



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

MARA CRISTINA PICOLI ZENEVICZ

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE
ÓLEOS DE SOJA E DE FRITURA EM SISTEMA DE
ULTRASSOM**

Florianópolis/SC
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Mara Cristina Picoli Zenevitz

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE
ÓLEOS DE SOJA E DE FRITURA EM SISTEMA DE
ULTRASSOM**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Florianópolis, SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zenevicz, Mara Cristina Picoli

Hidroesterificação Enzimática de Óleos de Soja e de Fritura em Sistema de Ultrassom / Mara Cristina Picoli Zenevicz ; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri ; coorientadora, Débora de Oliveira ; coorientador, José Vladimir de Oliveira - Florianópolis, SC, 2015.

174 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Hidroesterificação enzimática. 3. ácidos graxos livres. 4. Óleo de soja. 5. Óleo de fritura. 6. Ultrassom. I. Novy Quadri, Mara Gabriela. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Termo de Aprovação

Lute com determinação, abrace a vida
com paixão, perca com classe e vença
com ousadia, porque o mundo pertence
a quem se atreve e a vida é muito para
ser insignificante.

Augusto Branco

“Cada um escreve sua própria história”

AGRADECIMENTOS

- ♥ Primeiramente agradeço a todos os membros da banca por suas contribuições na avaliação deste trabalho;
- ♥ Aos meus orientadores professores Agenor, Vladimir e Débora, o meu muito obrigado pelo conhecimento que me foi passado, pelo compromisso, dedicação, amizade e carinho;
- ♥ Aos professores do programa que contribuíram com meu aprendizado, agradeço pela dedicação e amizade;
- ♥ Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC;
- ♥ Ao CNPq pelo suporte financeiro e concessão de bolsa;
- ♥ A Deus, pela Vida e por mais esta conquista;
- ♥ A minha família por me apoiar, amar e incentivar nas horas difíceis. Obrigado Mãe, meu irmão Maico e ao meu namorado, marido, companheiro e, sobretudo, amigo Leandro, pela paciência, pelas palavras de incentivo, compreensão e carinho;
- ♥ Ao meu pai Antônio, que mesmo não estando entre nós, se faz presente na minha vida. Obrigado por ter me ensinado a ser o que sou;
- ♥ Muitas pessoas passaram pelo meu caminho neste período, algumas pessoas eu agradeço de coração, e devo minha amizade, carinho, admiração e respeito;
- ♥ Aos bolsistas Patrícia, Gabriela e Artur pela ajuda na consecução dos experimentos;
- ♥ Aos amigos Raquel, Sibebe, Lu Batistella, Manuela, Marcelo, Lindomar, Peque, Daia, Maria José, Eliane, Mirian, Silvana, Stéphanie, Jaque, Lu Fontinelli, Denise, agradeço pela amizade e pelos chimarrões compartilhados, desculpa se esqueci de alguém, mas agradeço a todos;
- ♥ A todos os colegas dos Laboratórios ENGEBIO, LATESC e Central de Análises que me acolheram em todas as mudanças de lab. neste período, que não foram poucas;
- ♥ A todos que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.
 - ♥ A todos....
 - ♥ O meu muito OBRIGADO!!!

RESUMO

Neste trabalho estudou-se novas alternativas para produção de ésteres via hidroesterificação enzimática de óleo de soja e fritura em sistema livre de solvente empregando banho de ultrassom, em duas etapas, hidrólise enzimática em modo batelada seguida de esterificação dos ácidos graxos em reator enzimático operando em modo contínuo. Na etapa de hidrólise a melhor condição para o (óleo modelo) foi razão molar (óleo de soja: água) 1:20, 40 °C, 132 W, 10 % de catalisador enzimático Lipozyme TL IM e 300 rpm, utilizando álcool isopropílico para lavagem e separação da lipase. Após a hidrólise, o teor de AGL a partir de óleo de soja foi de aproximadamente 60 % (m/m) e para o óleo de fritura em torno de 60,93 % (m/m). A lipase recuperada apresentou 50 % da sua atividade relativa residual podendo ser reutilizada, e o ultrassom não interferiu na atividade residual da lipase. No teste do solvente de lavagem, quanto à recuperação e reutilização, observou-se que o mesmo pôde ser reutilizado não interferindo na produção dos AGL e nem na atividade da lipase. Para a etapa de esterificação estudou-se os efeitos das variáveis como razão molar (ácido graxo vegetal de soja (AGVS): etanol), vazão de alimentação, catalisador enzimático ideal e uso do ultrassom para a produção de ésteres etílicos em reator contínuo, onde chegou-se à condição otimizada de razão molar de 1:6 (AGVS: etanol), vazão de alimentação 2,5 mL/min, catalisador Novozym 435 e 65 °C, apresentando conversões em ésteres etílicos de 95 %. Para as reações de esterificação enzimática em modo contínuo, o ultrassom não apresentou benefícios. A integração dos processos para a hidroesterificação permitiu a produção do hidrolisado enzimático do óleo de soja e fritura com ultrassom e posteriormente esterificou-se a carga ácida em reator contínuo utilizando ultrassom. Obteve-se conversão em ésteres etílicos a partir do óleo de soja hidrolisado em torno de 82,85 % em 7 min e em 28 min uma conversão de 93,46 %. Para a esterificação do hidrolisado do óleo de fritura em reator contínuo com ultrassom obteve-se um teor de ésteres etílicos em torno de 79,33 % em 9 min, com o passar do tempo reacional o teor diminuiu para 51,87 % em 171 min utilizando ultrassom; para a reação sem o uso do ultrassom apresentou teores em ésteres etílicos em torno de 75,19 % em 9 min de reação diminuindo com o passar do tempo reacional para 66,44 % em 171 min. Na quantificação do hidrolisado provindo do óleo soja conseguiu-se quantificar os teores de AGL, MAG, DAG, TAG, água e glicerol. Através dos dados experimentais chegou-se a estequiometria da reação. Para a hidroesterificação de óleo de fritura quantificou-se os teores de AGL, MAG, DAG, TAG, água e glicerol

tanto do hidrolisado como das amostras após serem esterificadas com o intuito de verificar se além da esterificação poderiam estar ocorrendo a transesterificação, pode se concluir que ocorre a formação de água e ésteres produtos provindos da esterificação.

Palavras-chave: Hidroesterificação enzimática, ácidos graxos livres, óleo de soja, óleo de fritura, ultrassom, lipases, reator contínuo.

ABSTRACT

In this work were studied new alternatives for the production of esters by enzymatic hydroesterification of soybean and frying oil in a solvent-free system employing ultrasound bath, in two stages, enzymatic hydrolysis in batch mode followed by esterification of fatty acids in enzymatic reactor operating at continuously mode. In the hydrolysis step the best condition for soybean oil (oil type) was a molar ratio (soybean oil: water) of 1:20, 40 °C, ultrasound power of 132 W, 10 % of Lipozyme TL IM enzyme catalyst and 300 rpm using isopropyl alcohol for washing and separation of the lipase. After hydrolysis, the FFA content obtained from soybean oil was about 60 % (w/w) and from frying oil was about 60.93 % (w/w). The recovered lipase showed 50 % of its residual relative activity which could be reutilized, and the ultrasound did not interfered with residual activity of lipase. In the solvent test, considering its recovery and reutilization, was observed that the same solvent could be reused without interfering in the production of FFA nor even in the lipase activity. For the esterification step was studied the effects of variables such as mole ratio (soybean vegetable fatty acid (SVFA): ethanol), feed flow, ideal enzyme catalyst and use of ultrasound for the production of ethyl esters in a continuous reactor, where the optimized condition was molar ratio of 1:6 (SVFA: ethanol), feed flow of 2.5 mL/min, Novozym 435 as catalyst and 65 °C, with conversions of 95 % of ethyl esters. For the enzymatic esterification in continuous mode, the ultrasound bath showed no benefit. The integration of the processes for the production of hydroesterification allowed an enzymatic hydrolyzate of soybean and frying oil, with ultrasound and subsequently esterified to acid load in a continuous reactor using ultrasound. Conversion in ethylic esters was obtained from the hydrolyzed soybean oil, around 82.85 % in 7 min and 93.46 % in 28 min. For the esterification of the frying oil hydrolyzate in a continuous reactor with ultrasound gave a content of ethyl esters around 79.33 % in 9 min, as the reaction time passed the content decreased to 51.87 in 171 min using ultrasound; for the reaction without the use of ultrasound showed levels of ethyl esters around 75.19 % in 9 min of reaction, decreasing with the passage of reaction time to 66.44 % in 171 min. In the quantification of the hydrolyzate coming from soybean oil could be quantified FFA content, MAG, DAG, TAG, water and glycerol. Through the experimental data reached was made the stoichiometry of the reaction. For the frying oil hydroesterification were quantified the

levels of FFA, MAG, DAG, TAG, water and glycerol, from both hydrolyzed samples and samples after they were esterified in order to verify that if beyond the esterification could be occurring a transesterification, and so can be concluded that there is a formation of water and esters coming from esterification products. For the hypothesis that occurs along with the esterification, a transesterification can not have a precise conclusion, it should be performed other analyzes, deepening over this study.

Keywords: Enzymatic Hydroesterification, free fatty acids, soybean oil, frying oil, ultrasound, lipases, continuous reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma do documento da tese.....	27
Figura 2 - Estrutura básica dos acilgliceróis.	38
Figura 3 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel.	41
Figura 4 - Mecanismo de hidrólise do triacilglicerol pela lipase.	46
Figura 5 - Hidrólise sequencial dos grupos acila no acilglicerol, catalisada por lipases.	47
Figura 6 - Reação de esterificação do ácido carboxílico.	50
Figura 7 - Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos catalisada por ácidos.	51
Figura 8 - Esquema simplificado de produção de ésteres por hidroesterificação.	54
Figura 9 - Funcionamento do ultrassom.	61
Figura 10 - Representação do banho de ultrassom.	62
Figura 11 - Representação da ponteira ultrassônica.	62
Figura 12 - Procedimentos experimentais das etapas desenvolvidas neste trabalho.	74
Figura 13 – Fluxograma de todo o processo para obtenção do hidrolisado do óleo de soja e fritura.	75
Figura 14 - Aparato experimental utilizado para os testes de hidrólise enzimática de óleo de soja e fritura em sistema livre de solvente orgânico.	76
Figura 15 - a) Aparato experimental utilizado na esterificação enzimática em modo contínuo. b) Visão geral da unidade experimental.	80
Figura 16 - Esquema do processo de hidroesterificação enzimática. ...	84
Figura 17 - Imagem das dispersões nas condições 40 °C de temperatura, com potência do ultrassom de 132 W, razão molar óleo: água 1:9 (21,8 g de óleo de soja e 4,05 g de água). As condições de agitação mecânica para a formação da emulsão como etapa prévia foram: (a) 2000 rpm durante 1,5 h, seguida de 300 rpm durante tempo reacional; (b) 1000 rpm durante 1,5 h, seguida de 300 rpm durante o tempo reacional; (c) 300 rpm durante 1,5 h e durante o tempo reacional; (d) sem formação de emulsão prévia e 300 rpm durante o tempo reacional.	98
Figura 18 - Imagem da dispersão óleo e água a 40 °C, com potência ultrassônica de 132 W, razão molar óleo e água 1:9 (21,8 g de óleo de soja e 4,05 g de água).	100

Figura 19 – Cinética enzimática do óleo de soja nas diferentes condições de dispersão do óleo e água como etapa prévia em relação ao teor de AGL (% , m/m).	102
Figura 20 - Velocidade inicial das cinéticas enzimática do óleo de soja apresentadas na figura 18 nas diferentes condições de dispersão do óleo e água como etapa prévia em relação ao teor de AGL (% , m/m).....	103
Figura 21 - Hidrólise enzimática de óleo de soja catalisada por lipase de pâncreas suíno (A) e Lipozyme TL IM (B) com e sem emprego do ultrassom.	105
Figura 22 – Hidrólise enzimática do óleo de soja variando a razão molar (óleo de soja: água).	106
Figura 23 - Influência do ultrassom na cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja a 0 W (○) e 132 W (◆) de potência ultrassônica e na atividade relativa residual (%) da lipase após cada tempo de reação nas condições de potência ultrassônica de 0 W (Δ) e 132 W (▪).	110
Figura 24 – Reutilização do catalisador enzimático Lipozyme TL IM na hidrólise enzimática de óleo de soja (◆) e a atividade relativa residual (%) (Δ).	112
Figura 25 - Efeito da razão molar sobre a conversão dos AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo na presença do banho de ultrassom com a Novozym 435.	118
Figura 26 - Efeito do ultrassom sobre a conversão dos AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo com a Novozym 435.	119
Figura 27 - Efeito da vazão de alimentação dos substratos na conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação em modo contínuo com Novozym 435.	120
Figura 28 - Efeito da razão molar sobre a conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo utilizando-se Lipozyme TL IM.	122
Figura 29 - Efeito da razão molar sobre a conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo utilizando-se a Lipozyme TL IM.	123
Figura 30 – Cinética enzimática de esterificação enzimática comparando os catalisadores enzimáticos Lipozyme TL IM (▪) e Novozym 435 (Δ) na conversão do AGVS em ésteres etílicos na melhor condição encontrada neste estudo.	124
Figura 31 – Esterificação enzimática do hidrolisado de soja em reator contínuo utilizando o ultrassom.	126

