semente de borracha	Colza	Palma	Soja	
Viscosidade (cst) a 40 °C	-	5,81	4,50	4,42	4,08	2,60
Peso específico	0,960	0,874	0,882	0,860-0,90	0,885	0,850
Valor calórico (MJ/kg)	39,50	36,50	37	-	39,76	42
Ponto de ignição (°C)	260	130	170	182	69	68
Ponto de turvação (°C)	-12	4	-4	15	-2	-
Ponto de fluidez (°C)	-32	-	-12	15	-3	-20
Teor de cinzas (wt%)	0,020	-	-	0,020	-	0,010
Índice de acidez (mg KOH/g)	-	0,118	-	0,080	-	-

Fonte: (GUI et al., 2008).

Segundo Knothe e seus colaboradores (2006), o grau de insaturação, o comprimento e ramificação da cadeia dos ácidos graxos afetam as propriedades do biodiesel. Portanto, ao utilizar diferentes matérias-primas para um mesmo processo de produção de biodiesel a conversão deste e suas propriedades serão diferentes dentre outros motivos, possivelmente, pela composição do ácido graxo (NORJANNAH et al., 2016). O que pode ser evidenciado ao comparar as diferentes composições de ácidos graxos presentes nas matérias-primas representadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos para óleos comestíveis e não comestíveis

Composição de ácidos graxos	Óleos não comestíveis		Óleos comestíveis		
	Mamona	Semente de borracha	Colza	Palma	Soja
Oleico (C₁₈H₃₄O₂)	3,0	24,6	64,1	40,0	23,0
Linoleico (C₁₈H₃₂O₂)	4,2	39,6	22,3	10,0	51,0
Palmítico (C₁₆H₃₂O₂)	1,0	10,2	3,5	45,0	10,0
Estearico (C₁₈H₃₆O₂)	1,0	8,7	0,9	5,0	4,0
Linolênico (C₁₈H₃₀O₂)	0,3	16,3	-	-	7,0
Eicosenoico (C₂₀H₃₈O₂)	0,3	-	-	-	-
Ricinoleico (C₁₈H₃₄O₃)	89,5	-	-	-	-
Dehidroxiesteárico (C₁₈H₃₆O₄)	0,7	-	-	-	-
Palmitoleico (C₁₆H₃₀O₂)	-	-	0,1	-	-
Outros	-	-	9,1	-	-

Fonte: (GUI et al., 2008).

4.4.1 Utilização do óleo de soja residual de fritura para a produção de biodiesel

A fritura representa um dos mais populares métodos de preparação de alimentos (LEE et al., 2014). Sendo assim, o óleo residual proveniente de fritura representa um surpreendente potencial de oferta, uma vez que estes possuem inúmeras fontes de obtenção. Segundo Parente (2003), as possíveis fontes de óleos residuais vão desde cozinhas domésticas, comerciais e industriais, onde são praticadas as frituras de alimentos, até mesmo águas residuárias provenientes destes processos.

Define-se fritura como o processo de aquecimento do óleo (160-220 °C) na presença de ar durante longos períodos de tempo (CVENGROS et al., 2004). Após a fritura o óleo vegetal sofre algumas alterações físico-químicas como, aumento da acidez devido à formação de ácidos graxos livres, mudança em sua coloração para marrom escuro ou vermelho, aumento da viscosidade e calor específico e mudanças na tensão superficial (SANTOS et al., 2017).

Segundo Lee e seus colaboradores (2014), cerca de 15 milhões de toneladas de óleos residuais de fritura são descartadas anualmente no mundo todo. O consumo *per capita* no Brasil fica em torno de 20 litros/ano, entretanto, o montante coletado posteriormente ao uso é de menos de 1% do total produzido (ECÓLEO, 2019). Normalmente, o despejo destes resíduos são realizados de maneira incorreta, sendo parte destes óleos encaminhados à rede de esgoto, aterros sanitários, solos, lixões e cursos d'água, trazendo como consequência problemas tanto para fauna quanto para a flora, tornando-se uma causa potencial de problemas para a saúde humana (COSTA et al., 2000). Portanto, sua reciclagem e utilização vêm ganhando espaço cada vez maior, uma vez que os efeitos de degradação ambiental se mostram em níveis cada vez mais alarmantes.

Uma das alternativas de utilização do óleo de soja residual de fritura, além dos processos convencionais para produção de sabão caseiro, é seu uso como matéria-prima na produção de biodiesel (COSTA et al., 2000; DIZGE et al., 2009; FELIZARDO et al., 2005; LAM et al., 2010; LIU et al., 2014; SANTOS et al., 2017; TALUKDER et al., 2010; TINTOR et al., 2015; VESCOVI et al., 2016; YAGIZ et al., 2007). Por se tratar de um resíduo, a utilização deste possui vantagens tecnológicas, econômicas e ambientais tais como: não utilização de um óleo refinado, baixo custo de matéria-prima, e propiciar um destino final adequado para este resíduo.

Entretanto, para se utilizar o óleo de soja residual de fritura como matéria-prima para a produção de biodiesel é necessário conhecer suas propriedades físico-químicas, uma vez que estas podem influenciar de forma direta nas características do biodiesel produzido, de acordo

com a rota empregada, conforme descrito anteriormente. Geralmente, o óleo residual possuiu maior teor de água e ácidos graxos se comparado aos óleos bruto e refinados, pois sofre o processo de fritura mencionado (SANTOS et al., 2017). Portanto, é de extrema importância, a fim de se alcançar altas conversões, a escolha do método de produção mais adequado.

4.5 FORMAS DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL

O biodiesel é comumente produzido por transesterificação utilizando-se catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. A transesterificação é o processo de transformação de um éster carboxílico em outro, através da troca do grupo contendo o radical ($-OR$) presente no éster original, por outro grupo semelhante proveniente de um álcool, para dar origem à glicerina e a mono-álquil ésteres (biodiesel) (QUINTELLA et al., 2009; SILVA; FREITAS, 2008). A reação de transesterificação por catálise básica representa o método de produção mais empregado em escalas industriais (AGUIEIRAS et al., 2014; DABDOUB et al., 2009; GARCIA et al., 2008).

A transesterificação por catálise básica utiliza como matérias-primas principais moléculas reativas chamadas acil-aceptores (agentes acilantes – metanol e acetato de metila, por exemplo) e óleo vegetal, os quais devem apresentar características de óleos vegetais refinados, pois sua conversão em ésteres pode diminuir na presença de quantidades elevadas de água e acidez (DEMIRBAS, 2009), além de dificultar o processo de separação do glicerol e, até mesmo, a purificação do biodiesel. Devido ao fato da necessidade de refino do óleo vegetal e a utilização do metanol, que é altamente tóxico, há a geração de um custo operacional elevado (KNOTHE et al., 2006) e comprometimentos ambientais, além de ocasionarem problemas com a qualidade do produto (LIN et al., 2009).

A Agência internacional de Energia (AIE) estima que a escala de produção pode afetar em 25% no custo final do biodiesel, enquanto o preço da matéria-prima, bem como seu tratamento, pode representar diferenças de até 80 %. Portanto, a maneira mais viável indicada para a produção é o desenvolvimento de um método produtivo que aceite matérias-primas variadas e sem a necessidade de refino.

Como alternativa à reação de transesterificação por catálise básica, há a produção de biodiesel através da rota enzimática, em que se trata da transesterificação de triglicerídeos com um álcool, na presença de uma lipase extra ou intracelular. Esta pode ser realizada usando simplesmente a mistura dos substratos (álcool e lipídeos) ou solventes orgânicos, geralmente hexano ou heptano (SHIMADA et al., 2002).

Preparações comerciais de lipases extracelulares em sistemas reacionais homogêneos e também na forma imobilizada para a produção do biodiesel foram utilizadas na maioria das pesquisas publicadas, sendo que as mais utilizadas foram obtidas da *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica* (DABDOUB et al., 2009).

A Tabela 4 apresenta algumas das pesquisas que utilizaram a rota enzimática como meio de produção do biodiesel.

Tabela 4 – Pesquisas literárias sobre rota enzimática para a produção de biodiesel

Metódo	Lipases utilizadas	(%)	Referência
Transesterificação do óleo de girassol com metanol e butanol na presença de hexano como solvente e na ausência de solvente	<i>C. rugosa</i> <i>P. cepacia</i> <i>P. fluorescens</i>	95	DOSSAT et al., 2002; SOUMANOU et al. 2003
Alcoólise do óleo de canola na presença de metanol como solvente	<i>C. antártica</i>	97,9	CHANG et al., 2005
Transesterificação de óleo de cozinha residual na presença de metanol e solução de álcool polivinílico como solventes	<i>T. lanuginosus</i>	82	YAN et al., 2014
Hidroesterificação de óleo de cozinha residual na presença de água como solvente na etapa de hidrólise e sem solvente na etapa de esterificação	<i>T. lanuginosus</i> <i>C. antártica</i>	90	VESCOVI et al., 2016
Transesterificação direta da microalga <i>Botryococcus sp.</i> Na presença de água como solvente	<i>C. antártica</i>	88	SIVARAMAKRISHNAN et al., 2017

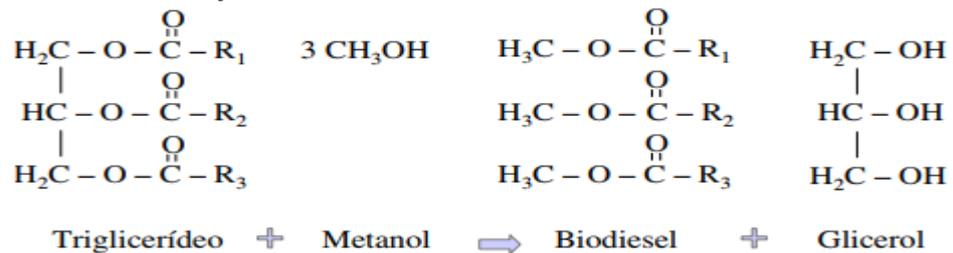
Fonte: Do autor.

Pode-se verificar que o uso de catalisadores enzimáticos para a produção de biodiesel empregando lipases, na transesterificação tem sido usado como uma alternativa que ajuda a superar os problemas associados à catálise alcalina. Além disso, observando os resultados obtidos em tais pesquisas, a rota enzimática mostra potencialidades de uso muito interessantes, em função da facilidade de recuperação e reuso do catalisador quando imobilizado, a baixas temperaturas requeridas, condições reacionais suaves com baixo consumo energético e pH não agressivo.

4.5.1 Produção de biodiesel: hidroesterificação *versus* transesterificação

A transesterificação possui como reação característica, o triglicerídeo reagindo com metanol ou etanol, formando ésteres metílicos ou etílicos, que constituem o biodiesel, e glicerol (Figura 5). Tais reações podem ser catalisadas por bases, ácidos ou até mesmo enzimas (PARENTE, 2003).

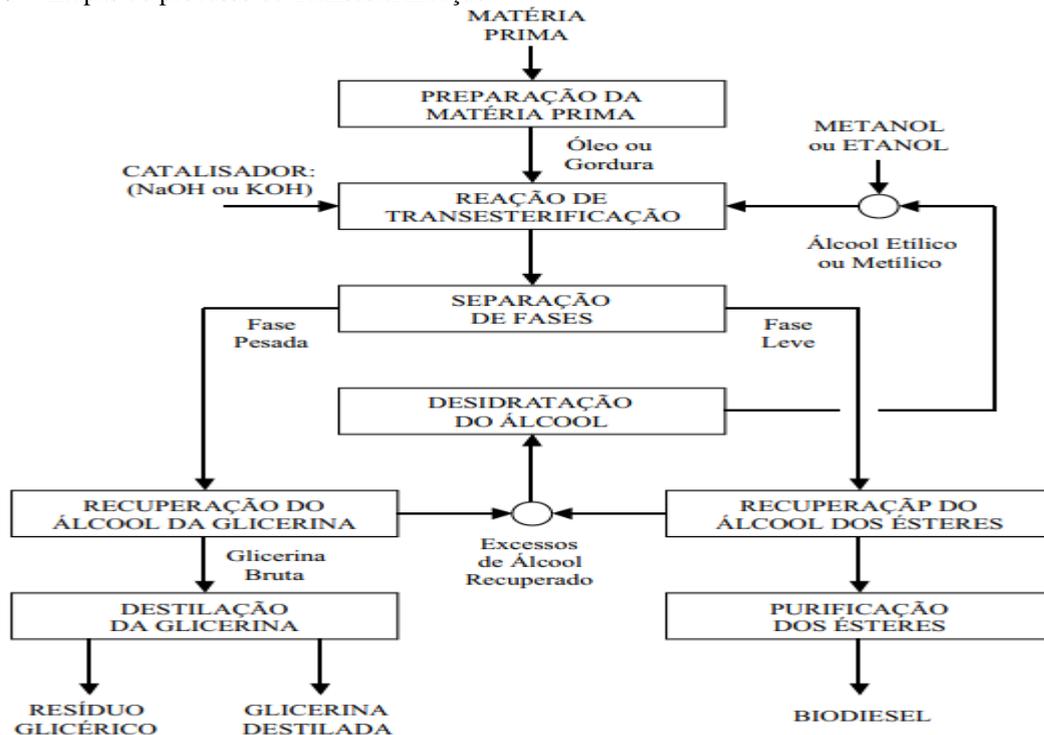
Figura 5 – Reação de Transesterificação



Fonte: (PARENTE, 2003; KUSS, 2015, p. 1014).

As etapas do processo de transesterificação, (Figura 6), envolvem a preparação da matéria-prima, reação, separação de fases, recuperação e desidratação do álcool, e purificação dos ésteres e da glicerina (PARENTE, 2003; KUSS, 2015).

Figura 6 – Etapas do processo de Transesterificação



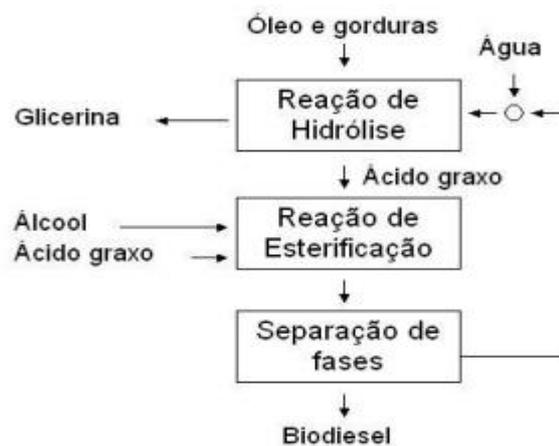
Fonte: (PARENTE, 2003; KUSS et al., 2015, p. 1015).

No processo de transesterificação via catálise básica é necessário a utilização de óleos com baixo teor de umidade e ácidos graxos livres de forma a evitar a formação de produtos saponificados que diminuam a eficiência da conversão. Portanto, uma etapa de preparação da matéria-prima antes que a reação ocorra é imprescindível. Em tal etapa, ocorre a neutralização do óleo através de uma lavagem com uma solução alcalina de hidróxido de potássio ou de sódio, seguido de secagem ou desumidificação. Entretanto, resíduos conhecidos como “*soapstocks*” são gerados, estes resíduos representam quimicamente sabões e são de difícil tratamento, elevando ainda mais os custos para o processo (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

Como alternativa ao processo de transesterificação o processo de hidroesterificação vem sendo estudado. O processo de hidroesterificação permite o uso de qualquer matéria-prima graxa, tais como, gordura animal, óleo vegetal, até mesmo, óleo de fritura usado, entre outros, independentemente da umidade e da acidez que estes possam (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

A produção de biodiesel pela via de hidroesterificação ocorre resumidamente em duas etapas, Figura 7, hidrólise seguida de esterificação (PARENTE, 2003).

Figura 7 – Etapas do processo de Hidroesterificação

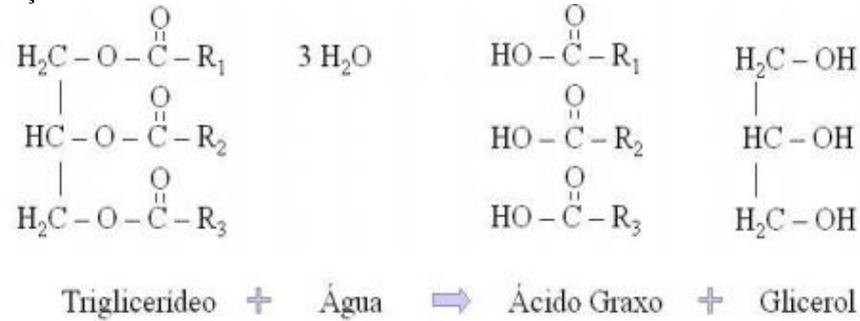


Fonte: (PARENTE, 2003; KUSS et al., 2015, p. 1016).

Primeiramente, toda matéria-prima é hidrolisado (Figura 8), ocorrendo a reação química entre a gordura ou o óleo com a água, liberando ácidos graxos livres e glicerol, independentemente da acidez e da umidade da matéria-prima (PARENTE, 2003). Além da não necessidade do preparo da matéria-prima, o glicerol obtido nesta etapa do processo de hidroesterificação é muito mais puro, podendo representar qualidade alimentar (alto custo), que

o glicerol advindo da transesterificação, devido ao não contato com o metanol, o qual é altamente tóxico (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

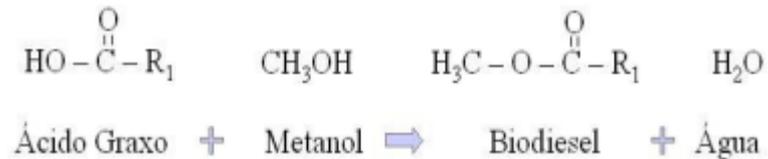
Figura 8 – Reação de Hidrólise



Fonte: (PARENTE, 2003; KUSS 2018, p. 1016).

Em seguida, a glicerina é removida e os ácidos graxos livres são então separados e esterificados com um álcool de cadeia curta, gerando biodiesel e água, (Figura 9) (PARENTE, 2003). O biodiesel gerado possui elevada pureza, não havendo necessidade de etapas de lavagem e, além disso, a água também é obtida, como subproduto, retornando para a primeira etapa do processo, a hidrólise (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

Figura 9 – Reação de Esterificação



Fonte: (PARENTE, 2003; KUSS, 2018, p. 1016).

Segundo Ramos e seus colaboradores (2001) a obtenção de um glicerol mais limpo, que facilita seu uso em outros processos, bem como um biodiesel isento de contaminações é uma das principais vantagens do processo de hidroesterificação.

Portanto, analisando os dois processos, tem-se que o processo de hidroesterificação mostra-se tão atraente quanto ou mais do que o processo de transesterificação para a produção de biodiesel, devido a abrangência em relação a matéria-prima, a qual não precisa de tratamento específico, a menor produção de resíduos indesejados, possibilidade de obtenção de glicerina mais pura e produto final isento de contaminação (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

Há uma maneira de o processo de hidroesterificação apresentar alta seletividade, alta especificidade, condições brandas de operação e elevada pureza dos produtos, sugerida, em 2014, por Aguiéiras e seus colaboradores, que se trata da utilização de lipases como catalisador em uma das etapas ou ambas as etapas do processo.

A constatação da aplicabilidade do processo de hidroesterificação para a produção de biodiesel utilizando matérias-primas de baixa qualidade e lipases como catalisador pode ser observada em pesquisas encontradas na literatura.

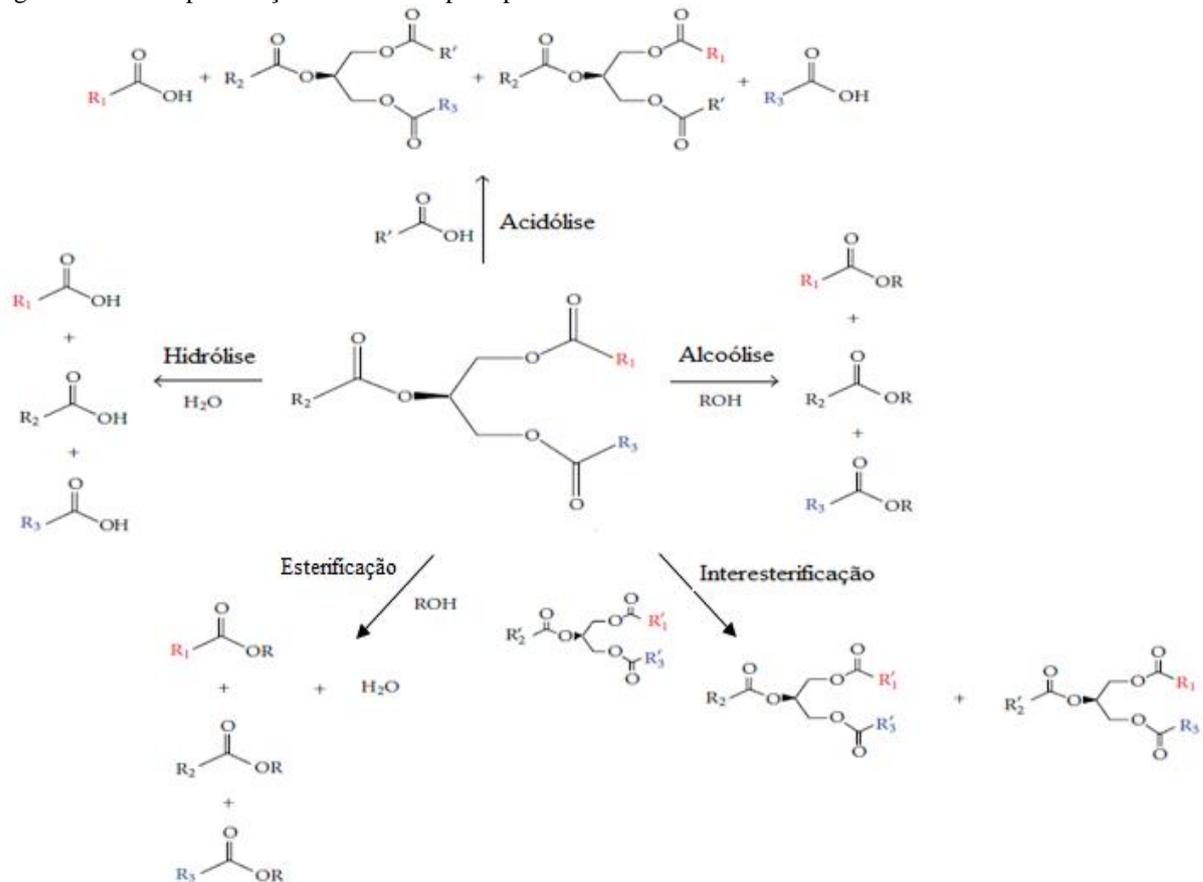
Em 2014, Aguiéiras e seus colaboradores utilizaram em seu estudo apenas catálise enzimática na produção de biodiesel por hidroesterificação. Foram utilizadas como catalisadores nas reações de hidrólise do óleo de macaúba e posterior esterificação dos ácidos graxos as lipases *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*. O resultado obtido foi, após 24 horas de hidrólise, uma conversão de 99,9%. Já, os rendimentos na esterificação foram de 75%, 91% e 92% após, respectivamente, 24, 48 e 72 horas de reação.

Em 2016, Vescovi e seus colaboradores em seus estudos também optaram pela utilização de somente a catálise enzimática. Para a etapa de hidrólise a lipase imobilizada *Thermomyces lanuginosus* foi utilizada apresentando após 12 horas um percentual de 94% de conversão dos acilgliceróis, enquanto na etapa de esterificação a lipase imobilizada *Candida antarctica* B apresentou após 6 h uma conversão em torno de 90%.

4.6 LIPASES

Lipases são enzimas hidrolíticas nomeadas e classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3), que catalisam a clivagem de ligações éster em triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos livres, podendo ser extraídas das células de tecidos vegetais e animais ou produzidas por microorganismos (MENDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013;). Estas são adaptadas para operar na interface de sistemas bifásicos apresentando também atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos (HASAN et al., 2006; MENDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Portanto, a aplicabilidade de uma lipase mostra-se muito ampla podendo ser empregada em diversas reações (HASAN et al., 2006; SANTOS et al., 2013). As principais reações catalisadas por lipases podem ser classificadas da seguinte forma representada na Figura 10.

Figura 10 – Principais reações catalisadas por lipase



Fonte: (RIBEIRO et al., 2011, p. 5).

As lipases apresentam muitas vantagens, principalmente, em processos de biotransformações, pois não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, a pressão ambiente e a baixas temperaturas. Além disso, por possuírem alta afinidade com uma grande gama de substratos, versatilidade quanto às propriedades do meio reacional, disponibilidade comercial e ainda uma elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade, podem ser amplamente aplicáveis em processos industriais (CASTRO et al., 2004; HASAN et al., 2006; SANTOS et al., 2013).

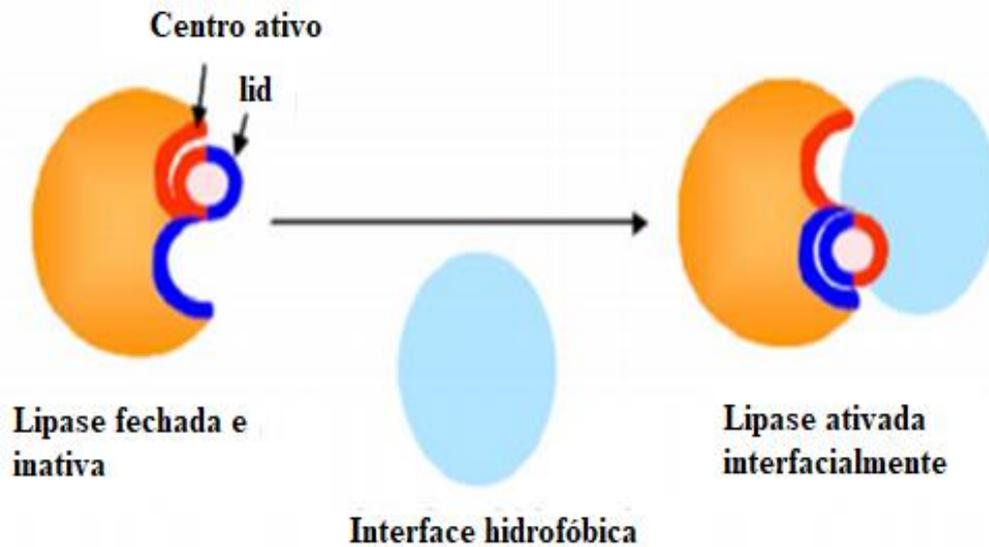
A especificidade de uma lipase é um fator muito importante para sua aplicação industrial e biotecnológica, sendo estas fundamentais para processos bioquímicos celulares, tais como a degradação de moléculas nutrientes, transformação e conservação de energia química e na síntese de macromoléculas biológicas a partir de moléculas precursoras simples. Estas especificidades representam a organização estrutural específica que cada lipase possui, permitindo a ligação apenas do(s) seu(s) substrato(s), e podem ser definidas de três formas:

quanto à regioseletividade, seletividade de substrato e enantioseletividade (GUPTA et al., 2004; SANTOS et al., 2013).

Sua especificidade quanto à regioseletividade ou regioespecificidade caracteriza-se pela propriedade da enzima de reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões de substrato, promovendo a seletividade da enzima pela posição de ligação éster em uma molécula. Em relação à classe de lipídios, a especificidade da enzima se dá em relação ao tipo de éster (di-, tri-, ou monoglicerídeo, metil éster, entre outros). Na seletividade de substrato, a enzima lipolítica reconhece um tipo de ácido graxo em particular e hidrolisa as ligações nas quais ele está envolvido. A enantioseletividade ou estereoespecificidade, caracteriza-se pelo fato de algumas destas enzimas catalisarem apenas a hidrólise ou a esterificação de um dos dois enantiômeros em substratos racêmicos (GUPTA et al., 2004).

Em meio aquoso, o mecanismo de ação de uma lipase é caracterizado pela necessidade de “ativação interfacial” para que se inicie a catálise, uma vez que sua estrutura tridimensional, formada pela tríade catalítica de aminoácidos serina-histidina-aspartato/glutamato, encobre o sítio ativo com uma superfície entrelaçada, um oligopeptídeo hidrofóbico, denominada tampa ou *lid*, o que caracteriza uma lipase fechada e inativa. Entretanto, quando há a ligação com o substrato esta tampa se move, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, fazendo com que o centro ativo fique acessível ao substrato e, simultaneamente, facilitando a ligação da lipase ao substrato expondo uma larga superfície hidrofóbica (CASTRO et al., 2004). O mecanismo descrito é representado na Figura 11. Sendo assim, com a ativação interfacial há o aumento da atividade lipolítica em função de substratos solúveis, uma vez que a tampa já se encontra aberta, o que indica a atuação preferencial das lipases em substratos emulsionados e em interfaces água-solvente orgânico, ou água óleo (BUCHHOLZ et al., 2005).

Figura 11 – Ativação Interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas



Fonte: (BUCHHOLZ et al., 2005).

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos, em que a produção destas podem ser desenvolvidas técnicas convencionais como fermentação submersa (FSM), que consiste no crescimento microbiano seguido das variações de condição de cultivo e composição (RAMOS et al., 2015) e fermentação em estado sólido (FES), na qual são utilizados substratos insolúveis atuando como suporte fisiológico e fonte de nutrientes com baixas porcentagens de água em sua composição (PANDEY, 2003). A FSM, técnica mais simples, apresenta vantagens consideráveis em relação a homogeneidade do sistema, maior eficiência na transferência de calor no meio e facilidade de controle de parâmetros reacionais, tais como, pH, temperatura, oxigênio, que são essenciais para a produção da lipase (RAMOS et al., 2015).

Além das técnicas convencionais de produção apresentadas, há uma técnica altamente sensível denominada reação em cadeia da polimerase (PCR), por meio da qual, pequenas quantidades de sequências de RNA ou DNA específicas podem ser amplificadas enzimaticamente até que milhões de cópias da sequência alvo sejam obtidas (GANDRA et al., 2008). Esta técnica que é utilizada para a preparação de fragmentos de DNA para clonagem e produção da lipase, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos de cultura tradicionais (MARLONY et al., 2003), apresentando diversas vantagens, como maior rapidez, maior poder de tipificação e discriminação, maior seletividade, especificidade e a possibilidade de trabalhar

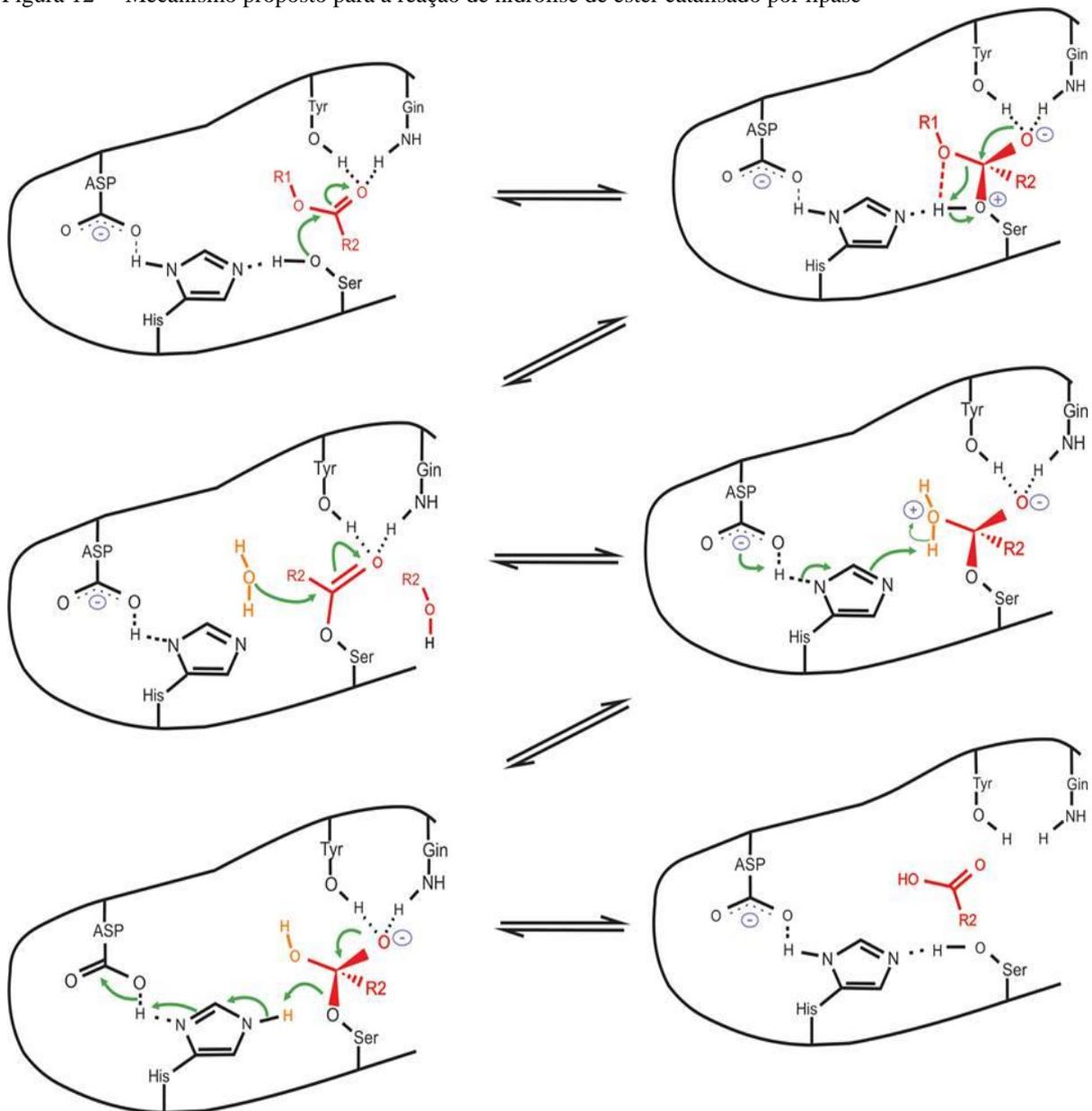
com micro-organismos que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH; NITSCHKO, 1999; GANDRA et al., 2008).

As lipases, de acordo com estudos literários, podem ser aplicadas em diversos processos industriais, incluindo processos de biotransformação, síntese e degradação de termoplásticos de engenharia, produção de produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, aromas e fragrâncias, emulsificantes, lipídios estruturados, pré-tratamento de resíduos ricos em lipídios, síntese de biodiesel pela hidrólise de óleos e gorduras (BRABCOVÁ et al., 2013; CASTRO et al., 2004; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; HASAN et al., 2006; HU et al., 2012; JIN et al., 2013; MENDES et al. ., 2012; MENDES et al., 2013; RODRIGUES; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010 a, b;).

4.6.1 Mecanismo da Reação de Hidrólise

A hidrólise de ligações ésteres de triaglicerídeos ocorre por clivagem sequencial dos grupos acila no triglicerídeo, sendo esta conversão enzimática usada na obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (MUKHERJEE, 1995). Seu mecanismo de reação está representado pela Figura 12. A reação inicia-se com o ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico na ligação éster pela molécula de oxigênio da serina, com formação de um intermediário tetraédrico estabilizado. Por fim, após a formação do complexo acil-enzima e liberação de um álcool, este é finalmente hidrolisado liberando os ácidos graxos e regenerando a enzima. De maneira inversa, a reação de esterificação enzimática pode ser observada.

Figura 12 – Mecanismo proposto para a reação de hidrólise de éster catalisado por lipase



Fonte: (CYGLER et al., 1994, p. 3182).

As vantagens apresentadas pelas reações de hidrólise e esterificação enzimática em relação às hidrólises química correspondem, respectivamente, à atuação das enzimas em uma faixa de temperatura mais baixa, reduzindo custos energéticos e possível degradação de produtos. Além disso, as enzimas utilizadas são biodegradáveis, sendo menos poluentes se comparadas aos catalisadores químicos. Entretanto, também existem desvantagens, como o tempo de reação ser mais longo e o elevado custo dos biocatalisadores (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

4.6.2 Métodos para imobilização de lipases

O grande problema na utilização de biocatalisadores na sua forma livre em reações está na instabilidade que estes possam apresentar em solução bem como sua reutilização. A imobilização enzimática surge como uma solução para tal problema, sendo esta uma técnica que mantém o biocatalisador fisicamente localizado ou confinado, retendo sua atividade catalítica, em regiões específicas de seu suporte, podendo o biocatalisador ser ainda reutilizado apresentando estabilidade operacional e durabilidade. Não existe uma técnica de imobilização ou suporte ideal para todos os processos enzimáticos, devido à grande especificidade das reações enzimáticas. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada (MENDES et al., 2013).

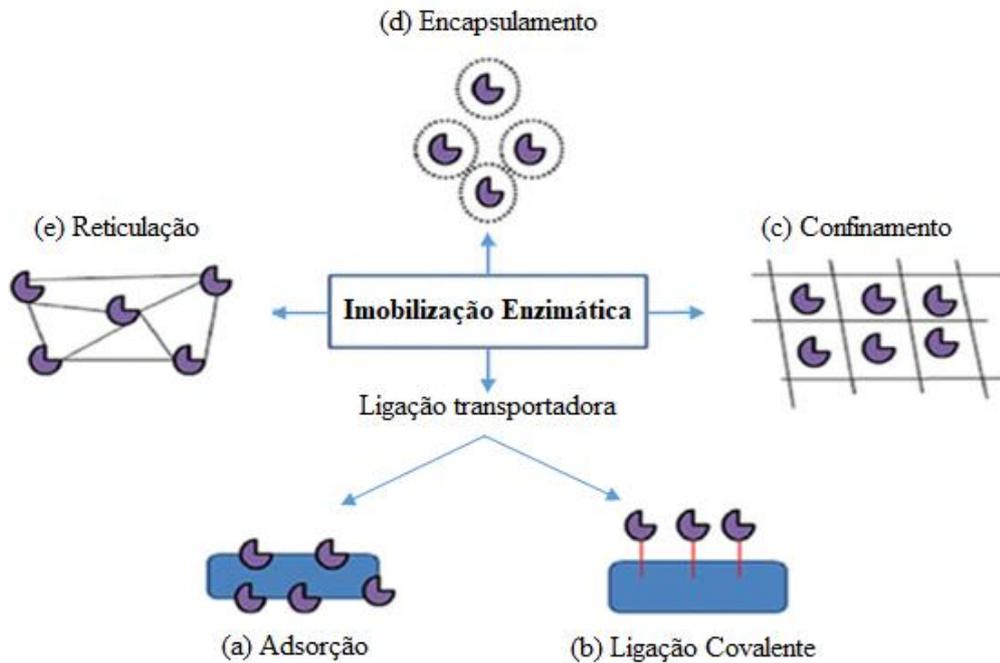
Segundo Dizge e seus colaboradores (2009), as propriedades dos biocatalisadores, atividade e difusão, são influenciadas fortemente pela estratégia de imobilização utilizada. A diminuição da atividade, bem como limitações na difusão estão geralmente ligadas com o método de imobilização e com o material de suporte utilizado, sendo que este último desempenha um papel muito importante na utilidade de uma enzima imobilizada. Segundo Arica e seus colaboradores (2000), os materiais suportes devem ser de baixo custo e fornecer uma área superficial grande e adequada, juntamente com o menor limite de difusão no transporte de substrato e produto para a ocorrência das reações enzimáticas.

Em 1916, Nelson e Griffin realizaram o primeiro estudo com imobilizações de enzimas relatado, em que observaram que a lipase invertase utilizada na absorção em carvão ativado manteve sua atividade e não era desorvida mesmo com as lavagens.

Uma vez imobilizada, a enzima que antes era considerada como um catalisador solúvel apresenta características vantajosas dos catalisadores heterogêneos, tais como sua facilidade de separação do meio reacional, da possibilidade na modulação de suas propriedades catalíticas e estabilização de sua estrutura tridimensional, da prevenção de contaminações microbianas e como mencionado anteriormente a possibilidade de sua reutilização (MATEO et al., 2007).

Os métodos mais comumente utilizados para imobilização das lipases em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânicas estão representados na Figura 13.

Figura 13 – Diferentes métodos de imobilização de enzimas



Fonte: (SANKARAN et al., 2016, p. 903).

A adsorção física, Figura 13 (a), é a técnica mais antiga e comumente utilizada para imobilização de lipases, sendo conhecida como uma técnica reversível em que a lipase é adsorvida para um material suporte através de interações não covalentes como adsorção física, por exemplo, forças de *Van der Waals*, interações hidrofílicas e ligações de hidrogênio (AL-ZUHAIR et al., 2007). Segundo Sankaran e seus colaboradores (2016), a adsorção física é o método mais utilizado para imobilização de enzimas utilizadas na síntese de biodiesel pois opera de forma direta e apresenta grande atividade enzimática. Entretanto, o principal revés apresentado é a lixiviação da enzima quando usada repetidamente o que causa diminuição na atividade desta.