Figura 32 – Efeito da potência do ultrassom sobre a conversão em ésteres etílicos comparando-se a quantificação por titulação a 0 W (◆) e 132 W (●) de potência ultrassônica e a técnica EN 14103 (CG) a 0 W (◇) e 132 W (□) de potência ultrassônica na esterificação enzimática do hidrolisado de fritura. 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição de ácidos graxos do óleo de soja.	40
Tabela 2 - Vantagens do uso do etanol sobre o metanol em reações de esterificação.....	55
Tabela 3 - Trabalhos que utilizaram o método de Hidroesterificação..	58
Tabela 4 – Síntese dos trabalhos de hidrólise e esterificação enzimática de óleos vegetais utilizando a tecnologia do ultrassom, presentes na literatura.	66
Tabela 5 – Variáveis avaliadas na hidrólise enzimática de óleo de soja.	78
Tabela 6 - Especificações do ácido graxo vegetal de soja (AGVS).	83
Tabela 7 - Atividade hidrolítica dos catalisadores testados em duas temperaturas.	95
Tabela 8 - Teor de água presente nas diferentes condições de dispersão do óleo de soja e água, sem presença de enzima, 40 °C e potência ultrassônica de 132 W.	103
Tabela 9 – Teor de AGL em função das variáveis de processo como razão molar, temperatura e concentração de catalisador enzimático Lipozyme TL IM.	107
Tabela 10 – Teor de AGL em função das variáveis de processo como: razão molar, temperatura e concentração de catalisador enzimático Lipozyme TL IM.	108
Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos constituintes do óleo de fritura...	114
Tabela 12 – Atividade de esterificação das lipases testadas.	116
Tabela 13- Composição da fase lipídica do produto da hidrólise enzimática do óleo de soja em modo batelada.	131
Tabela 14- Composição do substrato e do produto da esterificação do óleo de fritura, e conversão de hidrolisado de fritura a ésteres etílicos.	133

NOMENCLATURAS

AGL	ácido graxo livre
AGVS	ácido graxo vegetal soja
C _E	concentração de catalisador enzimático
CG	cromatógrafo em fase gasosa
DAG	diacilgliceróis
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
MAG	monoacilgliceróis
mL	mililitros
mg	miligrama
Mol	moles
M	molaridade
Min	minutos
rpm	rotação por minuto
v	volume
TAG	triacilgliceróis
U/g	unidade de atividade enzimática por grama
W	watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
3.1 ÓLEOS E GORDURAS.....	37
3.2 ÓLEO DE SOJA.....	39
3.3 ÓLEOS DE FRITURA.....	41
3.4 ENZIMAS.....	42
3.4.1 Enzimas lipolíticas.....	43
3.5 PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS E GORDURAS.....	44
3.5.1 Hidrólise enzimática.....	45
3.5.2 Esterificação enzimática.....	50
3.5.3 Hidroesterificação enzimática.....	54
3.6 ULTRASSOM.....	60
3.7 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ÉSTERES OPERADO EM REGIME CONTÍNUO.....	68
3.8 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	68
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1 MATERIAL.....	71
4.1.1 Reagentes.....	71
4.1.2 Catalisador enzimático.....	72
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	74
4.2.1 Primeira etapa: <i>hidrólise enzimática</i>	74
4.2.2 Segunda etapa: <i>esterificação enzimática</i>	79
4.2.3 Integração dos processos: <i>hidroesterificação</i>	83
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	84
4.3.1 Métodos utilizados na etapa de <i>hidrólise enzimática</i>	84
4.3.2 Métodos utilizados na etapa de <i>esterificação enzimática</i> em modo contínuo.....	87
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM MODO BATELADA.....	95
5.1.1 Seleção do catalisador enzimático com potencial para a reação de hidrólise.....	95
5.1.2 Determinação das condições de preparação da dispersão óleo de soja e água.....	97

5.1.3 Cinética enzimática da hidrólise em banho de ultrassom em modo batelada avaliando o tipo de agitação.....	101
5.1.4 Influência das variáveis razão molar, temperatura, concentração de enzima e solvente adequado na recuperação da lipase em relação ao teor de ácidos graxos.....	106
5.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM MODO CONTÍNUO.....	116
5.2.1 Seleção do catalisador enzimático com potencial para a reação de esterificação.....	116
5.2.2 Efeito da razão molar (AGVS: etanol) na esterificação do ácido graxo vegetal em modo contínuo em ultrassom.....	117
5.3 INTEGRAÇÃO DAS DUAS ETAPAS: HIDROESTERIFICAÇÃO.....	125
5.3.1 Hidroesterificação enzimática de óleo de soja e óleo de fritura.....	125
6 CONCLUSÕES.....	137
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	141
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXO I.....	171

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS DE SOJA E FRITURA EM SISTEMA DE ULTRASSOM

Por quê?

- ✓ A hidroesterificação é uma alternativa na produção de ésteres principalmente quando se utilizam óleos reciclados, podendo-se realizar o reaproveitamento destes dando um destino adequado e contribuindo com o meio ambiente
- ✓ Catalisadores enzimáticos sólidos podem ser reutilizados
- ✓ Reator em modo contínuo permite melhor controle e reduz o custo operacional

Quem já fez?

- ✓ São poucos os trabalhos de hidroesterificação os quais realizam tanto a hidrólise quanto a esterificação utilizando catalisadores enzimáticos
- ✓ Não constam na literatura trabalhos de hidroesterificação enzimática em ultrassom sem uso de agentes emulsificantes
- ✓ A hidroesterificação em reator em modo contínuo é considerada uma alternativa promissora

Hipóteses?

- ✓ É possível a obtenção de AGL pela hidrólise em ultrassom, sem a utilização de agentes emulsificantes e solventes orgânicos
- ✓ O óleo hidrolisado (fase lipídica) pode ser esterificado em reator em modo contínuo obtendo altas conversões em ésteres
- ✓ É possível realizar a hidroesterificação do óleo de fritura
- ✓ É possível a quantificação dos produtos e subprodutos das reações de hidrólise e esterificação enzimática
- ✓ Na hidroesterificação do óleo de fritura pode ocorrer além da esterificação a transesterificação

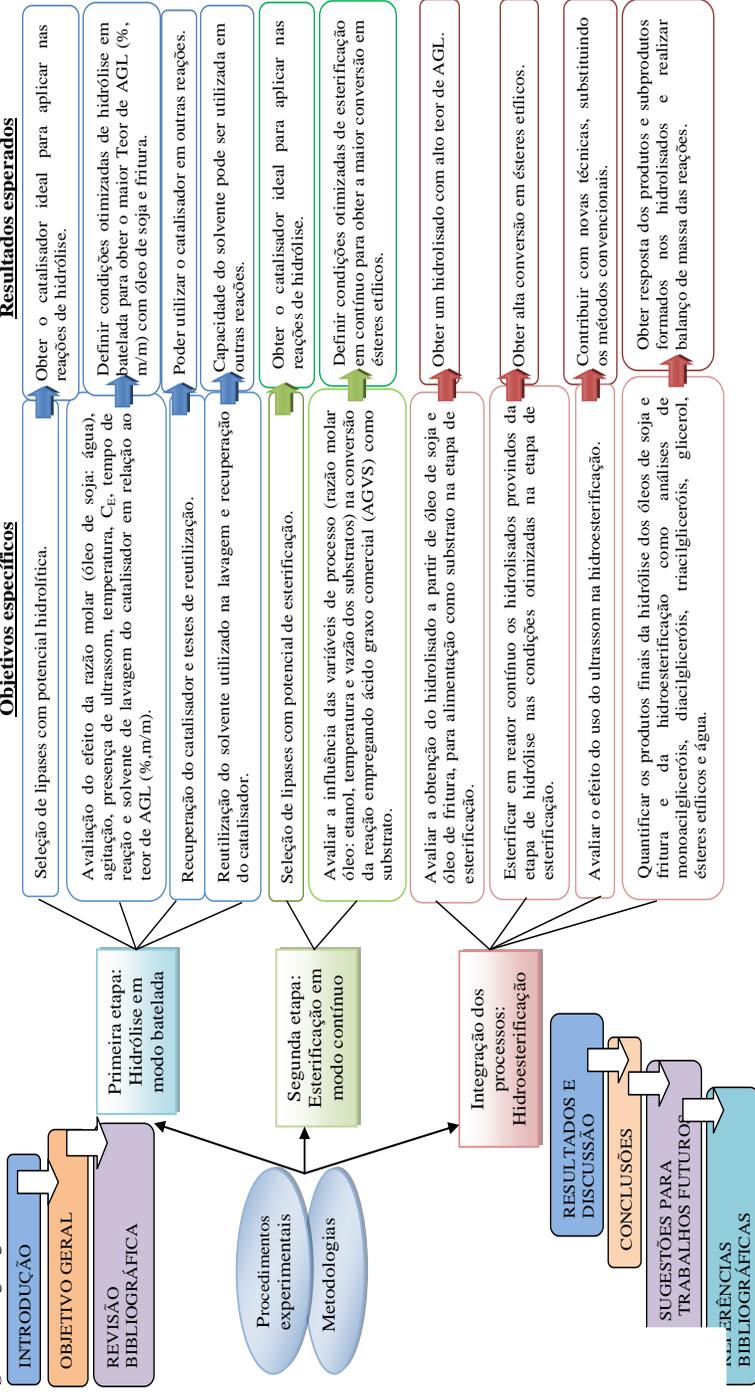
Métodos experimentais

- ✓ Método de atividade catalítica da lipase
- ✓ Quantificação dos produtos, AGL e ésteres, por titulação e CG
- ✓ Método de recuperação do solvente de lavagem do catalisador e recuperação do catalisador para reutilização
- ✓ Quantificações do teor de MAG, DAG, TAG, água, ésteres, glicerol e AGL no produto final

Resposta

- ✓ Determinar condições experimentais que conduzam a maior valor de teor de AGL através da hidrólise
- ✓ Como recuperar e reutilizar o catalisador utilizado na hidrólise
- ✓ Obter maiores conversões em ésteres etílicos pela esterificação dos AGL

Figura 1 - Organograma do documento da tese.



1 INTRODUÇÃO

O uso da tecnologia enzimática na modificação de óleos e gorduras vem ganhando cada vez mais espaço, de um lado devido às vantagens que apresenta frente aos processos convencionais, que exigem a operação em temperaturas e pressões mais elevadas e grande consumo de produtos químicos, e de outro devido ao desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitam a obtenção de enzimas de diversas fontes com um custo reduzido. Dentre as vantagens da rota enzimática, pode-se apontar o maior rendimento e maior especificidade do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia e redução da quantidade de resíduos gerados (CASTRO et al., 2004).

As lipases são enzimas naturalmente presentes no organismo dos seres vivos, responsáveis pelo metabolismo de óleos e gorduras. Estas enzimas possuem um grande potencial biotecnológico, pois em meio aquoso catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, e em condições de baixa quantidade de água podem promover também reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (JAEGER et al., 1994). As lipases (triacilglicerolacilidrolases E.C.3.1.1.3) atuam na interface entre a fase aquosa e o óleo, catalisando a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG), produzindo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (NOOR et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

O processo mais comum para obtenção de ésteres a partir de triacilgliceróis é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. Mais recentemente vem sendo estudado também o processo de hidroesterificação, o qual permite, além da utilização de uma ampla variedade de lipases de baixo valor comercial, o uso de uma maior variedade de matérias primas, incluindo óleos de fritura, óleos de elevada acidez bem como matérias graxas residuais do processamento de óleos.

A hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise seguida de uma etapa de esterificação. A hidrólise consiste em uma reação química entre a gordura ou o óleo com a água, gerando-se glicerina e ácidos graxos. Após a hidrólise, a glicerina é removida e os ácidos graxos gerados são então esterificados com um álcool que “neutraliza” a acidez presente, gerando ésteres de elevada pureza. Na reação também se obtém, como subproduto, a água, que pode retornar para o processo de hidrólise (ENCARNAÇÃO, 2008).

Na busca por novas técnicas que possam melhorar o rendimento de processos industriais, a tecnologia que emprega ultrassom vem se mostrando uma alternativa promissora devido aos benefícios que pode promover como miscibilidade do substrato, e à sua aplicabilidade em uma vasta gama de atividades (KWIATKOWSKA et al., 2011). Alguns estudos relatam que o uso de ultrassom possibilita a formação de emulsões mesmo sem a presença de substâncias surfactantes, devido à ocorrência de fenômenos no meio que promovem uma efetiva agitação e dispersão de fases em sistemas heterogêneos. Em reações enzimáticas, o uso de ultrassom tem demonstrado aumentos na atividade e estabilidade enzimática, bem como na vida útil destes biocatalisadores. No entanto, deve-se ressaltar que a influência das ondas ultrassônicas sobre enzimas podem ser positiva ou negativa, dependendo diretamente dos parâmetros de processo empregados e do tipo de enzima utilizada (KWIATKOWSKA et al., 2011; CHANDRALAPA et al., 2012).

Devido ao alto custo das lipases, o processo contínuo na produção de ésteres alquílicos, utilizando lipases imobilizadas empacotadas em reator de leito fixo (PBR) é considerado um processo viável (AL-ZUHAIR et al., 2011). Os reatores de leito fixo são, tradicionalmente, empregados na maioria dos reatores biocatalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala e controle automático e menor grau de força de cisalhamento, o que conseqüentemente, evita a ruptura das partículas do biocatalisador (AL-ZUHAIR et al., 2011; BALTARU et al., 2009; CHANG et al., 2009; CHEN; LIN, 2010; HALIM et al., 2009; WANG et al., 2011).

A inspeção da literatura revela que há poucos trabalhos sobre a hidroesterificação de óleos visando à produção de ésteres, que utilizam catalisadores enzimáticos tanto na etapa de hidrólise quanto na de esterificação, sendo que a maioria emprega as rotas enzimática/química. Do mesmo modo é difícil encontrar trabalhos que estudem a recuperação e reutilização do catalisador enzimático da etapa de hidrólise. Até o presente momento não foram encontrados trabalhos que utilizem a tecnologia do ultrassom em reação de hidroesterificação. Diante do cenário biotecnológico há uma grande preocupação com meio ambiente encaixando os conceitos de tecnologia verde. Devido a estas preocupações motivam-se estudos de processos que gerem menos resíduos, menores gastos energéticos, reutilização de resíduos de óleos e gorduras entre outros.

Levando-se em consideração a importância do estudo dessa nova tecnologia, com base nos aspectos expostos anteriormente, este trabalho

visa explorar o potencial do ultrassom para produção de ésteres em sistema livre de solvente orgânico, por meio do processo de hidroesterificação enzimática de óleo de soja, aqui empregado como matéria-prima modelo e após a aplicação em óleo de frituras, em reator contínuo, visando uma diminuição de tempo, custos e gastos energéticos e proporcionando um destino para óleos residuais, permitindo sua reutilização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral investigar nova alternativa para produção de ésteres via hidroesterificação enzimática de óleo de fritura em sistema livre de solvente empregando banho de ultrassom, em duas etapas, hidrólise enzimática em modo batelada seguida de esterificação dos ácidos graxos em reator enzimático operando em modo contínuo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Hidrólise enzimática em batelada:

- ✓ Identificar dentre catalisadores enzimáticos comerciais e não-comerciais, aqueles que apresentem um maior potencial de hidrólise;
- ✓ Determinar as condições de preparação da dispersão óleo e água, como razão molar (óleo:água), condições de agitação e estabilidade da emulsão;
- ✓ Avaliar a cinética enzimática de hidrólise em modo batelada em banho de ultrassom sob a influência das variáveis de processo (tempo e intensidade da agitação para formação da emulsão, tempo de reação e quantidade de enzima, solvente adequado para extração);
- ✓ Estudar a reutilização do solvente usado para extração dos AGL e separação do catalisador enzimático, bem como o estudo da reutilização da lipase para outras reações;
- ✓ Realizar a hidrólise de óleo de fritura adquirido de restaurantes locais, otimizar condições para este óleo, tendo como base as condições já otimizadas para óleo de soja.

Esterificação enzimática em contínuo:

- ✓ Selecionar o catalisador enzimático adequado à esterificação dos ácidos graxos gerados na etapa de hidrólise;
- ✓ Avaliar influência das variáveis de processo (razão molar óleo: etanol, temperatura e vazão dos substratos) na conversão da reação empregando ácido graxo vegetal de soja (AGVS) comercial, como substrato.

Integração dos processos: Hidroesterificação

- ✓ Avaliar a obtenção do hidrolisado a partir de óleo de soja e óleo de fritura, para alimentação como substrato na etapa de esterificação;
- ✓ Esterificar em reator contínuo os hidrolisados provindos da etapa de hidrólise nas condições otimizadas na etapa de esterificação;
- ✓ Avaliar o efeito do uso do ultrassom na hidroesterificação;
- ✓ Quantificar o produto final da hidrólise dos óleos de soja e fritura e da hidroesterificação como análises de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, glicerol e água.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão acerca do estado da arte no qual o presente trabalho se insere, procurando evidenciar a relevância do tema sob investigação, para a literatura científica. Inicialmente, será apresentada uma visão geral sobre óleos e gorduras, enzimas, lipases, evidenciando suas vantagens, aplicações e características. Posteriormente, ênfase será dada á modificação de óleos e gorduras, apresentando de forma sucinta as principais reações. Por fim, uma breve explanação sobre a utilização do ultrassom em reações catalisadas por enzimas mostrando a carência de trabalhos na literatura relatando o emprego de lipases na hidrólise de óleo de soja em sistemas de ultrassom para produção de ácidos graxos livres e posteriormente sua esterificação através do processo de hidroesterificação para obtenção de ésteres, sendo uma rota alternativa diante das convencionalmente utilizadas.

3.1 ÓLEOS E GORDURAS

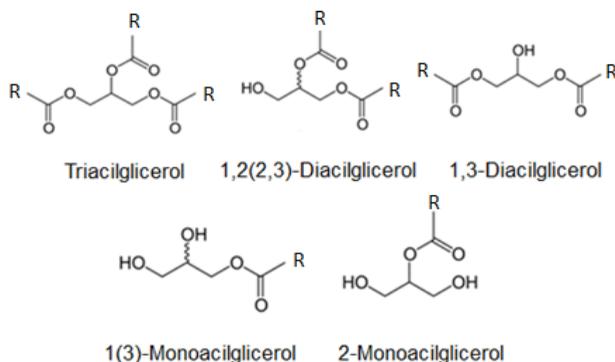
Desde a última década têm surgido um grande interesse na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando à utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado, de uso potencial na indústria farmacêutica, de alimentos, oleoquímica, entre outras. Os óleos e gorduras são matérias-primas versáteis para aplicação desta tecnologia (CASTRO et al., 2004).

Os óleos e gorduras são substâncias pertencentes à classe dos lipídeos podendo ter origem em diversas fontes, como no tecido adiposo de animais, em frutos e sementes (AWADALLAK et al., 2013). Em geral, os óleos e gorduras comestíveis são insolúveis em água e constituídos predominantemente por ésteres de glicerol e ácidos graxos (VOLL, 2011).

O esqueleto de óleos e gorduras é formado por cadeias de ácidos orgânicos lineares, denominados ácidos graxos ou ácidos carboxílicos com cadeia carbônica longa. Além disso, a grande maioria dos ácidos graxos naturais não apresenta ramificações e contém um número par de carbonos devido à rota bioquímica de síntese. Os ácidos graxos diferem entre si pelo número de carbonos da cadeia e também pelo número de insaturações (NICHOLS et al., 2003; MARTIN et al., 2006).

Nos óleos e gorduras, os ácidos graxos podem ser encontrados livres ou, preferencialmente, combinados. Na forma combinada, seus derivados são normalmente encontrados como monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, os principais compostos dos óleos e gorduras (Figura 2) (SUAREZ et al., 2007).

Figura 2- Estrutura básica dos acilgliceróis.



Monoacilgliceróis ou monoglicerídeos (MAG) são surfactantes não iônicos, que possuem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drugs Administration-USA), sendo amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas como emolientes para emplastos, liberando lentamente o medicamento, na indústria de alimentos como emulsificantes em produtos de panificação, margarinas, derivados do leite, doces e molhos, e na indústria de cosméticos são usados na melhora da consistência de cremes e loções. Estes compostos não promovem irritações na pele nem efeitos colaterais quando ingeridos, ao contrário dos tensoativos iônicos (FREITAS, 2006; KAEWTHANG et al., 2005).

Os diacilgliceróis ou diacilglicerídeos (DAG) são ésteres de glicerol que possuem dois grupos hidroxila esterificados por ácidos graxos, podendo existir em duas formas estequiométricas, 1,2 (2,3)-DAG e 1,3-DAG (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000). O DAG apresenta um teor de pelo menos 80 % de 1,3-DAG e tem sido utilizado como um óleo de cozinha funcional, devido às suas propriedades nutricionais (NAGÃO et al., 2000), sendo que também pode ser utilizado como emulsificante e estabilizante para as indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica (GONÇALVES et al., 2012).

Assim, estes compostos estão naturalmente presentes em óleos e gorduras, mas em níveis inferiores aos de TAG e representam uma classe importante de produtos químicos amplamente utilizados na indústria moderna (REDÓN et al., 2001).

Segundo Hidalgo e Zamora (2003) mais de 95 % (massa) dos óleos e gorduras são constituídos de triacilgliceróis, a fração restante é composta por monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, proteínas, esteróis, vitaminas e tocoferóis. As moléculas de triacilgliceróis são constituídas de três moléculas de ácidos graxos (AGL) de cadeia longa ligadas, na forma de ésteres, a uma molécula de glicerol (GERIS et al., 2007).

Devido às diferentes funcionalidades presentes em sua estrutura química, os triacilgliceróis, que são derivados de ácidos graxos, exibem uma grande versatilidade reacional (GUSTONE, 2000). Eles representam a principal forma de armazenamento de energia das plantas e nos animais (KOLAKOWSKA; SIKORSKI, 2002), pois são altamente eficientes no armazenamento de energia metabólica, uma vez que são menos oxidativos que ácidos e proteínas e praticamente não absorvem água (MATOS, 2010).

3.2 ÓLEO DE SOJA

A planta da soja pertence à classe *Dicotyledoneae*, subclasse *Archichlamydae*, ordem *Rosales*, subordem *Leguminosinae*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionaceae*, tribo *Phaseoleae*, gênero *Glycine* L., subgênero *Glycine* (Moench) e à espécie *Glycine max* (L.) Merrill (GONG et al., 2004).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com uma produção de 75 milhões de toneladas para a safra de 2010/2011, ficando atrás apenas dos Estados-Unidos. Destacando-se como a leguminosa de maior expressão econômica do planeta (BLACK, 2000), o grão de soja possui diversas aplicações, dando origem a produtos e subprodutos muito usados na agroindústria, na indústria química e de alimentos.

A soja possui excelente capacidade de adaptação, semelhante ao cultivo de feijão, preferindo terras sílico-argilosas férteis, nunca úmidas e nem ácidas, podendo ainda ser semeadas duas vezes ao ano (setembro-outubro e fevereiro-março). O grão possui textura macia, sabor pouco amargo, elevados teores de ácido ascórbico e β - caroteno e baixas

quantidades de fatores antinutricionais, com 17-19 % de proteínas e 35-40 % de gordura (SIMONNE et al., 2000; MARQUES, 2006; EMBRAPA SOJA, 2007).

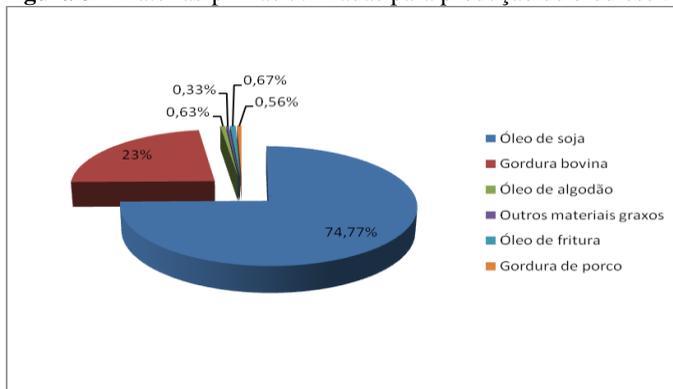
Apesar da vasta aplicação das proteínas da soja, o grão tem seu uso mais conhecido matéria-prima para a extração de óleo de soja, o qual apresenta aproximadamente 98 % da sua composição (Tabela 1) formada pelos ácidos graxos como esteárico, linolênico, palmítico, oleico e linoleico. Além disso, ainda existem pequenas quantidades de componentes não-glicerídicos, tais como fitoesteróis, ceras, hidrocarbonetos, carotenoides, tocoferóis e fosfatídeos (NETO et al., 2000).

Tabela 1- Composição de ácidos graxos do óleo de soja.

ÁCIDOS GRAXOS	NOMENCLATURA	Teor de AGL (%, m/m)
C14:0	Mirístico	-
C16:0	Palmítico	10,4
C16:1	Palmitoléico	0,1
C18:0	Esteárico	3,0
C18:1	Oleico	26,7
C18:2	Linoleico	52,2
C18:3	Linolênico	5,4
C20:0	Araquidônico	0,3
Total		98

Fonte: Remonatto (2013).

Recentemente, o óleo de soja também vem ganhando espaço como fonte alternativa de combustível, sendo a matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel, correspondendo a cerca de 80 % da produção no país (Figura 3).

Figura 3 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel.

Fonte: Adaptado de ANP (2015).

3.3 ÓLEOS DE FRITURA

Óleos comestíveis derivados de diversas oleaginosas, quando usados em frituras, geram um custo ambiental capaz de causar grandes problemas de poluição, especialmente quando descartado via esgoto doméstico. Diariamente são geradas grandes quantidades de óleo de cozinha nos lares, indústrias e estabelecimentos produtores de refeições no país. O resíduo de óleo, por falta de informação da população, muitas vezes é descartado de forma inadequada, ou seja, despejado diretamente em águas, como rios e riachos, pias e vasos sanitários, causando danos pelo entupimento de canos e o encarecimento dos processos de tratamento do esgoto (CASTANELLI, 2008). Uma vez constatado que o óleo já não é mais apropriado para consumo, o mesmo não deve ser descartado na rede pública de esgoto, pois provoca impactos ambientais significativos (SABESP, 2011). Os óleos nos esgotos pluviais e sanitários emulsificam-se com a matéria orgânica, ocasionando entupimentos em caixas de gordura e tubulações. Devido à imiscibilidade com a água e inferior densidade, há tendência à formação de filmes oleosos na superfície da água dificultando a troca de gases com a atmosfera, ocasionando depleção das concentrações de oxigênio e anaerobiose, com morte de peixes e outros organismos aeróbios. Na rede de esgotos, os entupimentos podem ocasionar pressões que conduzem à infiltração do esgoto no solo, poluindo o lençol freático ou havendo refluxo à superfície. Já nos municípios que possuem tratamento de esgoto, o mesmo quando ingressa aos sistemas com resíduos

gordurosos dificulta o tratamento, podendo encarecê-lo em até 45 % (REIS; ELLWANGER; FLECK, 2007).

A reutilização excessiva do óleo de fritura causa ainda o fenômeno de *off-flavor*, formação de espuma, aumento de intensidade de cor e viscosidade do óleo (ZHANG, 2012) e sugere-se que o mesmo seja descartado quando a quantidade de ácidos graxos livres alcançar 0,9 %, o teor de compostos polares máximo for de 25 % e os valores de ácido linolênico presente forem de até 2 % (ANVISA, 2004). Outro parâmetro importante e bastante utilizado na avaliação da qualidade dos óleos de fritura é a formação de ácidos graxos livres (AGL), uma vez que há um aumento no seu nível à medida que aumenta a degradação do óleo. Em temperaturas de fritura, uma quantidade considerável de umidade dos alimentos é liberada na forma de vapor, que reage com triacilgliceróis que, por hidrólise, formarão ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (PAUL; MITTAL, 1997).