A ligação covalente, Figura 13 (b), é o processo em que a enzima é vinculada ao suporte através dos grupos funcionais presentes na superfície da enzima por ligação covalente (POPPE et al., 2015). A força desta ligação é elevada o que proporciona grande rigidez a estrutura da enzima podendo mantê-la inalterada perante agentes desnaturantes como temperatura e pH e extremos, solventes orgânicos e outros (SANKARAN et al., 2016). Segundo Souza e seus colaboradores (2017), esta técnica representa o método mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas dentre os métodos de imobilização disponíveis.

As técnicas de encapsulamento e confinamento envolvem polimerização *in situ* de uma matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados, podendo a fixação da lipase ser feita por ligação covalente ou não (SOUZA et al., 2017). Na imobilização por encapsulamento, Figura 13 (d), as enzimas são capturadas em gel polimérico como miçangas e cápsulas, em que somente pequenas moléculas são capazes de difundir através de sua membrana permeável, enquanto na imobilização via aprisionamento, Figura 13 (c), a enzima é aprisionada dentro de uma matriz polimérica que permite a passagem do substrato e produto (SANKARAN et al., 2016). Segundo Sankaran e seus colaboradores (2016), em comparação com a técnica de imobilização por adsorção, o método de confinamento resulta em uma lipase imobilizada mais estável facilitando a recuperação e reuso durante processos contínuos, sendo sua principal desvantagem a limitação de transferência de massa e vazamento de enzima, o que na técnica por encapsulamento é evitado resultando em um aumento na transferência de massa.

A técnica por reticulação, Figura 13 (e), envolve formações de retículos intermoleculares pela adição de bi ou multifuncionais cristais de enzimas reticuladas (cross-linked enzyme crystals – CLECs) sem a presença de suporte específico (SOUZA et al., 2017). Segundo Souza e seus colaboradores (2017), após a reticulação os CLECs apresentam maior estabilidade mecânica e térmica, por apresentarem ligações cruzadas em toda sua estrutura tridimensional, e são insolúveis em soluções tampão e com solventes orgânicos, o que permite sua aplicação em diferentes meios reacionais sem perdas significativas de atividade catalítica, podendo também serem recuperados e reutilizados.

Estudos sobre diferentes métodos de imobilização e diferentes suportes utilizados podem ser encontrados na literatura, como por exemplo, a imobilização pelo método de ligação covalente, utilizando benoite modificado como suporte, realizada por Ramos e seus colaboradores (2014); bem como, o método de aprisionamento, tendo alginato de sódio como suporte, realizada, em 2012, por Kebabci e Cihangir; o método de encapsulação, com suporte de sílica mesoporosa, em 2012, por Hu e seus colaboradores; método de adsorção, com suporte AB8, por Yan e seus colaboradores. (2013); método de adsorção física em suporte ecológico, por Ramos e seus colaboradores (2015), entre outros. A produção enzimática de biodiesel utilizando lipases imobilizadas com diferentes suportes e técnicas pode também ser encontrada na literatura sendo estas representadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Diferentes métodos de imobilização de lipase para a síntese de biodiesel

Métodos de Imobilização	Transportador	Lipase	Matéria-prima	(%)	Referências
Adsorção	Pano de carvão granulado ativo (ACG-E)	<i>Candida antarctica</i> B	Óleo de Palma	100	NARANJO et al., 2010
	Resina acrílica	<i>Candida antarctica</i> B	Óleo de Girassol	99	OGNJANOVIC et al., 2009
	Polipropileno	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de Soja	58	SALIS et al., 2008
	Poliacrilonitrilo	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de Colza	80	SAKAI et al., 2010
Ligações Covalente	Resinas (Toyoparl AF-amino- 650M)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de Palma	100	MENDES et al., 2011
	Miçanga poliacrílica (Macroporosa Immobead-350)	<i>Steapsin Lipase</i>	Óleo de Girassol	94	DHAKE et al., 2012
	Microesferas de quitosana magnética	<i>Candida rugosa</i>	Óleo de Soja	87	XIE et al., 2012
Reticulação	Enzimas reticuladas agregadas (CLEAs)	<i>Photobacterium lipolyticum</i>	Óleo de Olívia	64	HAN et al., 2011
Confinamento	Sol-gel hidrofóbico	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de Soja	-	NOUREDDINI et al., 2005
	Sílica	<i>Steapsin Lipase</i>	Óleo da semente de algodão	98	KATIYAR et al., 2015
Encapsulamento	Biopolímero K-carrageenan	<i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS)	Óleo de Palma	100	JEGANNATHAN et al., 2010
	Aerogel de sílica	<i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Candida antártica</i>	Óleo da semente de girassol	56	ORÇAIRE et al., 2006

Fonte: Do Autor.

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIAIS

A lipase de *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) foi produzida por fermentação submersa no laboratório de Bioprocessos (BioPRO) da UNIFAL/MG. Também foram utilizadas as lipases comerciais de *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus* e lipase pancreática de suínos adquiridas da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). O suporte polimetacrilato (PMA – área superficial e diâmetro de poro de aproximadamente 500 m²/g e 170 Å, respectivamente), comercializado como Diaion® HP-2MG, e o estireno-divinilbenzeno (EDB - área superficial e diâmetro de poro de aproximadamente 500 m²/g e 260 Å, respectivamente), comercializado como Diaion® HP-20, foram adquiridos de Supelco (Bellefonte, PA, EUA). O suporte polipropileno (com tamanho de partícula menor que 1000 µm) comercializado como Accurel MP1001 foi adquirido da Membrana (Wuppertal, Alemanha).

A goma arábica foi adquirida da Synth (São Paulo, Brasil) e o azeite de oliva Carbonel foi adquirido em mercado local. Todos os demais reagentes utilizados para este trabalho foram de grau analítico.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE FRITURA

O óleo de fritura residual foi coletado do restaurante universitário da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG campus sede de Alfenas. O óleo foi filtrado em papel de filtro para retirada das impurezas sólidas, decorrentes do processo de fritura de alimentos e armazenado sob refrigeração (4°C).

Antes de ser utilizado para a produção do biodiesel via hidroesterificação, o óleo de fritura passou por uma série de análises físico-químicas utilizando métodos específicos, caracterizando-o quanto a densidade relativa, índice de peróxido, índice de saponificação, índice de acidez total, índice de iodo, teor de umidade, teor de ácidos graxos livres e viscosidade.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os procedimentos utilizados foram baseados na metodologia oficial da “American Oil Chemist’s Society” – AOCS (AOCS) publicados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL). A descrição de todos os procedimentos se encontra no Apêndice desta dissertação.

5.3 PRODUÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* (LGC)

A LGC foi produzida segundo a técnica descrita por Castro e seus colaboradores (2016). A lipase foi aplicada na sua forma livre e sem purificação na etapa de hidrólise do óleo de soja residual, dentro do processo de hidroesterificação. A LGC, purificada e imobilizada em diferentes suportes, também foi utilizada no estudo preliminar de esterificação para a produção de oleato de etila (ver item 5.4 Seleção de enzimas para a etapa de esterificação).

5.3.1 Meios de manutenção e de reativação

A cepa de *Geotrichum candidum* foi mantida, na temperatura de 5 °C, em meio de manutenção (Malte Extract Agar - MEA), o qual era constituído por 2% (m/v) de extrato de malte, 0,5% (m/v) de peptona de caseína e 1,5% (m/v) de ágar. Para sua reativação o micro-organismo foi repicado do MEA e plaqueado em meio de cultura contendo 6,5 % (m/v) Sabouraud destrose agar (SDA) e incubado à 30 °C por 48 h. Após o crescimento do fungo, colônias de diâmetro aproximado de 5 mm foram utilizadas para a produção do meio de inóculo.

5.3.2 Inoculação e fermentação submersa

O meio de inóculo foi constituído por fontes de nitrogênio, carbono, sais inorgânicos e um indutor de lipase. A composição utilizada foi a seguinte: peptona de caseína (2%), extrato de levedura (0,1%), nitrato de sódio (NaNO₃ 0,05%), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O 0,05%) e óleo de algodão (1%). Após o preparo do meio de cultura este foi autoclavado por 15 min à 120 °C. Uma colônia de diâmetro de 5 mm foi retirada da placa de reativação e introduzido no meio de inóculo, que foi incubado em shaker à 30 °C e agitação constante de 250 rpm, por um período de 24 h.

No processo de produção da lipase por meio de fermentação submersa o meio de cultivo foi composto por 2% de peptona (m/v), 1,5% de óleo de algodão (v/v), 0,1% de extrato de levedura (m/v), 0,05% (m/v) MgSO₄ e 0,05% (m/v) de NaNO₃ Foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 1000 mL, e 10% de sua capacidade total foi preenchida sendo adicionado 90 mL de meio de cultivo e 10 mL de inóculo. Os Erlenmeyers foram colocados em incubadora de piso (shaker) à temperatura de 30 °C e agitação constante de 250 rpm, por um período de 48 h (CASTRO et al., 2016). Após o período de 48 h, os meios fermentados foram filtrados à

vácuo, com papel de filtro e o sobrenadante resultante foi utilizado como extrato enzimático bruto. O filtrado contendo a *LGC* (22,9 IU/ml) foi utilizado para os estudos subsequentes.

5.3.3 Purificação da *LGC* produzida

O caldo de fermentação, previamente filtrado, foi concentrado em liofilizador e em seguida a lipase foi precipitada utilizando-se acetona a 8°C, na proporção de 1:2 (v/v) de extrato enzimático bruto:acetona. Após a adição da acetona, o sistema foi agitado por três minutos em vortex e centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm, para a separação das fases.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado do precipitado e uma segunda etapa de precipitação foi realizada. O sobrenadante foi colocado em contato com uma nova fase solvente na proporção de 1:1 (v/v) (sobrenadante:acetona). Em uma terceira etapa de precipitação, foi adicionado 100 mL de acetona ao sobrenadante resultante da segunda etapa de precipitação (FERREIRA et al., 2018). O precipitado, obtido nas três etapas de precipitação, foi reunido, ressuspendido em 5 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7, submetido à análise de atividade hidrolítica e de proteína, e utilizado na etapa de imobilização, descrito na seção 5.3.3.

5.4 SELEÇÃO DE LIPASES PARA A ETAPA DE ESTERIFICAÇÃO

Nesta etapa, a *LGC*, produzida via fermentação submersa e previamente purificada, e as lipases comerciais de *Pseudomonas fluorescens* (*LPF*), *Thermomyces lanuginosus* (*LTL*) e pancreática de suínos (*LPS*) foram imobilizadas em diferentes suportes; polimeacrilato (PMA), estireno-divinilbenzeno (EDB) e polipropileno (PPS). O objetivo destes ensaios foi verificar qual derivado seria mais apropriado para ser empregado na etapa de esterificação do processo de hidroesterificação. Dessa forma, os derivados obtidos foram aplicados na síntese do oleato de etila via esterificação em meio orgânico (hexano). O derivado que apresentou melhor desempenho nesta reação foi selecionado para ser aplicado posteriormente na reação de esterificação dos ácidos graxos hidrolisados, obtidos do óleo de soja residual, na etapa de hidrólise.

5.4.1 Procedimentos de imobilização

As lipases *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus* e pancreática foram re-suspendidas em tampão fosfato de sódio (5 mM), pH 7, e imobilizadas via adsorção física, sendo utilizado 30 mg de proteína por 1g de suporte para cada um dos suportes (PMA, EDB e PPS) (BASSI et al. 2016). Para a lipase de *Geotrichum candidum*, foi utilizado 10 mg de proteína por g de cada suporte (FERREIRA et al. 2018).

Visando a retirada do ar dos poros dos suportes hidrofóbicos, para que pudesse ocorrer o seu preenchimento com a solução aquosa contendo a lipase, uma etapa anterior à imobilização foi realizada. Assim, o suporte (1 g) foi incubado em 10 mL de etanol (95%, m/m) e agitado suavemente por 30 min. Em seguida foi filtrado e lavado com água destilada para a remoção do excesso de etanol. Somente após essa etapa é que os mesmos foram incubados em agitação (150 rpm), com a solução de lipase em tampão fosfato para a imobilização da enzima, durante 12 h à temperatura ambiente. Após esse tempo o derivado foi filtrado e lavado com água destilada. As análises de atividade e de proteína foram realizadas para as soluções iniciais e finais resultantes da imobilização e ainda para o derivado foi realizada análise de atividade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.4.2 Ensaios prévios para a esterificação enzimática

Os derivados obtidos na imobilização das enzimas *LGC*, *LTL*, *LPF* e *LPS* em diferentes suportes hidrofóbicos (PMA, EDB, PPS) foram aplicados na síntese do oleato de etila via esterificação em meio orgânico.

O substrato foi preparado utilizando-se 100 mM de álcool etílico e 100 mM de ácido oleico, ou seja, na proporção equimolar (1: 1). O solvente orgânico, hexano, foi adicionado, na quantidade adequada, para completar o volume em 10 mL.

A mistura reacional (10 mL) foi transferida para um frasco de vidro de 100 mL com tampa e incubada a 40°C sob agitação de 200 rpm. Os biocatalisadores foram adicionados às misturas de reação na proporção de 10% do meio reacional. Após 150 min de incubação, a conversão foi calculada medindo-se a concentração de ácido oleico residual na mistura reacional. As amostras foram retiradas, diluídas em 10 mL de uma mistura de etanol/acetona 1:1 (v/v) e tituladas com uma solução padrão de NaOH 20 mM, usando fenolftaleína como indicador. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As reações em branco foram

realizadas adicionando-se o suporte na mistura de reação e nenhuma conversão foi observada após 2 h de incubação.

5.4.3 Cálculo dos parâmetros de imobilização

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado pela equação 1:

$$RI(\%) = \frac{C_{t_0} - C_{t_a}}{C_{t_0}} \times 100 \quad (1)$$

em que:

C_{t_0} = atividade hidrolítica do sobrenadante antes da imobilização;

C_{t_a} = atividade hidrolítica do sobrenadante após a imobilização.

A atividade desaparecida (AD) foi determinada pela diferença entre C_{t_0} e C_{t_a} (equação 2).

$$AD = AH - AO \quad (2)$$

em que:

AH = atividade hidrolítica do derivado;

AO = a atividade oferecida.

A atividade recuperada (AR), que representa a porcentagem de atividade hidrolítica avaliada para o derivado em razão da atividade desaparecida, foi determinada de acordo com a equação 3 (RAMOS et al., 2015).

$$AR(\%) = \frac{AH}{AD} \times 100, \quad (3)$$

em que:

AD = a atividade desaparecida.

A proteína imobilizada (PI) foi determinada pela equação 4:

$$PI \text{ (mg/g)} = \frac{V_{enz} \times (C_0 - C_f)}{m_s} \quad (4)$$

em que:

C_0 = concentração inicial de proteína antes da imobilização;

C_a = concentração final de proteína após a imobilização;

V_{enz} = volume da solução de enzima (mL);

m_s = massa do suporte (g).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens*

Para os ensaios de caracterização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* foram utilizado 2 mg de proteína por 1g de suporte estireno-divinilbenzeno (EDB) para evitar problemas difusionais. As análises de atividade foram realizadas de acordo com item 5.6.1 (Determinação da atividade hidrolítica).

5.5.1 Imobilização da *LPF*

A adsorção da *LPF* em partículas de EDB via ativação interfacial foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Alves e seus colaboradores (2017). O suporte (1 g) foi incubado em 20 mL de solução de etanol (95%) sob agitação (200 rpm) por 30 min. Em seguida, o suporte foi filtrado em um funil de Buchner sob vácuo e completamente lavado com água destilada para remover a solução alcóolica residual. O suporte úmido foi incubado em 19 mL de solução enzimática contendo a *LPF* em pH 7,0 (fosfato de sódio tamponado 5 mM) contendo 2 mg de proteína. A suspensão foi mantida sob agitação (200 rpm) em agitador orbital a temperatura ambiente por 6 h. O biocatalisador preparado foi filtrado à vácuo, lavado com água destilada e armazenado a 4° C por 24 h antes de sua utilização. Em todos os ensaios de caracterização, realizados para a *LPF*, foi utilizado o biocatalisador preparado em baixo carregamento (2mg/g de suporte) de modo a se evitar problemas difusionais.

5.5.2 Efeito do pH e da Temperatura

Para a determinação da influência do pH na atividade da lipase livre e imobilizada em EDB, variou-se o pH do tampão utilizado na análise de atividade. Os tampões utilizados foram carbonato de sódio (pH 9), fosfato de sódio (pH 6, 7 e 8) e acetato de sódio (pH 5), todos a 100 mM. As análises foram realizadas utilizando-se o óleo de oliva e temperatura de 37 °C.

O efeito da temperatura para a atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada foi avaliado variando-se a temperatura no intervalo de 25 a 55 °C para a enzima livre e imobilizada.

As análises foram realizadas utilizando-se o óleo de oliva e 100 mM tampão fosfato de sódio a pH 7,0.

5.5.3 Efeito do substrato e determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_m e $v_{m\acute{a}x}$) foram determinados a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Michaelis-Menten, em que é necessário o cálculo das atividades das reações, utilizando-se a enzima livre e imobilizada, versus as diferentes concentrações do substrato empregado (óleo de oliva). Foram utilizadas as concentrações de substrato de 2,5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50% (m/m) e a análise da atividade hidrolítica.

A partir dos parâmetros encontrados K_m , $v_{m\acute{a}x}$ e K_{cat}/K_m , utilizou-se respectivamente as equações 5, 6, 7 e 8 para a determinação de K_{cat} , a energia livre de Gibbs requerida para a formação do complexo ES (ΔG_{E-S}^*) e a energia livre de Gibbs requerida para a liberação do produto formado (ΔG_{E-T}^*) (SALEEM et al., 2005).

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{V (K_m + [S])}{[S]}, \quad (5)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E_t]}, \quad (6)$$

$$\Delta G_{E-S}^* = -RT \times \ln \frac{1}{K_m}, \quad (7)$$

$$\Delta G_{E-T}^* = -RT \times \ln \frac{K_{cat}}{K_m}, \quad (8)$$

em que:

V = velocidade de reação (μmol de substrato/min de reação);

$v_{m\acute{a}x}$ = velocidade de reação máxima (μmol de substrato/min de reação);

$[S]$ = concentração do substrato (mM);

K_m = constante de Michaelis-Menten (mM);

$[E_t]$ = concentração total de lipase ($\mu\text{mol/mL}$);

R = constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ/mol.K);

T = temperatura absoluta (K).

Além dos parâmetros cinéticos a energia de ativação (E_a) da enzima foi determinada através do ajuste dos dados experimentais e da equação de Arrhenius.

$$\ln AH = -\frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} + \ln A \quad (9)$$

em que:

AH = atividade hidrolítica (U/mL);

R = constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ/mol.K);

T = temperatura (K);

A = fator de frequência.;

5.5.4 Efeito do carregamento de proteína

O efeito da quantidade de proteína imobilizada no suporte EDB também foi verificado. A lipase foi imobilizada em diferentes carregamentos de 2 a 40 mg de proteína/g de suporte. Os ensaios foram realizados a 25°C e foi utilizado o tampão fosfato para pH 7 (5 mM) ao longo de 12 h, sob agitação de 170 rpm.

Os dados experimentais obtidos para o equilíbrio de adsorção foram ajustados ao modelo isotérmico não linear de Langmuir, equação 9.

$$q_e = \frac{q_{\max} \times C_e}{K_L + C_e}, \quad (10)$$

em que:

q_e = capacidade de adsorção em equilíbrio (mg proteína/g suporte);

C_e = massa residual de proteína em volume unitário da solução de lipase (mg proteína/mL);

q_{\max} = capacidade máxima de adsorção (mg proteína/g de suporte);

K_L = constante Langmuir relacionada com a energia de adsorção (mL/mg de proteína).

5.6 PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO

5.6.1 Otimização da hidrólise enzimática em reator de tanque agitado

Foram utilizados sistemas de 50 g compostos por óleo de soja residual, extrato bruto enzimático contendo a LGC e água destilada. As reações ocorreram a 40°C, pressão atmosférica, 1000 rpm por um período 40 min. A composição destes sistemas foi determinada

de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis: fração de óleo residual no sistema, dado pela porcentagem da razão da massa de óleo residual e a massa total do sistema (% m/m) e concentração da *LGC* (U/g de sistema). Como variável resposta ao planejamento foi calculada a porcentagem de ácidos graxos livres obtidos para o tempo de reação de 40 min. Na Tabela 6 encontram-se os níveis utilizados para o planejamento.

Tabela 6 – Níveis para as variáveis do DCCR: fração de óleo residual no sistema e concentração de lipase

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
x ₁ Fração de óleo residual (% m/m)	15,9	20	30	40	44,1
x ₂ Conc. de lipase (U/g de sistema)	1,75	2,2	3,3	4,4	4,85

Fonte: Do Autor.

Alíquotas de 1 g foram retiradas após 40 min de reação. Essas alíquotas foram transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 10 mL de solução álcool-acetona (1:1 v/v), 3 gotas de fenolftaleína e tituladas com solução de NaOH 20 M, previamente padronizado. O mesmo procedimento foi utilizado para preparo do branco, porém a adição de meio de cultivo foi utilizada no lugar do extrato enzimático. Com os dados obtidos da titulação da amostra e do branco, e o auxílio da equação 15 (ROONEY; WEATHERLEY, 2001), a porcentagem hidrolisada do óleo de fritura pode ser calculada.

$$\text{Hidrólise (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times 10^{-3} \times M_{\text{NaOH}} \times \text{MM}}{A \times f} \times 100 \quad (11)$$

em que:

V = volume de solução de hidróxido de sódio (mL) necessário durante a titulação;

M = concentração de NaOH (20 mM);

MM = massa molecular média de ácidos graxos para o óleo de soja em g/mol (278,6 g/mol);

A = massa da amostra (g);

f = fração de óleo no início da reação.

O planejamento foi validado em uma das melhores condições obtidas, com a execução de um ensaio em triplicata. Neste ensaio ainda foi realizado o acompanhamento da reação de hidrólise com o tempo.

5.6.2 Esterificação enzimática

Os ácidos graxos oriundos do óleo residual de fritura, obtidos pela etapa de hidrólise foram utilizados para a etapa de esterificação. A mistura resultante da hidrólise foi lavada com água destilada (cinco vezes), para a separação da fase pesada (glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos) da fase leve (ácidos graxos livres). A fase leve ainda foi seca com adição de sulfato de sódio anidro.

Os ácidos graxos purificados e secos, foram adicionados em três concentrações molares diferentes para a reação de esterificação (100 mM, 500 mM e 1000 mM). O álcool etílico anidro foi utilizado na proporção equimolar para todas as reações. O solvente orgânico, hexano, foi adicionado, na quantidade adequada, para completar o volume em 10 mL. A lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em EDB (40 mg/g de suporte) foi utilizada na proporção de 10% de mistura reacional, para todas as reações.

A mistura reacional (10 mL), juntamente com o biocatalisador, foi transferida para um frasco de vidro com tampa de 100 mL e incubada a 40°C sob agitação de 200 rpm.

As amostras foram retiradas após os tempos de 1, 3 e 6 h de reação, diluídas em 10 mL de uma mistura de etanol/acetona 1:1 (v/v) e tituladas com uma solução padrão de NaOH 20 mM, usando fenolftaleína como indicador. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As reações em branco foram realizadas adicionando-se o suporte na mistura de reação e nenhuma conversão foi observada após 6 h de incubação.

5.6.2.1 Estabilidade operacional

A síntese do biodiesel foi realizada sob as melhores condições experimentais; concentração molar de ácidos graxos (1000 mM) e etanol na proporção estequiométrica em meio contendo hexano à 40° C e 200 rpm de agitação, durante 3 h. A reação foi catalisada pela *LPF* imobilizada em EDB (40 mg/ g de suporte) na proporção de 10% do meio reacional (V = 10 mL). Foram utilizados seis ciclos sucessivos de 3 h cada um.

Ao final de cada ciclo, o biocatalisador foi retirado da mistura reacional por filtração e lavado com hexano para remover os reagentes ou as moléculas de produto retidas no microambiente do biocatalisador. Após esse procedimento o biocatalisador era reintroduzido em uma nova reação e assim sucessivamente até completar os seis ciclos.

5.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.7.1 Determinação da atividade hidrolítica

A determinação da atividade hidrolítica da *LGC* foi realizada pela hidrólise do óleo de oliva em emulsão pelo método adaptado de Soares e seus colaboradores (1999). O substrato foi preparado pela mistura de 50 mL de óleo de oliva com 50 mL de solução de goma arábica a 7% (m/v) como agente tensoativo (ALVES et al., 2016). Para as enzimas comerciais foi utilizado 25 g de óleo de oliva e 75 g de solução de goma arábica a 3% (m/v) como agente tensoativo. A mistura reacional continha 5 mL de emulsão, 4,9 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (100 mM) e 0,1 mL de amostra contendo a lipase livre, ou 5mL de tampão e 0,1 g para a lipase imobilizada. A mistura foi incubada por 5 minutos, a uma temperatura de 37 °C e sob condições de agitação de 200 rpm em um agitador orbital. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de álcool/acetona na proporção de 1:1. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de 20 mM de hidróxido de sódio com a presença de fenolftaleína como indicador. O branco da reação foi realizado adicionando-se 0,1 mL do meio de cultivo autoclavado utilizado para a fermentação no caso *LGC*, ou 0,1 mL de tampão fosfato pH 7,0 no caso das lipases comerciais ou 0,1 g do suporte empregado para a imobilização.

Uma unidade internacional de atividade hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido graxo livre por minuto sob as condições experimentais descritas acima. A equação 16 a seguir descreve a expressão para o cálculo da atividade hidrolítica da enzima em estudo.

$$\textit{Atividade} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{(\bar{V}a - Vb) \times N \times 10^3}{t \times Vc}, \quad (12)$$

em que:

$\bar{V}a$ = volume médio (mL) gasto na titulação das amostras;

Vb = volume (mL) gasto na titulação do branco;

V_c = volume (mL) da amostra usada na reação;

N = normalidade da solução de NaOH;

t = tempo de reação (min).

5.7.2 Determinação da quantidade de proteína

A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) e foi utilizado como padrão a proteína BSA (albumina sérica bovina).

5.7.3 Caracterização do biodiesel produzido

O biodiesel produzido foi caracterizado através de cromatografia gasosa e outras análises importantes como quantidades de glicerol livre, monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG) e triacilglicerol (TAG) e viscosidade.

A cromatografia gasosa foi usada para determinar a composição e os constituintes do biodiesel, sendo o cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Plus utilizado seguindo as normas ABNT NBR 15908, para determinação da glicerina total, que é a soma da glicerina livre (0,02 %_{massa}) e glicerina combinada (mono-, di- e triglicerídeos), que estabelece limite máximo de 0,25 %_{massa}, e ABNT NBR 15764 para a determinação total de ésteres estabelecendo teor mínimo de 96,5 %_{massa} (LÔBO et al., 2009; ANP, 2014).

Para a viscosidade foi utilizado viscosímetro de marca Brookfield, modelo DV-II+ Pro.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

Sabe-se que para a produção de biodiesel não há uma especificação oficial para todas as propriedades físico-químicas da matéria-prima a ser empregada. Entretanto, há estudos que relatam que dependendo da rota escolhida as propriedades físico-químicas da matéria-prima podem influenciar no desempenho da(s) reação(ões), sendo portanto, muito importante sua caracterização (CANAKCI; SANLI, 2008; TALEBIAN-KIAKALAIEH et al., 2013; VESCOVI et al., 2016)

As análises físico-químicas do óleo de soja residual utilizado neste trabalho estão representadas na Tabela 10. As propriedades foram determinadas e comparadas com valores encontrados na literatura e também com a normativa para o óleo de soja refinado (comercial).

As propriedades físico-químicas encontradas para o óleo de soja residual quando comparadas ao óleo de soja refinado (Tabela 7) apresentaram valores dentro dos padrões especificados, com exceção do índice de acidez total e de saponificação.

Tabela 7 – Propriedades físico-químicas calculadas para o óleo de soja residual e sua comparação com valores de referência (óleo de soja comercial) e encontrados na literatura

Propriedade Avaliada	Valores obtido	Valores referência	Valores literatura
Índice de acidez total (mg/g)	0,69 ± 0,01	< 0,5 ^a	2,90 ^b
Índice de peróxido (meq/Kg)	9,50 ± 0,02	< 10 ^c	9,85 ^b
Índice de saponificação (mgKOH/g)	155,50 ± 8,26	189-195 ^c	189,4 ^b
Teor de ácidos graxos livres (% mg/g)	0,35 ± 0,01	< 0,6 ^d	0,79 ± 0,25 ^e
Teor de umidade (%) (25 ° C)	0,24 ± 0,01	-	0,10 ± 0,01 ^e
Densidade (g/mL) (25 ° C)	0,92 ± 0,00	0,922 ^c	0,916 ^f
Viscosidade (cP) (40 ° C)	23,51 ± 0,11	-	23,49 ^e

Nota: ^a ANP (2012); ^b MORAIS (2012); ^c ANVISA (1999); ^d MAPA (2006); ^e TINTOR (2015); ^f SANTOS (2018)

Fonte: Do autor.

O índice de acidez total indica a deterioração do material lipídico em termos de rancidez hidrolítica, sendo importante para a identificação da qualidade em que se encontra o óleo residual. Este parâmetro faz uma relação direta entre a quantidade e variedade dos ácidos graxos oxidados ou hidrolisados, devido ao tempo de uso e a ação do processo de fritura na amostra analisada. Por esse motivo, valores diferentes aos obtidos para o óleo refinado já eram esperados, pois para o óleo residual houve a hidrólise dos triglicerídeos durante o processo de fritura, causando consequentemente um aumento do seu índice de acidez total.

O valor encontrado para o índice de acidez total foi de 0,69 mg/g, sendo o valor do óleo refinado de até 0,5 mg/g. A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, por meio da Resolução ANP nº 14 de 11 de maio de 2012, estabelece que o teor de acidez máximo não pode ultrapassar 0,5 mg de KOH/ g de biodiesel. Assim, matérias-primas com elevado índice de acidez não são recomendadas para a produção de biodiesel via transesterificação por catalise alcalina, pois podem gerar um biodiesel com elevado índice de acidez, entretanto isso não é um problema para a rota de hidroesterificação. Nesta rota duas reações sequenciais são empregadas o que torna possível a utilização de matérias-primas com elevado teor de acidez (VESCOVI et al., 2016). Dessa forma, o valor do índice de acidez encontrado neste trabalho, para o óleo residual, não prejudicará a qualidade do biodiesel final, pois o mesmo será obtido via hidroesterificação.

Para o índice de peróxido tem-se, segundo Malacrida e seus colaboradores (2003), que para os óleos seu valor não pode ultrapassar 10 meq/kg para uso alimentício, o que indica uma baixa probabilidade de deterioração oxidativa, valor disciplinado também na Resolução RDC nº 482/99 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Assim, o valor encontrado neste trabalho para o índice de peróxido, de 9,50 meq/kg, está abaixo do valor máximo permitido, confirmando que o óleo poder ser utilizado na produção de biodiesel.

Os valores referentes ao índice de saponificação são estabelecidos pela ANVISA e também na Resolução RDC nº 482/99, numa faixa de 189 – 195 mg KOH/g para o óleo de soja refinado. O índice de saponificação é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para saponificar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama da amostra e, portanto, quanto mais alto for o índice de saponificação, melhor é a qualidade do óleo (MORETTO; FETT, 1998). O valor encontrado no óleo residual utilizado foi de $155,50 \pm 8,26$ mg KOH/g, podendo inferir a um possível estágio de degradação dos ácidos graxos presentes na amostra, decorrentes do processo de fritura, uma vez que o valor se encontra abaixo do limite inferior disciplinado pela ANVISA para o óleo de soja refinado.

Quanto ao teor de ácidos graxos livres, o valor encontrado neste trabalho foi de 0,35 % mg/g, o qual encontra-se dentro dos valores disciplinados pela Instrução Normativa MAPA nº 49, de 22 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, que para o óleo de soja refinado de uso alimentício determina valores entre 0,2 – 0,6 mg/g.

Dificuldades foram encontradas para se correlacionar valores e metodologias encontradas na literatura a respeito do índice de acidez total e teor de ácidos graxos livres, uma

vez que além de vários autores referenciarem estes como sinônimos, valores em porcentagem, que são apenas comuns para teor de ácidos graxos livres, foram encontrados para índices de acidez. Tintor e seus colaboradores (2015) que utilizou óleo residual de soja para a produção de biodiesel via transesterificação enzimática, reportou um valor de 0,79 mg/g para teor de ácidos graxos livres e 0,39 mg/g para o índice de acidez total.

As normas e legislações analisadas não apresentaram nenhuma descrição quanto ao teor de umidade para o óleo de soja refinado, entretanto, estudos relataram que altas taxas de umidade podem reduzir o rendimento da produção de biodiesel, principalmente via transesterificação. Assim, um valor de 0,05 % para o teor de umidade é considerado um valor aceitável, podendo variar quanto ao do tipo de rota de produção (CAVALCANTE et al., 2010; NAZ et al., 2004; CANAKCI et al., 2008).

Tintor e seus colaboradores (2015) reportaram um valor de umidade de $0,10 \pm 0,01$ %, enquanto que o valor encontrado para umidade neste trabalho foi de $0,24 \pm 0,01$ %. Apesar deste valor estar acima do valor aceitável descrito em literatura para a produção de biodiesel, que é de 0,05 % para o teor de umidade, é importante salientar que neste trabalho a rota escolhida para a produção de biodiesel foi a rota de hidroesterificação com catálise enzimática. Dessa forma, a presença de água no óleo residual na etapa de hidrólise não irá prejudicar a catálise enzimática, pois a reação ocorre na presença de água. Entretanto, um alto teor de umidade na matéria-prima para a produção de biodiesel não é desejado na rota de transesterificação, principalmente quando é utilizado o catalisador químico alcalino, pois a presença de água favorece a saponificação produzindo sabões a partir da reação dos ácidos graxos livres com o catalisador (VESCOVI et al., 2016).

A densidade encontrada está dentro dos valores especificados segundo a ANVISA, que estabelece valor de 0,922 g/ml (25°C) para o óleo de soja refinado, sendo o valor encontrado de 0,92 g/ml (25°C) (ANVISA, 1999). Assim, para o óleo de soja residual, não foi verificado nenhuma alteração em relação densidade, quando comparado ao óleo de soja refinado, mesmo após sua utilização na fritura de alimentos.

Em relação a viscosidade, nas normas e legislações analisadas, não foram encontrados nenhuma descrição a este respeito, podendo então inferir que não há especificações quanto a viscosidade para óleos e gorduras comercializados. Tintor e seus colaboradores (2015) fazem referência a um valor muito próximo ao verificado (23,49 cP).

6.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* (LGC) VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Após as 48 horas de fermentação, o caldo foi filtrado à vácuo utilizando-se papel filtro Whatman 41. O filtrado contendo a LGC (22,9 U/ml) foi utilizado para os estudos subsequentes.

Conforme relatado por Ramos e seus colaboradores (2015) a utilização de um meio de fermentação sintético, propiciou a produção pelo *Geotrichum candidum* de apenas uma única proteína que corresponde a lipase de massa molecular aparente de 65 kDa, diminuindo dessa forma a complexidade da etapa de purificação subsequente.

Dessa forma, na etapa de precipitação por solvente orgânico (que correspondem às três precipitações realizadas em sequência), somente a lipase produzida foi precipitada, sendo obtida uma recuperação em torno de 90% da atividade inicial utilizada (FERREIRA et al., 2018).

6.3 SELEÇÃO DE LIPASES PARA A ETAPA DE ESTERIFICAÇÃO

Estes ensaios foram destinados para a seleção de um biocatalisador que apresentasse uma boa taxa de conversão dos ácidos graxos livres em etil-ésteres, em um menor tempo de reação. Assim, buscou-se utilizar uma alta carga enzimática no suporte para permitir uma elevada atividade catalítica e, conseqüentemente, uma reação mais rápida (BLANCH; CLARK, 1997).

Dessa forma, quatro diferentes tipos de lipases foram imobilizadas, via adsorção, em três suportes hidrofóbicos distintos. Os parâmetros de imobilização obtidos para cada biocatalisador estão mostrados na tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros de imobilização obtidos na imobilização das diferentes lipases (*LGC*, *LTL* e *LPS*) em três suportes distintos (PMA, EDB e PPS)

Biocatalisador	RI ^a (%)	PI ^b (mg/g de suporte)	AH ^c (U/g de suporte)	AR ^d (%)
<i>LGC</i> -PMA	89,29 ± 0,34	9,92 ± 1,09	12,24 ± 1,59	1,96 ± 0,39
<i>LGC</i> -EDB	95,24 ± 1,01	9,52 ± 0,01	8,30 ± 1,07	1,19 ± 0,02
<i>LGC</i> -PPS	97,89 ± 0,23	9,87 ± 1,21	39,61 ± 1,32	5,78 ± 0,07
<i>LTL</i> - PMA	93,70 ± 0,21	37,48 ± 0,98	323,14 ± 2,56	11,37 ± 0,07
<i>LTL</i> - EDB	95,23 ± 0,14	38,10 ± 0,07	140,60 ± 3,04	4,93 ± 0,01
<i>LTL</i> - PPS	90,05 ± 0,76	36,02 ± 0,52	338,20 ± 5,33	13,83 ± 0,02
<i>LPF</i> - PMA	15,32 ± 0,03	16,24 ± 0,03	117,73 ± 2,77	10,34 ± 0,22
<i>LPF</i> - EDB	15,29 ± 0,76	16,01 ± 0,12	108,18 ± 9,71	5,23 ± 0,04
<i>LPF</i> - PPS	15,08 ± 0,59	14,97 ± 0,09	124,92 ± 3,07	12,51 ± 0,21
<i>LPS</i> - PMA	85,98 ± 0,55	41,82 ± 2,68	7,89 ± 0,04	33,17 ± 0,42
<i>LPS</i> - EDB	89,48 ± 0,43	41,18 ± 4,17	23,18 ± 0,52	93,65 ± 1,30
<i>LPS</i> - PPS	89,84 ± 0,11	40,60 ± 3,10	65,74 ± 0,43	264,50 ± 3,31

Nota: ^a Rendimento de imobilização; ^b Proteína imobilizada; ^c Atividade hidrolítica do derivado ^d Atividade recuperada.

Fonte: Do autor.

Para a lipase purificada de *G. candidum* foi oferecido uma carga de 10 mg de proteína, que correspondeu a uma atividade inicial de 669,72 U/mL. Por ser uma lipase produzida, existem algumas limitações no processo de obtenção da mesma como a formação de agregados bimoleculares, que fizeram com que o valor de 10 mg de proteína fosse o máximo carregamento possível de se obter para os ensaios de imobilização executados.

Já para as enzimas comerciais optou-se pelo carregamento de 40 mg de proteína, pois na literatura esse valor é atribuído a saturação do suporte de PMA para a *LTL* (37,5 ± 0,4 mg/g de PMA e 217,8 ± 1,1 U/g) relatado por Bassi e seus colaboradores (2016). Como se desejava a comparação entre esses biocatalisadores, um mesmo valor de proteína a ser oferecida foi adotado para todas as lipases comerciais (40 mg de proteína), uma vez que para o suporte EDB os valores de saturação do suporte reportados na literatura para a *LTL* são bem mais elevados (133,9 ± 1,3 mg /g de EDB) (ALVEZ et al., 2017). O mesmo pode-se afirmar para a *LPS* imobilizada em PMA (181,9 ± 4,5 mg/ g de PMA) (BASSI et al., 2016). Para a enzima *LPF* não foram encontradas citações em literatura da imobilização desta enzima nos suportes empregados.

O maior rendimento de imobilização foi obtido para a *LGC* purificada (97,89 ± 0,23) com o suporte polipropileno (PPS), sendo imobilizada 9,87 ± 1,21 mg de proteína por grama

de suporte. Os demais suportes (EDB e PMA) também apresentaram um bom rendimento de imobilização para essa lipase. Entretanto, para a LGC a atividade hidrolítica para os derivados obtidos foi baixa ($8,30 \pm 1,07$ a $39,61 \pm 1,32$), se comparada a atividade inicial oferecida ($669,72$ U/mL). Consequentemente, os valores de atividade recuperada para essa lipase também foram pequenos ($1,19 \pm 0,02$ a $5,78 \pm 0,07$). Uma possível explicação para esse comportamento pode ser atribuída ao tipo de imobilização realizado.

A adsorção física em suporte hidrofóbico (ativação interfacial) normalmente fornece uma hiperativação quando as lipases imobilizadas são comparadas com a sua forma livre (BASTIDA et al., 1998). No entanto, esse efeito é fortemente reduzido quando são utilizados substratos não solúveis, como o óleo de oliva para a determinação da atividade.