Uma maneira efetiva de reciclar os rejeitos de óleos usados em residências, restaurantes e indústrias é a sua utilização para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos (CHEN; ZONG; WU, 2005). Segundo Watanabe et al. (2001); Li et al. (2006); Wang, Wu e Zong (2008); Dizge et al. (2009); Halim, Kamaruddin e Fernando (2009), utilizar como substrato para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos o óleo residual de fritura apresenta-se como uma alternativa promissora dando um destino correto para estes resíduos.

3.4 ENZIMAS

Enzimas são macromoléculas biologicamente ativas, de natureza proteica ou glicoproteica, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação necessária para converter substrato em produto, sem que o equilíbrio da reação seja alterado. O mecanismo celular de sistemas vivos, animais, vegetais e microorganismos, depende da ação de enzimas, provenientes de tecidos animais e vegetais (glândulas, sementes e frutos), e culturas de microorganismos, que constitui atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica, onde se pode utilizar o próprio microrganismo ou fazer a extração de enzimas do meio de cultura de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (NEIDLEMAN, 1991; LEHNINGER et al., 2000).

A utilização de enzimas como biocatalisadores de reações de interesse apresenta vantagens por exigir um menor consumo energético, maior rendimento e obtenção de produtos biodegradáveis (CASTRO et

al., 2004). Elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, sem a ocorrência de reações paralelas, o que as difere dos catalisadores convencionais que exigem temperaturas mais elevadas e valores de pH distantes da neutralidade (FARIA, 2010). Outra vantagem reside na facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio reacional, ajustando o pH ou adicionando suplementos. Estes biocatalisadores podem ser usados nas formas brutas ou imobilizados, o que protege sua configuração nativa, contribuindo para sua estabilidade e permitindo sua reutilização (FABER, 1997).

O uso de enzimas em síntese orgânica vem crescendo exponencialmente, com aplicação em diversos tipos de biotransformações. Suas propriedades como biocatalisadores as tornam altamente requisitadas devido ao seu grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e na área de química fina. O mercado global da indústria de enzimas abrange o setor de produtos alimentícios, detergentes, têxteis, tratamento de couro e vinícolas. No setor alimentício, destaca-se a aplicação de enzimas na produção de alimentos fermentados, edulcorantes, etanol de cereais, produtos lácteos, sucos de frutas, indústrias de panificação e cervejarias (CARREA; RIVA, 2000; FABER, 1997).

3.4.1 Enzimas lipolíticas

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1), sendo classificadas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3). São amplamente distribuídas na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas. Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir de órgãos de animais (pâncreas) e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (FROST; MOSS, 1987). De modo geral, as enzimas obtidas a partir de microrganismos apresentam uma maior estabilidade térmica frente às extraídas de animais e vegetais, além de serem facilmente separadas por filtração ou centrifugação, constituindo um dos grupos mais utilizados atualmente no segmento industrial. Os microrganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* e leveduras do gênero *Candida* (HASAN et al., 2006).

Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C, com atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C (VULFSON, 1994). Um teor de água residual geralmente de 0,5 a 1 % (m/v), correspondente a uma atividade de água (aw) de 0,25 a 0,45, é necessário para a atividade catalítica da maioria das lipases. Este teor, entretanto, pode ser de até 11 % (m/v) (VILLENEUVE, 2007).

Em relação à especificidade quanto ao substrato, as lipases podem ser classificadas em quatro grupos: lipases não específicas ou aleatórias, relacionada à classe de lipídios onde a enzima é específica em relação ao tipo de éster; lipases regioespecíficas, onde a seletividade da enzima é determinada pela posição da ligação éster em uma molécula; lipases estereoespecíficas, que catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros; e lipases ácido graxo específico, onde a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia do ácido graxo ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia (VAN DER PADT, 1993; FREITAS, 2008).

Devido ao grande potencial, as lipases vêm sendo usadas nos mais diferentes tipos de indústria em diferentes aplicações. Na indústria de alimentos é usada como aditivo para síntese de aromas (maturação de queijos) e edulcorantes (aspartame); na área médica são usadas como remédio digestivo e para fins diagnósticos; na indústria farmacêutica promove a síntese de intermediários de fármacos (ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória) e resolução de misturas racêmicas (síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo). As lipases são também usadas na indústria de detergentes, de couro e para o tratamento de efluentes (BURKERT, 2002; BURKERT et al., 2004). Podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, transesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise (DALLA-VECCHIA, 2004).

3.5 PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS E GORDURAS

Nos últimos vinte anos têm surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras (CLAUSS, 1996; GONÇALVES, 1996; LIMA, 1996). Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais

e empregados como importantes matérias primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (GUNSTONE, 1999).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de aperfeiçoar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases, incluindo a utilização de meios não convencionais, imobilização da enzima, estudos cinéticos e de estabilidade da enzima, modificações químicas e desenvolvimento de biorreatores (FACIOLI; GONÇALVES, 1998).

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes (CLAUSS, 1996; GRAMPONE, 1993). Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um composto. Existem casos, entretanto, que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação. Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos (CASEY, 1992; HAMMAND, 1988).

A versatilidade das lipases tem sido explorada ou para substituir processos existentes, ou para produzir uma série de compostos considerados praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional. Esta habilidade catalítica tem sido aplicada na hidrólise de gorduras para produção de ácidos graxos, esterificação ou interesterificação de gorduras e outros lipídeos para preparação de produtos alimentícios ou não alimentícios (HAMMOND; GLATZ, 1988; VALENZUELA et al., 1994; WILLIS et al., 1995)

3.5.1 Hidrólise enzimática

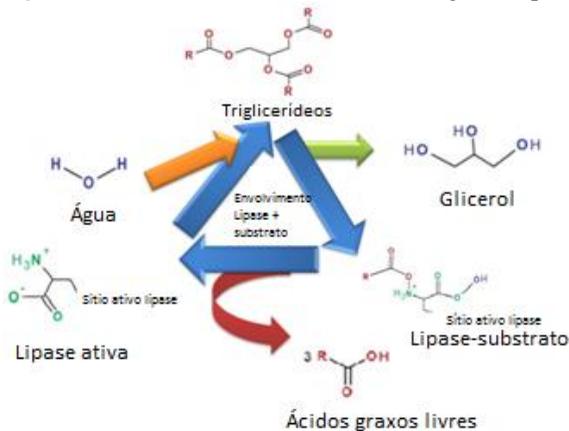
A hidrólise de óleos e gorduras tem como finalidade produzir ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais e glicerol (GIOIELLI et al., 1995). Os processos físico-químicos e enzimáticos são empregados para produção de ácidos graxos. O processo de hidrólise físico-química é geralmente conduzido sob altas pressões, na ordem de 50 Pa e temperaturas de 250 °C, por um período de até 2 horas (CLAUSS, 1996). Esse tipo de processo pode destruir cadeias longas, inativando o potencial biológico de ácidos graxos poli-insaturados (LIU et al., 2008) e geralmente fornece produtos de composição química mista, com coloração escura e rica em glicerol, requerendo uma etapa posterior de

destilação para remoção da cor e de subprodutos (NOOR et al., 2003). Em contrapartida, a hidrólise enzimática pode ser realizada sob condições mais brandas e levar à obtenção de produtos mais específicos (BEUVE; MORISON, 2010), apresentando-se como uma alternativa atrativa para a indústria, pois utiliza baixas temperaturas, variáveis controladas, meios reacionais e enzimas específicas, gerando assim um maior rendimento do processo, menor consumo de energia e redução da quantidade de resíduos (CASTRO et al., 2004).

Os ácidos graxos livres, obtidos por reações de hidrólise de óleos e gorduras, podem ser interesterificados e transesterificados (LIU et al., 2008), possuindo um vasto campo de aplicação como matéria-prima para a produção de ésteres, álcoois e aminas graxas, utilizados como lubrificantes, agentes emulsionantes, ingredientes para fabricação de sabões, detergentes e ração animal (NOOR et al., 2003). Monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ácidos graxos poli-insaturados são comumente usados como aditivos para indústrias de fármacos, alimentos e cosméticos (CASTRO et al., 2004; BABICZ et al., 2010).

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas (MERÇON, 1995). O mecanismo de reação de hidrólise bem conhecido para a ação da lipase em triacilgliceróis no óleo é apresentado na Figura 4.

Figura 4- Mecanismo de hidrólise do triacilglicerol pela lipase.

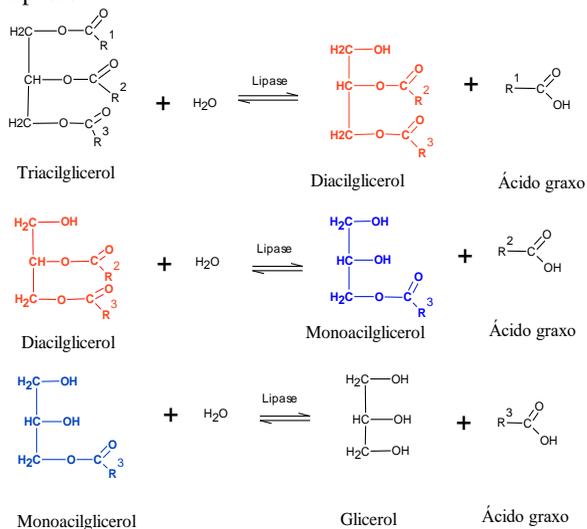


Fonte: Adaptado de SHARMA et al. (2012).

As lipases são enzimas interfaciais, permanecem ativada na interface óleo-água, devido à conformação tampa aberta de lipases na interface do sistema bifásico (YAN et al., 2011; MARUYAMA et al., 2000). O mecanismo representa a ligação do grupo acil (RCOO^-) na cadeia lateral positivo (NH_3^+) e íons de hidrogênio (H^+) na cadeia lateral negativo (COO^-) no sítio ativo da lipase. Isso provoca a liberação de ácidos graxos livres (RCOOH) no sistema solvente bifásico e também pode ser recuperado depois da extração da fase solvente.

A hidrólise parcial tem como intermediários DAG e MAG, que consistem em TAG sem um ou dois ácidos graxos, respectivamente. Diversos fatores definem se a reação será completa ou não, como o tempo de reação e a disponibilidade de reagentes para a conversão completa. A Figura 5 mostra as etapas de reação de hidrólise de triacilglicerol (CASTRO et al., 2004).

Figura 5 - Hidrólise sequencial dos grupos acila no acilglicerol, catalisada por lipases.



As lipases microbianas têm sido classificadas em três grupos, em função de sua especificidade com relação ao substrato: Lipases 1,3 específicas - catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições *sn*-1 e *sn*-3 dos acilgliceróis. A hidrólise total pode ocorrer se a reação for por tempo prolongado, considerando-se que o 2- MAG ou 1,2 (2,3)- DAG formados, ambos quimicamente instáveis, podem ser

isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3. As lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei* pertencem a este grupo. A lipase pancreática é uma típica lipase *sn*-1,3 específica, e algumas lipases vegetais (colza, mostarda e lupino) têm demonstrado possuir este tipo de especificidade. Lipases não específicas catalisam a hidrólise de TAG para ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório. Não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que este está esterificado no glicerol. Exemplos são as lipases de *Penicillium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*. Lipases ácido graxo específicas catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação *cis* na posição 9 (MACRAE; HAMMOND, 1985).

Linfield et al. (1984) estudaram a hidrólise de sebo, óleos de coco e oliva utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. A reação em emulsão foi conduzida em sistemas de frascos agitados, obtendo-se elevadas conversões (97-99 %) em 72 horas de reação. A hidrólise do óleo de palma foi estudada por Khor et al. (1986). Os autores empregaram três diferentes tipos de lipase: de *Candida rugosa*, lipase de germe de trigo e lipase pancreática de porco. Dentre as 3 lipases, a que apresentou melhores resultados foi a de *Candida rugosa*, com atividade ótima a 37 °C e pH 7,5.

Wang et al. (1988) analisaram a hidrólise de óleo de oliva catalisada por lipase de *Candida rugosa* em sistema com emulsão. Os autores não empregaram nenhum tipo de emulsificante, sendo a emulsificação realizada apenas com agitação mecânica. Foi verificado que as velocidades de hidrólise com e sem emulsificante foram similares.

Park et al. (1989) estudaram a hidrólise de óleo de soja com diferentes tipos de lipase, onde o principal objetivo era comparar as atividades das enzimas em sistemas isolados e em sistemas combinados com dois tipos diferentes de lipases. Após 10 h de reação, os autores verificaram que os sistemas de lipases combinadas apresentaram cerca de 98 e 99,5 % de conversão, sendo superiores aos sistemas com apenas uma lipase que apresentou 7,2 e 44,4 % de conversão.

Bilyk et al. (1991) estudaram a hidrólise de diferentes óleos vegetais e animais por lipases de *Candida rugosa*, de *Rhizomucor michei*, e de pâncreas suíno, em sistemas empregando n-hexano como solvente. Após a reação, estes autores recuperaram a lipase por filtração

e reempregaram-na no sistema, não verificando perda significativa de atividade, o que possibilitou a sua reutilização por várias vezes. Fu et al. (1995) estudaram a hidrólise do óleo de oliva, óleo de soja, óleo de palma, óleo de coco e óleos hidrogenados empregando o catalisador lipase de *Aspergillus* sp. A lipase apresentou alta atividade específica (60000 U/g) e não demonstrou especificidade por posição. Esta enzima também demonstrou ser mais efetiva na catálise, quando comparada com a Lipolase de *A. oryzae*, com ótima atividade a 37 °C e pH de 6,5 a 7. A enzima foi ativada por íons cálcio, mas inativada por solventes orgânicos como o isopropanol e propanona. Todos os substratos analisados foram hidrolisados aos ácidos graxos correspondentes, empregando uma concentração de enzima de 5 a 30 U/meq, com rendimento de 90 a 99 %, em tempo de reação de 2 a 24 h.