Pelo mecanismo de ativação interfacial em suportes hidrofóbicos, o centro ativo da lipase é orientado para a superfície do suporte. Se o espaço entre o suporte e o sítio ativo da lipase é pequeno, pode-se ter uma baixa acessibilidade de substratos grandes como os triglicerídeos, ao sítio ativo da lipase, resultando em uma baixa atividade hidrolítica para o derivado (FERREIRA et al., 2018).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* apresentou valores de imobilização acima de 90% para todos os suportes empregados, e consequentemente quase toda a proteína oferecida (40 mg) foi imobilizada. Este resultado está de acordo com o reportado por Bassi et al (2016) para o PMA e por Alves e seus colaboradores (2016) para o EDB.

A lipase de *Pseudomonas fluorescens* apresentou os menores valores de rendimento de imobilização dentre as lipases utilizadas. Uma possível explicação para este comportamento é o fato desta lipase ser vendida comercialmente junto com proteínas estabilizantes em sua formulação, como por exemplo, albumina, que é usada para estabilizar soluções enzimáticas (BLANCO et al., 2004). Esses outros componentes presentes poderiam estar competindo com a lipase durante a imobilização. Outra possível explicação seria que, para a concentração utilizada, a LPF estaria formando agregados bimoleculares, preferencialmente pelo sítio ativo, impedindo que a lipase se ligasse ao suporte via ativação interfacial (PALOMO et al., 2003; VESCOVI et al., 2017).

6.3.1 Ensaios prévios para a esterificação enzimática

Todos os derivados obtidos foram empregados na síntese do oleato de etila. O óleo de soja possui 24 % m/m de ácido oleico em sua composição, além disso, o Brasil é um grande

produtor de álcool etílico. Por esse motivo essa reação foi escolhida como padrão para selecionar o melhor biocatalisador a ser empregado na etapa de esterificação, dentro da via de produção de biodiesel por hidroesterificação.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados obtidos para a reação de esterificação entre o ácido oleico e o álcool etílico na razão de 1:1 e 100 mM, após 150 min de reação.

Tabela 9 – Resultados obtidos após 150 min para a reação de esterificação do oleato de etila, utilizando os derivados obtidos pela combinação das lipases (*LGC*, *LTL* e *LPS*) imobilizadas em três suportes distintos (PMA, EDB e PPS)

Biocatalisador	Y^a (%)	Biocatalisador	Y^a (%)
<i>LGC</i> -PMA	20,44 ± 0,65	<i>LPF</i> - PMA	41,30 ± 0,01
<i>LGC</i> -EDB	11,48 ± 0,10	<i>LPF</i> - EDB	70,31 ± 0,96
<i>LGC</i> -PPS	13,87 ± 0,37	<i>LPF</i> - PPS	68,94 ± 0,32
<i>LTL</i> - PMA	65,53 ± 0,55	<i>LPS</i> - PMA	3,07 ± 0,06
<i>LTL</i> - EDB	62,46 ± 0,28	<i>LPS</i> - EDB	0,00 ± 0,19
<i>LTL</i> - PPS	63,48 ± 0,54	<i>LPS</i> - PPS	0,00 ± 0,65

Nota: ^a Porcentagem de conversão e oleato de etila

Fonte: Do autor.

A *LPF* imobilizada em EDB foi o derivado que obteve a maior porcentagem de conversão para a reação de esterificação empregada, chegando a 70,31 ± 0,96 % em apenas 150 min de reação. É importante destacar, que a *LPF* foi a enzima que apresentou o menor rendimento de imobilização dentre as lipases comerciais utilizadas, demonstrando que a imobilização nos suportes selecionados propiciou que essa lipase fosse mais ativa para a reação de esterificação do que para a reação de hidrólise (determinação da atividade lipolítica).

O processo de imobilização pode provocar alterações na atividade, especificidade ou seletividade da lipase imobilizada. Estas alterações nas propriedades da enzima podem, ou não, estarem associadas a mudanças na conformação de sua estrutura enzimática. Algumas vezes, estas alterações são positivas, como por exemplo, a estabilização da forma ativa das lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos via ativação interfacial. Entretanto, nem sempre as alterações resultarão em aspectos positivos e por esse motivo a preparação de uma vasta coleção de biocatalisadores, é uma boa estratégia para se encontrar um derivado adequado à reação em que se deseja aplicar a catálise enzimática (MATEO et al., 2007; BARBOSA et al., 2011; FÉRNANDEZ-LORENTE et al., 2007).

Assim, pelas razões discutidas anteriormente a *LPF* imobilizada em EDB foi selecionada para ser aplicada na etapa de esterificação para produção do biodiesel utilizando óleo de soja

residual. Além disso, a imobilização desta lipase em EDB ainda é inédita em literatura, contribuindo também para sua escolha na continuidade deste trabalho

Dessa forma, foram realizados os ensaios de caracterização do derivado, determinação dos parâmetros cinéticos, estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos.

6.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* (LPF)

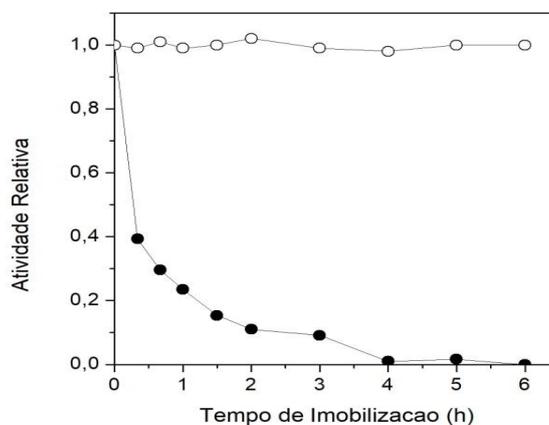
6.4.1 Imobilização da LPF

A LPF foi imobilizada em estireno-divinilbenzeno (EDB) por adsorção em superfície hidrofóbica pelo mecanismo de ativação interfacial, utilizando-se baixo carregamento (2 mg/ g de suporte), para evitar problemas difusionais.

O processo de imobilização da LPF no suporte resultou em uma diminuição da atividade hidrolítica no sobrenadante (Figura 14). Não houve diminuição da atividade da LPF no controle (solução enzimática solúvel encubada). Dessa forma, pode-se afirmar que a diminuição da atividade no sobrenadante pode ser atribuída à imobilização da enzima por adsorção física na superfície de suporte.

Após 4 h de incubação, a imobilização da LPF em EDB atingiu o equilíbrio com a imobilização de praticamente 100% da atividade oferecida. Este derivado foi utilizado para todos os ensaios de caracterização mostrados na Figura 14.

Figura 14 – Atividade hidrolítica relativa no sobrenadante resultante da imobilização da LPF em EDB (●) à 25 °C, pH 7,0 (tampão de fosfato de sódio 5 mM), e na solução controle (○)



Fonte: Do autor.

6.4.2 Efeito do pH e da temperatura

O efeito do pH na atividade catalítica da *LPF* imobilizada em EDB foi determinado pela hidrólise do óleo de oliva em emulsão para o intervalo de pH variando de 4 a 9 (Figura 15.a). Os resultados obtidos para a lipase imobilizada foram comparados com os resultados da *LPF* livre.

Dentre os valores de pH avaliados, tanto a *LPF* imobilizada quanto a lipase livre, apresentaram uma maior atividade hidrolítica para o pH 8, correspondendo a uma atividade de 150,9 e de 72,1 U/mL para *LPF* livre e imobilizada respectivamente. Assim, pode-se afirmar que a imobilização em EDB não alterou o pH da enzima livre. Este resultado corrobora com o resultado relatado por Santos e seus colaboradores (2008), no qual foi descrito que a *LPF* livre e a imobilizada em polisiloxano–polivinil álcool ativado com glutaraldeído, apresentaram um mesmo pH ótimo de 8,3. Liu e seus colaboradores (2017) também relataram ser 8,0 o pH ótimo da lipase livre de *Pseudomonas fluorescens*.

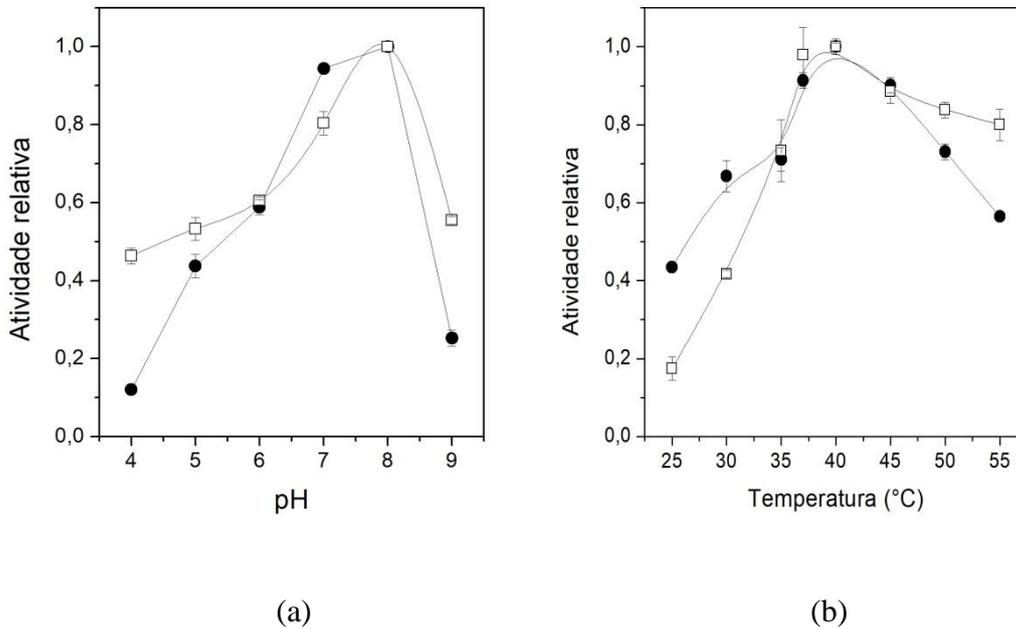
Para toda a faixa de pH estudada, a exceção do pH 7, a imobilização da lipase proporcionou uma melhor retenção da sua atividade, quando comparada à lipase livre. Destaca-se que para o pH 9, a *LPF* imobilizada manteve 50% de sua atividade máxima, (determinada para o pH ótimo de 8), enquanto que para a enzima livre houve a perda de 75% de sua atividade.

O efeito da temperatura (faixa de 25 a 55°C) foi determinado para a atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada (Figura 15.b). A máxima atividade hidrolítica tanto para a lipase livre, quanto para a imobilizada, foi observada para a temperatura de 40°C, correspondendo a uma atividade de 347,5 e a 92,8 U/mL para *LPF* livre e imobilizada respectivamente. Entretanto, para temperaturas acima de 40°C os resultados obtidos demonstraram que a imobilização auxiliou a *LPF* a manter a sua estabilidade, quando comparada à *LPF* livre (Figura 14.b).

Normalmente, quando as enzimas são imobilizadas, há uma interação entre a enzima e a superfície do suporte, que pode proporcionar uma conformação mais rígida para a molécula de proteína, resultando em uma forma globular mais estável e ativa em temperaturas mais altas, para este biocatalisador (VILLENEUVE et al., 2000).

Ainda, o aumento da temperatura de 25 para 40 °C propiciou um aumento dos valores iniciais da velocidade de reação, devido a uma possível diminuição da viscosidade do meio reacional e a uma maior frequência das colisões entre a lipase e as moléculas de substrato favorecendo a reação de hidrólise do óleo de oliva (GUO et al., 2006).

Figura 15 – Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica da *LPF* livre (●) e imobilizada (□) em EDB. (a) pH (reações realizadas a 37°C); (b) Temperatura (reações realizadas em pH 7)

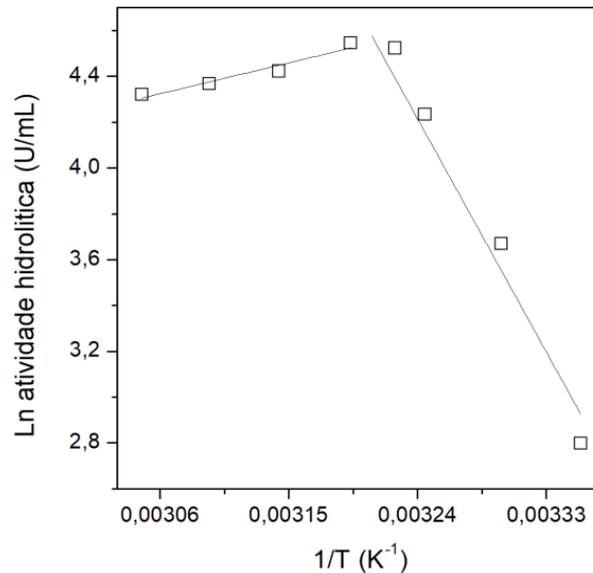


Fonte: Do autor.

O cálculo da energia aparente de ativação (E_a), que é a energia requerida para a ativação do complexo enzima substrato (ES) foi realizado para a enzima imobilizada, utilizando-se a equação de Arrhenius, no intuito de se ter uma melhor avaliação da influência da temperatura (Figura 16).

É possível observar que acima do ponto de inflexão da curva, houve um decréscimo das atividades iniciais, devido à distorção e consequente inativação da *LPF*. O valor da energia aparente de ativação (E_a) encontrado para a lipase imobilizada foi de $94,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto que o valor para a energia de inativação foi de $-12,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Os valores da *LPF* imobilizada não foram comparados com a lipase livre, pois a mesma se encontrava misturada com estabilizantes que poderiam mascarar a influência do aumento de temperatura no cálculo da energia de ativação (BLANCO et al., 2004).

Figura 16 – Determinação da energia de ativação, utilizando a equação de Arrhenius, para a *LPF* imobilizada. O coeficiente de determinação (R^2) para o ajuste foi acima de 0,94



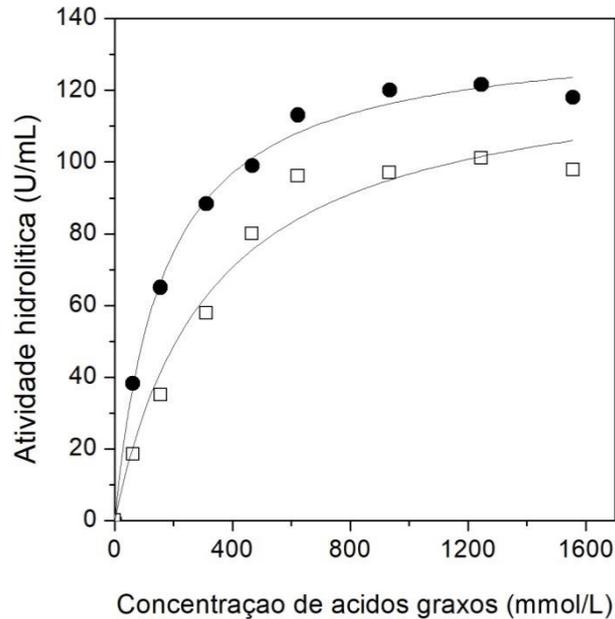
Fonte: Do autor.

6.4.3 Efeito do substrato e determinação dos parâmetros cinéticos

O modelo de cinética de Michaelis-Menten foi adotado para avaliação da influência da concentração de substrato (óleo de oliva), na atividade hidrolítica da *LPF* livre e imobilizada (Figura 17). Elevados coeficiente de determinação tanto para a lipase livre ($R^2= 0,99$), quanto para a lipase imobilizada ($R^2= 0,97$) foram obtidos para os parâmetros cinéticos como $v_{m\acute{a}x}$ e K_m (Tabela 13) utilizando o software Origin pro 8.0. A quantidade de proteína utilizada tanto para a *LPF* livre quanto para a imobilizada foi a mesma para todos os ensaios (0,2 mg de proteína), visando garantir a comparação dos resultados.

Na Tabela 10, observa-se que a quantidade de produto formado por minuto de reação ($v_{m\acute{a}x}$) foi levemente maior para a lipase livre (136,65 U/mL) do que para lipase imobilizada (128,06 U/mL). O valor de K_m é determinado pela quantidade necessária de substrato para se obter a metade da atividade máxima. Para a lipase livre foi obtido um valor de K_m de 164,07 mmol/L, enquanto para a lipase imobilizada foi observado um valor de K_m de 325,15 mmol/L. Os resultados obtidos indicaram que a imobilização da *LPF* suporte EDB limitou levemente o poder catalítico da lipase, provavelmente devido a conferência de uma maior rigidez à enzima. Comportamentos similares foram reportados para Santos e seus colaboradores (2008), para a *LPF* imobilizada em polisiloxano–polivinil álcool modificado quimicamente.

Figura 17 – Efeito da concentração de ácidos graxos livres (AGL) para a *LPF* livre (•) e imobilizada em EDB (□). As reações foram realizadas a 45°C e pH 7, utilizando-se óleo de oliva emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min



Fonte: Do autor.

Tabela 10 – Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a *LPF* livre e imobilizada em EDB em reações de hidrólise utilizando óleo de oliva emulsificado

Parâmetros	Enzima imobilizada		Enzima livre	
V_{\max} (U/mL)	128,06		136,65	
K_m (mmol/L)	325,15		164,07	
k_{cat} (min^{-1})	22549,50		21132,01	
k_{cat}/K_m	137,44		64,99	
$1/K_m$	0,0031		0,0061	
ΔG_{E-S} (kJ/mmol)	13,15		14,91	
ΔG_{E-T} (kJ/mmol)	-12,69		-10,76	

Fonte: Do autor.

O número máximo de reações catalisadas por minuto e por sítio catalítico é dado por k_{cat} . Os valores encontrado de k_{cat} tanto para a lipase livre imobilizada foram muito similares (Tabela 10).

A energia livre de Gibbs serve para determinar o grau de espontaneidade com que ocorre a interação da enzima com o substrato, ou seja, na fase de afinidade (ΔG_{E-S}). Quando os resultados são positivos significa que essa interação não é espontânea e assim para que ocorra

a formação do complexo enzima-substrato (ES) é necessário o fornecimento de energia para o sistema, através do aumento de temperatura (SALEEM et al., 2005). Os resultados encontrados tanto para a LPF livre quanto imobilizada foram positivos e muito similares (14,91 e 13,15 kJ/mmol, respectivamente). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos para a temperatura ótima, para os quais foi verificado que é necessário um incremento da temperatura para que a reação atinja a máxima atividade hidrolítica tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada (em 40°C).

Quando a energia livre de Gibbs para a fase catalítica (ΔG_{E-T}) é negativa significa que esta reação é espontânea na fase de liberação do produto, ou seja, o grau de desordem da reação está aumentando, e a enzima está liberando para o sistema uma parte da energia recebida na fase de afinidade. Tanto para a LPF livre quanto para a imobilizada foram observadas energias negativas (ΔG_{E-T}) sendo que para o derivado o valor encontrado de ΔG_{E-T} foi de -12,69 kJ/mol, e para a lipase livre foi de -10,76 kJ/mol, demonstrando, assim, que a fase de liberação do produto formado foi espontânea.

6.4.4 Efeito do carregamento da proteína

Para se avaliar a influência da carga enzimática sobre as propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados por imobilização da LPF em EDB, foi oferecida uma concentração de proteínas que variou de 2 a 40 mg de proteína por grama de suporte. Na Tabela 11 encontram-se os resultados da influência do carregamento de proteína nos parâmetros de imobilização. Foram observadas a imobilização de 2,0 a 11,7 mg/g de suporte e atividades hidrolíticas de $71,8 \pm 2,4$ a $398,8 \pm 2,5$ U/ g de suporte para os derivados (Tabela 11). As imobilizações ocorreram a 25°C, pH 7,0 a baixa força iônica (5 mM) e a 12 h, que correspondeu ao tempo necessário para se atingir o estado de equilíbrio para todos os ensaios.

Tabela 11 – Influência do carregamento inicial de proteína nas propriedades catalíticas da *LPF* imobilizada em EDB

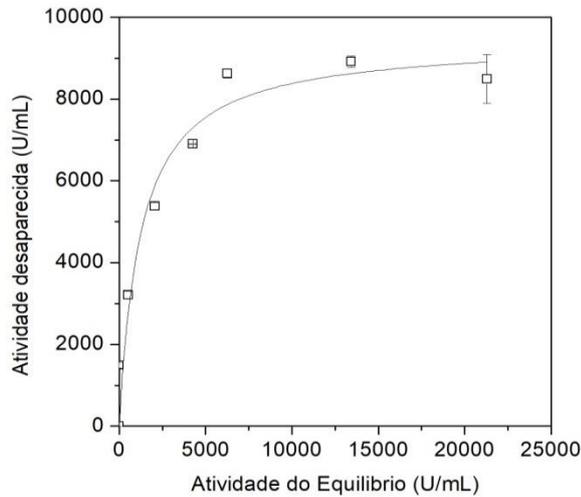
Carregamento de proteína (mg/g de suporte)	AO (U/mL)	AD (U/mL)	RI (%)	PI (mg/g de suporte)	AH (U/g de suporte)	AR (%)
2,0	1490,1 ± 69,7	1490,1 ± 69,7	100,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	71,8 ± 2,4	4,8 ± 0,1
5,0	3725,2 ± 98,2	3203,6 ± 95,0	86,0 ± 1,2	4,3 ± 0,2	127,4 ± 4,0	3,9 ± 0,2
10,0	7450,3 ± 91,9	5379,1 ± 89,0	72,2 ± 2,3	7,2 ± 0,1	152,6 ± 2,7	2,8 ± 0,3
15,0	11175,5 ± 210,5	6906,4 ± 10,5	61,8 ± 1,9	9,3 ± 0,5	252,0 ± 5,1	3,6 ± 0,0
20,0	14900,6 ± 22,1	8627,4 ± 112,6	57,9 ± 0,2	11,1 ± 0,2	378,7 ± 0,9	4,4 ± 0,1
30,0	22350,9 ± 431,8	8918,0 ± 142,9	39,9 ± 0,7	11,7 ± 0,1	398,8 ± 2,5	4,5 ± 0,0
40,0	29801,2 ± 519,6	8493,3 ± 601,3	28,5 ± 1,0	11,4 ± 0,3	328,9 ± 2,5	3,9 ± 0,8

AO = Atividade oferecida; AD = Atividade desaparecida; RI = Rendimento de imobilização; PI = Concentração de proteína, imobilizada; AH = Atividade hidrolítica; AR = Atividade recuperada.

Fonte: Do autor.

A isoterma de adsorção, determinada a partir do ajuste dos dados experimentais para o modelo de Langmuir (Figura 18), foi utilizada para avaliar a capacidade de adsorção do suporte empregado (EDB). No gráfico foi plotado a atividade desaparecida versus a atividade do sobrenadante no equilíbrio. O ajuste dos dados apresentou um bom coeficiente de determinação (0,95) e foi obtida uma máxima atividade desaparecida de 9420,54 (U/mL) na qual faz-se a correspondência com a máxima capacidade de adsorção do suporte (q_{max}). Assim, na Tabela 11 o valor de atividade desaparecida que mais se aproximou do obtido pelo gráfico foi de 8918,0 ± 142,9 correspondendo a 11,7 ± 0,1 mg de proteína por grama de suporte.

Figura 18 – Isoterma de Langmuir ajustada aos dados experimentais para a adsorção da *LPF* em EDB a 25° C em tampão fosfato (5 mM, pH 7,0)



Fonte: Do autor.

Dessa forma, pode-se afirmar que a imobilização atingiu a saturação do suporte EDB quando foi oferecido o valor inicial de 30 mg/g de suporte, resultando em uma imobilização de $39,9 \pm 0,7$ % da lipase oferecida ($11,7 \pm 0,1$ mg/g de suporte).

O suporte EDB possui uma área superficial e diâmetro de poro de, aproximadamente, $500 \text{ m}^2/\text{g}$ e 260 \AA , respectivamente (informação da Sigma-Aldrich) e a lipase de *Pseudomonas fluorescens* é uma proteína globular pequena, com um diâmetro molecular de aproximadamente 50 \AA (5 nm) (SCHRAG et al., 1997; KIERKELS et al., 1993). Assim, o poro do suporte é grande o suficiente para permitir a imobilização desta lipase e o livre acesso do substrato ao seu sítio ativo, diminuindo os problemas difusionais e corroborando para que o biocatalisador possa exibir uma elevada atividade catalítica (LIMA et al., 2015).

6.5 PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA HIDROESTERIFICAÇÃO

6.5.1 Otimização da hidrólise enzimática em reator de tanque agitado

Para a otimização da hidrólise enzimática do óleo de soja residual, foi utilizado um DCCR para duas variáveis: a fração de óleo residual utilizada no sistema (% m/m) e a concentração de lipase (*LGC*) utilizada no sistema (U/g de sistema).

A porcentagem de ácidos graxos livres obtidos (% hidrólise) para a reação de hidrólise do óleo de soja residual pela *LGC*, após 40 min de reação está mostrada na Tabela 12.

Tabela 12 – Matriz do DCCR 22 para a hidrólise do óleo de soja residual, utilizando a LGC. A resposta do planejamento foi a porcentagem de ácidos graxos livres obtida após 40 min de reação

Ensaio	Variáveis Codificadas (Reais)		Resposta
	Fração de óleo no sistema (% m/m)	Concentração de lipase (U/g de sistema)	Hidrólise (%)
1	-1 (20)	-1 (2,2)	42,08
2	1 (40)	-1 (2,2)	56,95
3	-1 (20)	1 (4,4)	98,36
4	1 (40)	1 (4,4)	60,70
5	-1,41 (15,9)	0 (3,3)	59,97
6	1,41 (44,1)	0 (3,3)	74,47
7	0 (30)	-1,41 (1,75)	12,15
8	0 (30)	1,41 (4,85)	81,47
9	0 (30)	0 (3,3)	40,02
10	0 (30)	0 (3,3)	37,34
11	0 (30)	0 (3,3)	38,59

Fonte: Do autor.

A maior porcentagem de hidrólise, de 98,36 %, foi obtida para o ensaio 3, no qual foram empregadas uma fração de óleo residual de 20 % (m/m) e uma concentração de enzima de 4,4 U/g de sistema. Já a menor porcentagem de hidrólise observada (12,15 %) foi para o ensaio 7, no qual foi utilizada a menor concentração de enzima (1,7 U/g de sistema) de todo planejamento.

O segundo melhor resultado para a hidrólise enzimática (81,47 %), correspondeu ao ensaio 8, no qual foi utilizado a maior concentração de lipase no sistema (4,85 U/g de sistema). Para a maior concentração de óleo utilizada (ensaio 6) foi observado uma porcentagem de hidrólise de 74,47 %. Esses resultados confirmaram que a lipase utilizada possui especificidade pelo substrato, o óleo de soja, pois ela foi capaz de hidrolisar uma grande quantidade de óleo em um tempo reduzido (40 min) quando comparada a outras lipases reportadas em literatura. Lipases provenientes de diferentes fontes mostram diferentes especificidades por substratos (capacidade de hidrolisar um tipo de éster de ácido graxo) (STRÁNSKÝ et al., 2007).

Esse tipo de especificidade é muito útil, pois lipases que não apresentam esta especificidade realizam a hidrólise das ligações que contenham ácidos graxos de cadeia longa muito lentamente (JACOBSEN; OLSEN; ALLERMANN, 1990).

Em trabalhos anteriores, realizados no laboratório de Bioprocessos, verificou-se que a LGC produzida, por fermentação submersa, utilizando-se o óleo de algodão como indutor e única fonte de carbono, apresentava uma elevada especificidade em hidrolisar as ligações ésteres dos triacilgliceróis que continham ácidos graxos de cadeia longa e insaturados nas

posições cis-9 ou cis-9,12, como nos ácidos oleico e linoleico (CASTRO et al., 2016).

Cavalcanti-Oliveira e seus colaboradores (2011) relataram que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* demorou cerca de 48 h para hidrolisar 89 % do óleo de soja presente em um sistema com condições muito similares ao utilizado neste trabalho (apenas água destilada, enzima e óleo de soja na fração de 50 % (volume de óleo/volume de sistema)).

Na tabela 13, estão apresentados outros estudos referentes a hidrólise do óleo de soja, refinado e residual, utilizando diferentes lipases. Os resultados mostrados evidenciam a vantagem de se utilizar a *LGC*, frente a essas outras lipases, em relação ao tempo de catálise e porcentagem de conversão do óleo vegetal em ácidos graxos livres. Essa vantagem decorre de sua elevada especificidade em hidrolisar ligações de ácidos graxos longos e insaturados como os ácidos oleico e linoleico, presentes em grande quantidade no óleo de soja (24,0 e 56,7 % em composição m/m, respectivamente) (SANTOS et al., 2013).

Tabela 13 – Estudos referentes a hidrólise do óleo de soja utilizando diferentes tipos de lipases

Lipase	Razão (óleo/solução aquosa)	Temperatura e tempo de reação	Conversão	Referência
<i>C. rugosa</i>	Óleo/tampão pH 8,0 (2:1 em peso)	40 °C, 5 h	88 %	TING et al., 2008
<i>C. rugosa</i>	Óleo/água (1:1 (v/v))	30 °C, 10 h	100 %	TALUKDER et al., 2010
<i>J. curcas</i>	Óleo/tampão (50% m/v)	40 °C, 2 h	99 %	DE SOUSA et al., 2010
<i>Y. lipolytica</i>	Óleo/água (200g/120ml)	40 °C, 48 h	92,5 %	MENG et al., 2011
<i>R. communis</i>	Óleo/tampão (44.1 (m/m))	37 °C, 80 min	32 %	SANTOS et al., 2013
<i>T. lanuginosus</i>	Óleo/água destilada (1:4 (v/v))	30 °C, 24 h	100 %	VESCOVI et al., 2016

Fonte: Do autor.

Na Tabela 14 encontram-se os coeficientes de regressão obtidos para o DCCR. O termo quadrático para a fração de óleo no sistema e o termo linear para a concentração de lipase foram estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Tabela 14 – Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR

	Coeficientes	Erro padrão	p-valor
Média	38,65	5,95	0,001
x ₁	-0,29	3,64	0,940
x ₁ ²	16,17	4,33	0,014
x ₂	19,76	3,6	0,003
x ₂ ²	5,95	4,33	0,228
x ₂ .x ₂	-13,13	5,15	0,051

Fonte: Do autor.

Na Tabela 15 encontra-se a ANOVA para o planejamento realizado. Verificou-se que o F_{calc} . (9,99) foi maior que o F_{tab} . (5,05) e que o coeficiente de determinação foi bom (0,91) permitindo a construção da superfície de resposta (Figura 19) para análise estatística do planejamento pelo modelo gerado com todos os coeficientes de regressão obtidos para as variáveis codificadas (Equação 17).

$$\text{Hidrólise (\%)} = 38,65 - 0,29x_1 + 16,17x_1^2 + 19,76x_2 + 5,95x_2^2 - 13,13x_1x_2 \quad (13)$$

em que:

x₁ = Variável codificada: fração de óleo no sistema (% m/m);

x₂ = Variável codificada: concentração de lipase (U/g de sistema).

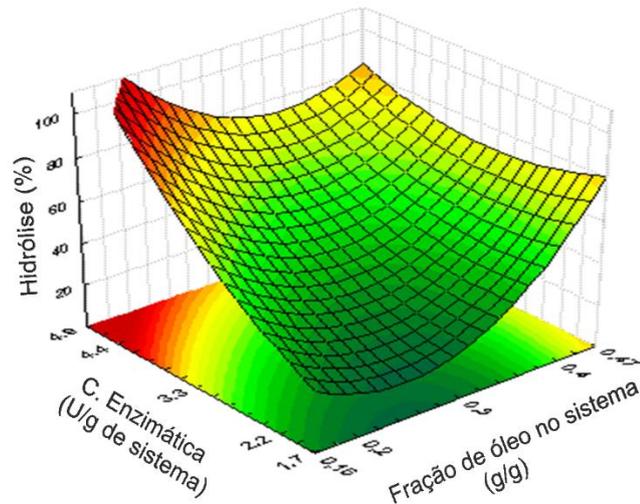
Tabela 15 – ANOVA para a resposta do DCCR 22, porcentagem de hidrólise do óleo de soja residual após 40 min de reação

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	5298,35	5	1059,67	9,99	0,013
Resíduos	530,34	5	106,07		
Falta de Ajuste	526,74				
Erro Puro	3,6				
Total	5828,69	10			

(R) = 0,91; $F_{tab_{5;5;0,05}} = 5,05$

Fonte: Do autor.

Figura 19 – Superfície de resposta em função da fração de óleo e da concentração enzimática no sistema



Fonte: Do autor.

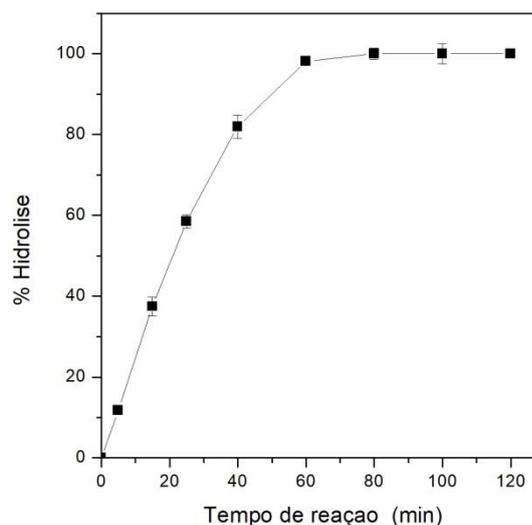
Observa-se pela Figura 19, que é possível obter-se uma conversão de 100 %, em um mesmo tempo reduzido de reação (40 min), para uma concentração enzimática acima de 4,4 (U/g de sistema) e fração de óleo no sistema entre 16 e 20 % (m/m).

Concluiu-se que a utilização do planejamento fatorial possibilitou a obtenção de uma porcentagem de hidrólise de 74,47 % em apenas 40 min, para um sistema constituído por 44,1 % (m/m) de óleo de soja residual. Assim, o emprego da *LGC* foi muito apropriado para a etapa de hidrólise na obtenção de biodiesel via hidroesterificação, pois a elevada especificidade desta enzima pelo substrato empregado (óleo de soja residual) possibilitou que a reação ocorresse com elevado rendimento (98,36 %) em um baixo tempo de reação (40 min).

A validação do planejamento foi realizada, em triplicata, para a condição empregada no ensaio 8, no qual foi utilizado 30 % (m/m) de fração de óleo residual e 4,85 (U/g de sistema) de concentração da *LGC*.

A Figura 20 mostra os resultados obtidos ao longo de 120 min de acompanhamento da reação de hidrólise com o tempo.

Figura 20 – Acompanhamento da reação de hidrólise do óleo de soja residual com tempo, utilizando a *LGC*



Fonte: Do autor.

Observou-se que a conversão de 100 % do óleo residual foi alcançada em apenas 60 min de reação, ratificando-se desta forma, as vantagens (discutidas anteriormente) do emprego de uma lipase com elevada especificidade pelo substrato na reação de hidrólise, para obtenção de ácidos graxos livres.

6.5.2 Esterificação enzimática

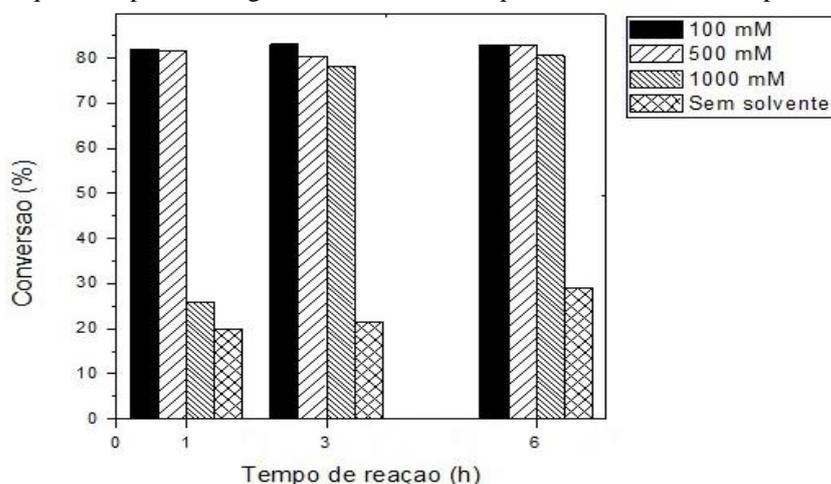
Após a reação de hidrólise do óleo de soja residual (30 % m/m) catalisada pela *LGC* produzida (4,85 U/g de sistema), os ácidos graxos liberados foram separados e utilizados na etapa de esterificação para a produção de ésteres etílicos.

As reações de esterificação foram catalisadas pela *LPF* imobilizada em EDB (30 mg/ g de suporte) na proporção de 10% do meio reacional. Este derivado foi selecionado em ensaios anteriores (ver item 6.3). Foram utilizadas três concentrações molares diferentes de ácidos graxos (100 mM, 500 mM e 1000 mM) em meio contendo hexano e também foi realizado um ensaio sem a adição de solvente, ou seja, no meio reacional só havia os ácidos graxos e etanol na proporção estequiométrica para a reação.

Tanto para 100 mM quanto para 500 mM foram atingidas conversões acima de 80% em apenas uma hora de reação. Nesses ensaios foram utilizadas as menores concentrações molares de ácidos graxos e, portanto, já era esperado verificar-se uma maior conversão em um menor

tempo. Isso porque ocorreu uma melhor difusão de moléculas de reagentes para o microambiente interno do biocatalisador, devido à diminuição da viscosidade na mistura de reação, pela utilização do solvente orgânico no meio reacional. Quando a concentração molar dos ácidos graxos aumentou para 1000 mM, verificou-se que houve uma diminuição da porcentagem de ésteres etílicos formado na primeira hora de reação, provavelmente devido a maior viscosidade do meio reacional. Assim, na medida em que o meio foi se tornando menos viscoso, pela formação de ésteres etílicos, verificou-se um aumento da porcentagem de conversão atingindo um valor próximo a 80% de conversão em 3 horas de reação.

Figura 21 – Efeito da concentração de ácidos graxos na síntese de ésteres etílicos. As reações foram realizadas na proporção equimolar para ácido graxos e etanol, e a temperatura de 40°C e 200 rpm



Fonte: Do autor.

Quando foi utilizado o meio reacional sem solvente, verificou-se que o biocatalisador não alcançou a mesma eficiência dos ensaios anteriores, mesmo para o maior tempo de reação (29 % em 6 h). Dessa forma, pode-se afirmar que para esta reação a utilização do solvente, no caso o hexano, foi de fundamental importância para permitir uma melhor difusão das moléculas reacionais para o sítio ativo da enzima imobilizada e conseqüentemente proporcionar a obtenção de uma maior porcentagem de ésteres etílicos em um menor tempo.

A partir dos resultados encontrados, selecionou-se a condição inicial de ácidos graxos de 1000 mM e o tempo de 3 h para os ensaios de estabilidade operacional (reutilização) do biocatalisador.

Essa condição foi escolhida, dentro das condições estudadas, como a melhor condição experimental para produção de biodiesel, pelo derivado *LPF*-EDB, pois foi utilizada a maior concentração inicial de ácidos graxos estudada em meio com solvente, e obteve-se uma conversão de aproximadamente 80 % de ésteres etílicos em 3 horas de reação. Este tempo de

reação (3 h) é considerado curto se comparado às reações de esterificação reportadas para o processo de hidroesterificação e também às reações de transesterificação enzimática descritas em literatura. Na Tabela 16 estão apresentados resultados reportados na literatura para as reações de esterificação e de transesterificação utilizadas na produção de biodiesel empregando diferentes lipases.

Tabela 16 – Estudos referentes a esterificação dos ácidos graxos hidrolisados e processos de transesterificação utilizando diferentes tipos de lipases

Lipase	Razão molar	Temp. e tempo de reação	Conversão	Referência
Esterificação				
<i>C. antártica</i>	Metanol (1:5)	30 °C, 24 h	96 %	WATANABE et al., 2007
<i>Y. lipolytica</i>	Etanol (1:1)	30 °C, 3 h	85 %	MENG et al., 2011
<i>B. cepacia</i>	Etanol (1:3)	50 °C, 31 h	92 %	SOARES et al., 2013
<i>C. sp. 99-125</i>	Metanol (1:2)	40 °C, 8 h	96 %	LIU et al., 2014
<i>Novozym 435</i>	Etanol (1:6)	40 °C, 24 h	89,5 %	KOCHEPKA et al., 2015
<i>C. antártica</i>	Etanol (1:7)	40 °C, 6 h	90 %	VESCOVI et al., 2016
Transesterificação				
<i>P. fluorescens</i>	Metanol (1:3)	35 °C, 90 h	80 %	KAIEDA et al., 2001
<i>C. rugosa</i>	Metanol (1:2)	35 °C, 90 h	80 %	KAIEDA et al., 001
<i>P. cepacia</i>	Metanol (1:3)	35 °C, 90 h	100 %	KAIEDA et al., 2001
<i>Novozym 435</i>	Acetato de metila (1:7)	40 °C, 10 h	92 %	XU et al., 2005
<i>P. fluorescens</i>	Etanol (1:4)	34 °C, 15 h	67,9 %	TINTOR et al., 2015
<i>P. cepacia</i>	Etanol (1:7.5)	35 °C, 1 h	65 %	NOUREDDI NI et al., 2016

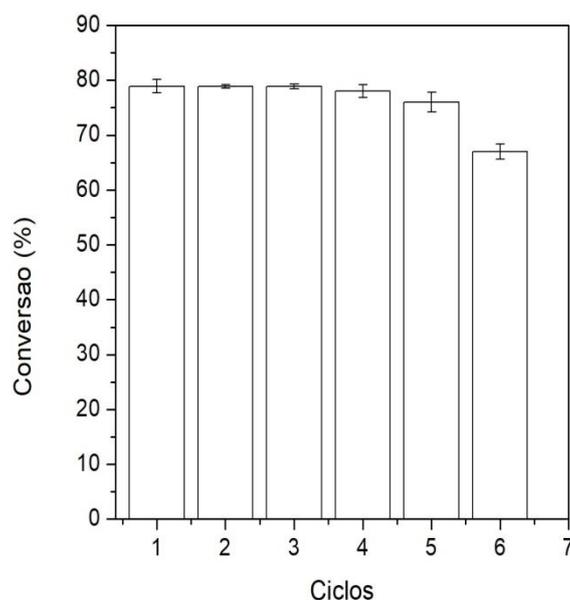
Fonte: Do autor.