Ghosh e Bhattacharyya (1995) estudaram a hidrólise enzimática de óleos comerciais em alta acidez como de coco, soja, mostarda, girassol e arroz com o objetivo de produzir ácidos graxos. Acilgliceróis neutros de óleos de alta acidez foram quase completamente hidrolisados por lipase de *Candida cylindracea* em 48 h. O óleo de coco, com acidez inicial de 69,2 %, foi hidrolisado à temperatura de 35 °C por 48 horas, atingindo acidez final de 80 %.

Kiatsimkul et al. (2006) estudaram 8 diferentes lipases comerciais na hidrólise de óleo de soja em agitador rotativo e verificaram que a lipase de *C. rugosa* conduziu a um melhor rendimento na reação de hidrólise em 24 horas (25 %) seguida da lipase de *A. niger* (13 %). Quando foi realizada hidrólise do óleo de soja epoxidado, 45 % de conversão foram obtidos pela lipase de *B. cepacia* e 23 % pela lipase de *C. rugosa* em 2 horas de reação.

Padilha e Augusto-Ruiz (2007) realizaram hidrólise de óleo de pescado empregando lipase de pâncreas suíno em solução tampão pH 8 e acetato de polivinila como emulsificante. As reações foram realizadas a 38 °C sob agitação magnética e o rendimento em ácidos graxos livres foi de 44 % em 1 hora de reação.

Outro estudo promissor foi o apresentado por Talukder et al. (2010), sobre a hidrólise do resíduo de óleo de cozinha por lipase de *Candida rugosa*, o qual conduziu a conversões completas após 10 horas a uma concentração de óleo de 50 % e a concentração da lipase de 0,025 %, sem aditivos para o meio de reação (água).

Rodrigues e Ayub (2011) estudaram a hidrólise de óleo de soja com mistura de enzimas comerciais de *T. lanuginosus* (TLL, Lipolase 100 L, imobilizada em Lewatit® VP OC 1600) e *R. miehei* (RML, Lipozyme RM IM) em agitador rotativo, a 30 °C por 10 horas. Na

condição ótima (razão molar água: óleo 3:1, 25 % de enzima sobre a massa de óleo, razão mássica TLL/RML de 65 %) foram obtidos 95 % de conversão.

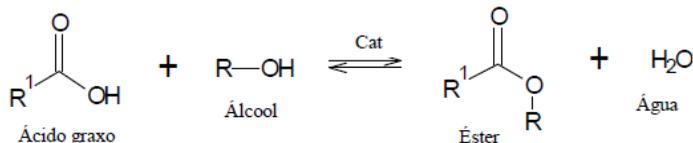
A literatura aponta que, em condições de pressão atmosférica e temperaturas mais amenas (35-65 °C), a hidrólise enzimática é bastante lenta e, em muitos casos, atinge baixas conversões mesmo em longos tempos de reação. Frente a isso, surge a necessidade de se estudar novas tecnologias para a otimização de reações de hidrólise enzimática de óleos vegetais (FEITEN, 2013).

3.5.2 Esterificação enzimática

A esterificação ocorre a partir da reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), com formação de ésteres e água, por catalisadores básicos, ácidos ou enzimas (Figura 6) (CARDOSO, 2008).

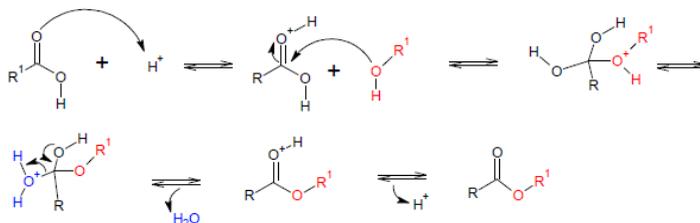
A reação de esterificação é um processo reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (esterificação) como a reação inversa (hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool (NEVES, 2008). Nesta reação, no procedimento mais comum, o ácido carboxílico é protonado por um ácido, facilitando o ataque nucleofílico do álcool na carbonila, formando um intermediário tetraédrico que posteriormente sofre um rearranjo, seguido da perda de uma molécula de água e formando uma molécula de éster, como demonstrado na Figura 7.

Figura 6 - Reação de esterificação do ácido carboxílico.



Fonte: Cardoso (2008).

Figura 7 - Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos catalisada por ácidos.



Fonte: Neves (2008).

A habilidade das lipases em catalisar a reação reversa de síntese pode ser aplicada na obtenção de inúmeros produtos de interesse. Misturas de esterificação geralmente contêm somente os substratos e enzimas sendo a água um subproduto da reação (GANDHI, 1997).

A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o tempo da reação, 1mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Como solventes hidrofílicos são geralmente evitados para prevenir a inativação da enzima, a formação desta fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação. A remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação para sua conclusão com altas conversões (CASTRO et al., 1995).

A taxa de conversão do ácido graxo em ésteres depende diretamente da maneira como a reação será conduzida, bem como das condições do processo. Assim, o curso da esterificação será influenciado por vários fatores que incluem qualidade da matéria-prima (teor de ácidos graxos livres e presença de água), temperatura reacional, razão molar álcool/ácido graxo e concentração de catalisador (LIMA, 2007). Conforme Patel et al. (2013), a reação de esterificação é uma reação de equilíbrio limitado. Visando transpor a limitação de equilíbrio, a esterificação de ácidos graxos livres geralmente é realizada utilizando o álcool em excesso, a fim de favorecer a reação.

Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem (VOLFSOON, 1994).

Industrialmente, a esterificação catalisada por lipases é empregada para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de

pureza e qualidade, que são ingredientes empregados na formulação de cremes, cosméticos e outros produtos de higiene. O processo em questão é conduzido em reatores agitados, utilizando uma preparação de lipase imobilizada numa temperatura entre 50-70 °C. A água gerada durante a reação de esterificação é removida por destilação a vapor. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subsequentes (MUKHERJEE, 1990).

Uma das características importantes de um produto para sua aplicação em alimentos, cosméticos ou fármacos é sua maior ou menor facilidade de formar emulsões estáveis. Emulsificante é uma substância que tem afinidade tanto por substâncias polares, quanto por apolares e permitem a dispersão de substâncias como lipídeos em água. Dependendo de sua composição, podem fazer parte de sistemas para uso em cremes, molhos e loções, tendo, portanto, considerável uso industrial (NOVO NORDISK, 1995; VOLFSO, 1994).

Lipases também podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol (VOLFSO, 1994). Esses tipos de ésteres são ingredientes multifuncionais, sendo usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofóbicos; podem ser utilizados em sorvetes, margarinas, coberturas, sobremesas e produtos de panificação (LIMA; NASSU, 1996).

Outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres de ácidos graxos e açúcares, que apresentam larga aplicação como em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (LORTIE, 1997; CHAMOULEON et al., 2001; TSITSIMPIKOU et al., 1997). Além de seu efeito conservante, ésteres de carboidratos e ácidos graxos têm sido associados como agentes antitumor e inibidores do crescimento de plantas (CAO et al., 1999; GAO et al., 1999). Finalmente, merece referência a produção de ésteres aromatizantes, ésteres de baixa massa molecular, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (GATFIELD, 1995).

De Castro et al. (1997) estudaram a influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo (C2 a C18) e obtiveram altas taxas de esterificação (95 a 98 %) para ácidos contendo 4 ou mais carbonos. Resultados similares foram obtidos por Habulin et al. (1996) e Janssen et al. (1993).

A lipase obtida de *Geotrichum candidum* foi relatada como sendo capaz de esterificar os ácidos oléico (18:1), linoléico (18:2) e α -linolênico (18:3) com butanol, enquanto os ácidos graxos de cadeia carbônica maior que C18, como o ácido erúico (C22:1), ou ácidos

insaturados como ácido γ -linolênico (18:3) e petroselênico (18:3), mostraram uma taxa de esterificação nula (SONNET et al., 1993). Esta possível “discriminação” pode ser aproveitada para a obtenção de concentrados de AGPI na fração não esterificada. A concentração de ácido γ -linolênico de 24,9 % em relação aos ácidos graxos totais do óleo de borragem (*Borago officinalis*) subiu para 71,8 % na fração ácidos graxos não esterificados com butanol após 48 h de reação (FAGLIA e SONNET, 1995). A reação preferencial de esterificação do butanol com os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico obtidos do óleo de *Mucor* sp. foi utilizada para obter concentrados de ácido γ -linolênico na fração ácidos graxos não esterificadas após catálise por lipase de *Geotrichum* sp. (CARVALHO; PASTORE, 1998).

Medina et al. (1999) relataram a obtenção de 93,5 % de TAG contendo 25,7 % de EPA e 44,7 % de docosaexaenóico (DHA) usando como substrato o óleo de peixe e a obtenção de 89,3 % de TAG contendo 45,6 % de eicosapentaenóico (EPA) e 43,4 % de ácido araquidônico usando como substrato a microalga *Phaeodactylum cruentum*, em meio reacional orgânico, isento de água. A adição de solventes orgânicos no meio tem sido usada como forma de impedir a hidrólise e aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos, tornando viável a reação de esterificação.

Schimitt-Rozieres et al. (2000), estudaram o aproveitamento dos constituintes oleosos do caldo (efluentes) da indústria de enlatados de sardinha, visando o enriquecimento do EPA e DHA neste óleo, após hidrólise com a lipase de *Candida rugosa*, seguida da esterificação seletiva com a lipase de Lipozyme (*Rhizomucor miehei*).

Trabalhos de pesquisa estão sendo realizados, visando à otimização e o desenvolvimento de processos em escala industrial para a síntese de diversos ésteres de valor comercial. Garcia et al. (2000) desenvolveram um modelo cinético que descreve a síntese de oleato de cetila (um análogo do óleo de cachalote, que possui importantes aplicações em indústrias de cosméticos, lubrificantes, alimentos e fármacos), usando como catalisador uma lipase comercial Novozym SP 435 (Novozymes).

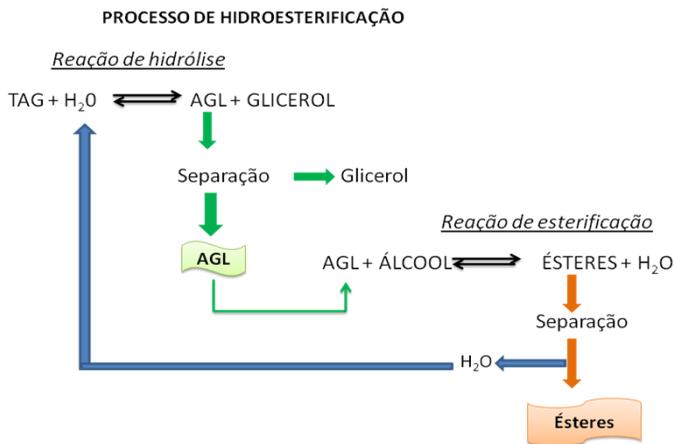
A viabilidade econômica para a produção de biodiesel pode ser acentuada quando realizada via esterificação de diferentes ácidos graxos livres presentes nas borras ácidas oriundas do processo de refino de óleo vegetais (GHANDI et al., 1995) e em resíduos graxos de outros processos (XEU et al., 2006).

3.5.3 Hidroesterificação enzimática

O processo de hidroesterificação é uma interessante alternativa para a produção de ésteres, pois permite o uso de qualquer matéria-prima graxa (óleos de plantas oleaginosas, resíduos gordurosos industriais, óleos utilizados para frituras, subprodutos de refino de óleos vegetais e gordura animal), independente do teor de ácidos graxos e da umidade que possuem. É uma alternativa ao processo convencional de produção de ésteres, pois favorece a utilização de diversas matérias-primas de qualquer teor de ácido graxo e umidade, uma vez que todos os triacilgliceróis presentes no óleo serão transformados por hidrólise (DARIO, 2006).

A hidroesterificação consiste basicamente de duas etapas: hidrólise seguida de uma reação de esterificação (ENCARNAÇÃO, 2008). Um dos primeiros passos para a obtenção de derivados químicos de óleos vegetais é a hidrólise, que conduz a glicerol, mono e diacilglicerol e uma mistura de ácidos graxos. As transformações de óleos e gorduras são predominantemente baseadas em processos químicos convencionais (ROONEY, WEATHERLEY, 2001). Na Figura 8 se encontra o esquema simplificado da produção de ésteres por hidroesterificação.

Figura 8 - Esquema simplificado de produção de ésteres por hidroesterificação.



A hidrólise em si é uma reação química que ocorre entre um triacilgliceróis e a água produzindo ácidos graxos e como subproduto o glicerol. Esta reação pode ocorrer na presença de catalisadores ácidos,

básicos e enzimáticos. Após a hidrólise, os ácidos graxos gerados são esterificados com metanol ou etanol, obtendo-se o metil ou etil éster com elevada pureza. O glicerol não sofre qualquer alteração por parte de interação com o metanol ou com o éster, uma vez que é removido ao final do processo de hidrólise. Além disso, a glicerina obtida é mais pura que a glicerina advinda do processo de transesterificação (GOMES, 2009).

A esterificação gera então os ésteres e como subproduto a água, que pode ser reutilizada no processo de hidrólise, fechando o ciclo. Isso evita problemas de contaminação dos ésteres com resíduos de glicerina livre ou total (mono, di e triacilgliceróis). Geram ésteres de mais elevada pureza, sem necessidade de etapas de lavagem que geram efluentes e o elevado consumo de compostos químicos (GOMES, 2009).