6.5.2.1 Estabilidade operacional

O efeito da reutilização do biocatalisador impacta diretamente sobre a viabilidade econômica do processo enzimático, pois favorece a redução de custo do biocatalisador por quilograma de produto, sendo um fator muito importante a ser considerado para produtos que possuam valores de mercado de baixo e médio custo, como o biodiesel (HILLS et al., 2003).

Para esse estudo, o derivado *LPF*-EDB foi usado repetidamente na síntese do biodiesel sob as melhores condições experimentais encontradas anteriormente. A Figura 22 mostra o resultado obtido para a reutilização do biocatalisador ao longo de seis ciclos consecutivos de 3 h cada um.

Figura 22 – Estabilidade operacional (reutilização) do *LPF*-EDB para a síntese de biodiesel a partir de 1000 mM de ácidos graxos e etanol (equimolar), em meio contendo hexano. Os ensaios foram realizados a 40°C e 200 rpm



Fonte: Do autor.

Pode-se observar que o *LPF*-EDB reteve 100% de sua atividade inicial após os quatro primeiros ciclos. A partir do quinto ciclo houve uma pequena diminuição na porcentagem de ésteres etílicos obtida (76 %), sendo que para o último ciclo a porcentagem obtida de ésteres etílicos foi de aproximadamente 65 %, configurando uma perda de 17,7 % em relação ao primeiro ciclo. Uma possível explicação para isso seria o acúmulo das moléculas de água no microambiente interno do biocatalisador (suporte), ou a possível inativação e dessorção de algumas moléculas enzimáticas adsorvidas preferencialmente no ambiente externo das partículas de EDB (SILVA et.al, 2014). Ainda assim, os resultados obtidos sugerem uma forte

interação da enzima com o suporte preparado indicando que o derivado *LPS*-EDB foi suficientemente estável e pode ser reutilizado.

A estabilidade do biocatalisador é reportada em vários trabalhos, nas quais se pode observar decréscimos de atividade após ciclos de reuso. Talukder e seus colaboradores (2010), na etapa de hidrólise enzimática do óleo residual de cozinha reportaram a perda de atividade de aproximadamente 7%, após quatro ciclos de 10 h de reação para a lipase *C. rugosa*.

Vescovi e seus colaboradores (2016), reutilizaram as lipases *T. lanuginosus* no processo de hidrólise e *C. antarctica* do tipo B no processo de esterificação para a produção de biodiesel através da hidroesterificação do óleo de cozinha residual. Para a primeira etapa do processo de produção a lipase foi reutilizada e apresentou após cinco ciclos de 10 h queda de 42 % na conversão de ácidos graxos livres. Na esterificação essa mesma lipase apresentou alta estabilidade após cinco ciclos de reutilização em 10 h de reação. A alta estabilidade da lipase de *C. antarctica* foi reportada também em estudos realizados por Talukder e seus colaboradores em 2010, para a etapa de esterificação.

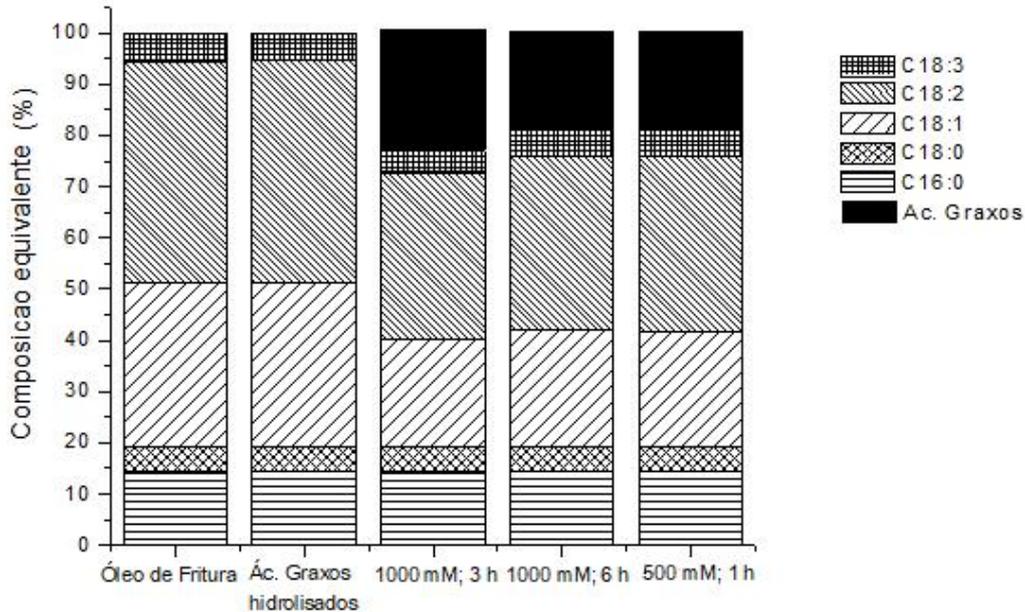
Yagiz e seus colaboradores (2007), estudaram as atividades no reuso da lipase *Lipozyme IM* no processo de transesterificação do óleo de cozinha vegetal residual com metanol. O biocatalisador foi reutilizado durante sete ciclos de 10 min cada em diferentes temperaturas (45 e 55 °C). Foi observado para a temperatura de 45 °C perda de 64% em atividade após o sétimo ciclo, enquanto para a temperatura de 55 °C a perda apresentada foi de 86 %.

6.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS

Os padrões de qualidade utilizados para a produção e uso do biodiesel no território nacional estão presentes e regulamentados na resolução ANP N° 45, de 25 de agosto de 2014. Dentre todas as propriedades físico-químicas e de composição do biodiesel a serem controlados, pode-se destacar a composição de ésteres, a viscosidade e as quantidades de glicerol livre, monoacilglicerol (MAG), de diacilglicerol (DAG) e de triacilglicerol (TAG) como sendo as mais importantes. Dessa forma, as análises dos ésteres etílicos produzidos foram focadas na determinação destes parâmetros considerados os mais significativos.

Na Figura 23 estão mostrados os perfis de composição equivalente em ésteres etílicos obtidos para o óleo residual de fritura, para os ácidos graxos obtidos na etapa de hidrólise pela *LGC* e para três ensaios de esterificação no qual se obteve um teor de conversão próximo a 80 % na produção de ésteres etílicos.

Figura 23 – Perfil da composição dos ésteres etílicos para as amostras analisadas; óleo de fritura, ácidos graxos livres hidrolisados pela *LGC*, reações de esterificação utilizando 1000 mM de ácidos graxos em 3 h de reação, 1000 mM de ácidos graxos em 6 h de reação, 500 mM de ácidos graxos em 1 h de reação



Fonte: Do autor.

Observa-se que a composição equivalente em ésteres obtida para os ácidos graxos livres resultantes da etapa de hidrólise pela *LGC*, foi idêntica a composição inicial do óleo residual de fritura, demonstrando que esta etapa está totalmente otimizada e que o óleo de fritura foi totalmente hidrolisado em apenas 60 min de reação pela lipase produzida.

Para os três ensaios de esterificação aplicou-se o teste de Tukey, com 95 % de nível de confiança, e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para as conversões obtidas. Dessa forma pôde-se afirmar que o ensaio no qual foi utilizado 1000 mM de ácidos graxos e 3 h de esterificação, foi o melhor resultado obtido para a etapa de esterificação enzimática, e assim as demais análises de caracterização do biodiesel produzido foram realizadas para este ensaio.

Na tabela 17 estão mostradas as análises realizadas para os ésteres etílicos obtidos após 3 h de esterificação utilizando-se a concentração molar de 1000 mM de ácidos graxos livres e razão molar equimolar entre o álcool etílico e os ácidos graxos livres, obtidos previamente a partir da hidrólise do óleo residual de fritura.

Tabela 17 – Propriedades e composição dos ésteres etílicos produzido enzimaticamente a partir do óleo residual de fritura, para o ensaio no qual foi utilizado 1000 mM de ácidos graxos livres, e razão molar de 1:1 para o álcool etílico

Propriedades	Biodiesel a partir do óleo de fritura	ANP n° 45
Teor de Ésteres (%)	78,82	Min 96,50
Glicerol livre	0,0	Max. 0,02
MAG	0,0	Max. 0,80
DAG	0,0	Max. 0,20
TAG	0,0	Max. 0,20
Viscosidade a (cP) (40 °C)	4,01 ± 0,02	2,6- 5,3

Fonte: Do autor.

Observa-se que o biodiesel produzido enzimaticamente atendeu a todas as especificações da ANP, exceto o teor mínimo de ésteres. Destaca-se que esta conversão foi atingida em apenas 3 horas de esterificação, demonstrando que o derivado empregado possui um grande potencial para ser utilizado na etapa de esterificação. Soares e seus colaboradores, (2013) obteve uma conversão de 93 % após 31 h de reação, utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando como acil receptor o álcool etílico. Aguiéiras e seus colaboradores, (2014) obteve 91 % de conversão após 8 horas de esterificação para o óleo de macaúba e álcool etílico, usando a lipase de *R. miehei* como biocatalisador. Utilizando-se o metanol como acil receptor, Watanabe e seus colaboradores, (2007) obteve um conversão de 96% em 24 h de esterificação.

Neste sentido, um estudo sequencial deverá ser realizado para possibilitar um aumento na conversão de ésteres, uma vez que este derivado apresentou uma elevada conversão em um tempo reduzido quando comparado a outros trabalhos descritos em literatura, de modo a tornar o biodiesel produzido apto para comercialização.

A produção de ésteres etílicos via hidroesterificação utilizando-se como a matéria-prima o óleo residual de fritura com emprego de catalisadores enzimáticos nas duas etapas do processo foi atingida com sucesso, validando o presente trabalho desenvolvido.

7 CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi o de produzir biodiesel usando óleo de soja residual de fritura via hidroesterificação e catálise enzimática, sendo que os resultados obtidos foram promissores e nesse conjunto de dados, podem ser destacados:

a) A matéria-prima testada apresentou parâmetros físico-químicos semelhantes a valores encontrados nas normas e legislação, bem como aos valores encontrados na literatura, apresentando diferenças apenas no índice de acidez total e de saponificação. Entretanto, a utilização do óleo de soja residual de fritura não apresentou nenhum problema ao ser utilizado, uma vez que a produção se deu através da hidroesterificação;

b) As lipases utilizadas para as etapas de hidrólise e esterificação foram respectivamente, *LGC* livre e *LPF* imobilizada em EDB. A *LGC* foi escolhida e produzida por demonstrar grande afinidade ao processo de hidrólise com elevadas conversões em curtos tempos devido a sua especificidade. Embora, a *LPF*-EDB apresentasse baixo valor de RI dentre as lipases utilizadas, demonstrou possuir uma maior afinidade com a reação de esterificação chegando a $70,31 \pm 0,96$ % em apenas 150 min de reação;

c) Foi realizada a caracterização da *LPF* livre e imobilizada (*LPF*-EDB). Primeiramente, verificou-se que a *LPF* apresentou equilíbrio com a imobilização após 4 h de incubação com 100 % de atividade oferecida, sendo esta utilizada nos ensaios. As lipases livre e imobilizada apresentaram atividades máximas nas faixas de pH 8 e temperatura de 40 °C.

d) Na otimização da reação de hidrólise foi obtido 100 % de conversão a após 60 min utilizando-se a *LGC* produzida via fermentação submersa;

e) Nas reações de esterificação catalisadas pela *LPF*-EDB três concentrações molares diferentes de ácidos graxos (100 mM, 500 mM e 1000 mM) com solvente (hexano) e sem solvente foram realizadas. Para a concentração de 1000 mM de ácidos graxos foi observado conversão de aproximadamente 80 % de ésteres etílicos em apenas 3 h de reação. A lipase imobilizada foi reutilizada no processo e apresentou estabilidade operacional durante quatro ciclos de 3 h cada;

f) O conjunto de dados obtidos demonstrou que é possível o a produção de ésteres etílicos via hidroesterificação utilizando-se óleo residual como matéria-prima e catalisadores enzimáticos nas etapas do processo.

8 SUGESTÕES PARA ENSAIOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar os estudos de síntese de biodiesel por hidroesterificação por catálise enzimática sugere-se as seguintes etapas:

a) Realizar novas análises quanto a imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* produzida e purificada utilizando novos suportes de baixo custo, tais como subprodutos agroindustriais, e novas técnicas de imobilização, afim de emprega-lo em ambas etapas da hidroesterificação;

b) Realização de um planejamento experimental para determinar as condições ótimas para a obtenção dos ésteres etílicos;

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA (AIE). **Coal Industry Advisory Board: CIAB**. Disponível em: <www.iea-coal.org.uk>. Acesso em: 10 maio. 2018.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA (AIE). Key world energy statistic. **International Energy Agency I**, 2017.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 15, p. 315-321, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução n° 482**, de 23 de setembro de 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico Produção de biodiesel - B100 - 2005-2018**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: 04 maio 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Resolução ANP n° 14 de 11 de maio de 2012. Especificação do Biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP n° 4/2012**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, seção 1, 18 maio 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Resolução ANP n° 45, de 25.8.2014**. Disponível em: <<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2014/agosto&item=ranp-45--2014>>. Acesso em: 05 maio 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC n° 482 de 23 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, Poder Executivo, 13 out. 1999.

AL-ZUHAIR S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 1, p. 57–66, 2007.

ALVES, M. D.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 5377-5387, 2016.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, USA: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 1990. v. 4.

ARICA, M.Y.; YAVUZ, H.; PATIR, S.; DENIZLI, A. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly-methylmethacrylate/microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 127–138, 2000.

BARBOSA, O.; SAÉZ, R. G. T.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 766-774, 2012.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase b from *Candida antarctica* In organic media: enantioselective production of atenolyl acetate. . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 124-132, 2011.

BASSI, J. J.; TOREDO, L. M.; LAGE, F. A. P.; KHEDY, G. I.; DELL DUCAS, J.; CUSTÓDIO, A.P; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016

BASTIDA, P.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, J.; HUGUET, J. M.; GUISÁN. A single step purification immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 486–493, 1998.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PEREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 83-93, 2004.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York: CRC Press, 1997. v. 2.

BOLIVAR, J.M. e al. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 158-163, 2009.

BRABCOVÁ, J. et al. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 62– 72, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BUCHHOLZ, K.; KASHE, V.; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and enzyme technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

BUSH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.

CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 431–441, 2008.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146 – 156, 2004.

CASTRO P. F.; MOREIRA N. C.; ESPERANÇA M. N.; OLIVEIRA L. M.; BADINO A. C.; TAVANO O.; MENDES A. A.; BASSO R. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R.; HIRATA D. B. High lipase production from *Geotrichum candidum* in reduced time using cottonseed oil: optimization, easy purification and specificity characterization, **Journal of Chemical Engineering Research and Design**, v. *Updates*, p. 60–69, 2016.

CAVALCANTE, K. S. B.; PENHA, M. N. C.; MENDONÇA, K. K. M.; LOUZEIRO, H. C.; VASCONCELOS, A. C. S.; MACIEL, A. P.; DE SOUZA, A. G.; SILVA, F. C. Optimization of transesterification of castor oil with ethanol using a central composite rotatable design (CCRD). **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 1172-1176, 2010.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; SILVA, P.R.; RAMOS, A.P.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification, **Enzyme Research**, v. 2011 p. 1–8, 2010.

CVENGROS, J.; CVENGROSOVA, Z. Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, n. 2, p. 173-181, 2004.

CHANG, H. M.; LIAO, H. F.; LEE, C. C.; SHIEH, C. J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n.3, p. 307–312, 2005.

COSTA, N. P. R.; ROSSI, L.; ZAGONEL, G.; RAMOS, L. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. **Química Nova**, v. 23, p. 531–537, 2000.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQLI, A. N.; GUPTA, A. K.; A Structural basis for the chiral preferences of lipases, **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 3180-3186, 1994.

DABDOUB, Miguel J.; BRONZEL, João L. and RAMPIN, Márcia A.. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, vol.32, n.3, pp.776-792, 2009.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, maio 2004.

DHAKE, K. P.; BHATTE, K. D.; WAGH, Y. S.; SINGHAL, R. S.; BHANAGE, B. M. Immobilization of steapsin lipase on macroporous imbead-350 for biodiesel production in solvent free system. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 959–965, 2012.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 1, p. 14-34, 2009.

DE MORAIS, A. L.; CHRISTIANI, G.; CESTARI, A.; FLUMIGNAN, D.L. Caracterização da identidade e controle da qualidade de óleo vegetal, matéria-prima para a produção de biodiesel. **VI Workshop Agroenergia**. Junho de 2012.

DE SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 133-137, 2010.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, Seção 1, p. 195, 14 jan. 2005.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource technology**, v. 100, p. 1983-1991, 2009.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 90, 2002.

ECÓLEO (Associação Braileira para sensibilização, coleta, reaproveitamento e reciclagem de óleo comestível). **Reciclagem do óleo**. Disponível em: < <http://ecoleo.org.br/projetos/6766-2/> > Acesso em 05 fev. 2019.

FUENTES, M. et al. Mixed ion exchangers supports as useful ion exchangers for protein purification. Purification of *Penicillin G acylase* from *E.coli* **Biomacromolecules**, v. 8, p. 703-707, 2007.

FELIZARDO, P.; CORREIA, M. J.; RAPOSO, I.; MENDES, J. F.; BERKEMEIER, R.; BORDADO, J. M.. Production of biodiesel from waste frying oils. **Waste Management.**, 26 (5), 487-494, 2005.

FERREIRA, M. M.; SANTIAGO, F. L. B.; DA SILVA, N. A. G.; LUIZ, J. H. H.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A.; HIRATA, D. B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2018.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M; GUISÁN, J.M; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol in the activity, stability and enantioselectivity of lecithase® ultra . **J Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, p. 99-104, 2007.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, p. 109-118, 2008.

GARCIA, C. M. et al. Transesterification of soybean oil catalyzed by sulfated zirconia. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6608-6613, 2008.

- GARCIA-GALAN, C. et al. Tuning of lecithase features via solid-phase chemical modification: effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 604-616, 2014.
- GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, p. 1646-1653, 2008.
- GUO, Z.; XU, X. Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. **Green Chemistry**, v. 8, p. 54–62, 2006.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.
- HAN, J. Y.; KIM, H. K. Transesterification using the cross-linked enzyme aggregate of *Photobacterium lipolyticum* lipase M37. **Journal of Microbial Biotechnology**, v. 21, p. 1159–1165, 2011.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology, Islamabad**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 601–607, 2003.
- HU, Y.; TANG, S.; JIANG L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of Burkholderia cepacia Lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2291 – 2299, 2012.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - Capítulo XVI - Óleos e Gorduras. **Instituto Adolfo Lutz**, 4ª Edição, 1ª Edição Digital.
- JACOBSEN, T.; OLSE, J.; ALLERMANN, K. Substrate Specificity of *Geotrichum candidum* Lipase Preparations. **Biotechnology Letters** 12, v. 2, p. 121-126, 1990.
- JEGANNATHAN, K. R.; JUN-YEE, L.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in κ -carrageenan. **Fuel**, v. 89, p. 2272–2277, 2010.
- JIN, Z.; LIANG, S.; ZHANG, X.; HAN, S.; REN, C.; LIN, Y.; ZHENG, S. Synthesis of fructose laurate esters catalyzed by a CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst in a non-aqueous system. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 365 – 374, 2013.
- KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 5–12, 2001.
- KAMIMURA E. S. et al. Production of lipase from *Geotrichum sp* and adsorption studies on affinity resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, p. 2, 1999.

KATIYAR, M.; ALI, A. One-pot lipase entrapment within silica particles to prepare a stable and reusable biocatalyst for transesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, p. 623–632, 2015.

KEBABCI, O.; CIHANGIR, N. Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production: NBRC 1658, IFO 1195, and a local strain. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 15 – 24, 2012.

KIERKELS, J. G. T.; VLEUGELS, L. F. W.; GELADÉ, E. T. F.; VERMEULEN, D. P.; KAMPHUIS, J.; WANDREY, C.; VAN DEN TWELL, W. J. J. Pseudomonas fluorescens lipase adsorption and the kinetics of hydrolysis in a dynamics emulsion system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 513-521, 1994.

KNOTHE, G. et al. (Eds.). **Manual do Biodiesel**. Tradução Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Blucher, p. 340, 2006.

KUSS, V. V.; KUSS A. V.; ROSA, R. G.; ARANDA, D. A. G.; CRUZ, Y. R. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1013-1020, 2015.

KOCHEPKA, D. M.; DILL, L. P.; COUTO, G. H.; KRIEGER, N.; RAMOS, L. P. Production of fatty acid ethyl esters from waste cooking oil using Novozym 435 in a solvent-free system. **Energy Fuel**, v. 29, p. 8074-8081, 2015.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500-518, 2010.

LEE, A. F.; BENNETT, J. A.; MANAYIL, J.C.; WILSON, K. Heterogeneous catalysis for sustainable biodiesel production via esterification and transesterification, **Chemistry Society**, v. 22, p. 7887-7916, 2014.

LIU, S.; NIE, K.; ZHANG, X.; WANG, M.; DENG, L. Y. X. Kinetic study on lipase-catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.99, p. 43–50, 2014.

LIU, W.; LI, M.; YAN, Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and used for biodiesel production. **Scientific reports** 7, v. 15711, p. 0-11, 2017.

LIN, L. et al. Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 5, p. 681-688, 2009.

LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; CASTRO, H. F.; DE RÓS, P. C. M. D.; MENDES, A. A.; GIORDANO, E. L. C.; TARDIOLI, P. W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523-535, 2015.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; DA CRUZ, R. S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MALACRIDA, C. R. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê - óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. **Braz. J. Brazilian Journal of Food Technology, São Paulo**, v. 6, n. 2, p. 245-249, 2003.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology, Amsterdam**, v. 83, n. 1, p. 39-48, Jan. 2003.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNAR, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology, Amsterdam**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MATEO, C. et al. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1022 – 1033, 2007b.

MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1593–1601, 2007c.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MENDES, A. A.; CASTRO, HEIZIR F.; GIORDANO, R.L.C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, p. 245-251, 2013a.

MENDES, A. A. et al. Preparation and application of epoxy chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 160-167, 2013b.

MENDES, A.A. et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1055–1066, 2011a.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Enzymatic synthesis of biodiesel from vegetable oils using microbial lipases immobilized on resin affinity by multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109-115, 2011b.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p.109–115, 2011.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.78, p. 119– 134, 2012.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG, N.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 6, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa MAPA nº. 49, de 22 de dezembro de 2006. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, seção 1, 26 dez. 2006.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). **Percentual obrigatório de biodiesel passa para 10%. 01 mar. 2018**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticias/-/asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/percentual-obrigatorio-de-biodiesel-passa-para-10->. Acesso em: 05 maio 2018.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, p. 229-245, 1999.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. **Varela**, São Paulo, 1998.

MUKHERJEE, K. D. Fraction of fatty acids and other lipids via lipase-catalyzed reactions. **Journal of Oleagineux Corps Gras Lipides**, v. 2, p. 365-368, 1995.

NARANJO, J. C.; CÓRDOVA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V. S.; MORENO-PIRAJÁN, J. C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p.166–171, 2010.

NAZ, S.; SHEIKH, H.; SIDDIQI, R.; ASAD SAYEED, S. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. **Food Chemistry**, v. 88 (2), p. 253-259, 2004.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, p. 1191, 1996.

NELSON, J. M. e GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v 38, p1109-1115, 1916.

NORJANNAH B.; ONG H. C.; MASJUKI, J. C; JUAM; CHONG, W. T. Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review. **Royal society of chemistry**, v. 6, p. 60034-60055, 2016.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p.769–777, 2005.

ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 106–113, 2006.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Bioresource technology enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5146–5154, 2009.

PALOMO, J M. et al. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 447–454, 2005.

PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v.4, p. 1-6, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal, Amsterdam**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARENTE, E.J., **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: TECBIO, 2003.

PESELA, B.C.C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISÁ, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the Catalytic Properties of Multimeric Enzymes by using different Immobilization Protocols. Application to the Synthesis of Galacto-Oligosaccharides Catalyzed by beta-galactosidase from *E. coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 310-315, 2007.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511–525, 2015.

POUSA, P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.

QUINTELLA, C. M. et al. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RAMOS, E. Z. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 2015.

RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 1, 317-369, 2017.

RAMOS, M. D.; GÓMEZ, G. I. G.; GONZÁLEZ, N. S. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on bentonite modified with benzyltriethylammonium chloride. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 79 – 83, 2014.

RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstock to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1 – 17, 2011.

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

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalyzed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947–953, 2001.

SAKAI, S.; LIU, Y.; YAMAGUCHI, T.; WATANABE, R.; KAWABE, M.; KAWAKAMI, K. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in non-aqueous solvent. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1059–1062, 2010.

SALEEM, M.; RASHID, M. H.; JABBAR, A.; PERVEEN, R.; KHALID, A. M.; RAJOKA, M. I. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachnotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 849–855, 2005.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p.19–26, 2008.

SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; CHANG, J. Biodiesel Production Using Immobilized Lipase: Feasibility and Challenges. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 10, p. 896-916, 2016.

SANTOS, I. J. O.; MEDEIROS, M. S.; MELO, J. C. S.; OLIVEIRA, K. P.; COSTA, C. H. C. Caracterização físico-química do óleo residual de fritura para obtenção do sabão líquido. **55° CBQ – Congresso Brasileiro de Química**. 10 de abril de 2018.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52–53, p. 49–57, 2008.

SANTOS, K. C.; CASSIMIRO, D. M. J.; AVELAR, M. H. M.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Characterization of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **In Crops Pros**, v. 49, p. 462-470, 2013.

SANTOS, L. K.; HATANAKA, R. R.; OLIVEIRA, J. E.; FULMIGANAN, D. L. Experimental factorial design on hydroesterification of waste cooking oil by subcritical conditions for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 114, p. 574-580, 2017.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 339 – 247, 2003.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; LANG, M. C. D.; BURGDORF, T.; HECHT, H.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas lipase*. **Structure**, v. 5, p. 187-202, 1997.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. **Fuel** **87**, v. 12, p. 2355-2373, 2008.

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**, v. 17, p. 133, 2002.

SILVA, N.C.A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B., CASTRO, H. F., MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on polyhydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal** v. 82, p. 139– 149, 2014.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir o combustível. **Ciência Rural**, v. 38, p. 843-851, 2008.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Direct transesterification of *Botryococcus* sp. catalysed by immobilized lipase: ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester. **Fuel**, v. 191, p. 363-370, 2017.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77/79, p. 745-757, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 97, 2003.

SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. d'A.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 133-137, 2010.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte, p. 529 -568. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, São Paulo: Blucher, 2017.

SRIVASTAVA A.; PRASAD R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 111–133, 2000.

STRÁNSKÝ, K.; ZREVUCKA M.; KEJIK, Z.; Substrate specificity, region-selectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum sp.* **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 209-216, 2007.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solidstate fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2607 – 2612, 2009.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from Waste Cooking Oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683-710, 2012.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; NGM, F.; MELISSA, Y. L. S. Two step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 207–212, 2010.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2016-2019, 2010.

TAPANES, N. D. L. C. O.; ARANDA, D. A. G.; PEREZ, R. S.; CRUZ, Y. R. Biodiesel no Brasil: Matérias Primas e Tecnologias de Produção. **ACTA Scientiae & Technicae**, v. 1, n.1, 2013.

TING, W. J.; HUANG, C. M.; GIRIDHAR, N.; WU, W. T. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 39, p. 203-210, 2008.

TINTOR, C. B.; HIRATA, D. B.; PEREIRA, E. B. Síntese de biodiesel a partir de resíduos gordurosos de fritura utilizando como ferramenta planejamento fatorial. REA – **Revista de estudos ambientais (Online)**, v. 17, n. 2, p. 51-59, 2015.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSLIP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p 52-59, 2010.

VESCOVI, V.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Immobilized Lipases on Functionalized Silica Particles as Potential Biocatalysts for the Synthesis of Fructose Oleate in an Organic Solvent/Water System. **Molecules**, v. 22, p. 212, 2017.

VESCOVI, V.; ROJAS, M.J; BARALDO, A. J.; BOTTA, D. C.; SANTANA, F. A. M.; COSTA, J. P.; MACHADO, M. S.; HONDA, V. K.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 93, p. 1615-1624, 2016.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, M.J.; HAAS, J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p.113–148, 2000.

XIE, W.; WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass Bioenerg**, v. 36, p. 373–380, 2012.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, p.1239, 2003.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015–1021, 2007.

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

YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 179 – 187, 2013.

YAN, J.; ZHENG, X.; LI, S. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 43–48, 2014.

YUST, M.M. et al. Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from Flavourzyme. Obtention of chickpea protein hydrolysates without free amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6503–6508, 2007.

ZAHER, F. Utilization of used frying oil as diesel engine fuel. **Energy Sources**, v. 25, p. 819–826, 2003.

APÊNDICE

1. Determinação da densidade relativa

Método que determina a razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume a 25°C.

Foram utilizados três picnômetros com junta esmerilhada de 50 mL, termômetro com subdivisão de 0,1 °C e balança eletrônica analítica da marca Marte modelo AY220. Primeiramente, aferiu-se a massa dos três picnômetros com o auxílio da balança eletrônica analítica. O termômetro foi utilizado para se aferir a temperatura de $25 \pm 0,1$ ° do óleo residual de fritura. Os picnômetros foram então preenchidos cuidadosamente para se prevenir a formação de bolhas de ar, com as amostras de óleo. Por fim, as massas dos três picnômetros contendo as amostras de óleo de fritura à $25 \pm 0,1$ °C foram aferidas e anotadas (AOCS, 1990).

Com os dados aferidos o cálculo da densidade foi calculado com o auxílio da equação 1:

$$\text{densidade relativa} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{\bar{A} - \bar{B}}{C}, \quad (1)$$

em que:

\bar{A} = massa média dos três picnômetros contendo o óleo de fritura;

\bar{B} = massa média dos três picnômetros vazios;

C = volume de 50 ml referentes ao picnômetro.

2. Determinação do índice de peróxido

Método que determina todas as substâncias, nas condições do teste, que oxidam o iodeto de potássio (peróxidos ou produtos resultantes da oxidação da gordura) em termos de miliequivalentes de peróxido por 100 g de amostra.

Foram utilizados três frascos Erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada, uma proveta de 50 mL, pipeta graduada de 1mL, bureta de 10 mL com sub-divisões de 0,05 mL e balança eletrônica analítica. Primeiramente, $5 \pm 0,05$ g da amostra de óleo de fritura foram pesadas em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, 30 mL da solução de ácido

acético-clorofórmico (3:2 v/v), pré-preparada, foi adicionada no frasco de Erlenmeyer agitando-o até a dissolução da amostra. Então, 0,5 mL da solução saturada de KI, preparada com 30 g de iodeto de potássio e 21 mL de água, foi adicionada deixando o frasco em repouso ao abrigo da luz por exatos um minuto. Após um minuto, 30 mL de água foi adicionado no frasco e titulou-se com solução de tiossulfato de sódio 0,01 N, com agitação constante, até que a coloração característica amarela tivesse desaparecido. Por fim, após o desaparecimento da coloração amarela, foi adicionado 0,5 mL de solução de amido indicadora (1% m/v), que deu coloração azul à amostra, e continuou-se a titular até que tal coloração desaparecesse por completo. O procedimento foi realizado em triplicata e provas em branco com adição de água ao invés da amostra de óleo foram realizadas nas mesmas condições. Com os dados de volume provenientes das titulações e com o auxílio da equação 2, o índice de peróxido foi calculado (AOCS, 1990).

$$\text{índice de peróxido} \left(\frac{\text{meq}}{1000 \text{ g da amostra}} \right) = \frac{(\bar{A} - \bar{B}) \times N \times f \times 1000}{P}, \quad (2)$$

em que:

- \bar{A} = volume médio (mL) gasto na titulação da amostra;
- \bar{B} = volume médio (mL) gasto na titulação do branco;
- N = normalidade da solução de tiossulfato de sódio;
- f = fator da solução de tiossulfato de sódio;
- P = n° de g da amostra.

3. Determinação do índice de saponificação

Método que determina a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade de amostra definida, expressando o número de miligramas necessários de hidróxido de potássio para saponificar um grama de uma determinada amostra, sendo útil para verificar até mesmo a massa molecular média e possível adulteração por outros óleos.

Foram utilizados condensador de água, balões volumétricos de 50 mL, bureta de 50 mL aquecedor encamisado e estufa. Com a amostra completamente seca e sem impurezas, após ficar por uma hora em estufa a 150 °C, calculou-se a massa correspondente de 45 a 55 % da titulação do branco (4-5 g). A massa então foi transferida para balões volumétricos, os quais foram conectados a um condensador de água deixando a amostra ferver suavemente em contato

ao aquecedor encamisado por aproximadamente uma hora, tempo necessário para a saponificação completa da amostra. Após esse tempo 1 mL de solução de fenolftaleína indicadora foi adicionada iniciando a titulação da amostra com solução de ácido clorídrico 0,5 M, pré-preparado, até o desaparecimento da cor característica rósea da amostra. O procedimento foi realizado em triplicata e provas em branco com adição de água ao invés da amostra de óleo, também, foram realizadas nas mesmas condições. Com os dados de volume provenientes das titulações e com o auxílio da equação 3, o índice de saponificação pode ser calculado (AOCS, 1990).

$$\text{índice de saponificação } \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{28,06 \times f \times (\bar{A} - \bar{B})}{P}, \quad (3)$$

em que:

\bar{A} = volume médio (mL) gasto na titulação da amostra;

\bar{B} = volume médio (mL) gasto na titulação do branco;

f = fator da solução de HCl 0,5 M;

P = n° de g da amostra.

4. Determinação do índice de acidez total

Método que fornece dado importante para avaliação do estado de conservação do óleo e podendo ser aplicado a óleos brutos e refinados. O índice de acidez, definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessários para neutralizar um grama da amostra, pode expressar tanto processos de decomposição seja por fermentação, oxidação ou por hidrólise, que quase sempre alteram a concentração dos íons hidrogênio presentes na amostra, quanto a decomposição, acelerada por aquecimento e pela luz, dos glicerídeos tendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres.

Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125 mL, proveta de 50 mL, bureta de 10 mL e balança eletrônica analítica. Primeiramente, pesou-se 2 g da amostra no frasco Erlenmeyer de 125 mL. Então, 25 mL de solução de éter-álcool (2:1 v/v), pré-preparada, foram adicionados juntamente com duas gotas da solução de fenolftaleína indicadora. A amostra foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,01 M até que uma coloração rósea aparecesse e persistisse por 30 segundos. Com os dados de volume provenientes da titulação e com o auxílio das equações 4, 5 e 6 o índice de acidez, a acidez em solução molar e em ácido oleico puderam ser calculados (IAL, 1985).

$$\text{índice de acidez} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{v \times f \times 5,61}{P}, \quad (4)$$

$$\text{acidez em solução molar, por cento} \left(\frac{v}{m} \right) = \frac{v \times f \times 100}{P}, \quad (5)$$

$$\text{acidez em ácido oleico, por cento} \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{v \times f \times M \times 28,2}{P}, \quad (6)$$

em que:

v = volume (mL) gasto na titulação;

f = fator da solução de hidróxido de sódio;

P = n° de g da amostra.

5. Determinação do índice de iodo pelo método de Wijs

Método que determina a massa da água contida em uma amostra dividido pela massa de amostra seca, sendo expressa em quilogramas de água por quilogramas de amostra, ou, multiplicando-se por 100, tem-se em percentagem.

Foram utilizadas 3 placas de petris, estufa elétrica, dessecadora a vácuo e balança eletrônica analítica. Primeiramente, 5 g da amostra de óleo foram pesadas em placa de petri, A placa de petri contendo a amostra de óleo foi levada a estufa sendo mantida à 150 °C por uma hora. Após uma hora de aquecimento, retirou-se a placa de petri da estufa deixando-a resfriar em um dessecador. Após resfriamento a massa foi novamente aferida. O procedimento foi realizado em triplicata. Com os dados de massa aferidos e com o auxílio da equação 7, o teor de umidade pôde ser calculado.

$$\text{teor de umidade}(\%) = \frac{\bar{m}u - \bar{m}s}{\bar{m}s} \times 100, \quad (7)$$

em que:

$\bar{m}u$ = massa média das amostras úmidas (g);

$\bar{m}s$ = massa média das amostras após secagem (g).

6. Determinação do teor de umidade

Método que expressa o grau de insaturação de um óleo ou gordura em termos do número de centigramas de iodo absorvido, que é fixado nas ligações etilênicas dos ácidos graxos, por grama da amostra.

Foram utilizados balança analítica, agitador magnético, estufa, cronômetro, papel de filtro qualitativo, frasco Erlenmeyer de 500 mL com tampa esmerilhada, proveta de 50 mL, pipetas volumétricas de 2, 5, 20 e 25 mL e bureta de 50 mL. Primeiramente, em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com tampa pesou-se 0,25 g da amostra a ser analisada, adicionando-se, posteriormente, 10 mL de solução de tetracloreto de carbono. Em seguida, neste mesmo frasco foram adicionados 25 mL de solução de Wijs, após adição o frasco foi tampado e agitado cuidadosamente com movimentos rotacionais, para que fosse assegurada uma perfeita homogeneização. Após homogeneizada, o frasco contendo a amostra foi deixado em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 min. Após os 30 min, foi adicionado 10 mL de solução de iodeto de potássio a 15 % e 100 mL de água que havia sido recentemente fervida e fria. Por fim, a amostra foi titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela, que com a adição de 1 a 2 mL de solução indicadora de amido 1% ficou com a coloração azul, sendo que o volume final anotado foi quando a coloração azul desapareceu por completo. Provas em branco com adição de água ao invés da amostra de óleo, também, foram realizadas nas mesmas condições. Com os dados de volume provenientes das titulações e com o auxílio da equação 8, o índice de iodo pode ser calculado (AOCS, 1990).

$$\text{Índice de Iodo (\%)} = \frac{(V_B - V_A) \times M \times 12,68}{P}, \quad (8)$$

em que:

V_B = mL gasto na titulação do branco;

V_A = mL gasto na titulação da amostra;

M = molaridade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

P = n° g da amostra.

7. Determinação do teor de ácidos graxos livres

Método que determina a porcentagem (em peso) de ácidos graxos livres, em relação a um ácido graxo específico, geralmente ácido oleico (PM = 282 g).

Foram utilizados balança analítica, frascos erlenmeyers de 250 mL, banho de aquecimento e balão volumétrico de 75 mL. Primeiramente, 1 g de amostra aclimatada em temperatura ambiente foi pesada em frasco erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, foram adicionados ao frasco, 75 mL de solução de álcool etílico, o qual foi aquecida em banho (40 °C) e previamente neutralizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1M). Por fim, foi adicionada solução indicadora de fenolftaleína ao sistema, o qual apresentou coloração rósea, e então este foi titulado com solução de hidróxido de potássio (KOH 0,081 M) até a mudança da coloração rosa. Tal procedimento foi realizado em triplicata. Com os dados de volume provenientes das titulações e com o auxílio da equação 9, o teor de ácidos graxos livres pode ser calculado (AOCS, 1990).

$$AGL = \frac{V_t \times M \times 28,2}{m}, \quad (9)$$

em que:

V_t = volume médio (mL) gasto na titulação da amostra;

M = molaridade da solução de KOH (mol/L);

m = massa da amostra (g)

8. Viscosidade

A viscosidade absoluta foi medida em viscosímetro de marca Brookfield, modelo DV-II+ Pro, sendo as medidas realizadas conforme a norma ABNT NBR 10441 que estabelece a faixa permitida de 3,0 a 6,0 mm²/s (LÔBO et al., 2009; ANP, 2014).