O processo de esterificação pode ser realizado com metanol ou etanol. Na Tabela 2 são apresentadas as vantagens do etanol sobre o metanol dentre as quais se destacam autossuficiência e baixa toxicidade (JAEGER et al., 1999). O metanol ainda é o álcool mais utilizado devido a seu baixo custo e por reagir mais rapidamente com o óleo vegetal do que os outros alcoóis.

Tabela 2 - Vantagens do uso do etanol sobre o metanol em reações de esterificação.

<i>CARACTERÍSTICAS</i>	<i>ETANOL</i>	<i>METANOL</i>
Despesas com importação	Não	Sim
Impacto na cadeia produtiva	Grande	Pequeno
Geração de emprego no país	Muitos	Poucos
Tecnologia de transesterificação dominada	Sim	Sim
Compatibilidade com materiais	Maior	Menor
Toxicidade	Moderada	Elevada
Impacto em caso de acidente	Baixo	Alto
Renovável	Sim	Não
Viabilidade econômica comparativa	Equivalente	Equivalente

Fonte: Adaptado de Jaeger et al. (1999).

A grande vantagem da hidroesterificação em relação à transesterificação é que o ácido graxo livre é o reagente, não sendo, portanto, uma limitação em termos de especificação de matéria-prima. Isto faz com que seja possível a utilização de matérias-primas de alta

acidez, tais como o éster de algas, óleos e gorduras residuais e óleos vegetais com acidez acima de 1 % (Ex: óleo de dendê), sem a necessidade de um pré-tratamento da matéria-prima por uma reação de neutralização. A rota se torna ainda mais atrativa se conjugada ao uso de catalisadores heterogêneos, eliminando a formação de sabão, diminuindo o número de operações unitárias de separação, tornando possível a reutilização do catalisador e produzindo uma glicerina de alta pureza, livre de sais (ARANDA, 2009).

Nas unidades de produção que se utiliza a hidroesterificação atingem-se conversões superiores a 99 %. Independente da acidez e da umidade (que é reagente do processo) da matéria-prima, o produto final de hidrólise possui acidez superior a 99 %. Portanto, ao invés de diminuir a acidez por um refino, a hidrólise aumenta propositadamente a acidez da matéria-prima. Além disso, obtém-se uma glicerina muito mais pura que a glicerina advinda da transesterificação. As matérias-primas de grau alimentício geram glicerinas de grau alimentício a partir da hidroesterificação. Isso jamais ocorre na transesterificação, onde um significativo teor de sais, alcoóis e outras impurezas encontram-se presente na glicerina (NETO, 2011).

A hidroesterificação, por dispensar catalisadores homogêneos ou ácidos e bases de lavagem, possui um custo operacional de US\$ 35/ton na produção de biodiesel enquanto que uma planta de transesterificação possui o dobro do custo operacional. Numa planta de 100.000 ton/ano isso representa um gasto a mais de US\$ 3,5 milhões/ano (USDA, 2011). A análise econômica tem mostrado que o processo de hidroesterificação pode ser tão atrativo, ou mais, que o processo de transesterificação alcalino para a produção de biodiesel (ENCARNAÇÃO, 2008).

Além disso, as vantagens de uma planta de hidroesterificação são ainda maiores pela utilização de matérias-primas ácidas como óleos bruto de palmáceas (dendê, macaúba, babaçu), óleo de mamona bruto ou gorduras de vísceras de animais de elevada acidez (suíno, gado, frango). A transesterificação é inviável para essas matérias-primas mais baratas (NETO, 2011). Como cerca de 65-85 % do custo de produção dos ésteres (biodiesel) é proveniente do custo da matéria-prima, a hidroesterificação permite um significativo salto na viabilidade da produção de ésteres (ARANDA, 2005). Do mesmo modo neste processo pode-se utilizar óleos de frituras utilizados em nossas casas, bares e restaurantes podendo dar um destino adequado para o mesmo sem nenhum processo pré-tratamento. Apesar de todos estes aspectos favoráveis, é uma técnica recente com poucos trabalhos disponíveis na

literatura. Na Tabela 3 estão os trabalhos encontrados na literatura até o momento onde o processo de hidroesterificação foi estudado.

Tabela 3 - Trabalhos que utilizaram o método de Hidroesterificação.

Referências	Gomes (2009)	Talukder et al. (2010)	De Souza et al. (2010)	Cavalcanti-Oliveira et al. (2011)	Soares et al. (2013)	Aguieiras et al. (2014)
Etapas de HIDRÓLISE	Enzimática	Enzimática	Enzimática	Enzimática	Água subcrítica	Enzimática
Modo de operação	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada
Catalisador (% em peso de óleo)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Candida rugosa</i> (0,05%)	VEEG pinhão manso (10%)	<i>Thermomyces lanuginos</i> (lipase líquida, 2,3 %)	Livre de catalisador	<i>Ricena nos communis L.</i> (2,5 m/v)
Temperatura e pressão	45 °C e 1 atm	30 °C e 1 atm	40 °C e 1 atm	60 °C e 1 atm	250 °C e 60 atm	30 °C e 1 atm
Substrato	Óleo residual da indústria pesqueira (450 g de óleo mais 600 mL enzima)	Óleo de cozinha usado: água (1:1) v/v	Tris-HCL 0,1 mol L ⁻¹ ; óleo de pinhão manso (9:1) v/v	Óleo de soja: água (1:1) v/v	Óleo ácido de borra de soja: água (1:1) v/v	50 % v/v óleo Tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH4
Conversão e	81 % em 48 h	100 % em 10 h	98 % em 2h	89 % em 48 h	95 % em 1h	99,6 % em 6 h

tempo

Etapa de ESTERIFICAÇÃO		Química	Química	Química	Química	Enzimática	Enzimática
Modo de operação	Química	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Reator feito	Reator
Catalisador (% em massa)	Ácido níotico (15 %)	Amberlyst 15 (100 %)	Ácido níóbico (20 %)	Ácido (20 %)	Sólido	Reator feito empacotado	descontínuo agitado <i>R. miehei</i> 15,1 L sólido seco para cada g de AGL
Temperatura e pressão	200 °C e 1 atm	60 °C e 1 atm	200 °C e 34 atm	200 °C e 24 atm	50 °C e 1 atm	50 °C e 1 atm	40 °C e 1 atm
Mistura de reação (razão molar dos substratos)	AGL/metano 1 (1:3)	AGL/metano 1 (4:1) em isopropanol	AGL/metanol 99 % em 2 h	AGL/metanol (1:3)	AGL/etanol (1:)	AGL/etanol (1:)	Etanol: AGL (2:1)
Conversão e tempo	56,57 % em 1 h	99 % em 2 h	97 % em 2 h	92 % em 1 h	93 % em 31 h	91 % em 8 h	

Fonte: (autora)

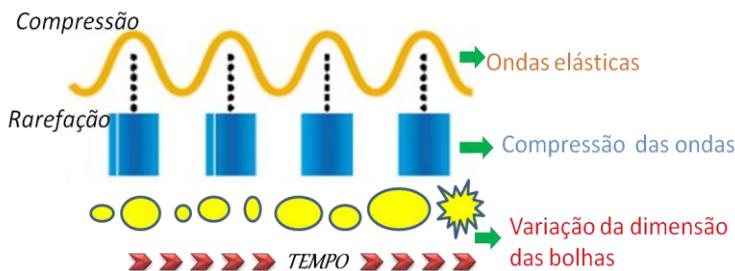
Alguns estudos têm utilizado técnicas ainda mais sofisticadas em hidrólise e esterificação enzimática, tais como ultrassom (HUANG et al., 2010; LIU et al., 2008) e CO₂ supercrítico (PRIMOŽIČ et al., 2005) para aumentar a área de interface óleo-água onde a lipase atua. Para a hidroesterificação não foi encontrado trabalho utilizando o ultrassom nem na etapa de hidrólise e nem na etapa de esterificação.

3.6 ULTRASSOM

As ondas de ultrassom é conhecido por ser uma ferramenta útil para o aumentar a transferência de massa de sistemas heterogêneos líquido-líquido (JI et al., 2006). A ciência do ultrassom trabalha com ondas sonoras de frequência acima de 20 kHz, além do intervalo perceptível pelo ouvido humano, que varia de 16 Hz a 16 KHz (MASON, 1990).

Quando ondas de ultrassom são propagadas através de um meio líquido, ocorre a interação entre as ondas ultrassônicas, o líquido e o gás dissolvido, acontecendo o fenômeno conhecido como cavitação acústica (CHANDRAPALA, 2012). A cavitação consiste na criação e implosão de microbolhas de gás e vapor no centro do líquido, devido às oscilações de pressão (BARBOSA; SERRA, 1992). Como pode-se observar no esquema apresentado na Figura 9, ciclos periódicos de oscilação de pressão (compressão e expansão) causam aumento do tamanho das bolhas que ao atingirem um tamanho crítico implodem-se, liberando grande quantidade de energia em pontos localizados no líquido, que podem atingir temperaturas da ordem de 2000–10,000 K e pressões acima de 1000 atm (LORIMER; MASON, 1987; YU et al., 2010). Esse fenômeno proporciona uma eficiente agitação do meio, pois quando ocorre a cavitação, as bolhas perto da fronteira entre duas fases de líquidos imiscíveis sofrem um colapso, fornecendo energia para promover a mistura (YACHMENEV et al., 2004).

Figura 9 - Funcionamento do ultrassom.



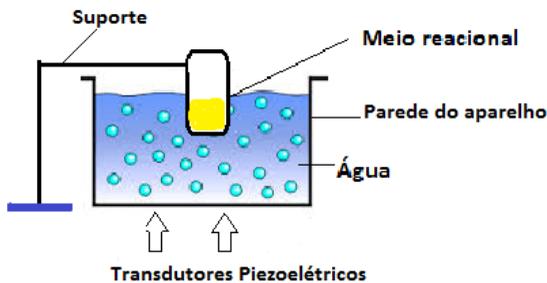
Adaptado de: Promedita (2015).

Existem muitos fatores que podem afetar a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (RASO et al., 1999). O ultrassom pode produzir cavitação e/ou formação de microfluxos em líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos, além de conferir instabilidade nas interfaces líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-sólido (BOLDYREV, 1995).

De modo geral, existem duas configurações de equipamentos de ultrassom: o banho de ultrassom e a ponteira ultrassônica. Nestes, a fonte de energia ultrassônica é um transdutor piezoelétrico, que é constituído por cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais e o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional (BARBOSA; SERRA, 1992).

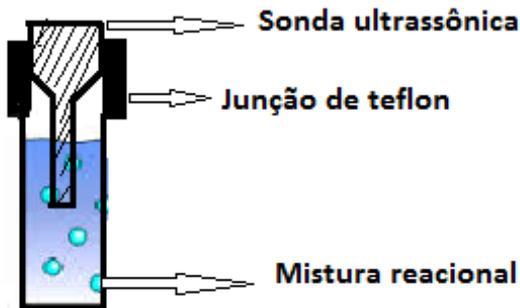
No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, normalmente água (Figura 10). Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassônica, e conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Na sonda, o transdutor é acoplado na extremidade do equipamento e entra em contato direto com o sistema reacional, por isso geralmente é mais eficiente (Figura 11) (BARBOSA; SERRA, 1992).

Figura 10 - Representação do banho de ultrassom.



Fonte: Adaptado de Barbosa; Serra, (1992).

Figura 11 - Representação da ponteira ultrassônica.



Fonte: Adaptado de Barbosa; Serra (1992).

O ultrassom é mais aplicado nas áreas da biologia (homogeneização, rompimento de células), engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc.), física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som), polímeros (polimerização, despolimerização, degradação da massa molecular), entre outros (MARTINES; DAVOLOS; JAFELICCI, 2000; CHANDRAPALA, 2012).

Há muitos relatos que incluem ultrassom como uma ferramenta para extração de metabólitos de origem vegetal e compostos bioativos de material vegetal ou animal (MASON, 2003). Ultrassom de alta intensidade tornou-se uma ferramenta para a permeabilização das

membranas celulares e perturbar as paredes celulares. Além da sua utilização como uma técnica preparativa laboratorial (VILKHU et al., 2008; BORTHWICK et al., 2005) é um método para intensificar o desempenho de biocatalisadores (CHISTI, 2003). A sonicação pode ser também uma técnica de pesquisa básica em células de levedura, incluindo a localização de proteínas enzimáticas, por exemplo, as lipases (KAPTUROWSKA et al., 2012).

Além de acelerar as reações químicas, a cavitação acústica também gera forças físicas violentas, que incluem forças de cisalhamento, ondas de choque e turbulência (ASHAKKUMAR; MASON, 2007). Em algumas aplicações, tanto as forças físicas e relações químicas são úteis. Um dos principais problemas na utilização de ultrassom no processamento de alimentos é a modificação da funcionalidade controlada de ingredientes alimentares, sem modificação química. Ashokkumar et al. (2008) têm abordado esta questão, recomendando frequência adequada e condições de energia. Em casos específicos, no entanto, a modificação química também tem sido considerada útil.

Métodos não convencionais podem ser ferramentas importantes para o desenvolvimento de processo ecologicamente corretos, especialmente em relação aos conceitos da chamada 'química verde'. Estes métodos buscam a redução de desperdícios e obtenção de produtos e subprodutos não poluentes, fornecendo tecnologias alternativas sustentáveis, com um reduzido impacto ambiental, devido à natureza biodegradável dos resíduos gerados (VARMA, 1999). A utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência, é considerada uma tecnologia "verde" devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, possuir um desempenho economicamente viável (MASON, 2007).

Tecnologias de ultrassom têm como uma vantagem interessante acelerar as velocidades de numerosas reações químicas. Em reações enzimáticas, o uso de ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica, além de um aumento da vida útil destes biocatalisadores (BATISTELLA et al., 2012).

Como se pode notar, o uso da tecnologia do ultrassom se destaca como uma alternativa aos métodos convencionais, apresentando efeitos benéficos em reações catalisadas por enzimas como reações de hidrólise, esterificação e transesterificação entre outras. Encontram-se alguns trabalhos disponíveis na literatura referentes à utilização do ultrassom

como o trabalho de Liu et al. (2008) avaliaram os efeitos das variáveis de processo na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, usando banho de ultrassom. Os autores observaram que a velocidade de reação aumenta com o aumento da razão molar água/óleo até 0,337:1 e então se mantém constante com adição de água. As maiores atividades hidrolíticas foram alcançadas na faixa de temperatura de 30 a 55 °C, a 60 °C a enzima perdeu 50 % da atividade e a 65 °C toda a atividade hidrolítica foi perdida. Também foi observado um aumento na velocidade de reação com o aumento da concentração de enzima até a concentração de 0,55 %, sendo que concentrações maiores não foram significativas em termos da velocidade reacional.

Hanh et al. (2009) estudaram a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos. A condição ótima do processo de esterificação foi com razão molar de álcool e ácido oleico de 3:1,5 % de ácido sulfúrico a 60 °C de temperatura por 2 horas de reação. Foram obtidas conversões de cerca de 80 % utilizando n-propanol, cerca de 70 % utilizando n-butanol e cerca de 60 % utilizando 2-propanol como solvente.

Santos et al. (2010) avaliaram a produção de éster metílico a partir de óleo de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e metanol, utilizando ultrassom. Os autores relataram 98 % de conversão após 90 minutos com frequência de 40 kHz e temperatura de 30 °C.

Yu et al. (2010) avaliaram o efeito das variáveis de processo na produção de biodiesel com óleo de soja e metanol em sistema de ultrassom utilizando como catalisador a enzima Novozym 435. As condições ótimas obtidas foram de 50 % de potência, 0,5 % (m/m) de água, 1:1 de álcool terc-amílico/óleo (mol/mol), 6:1 de metanol/óleo (mol/mol), 6 % (m/m) de enzima e 40 °C. Nestas condições foram obtidos 96 % de conversão em etil ésteres após 4 horas de reação. Nestas condições, a enzima não apresentou perda de atividade durante os ciclos.

Ha, Hiepe e Koo (2010) avaliaram a aplicação de radiação de ultrassom na esterificação de frutose com ácido palmítico em líquidos iônicos, catalisada por lipase. Quando se utiliza o ultrassom a conversão foi de 78 %, enquanto o uso de um agitador magnético conduziu a conversão de 62 %.

Zhu et al. (2010), estudando a produção de ésteres de frutose utilizando a lipase Novozym 435 em ultrassom, determinaram a intensidade de 10 kHz, 0,16 W.m² e 40 kHz, 1 W.m² como sendo as melhores condições para a produção de ésteres de frutose, havendo um aumento exponencial da conversão até 8 horas, e após observou-se um rápido aumento na produção de monoésteres. Este resultado ressalta o

fato de que o ultrassom pode melhorar a transferência de massa, “limpar” o canal das enzimas, e promover a remoção do produto ao redor ou dentro da lipase imobilizada.

Kumar et al. (2011) avaliaram a produção de ésteres metílicos através da metanólise do óleo de pinhão manso onde foi utilizada uma lipase imobilizada (*Chromobacterium viscosum*) como catalisador, em sistema de ultrassom. Foi avaliado o efeito do tempo, razão molar óleo/metanol, concentração do catalisador (e da amplitude e ciclo do ultrassom). A condição ótima obtida foi em 30 min de reação, razão molar óleo/metanol de 1:4, concentração do catalisador de 5 % (m/m), ultrassom com amplitude de 50 % e ciclos de 0.7 s. Na condição otimizada obteve-se o rendimento de 84,5 % em éster metílicos.

Xiao et al. (2011) investigaram a influência do ultrassom no pré-tratamento da protease alcalina de *Bacillus subtilis* na produção de troxerutin via síntese enzimática em meio contendo solvente não aquoso. O uso do ultrassom resultou em uma conversão de 87,3 % enquanto que experimentos realizados nas mesmas condições, porém com enzima não tratada, conduziram a conversões de troxerutin de 56,3 %.

Chen et al. (2011a) estudaram as variáveis que interferem na síntese enzimática do éster fenetil do ácido caféico (CAPE), em banho de ultrassom. Empregando metodologia de planejamento experimental, os autores observaram que o tempo de reação, a razão molar entre os substratos e a potência de ultrassom influenciaram nas conversões, enquanto que a quantidade de enzima não apresentou influência significativa. As condições ótimas para a esterificação enzimática foram: tempo de reação de 9,6 h, razão molar 1:71 (ácido caféico:álcoolfenetil), quantidade de enzima de 2938 PLU e potência de ultrassom de 2 W.cm⁻² com uma conversão de 96,08 %.

Wang et al. (2012) avaliaram o efeito do ultrassom na produção de (R/S)-1-cloro-3-(1-naftiloxi)2-propanol via transesterificação enzimática. Os autores avaliaram a atividade e enantiosseletividade de diferentes lipases usando sistema de ultrassom e sistema convencional (skaker). Todas as enzimas estudadas apresentaram atividade superior quando os experimentos foram conduzidos em sistema de ultrassom, embora a lipase de pâncreas suíno tenha apresentado uma enantioseletividade levemente inferior, em sistema de ultrassom.

Conforme trabalho de Batistella et al. (2012), na transesterificação de óleo de soja utilizando solvente orgânico (n-hexano) e por meio de sistema ultrassônico, houve uma tendência ascendente para os catalisadores (lipases comerciais Lipozyme RM IM e

Novozym 435). Ocorreu um aumento no rendimento nas primeiras 4 horas de reação, utilizando a enzima Lipozyme RM IM o rendimento foi de aproximadamente 86,5 % e para a Novozym 435 o rendimento foi de aproximadamente 57 %.

Kuo et al. (2013) investigaram a síntese enzimática de 4'-acetoxiresveratrol de resveratrol e acetato de vinila. Os resultados são mostrados que o composto fenólico de tempo de acetilação apresentou uma conversão molar mais elevada após 24 horas foi obtida com a ajuda de ultrassom (77 %) do que a mistura mecânica (64 %), sob as mesmas condições de quantidade de enzima. Os resultados indicaram que o ultrassom aumenta em torno de 13 % o rendimento.

Na Tabela 4 estão compilados alguns trabalhos de hidrólise e esterificação enzimática em diferentes óleos, empregando diferentes lipases, em diferentes sistemas de agitação (orbital, magnética ou mecânica) encontrados até o momento na literatura.

Tabela 4 – Síntese dos trabalhos de hidrólise e esterificação enzimática de óleos vegetais utilizando a tecnologia do ultrassom, presentes na literatura.

<i>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ULTRASSOM</i>				
<i>Autor (ano)</i>	<i>Lipase</i>	<i>Óleo</i>	<i>Conversão</i>	<i>Tempo</i>
Linfield et al. (1984)	<i>Candida rugosa</i>	Coco e oliva	98 %	72 h
Wang et al. (1988)	<i>Candida rugosa</i>	Oliva	35 %	1 h
Ghoshe e Bhattacharyya (1995)	<i>Candida cylindracea</i>	Mostarda, girassol e arroz	99 %	48 h
Kiatsimkul et al. (2006)	<i>Candida rugosa</i>	Soja	25 %	24 h
Padilha e Augusto-Ruiz (2007)	Pâncreas suíno	Pescado	44 %	1 h
Liu et al. (2008)	<i>C. lipolytica</i>	Soja	94 %	1 h
Gomes (2009)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Pescado	81 %	48 h
Babicz et al. (2010)	Lipozyme TL IM	Palma	40 %	1,5 h

Rodrigues e Ayub (2011)	<i>T. lanuginosus</i> e <i>R. miehei</i>	Soja	95 %	10 h
Gonçalves et al. (2012)	Lipozyme TL IM	Palma	25 %	1,5 h
	<i>PS Amano</i> IM		29,8 %	1,5 h
Awadalak (2012)	Lipozyme RM IM	Palma	50 %	24 h
Feiten et al. (2013)	Lipozyme TL IM	Soja	90 %	2 h

ESTERIFICAÇÃO EM ULTRASSOM

<i>Autor (ano)</i>	<i>Catalisador</i>	<i>Substrato</i>	<i>Conversão</i>	<i>Tempo</i>
Mootabadi et al. (2010)	H ₂ SO ₄	Ácido graxo destilado de palma e metanol	98 %	720 min
Hingu et al. (2010)	KOH	Óleo de cozinha e metanol	99 %	0,93 min
Chand et al. (2010)	KOH	Óleo de cozinha e metanol	89 %	40 min
Santos et al. (2009)	KOH	Óleo de cozinha e metanol	98 %	30 min
Huang et al. (2010)	H ₂ SO ₄	Ácido graxo e metanol	95 %	90 min
Santin et al. (2014)	<i>C. antarctica</i> B (CAL-B) IM	Ácido graxo de soja comercial e etanol	81 %	180 min

(Fonte: autora)

3.7 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ÉSTERES OPERADO EM REGIME CONTÍNUO

Devido ao alto custo das lipases, o processo contínuo na produção de ésteres alquílicos, utilizando lipases imobilizadas empacotadas em reator de leito fixo (PBR), é considerado um processo viável (AL-ZUHAIR et al., 2011). Entretanto, informações para ampliação de escala industrial são ainda escassas. Desta forma, grandes esforços devem ser feitos para investigar possíveis configurações de reatores que possam empregar lipases imobilizadas. No reator de leiro fixo, as enzimas imobilizadas preenchem a coluna do reator através da qual o reagente é bombeado. É um dos tipos de biorreatores mais comumente empregados na área biotecnológica (COSTA e SILVA, 2013).

Os reatores de leito fixo são, tradicionalmente, empregados na maioria dos reatores biocatalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala e controle automático e menor grau de força de cisalhamento, o que conseqüentemente, evita a ruptura das partículas do biocatalisador (AL-ZUHAIR et al., 2011; BALTARU et al., 2009; CHANG et al., 2009; CHEN; LIN, 2010; HALIM et al., 2009; WANG et al., 2011). Porém, existem alguns inconvenientes nos PBR para reações que formam glicerol como subprodutos, pois o glicerol formado fica retido na superfície da lipase imobilizada, diminuindo a eficiência catalítica e ocorrência de caminhos preferenciais (GOG et al., 2012).

Os reatores PBR operados em modo contínuo para produção de biodiesel ou para diferentes sínteses podem ser operados usando diferentes configurações: PBR simples estágio com adição gradual de álcool (ROYON et al., 2007; SHIMADA et al., 2002); PBR simples estágio com recirculação (HSU et al., 2004); PBR em serie (NIE et al., 2006); inclusive PBR para produção em escala industrial (AL-ZUHAIR et al., 2011)

3.8 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Na investigação de processos alternativos aos convencionais e ambientalmente compatíveis, este trabalho está vinculado a diversas contribuições na área biotecnológica. A utilização de catalisadores enzimáticos, ainda é um problema industrial devido ao alto custo. Neste sentido o uso de enzimas imobilizadas é uma alternativa interessante

com ênfase na reutilização, diminuindo custos de processo. Outra alternativa para minimizar os problemas encontrados no processo convencional de produção de ésteres via catálise enzimática é o processo de hidroesterificação, sendo esta a mais nova e interessante alternativa para a obtenção destas substâncias, pois permite o uso de qualquer matéria-prima independente do teor de ácidos graxos e da umidade que possuem.

A grande maioria dos trabalhos de síntese enzimática direciona para a seleção de enzimas adequadas, e para testes de desempenho catalítico efetuados em reatores operados em regime batelada, em pequena escala de produção. Entretanto, em termos práticos, os processos que envolvem enzimas imobilizadas são preferivelmente operados em forma contínua. Estes sistemas, quando comparados com processos em batelada apresentam vantagens técnicas, por possibilitarem o controle automático, serem mais fáceis de operar e favorecem o controle de qualidade do produto, proporcionando alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação, requerendo o mínimo de equipamento. A técnica do ultrassom vem mostrando ser uma técnica promissora, melhorando o rendimento das reações, promovendo vários benefícios na catálise enzimática principalmente no aumento da velocidade inicial da reação.

Diante do exposto na seção de revisão bibliográfica, no que concerne ao estado da arte, fica evidente a importância da realização deste trabalho, apresentando grande potencial para estudos mais aprofundados, visando às novas rotas biotecnológicas, enfatizando que, até o momento, não foram encontrados trabalhos disponíveis na literatura sobre a hidroesterificação enzimática de óleos vegetais em sistemas assistidos por ultrassom.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os material e métodos adotados para a realização dos experimentos, assim como os procedimentos laboratoriais utilizados. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) e Central de análises pertencentes ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a etapa de determinação da atividade hidrolítica das lipases:

- Goma arábica (Synth);
- Tampão fosfato de sódio (Vetec) pH 7;
- Acetona (95 % de pureza, Vetec);
- Etanol (95 % de pureza, Vetec);
- Hidróxido de sódio (Vetec);
- Óleo de oliva (Carbonell).

Para as reações de hidrólise foram utilizados:

- Óleo de soja, (M.M de 872 g/mol), (BUNGE);
- Óleo de fritura (adquirida de restaurantes locais);
- Água destilada;
- n-hexano (95 % de pureza, Vetec) (usado na lavagem do catalisador);
- Álcool isopropílico (P.A, Vetec) (usada na lavagem do catalisador).

Para a determinação do teor de ácidos graxos livres das amostras (Teor de AGL (% , m/m)) foram utilizados:

- Hidróxido de potássio (Vetec);
- Etanol: Éter etílico (1:1 v/v) (95 % de pureza, Vetec);
- Fenoltaleína.

Foram utilizados os seguintes reagentes para a etapa de determinação da atividade de esterificação das lipases:

- Ácido láurico (Sigma–Aldrich);
- Álcool n-propílico (P.A);
- Solução acetona: etanol (1:1 v/v) (P.A Fmaia);
- Solução de NaOH 0,01mol/L;
- Etanol (P.A Vetec).

Foram utilizados os seguintes reagentes para a etapa de esterificação enzimática:

- Ácido graxo produzido na etapa de hidrólise (M.M 282 g/mol);
- Ácido graxo vegetal comercial (lote: PA 1060.525 A12) produzido por SGS Agricultura e Indústria Ltda, de Ponta Grossa-PR;
- Etanol (98,9 % de pureza, Vetec).

4.1.2 Catalisador enzimático

Foi realizado um *screening* para a definição da lipase com melhor atividade hidrolítica, dentre as lipases comerciais e não comerciais:

Lipases comerciais:

- Novozym 435 (*Candida antarctica*): Produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esférico, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVOZYMES).
- Lipozyme RM IM: Lipase produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica. Apresenta especificidades nas posições 1,3 do triglicerídeo. O tamanho de partícula está entre 0,2 e 0,6 mm e densidade entre 350-450 kg/m³. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70 °C (NOVOZYMES).

- Lipozyme TL IM: Lipase do fungo geneticamente modificado *Thermomyces lanuginosus* (TL), produzida em fermentação submersa, purificada e imobilizada em sílica. É uma lipase 1,3-específica, isto é, hidrolisa apenas ésteres de ácidos graxos primários, na posição 1,3 do triacilglicerol, 2-monoacilglicerol e 1,2 (2,3)-diacilglicerol. Possui tamanho de partícula entre 0,3 e 1,0 μm e densidade média de 400 kg/m^3 . Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70 °C (NOVOZYMES).
- Lipase de pâncreas suíno (Porcine): Lipase Tipo II, em estado bruto, obtida de pâncreas suíno, também conhecida como triacilglicerol acilhidrolase, com aspecto físico na forma de pó liofilizado, na cor amarelo claro, pH ótimo na faixa de 6,5 a 7,5, temperatura de utilização na faixa de 40-70 °C e com característica de hidrossolubilidade moderadamente solúvel (Sigma-Aldrich).

Lipases não comerciais:

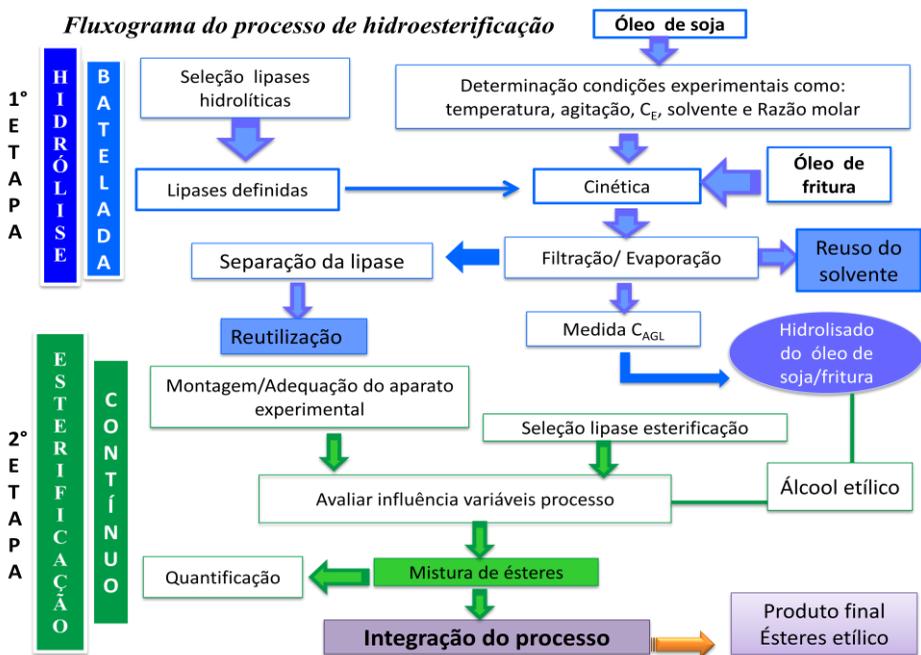
- Extrato enzimático de *Penicillium brevicompactum*: Lipase não-comercial, produzida através do fungo *Penicillium brevicompactum*, previamente isolado por FREIRE (1996). A manutenção das cepas e a fermentação em estado sólido (FES) foram realizadas conforme método descrito por Silva et al. (2010). A partir do extrato precipitado liofilizado, foi realizado o processo de imobilização deste com alginato de sódio e carvão ativado (SILVA et al. 2010). A enzima imobilizada apresentou diâmetro de poro igual a 4,24 nm e volume de poro de 0,1 mL/g.
- Extrato enzimático de *Rhizopus* sp. liofilizado e imobilizado: Lipase não-comercial, produzida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de babaçu como substrato. A partir do extrato precipitado liofilizado, foi realizado o processo de imobilização deste com alginato de sódio e carvão ativado (SILVA et al., 2010). A enzima imobilizada apresentou diâmetro de poro igual a 4,24 nm e volume de poro de 0,1 mL/g.

Foi realizado um *screening* para a definição da enzima com melhor atividade de esterificação entre as lipases Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, descritas acima.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho estão divididos em duas etapas, como mostra a fluxograma apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Procedimentos experimentais das etapas desenvolvidas neste trabalho.



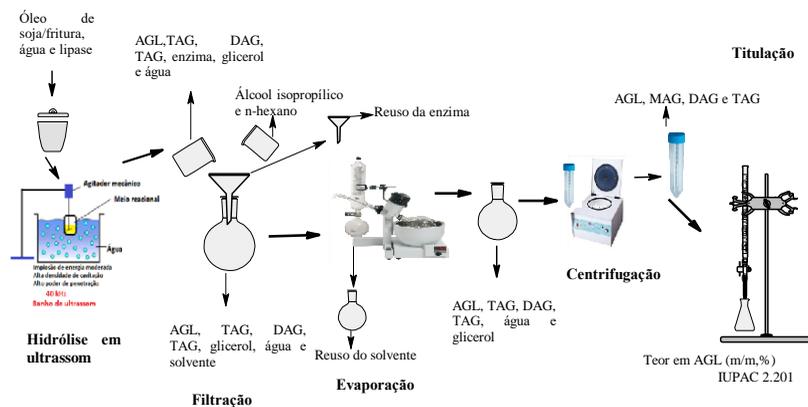
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.1 Primeira etapa: *hidrólise enzimática*

Nesta etapa será apresentado o aparato experimental e o estudo das variáveis que influenciaram na produção dos ácidos graxos pela hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente orgânico na presença de ultrassom, e depois de estabelecidas as melhores condições foram aplicadas para reações de hidrólise do óleo de fritura. No

fluxograma da figura 13 está apresentado todo o processo de hidrólise até a obtenção dos hidrolisados tanto para o óleo de soja quanto para óleo de fritura.

Figura 13 – Fluxograma de todo o processo para obtenção do hidrolisado do óleo de soja e fritura.

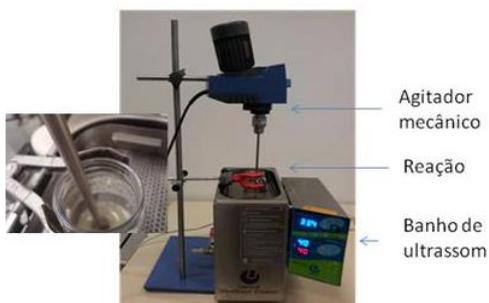
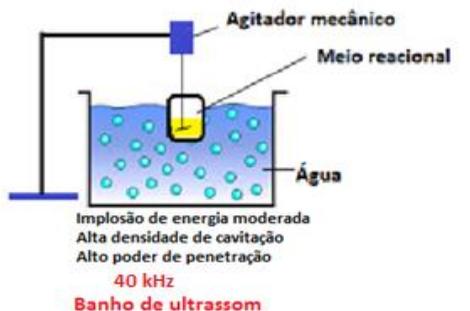


Sendo: AGL (ácido graxo); TAG (triacilglicerol); DAG (diacilglicerol); MAG (monoacilglicerol).

4.2.1.1 Aparato experimental utilizado na hidrólise enzimática

O aparato experimental utilizado para os experimentos é constituído de um banho de ultrassom (frequência de 40 kHz e potência de 132 W) que apresenta um transdutor de ultrassom (área de superfície de 282,2 cm²) montado no fundo do banho na horizontal, ao longo do comprimento do mesmo, o que tem sido considerado um sistema de ultrassom adequado (FIAMETTI et al., 2012) onde foram acoplados, em sua cuba, um agitador mecânico (hélice tipo naval, fluxo axial) e o recipiente onde aconteceram as reações, conforme mostra a Figura 14. A escolha da combinação do banho ultrassônico mais agitação mecânica foi definida para evitar a utilização de agentes emulsificantes. Para todos os testes de hidrólise, o meio reacional foi constituído de uma massa de reagentes de 21,8 g de óleo de soja/óleo de fritura mais a quantidade equivalente em mols de água testada e 1 ou 10 % (m/m) de catalisador enzimático em relação à massa total dos substratos.

Figura 14 - Aparato experimental utilizado para os testes de hidrólise enzimática de óleo de soja e fritura em sistema livre de solvente orgânico.



4.2.1.2 Avaliação do efeito da razão molar (óleo de soja: água) sobre a estabilidade da emulsão

No primeiro momento realizou-se a avaliação das condições de preparação da emulsão onde foram testadas três diferentes razões molares: 1:3, 1:6 e 1:9 (óleo de soja: água, mol/mol). A escolha destas razões molares foi baseado na estequiometria da reação de hidrólise que é 1:3 (óleo:água). O excesso de água foi avaliado visando verificar seu efeito no favorecimento do curso da reação. As demais condições experimentais foram fixadas, sendo elas: potência ultrassônica de 132 W, 40 °C, 1000 rpm e sem presença de catalisador.

4.2.1.3 Determinação das condições de agitação e estabilidade da emulsão

Para observar a estabilidade da emulsão formada, foram realizados testes de emulsificação nas condições de 1:9 (óleo: água mol/mol), potência ultrassônica de 132 W, 40 °C e 1000 rpm. Após a formação da emulsão, o ultrassom foi mantido com potência máxima e removeu-se toda a agitação, observando se a emulsão mantinha-se estável na ausência de agitação.

Com o objetivo de diminuir a agitação utilizada no processo, a fim de reduzir o gasto energético, também foi realizado outro teste, onde observou-se a estabilidade da emulsão. Neste teste, após a formação da emulsão nas mesmas condições citadas acima, o ultrassom foi mantido em potência máxima e a agitação mecânica foi reduzida para 300 rpm.

4.2.1.4 Cinética enzimática em banho de ultrassom em modo batelada avaliando o tipo de agitação

Após a realização dos testes preliminares, realizaram-se avaliações cinéticas variando a agitação mecânica, utilizando-se a melhor razão molar (óleo:água), e fixando-se 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, e C_E de 10 % (m/m) lipase de pâncreas suíno como catalisador, massa calculada sobre a massa total dos substratos. As condições de agitação mecânica para a formação da emulsão como etapa prévia foram: (1) 2000 rpm durante 1,5 h, seguida de 300 rpm durante a reação de hidrólise enzimática; (2) 1000 rpm durante 1,5 h, seguida de 300 rpm durante o tempo reacional; (3) 300 rpm durante 1,5 h e durante o tempo reacional; (4) sem formação de emulsão prévia e 300 rpm durante o tempo reacional. Após esta etapa, o C_E (10 % m/m da lipase de pâncreas de porco) foi adicionado, e a agitação foi estabelecida em 300 rpm até o fim da reação para todas as amostras.

As reações foram conduzidas em intervalos de tempo variando de 0 a 12 horas em temperatura de 40 °C. Após o tempo de reação, a amostra foi filtrada com auxílio de n-hexano para retenção do catalisador enzimático. O solvente (n-hexano) foi evaporado em rota evaporador a 60 °C. As amostras foram submetidas à análise para determinar o teor de AGL (% , m/m).

A partir da melhor condição encontrada nos testes de emulsificação, foram realizados novos experimentos cinéticos empregando C_E de 1 % (m/m) lipase de pâncreas suíno e Lipozyme TL

IM. Todos os experimentos citados acima foram também realizados sem utilização do ultrassom, mantendo-se as mesmas condições e utilizando o mesmo aparato experimental citado no item 4.2.1.1. É importante ressaltar que as cinéticas foram destrutivas e realizadas em duplicata.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos descritos acima, outras variáveis foram avaliadas buscando maximizar o teor de AGL no processo de hidrólise enzimática, conforme será descrito mais adiante.

4.2.1.5 Influência da razão molar (óleo soja: água) na produção dos ácidos graxos

Para avaliar a influência da razão molar (óleo de soja: água) na produção dos AGL, foi realizada a reações de hidrólise variando a razão molar óleo e água (1:9; 1:10; 1:20; 1:40 e 1:46), fixando C_E de 1 % (m/m), 2 h de reação, 300 rpm e potência ultrassônica de 132 W. Após o tempo de reação, a amostra foi filtrada com auxílio de n-hexano para retenção do catalisador enzimático. O solvente (n-hexano) foi evaporado em rota evaporador a 60 °C. As amostras foram submetidas à análise para determinar o teor de AGL (% m/m).

As variáveis avaliadas na hidrólise enzimática do óleo de soja foram temperatura, razão molar (óleo: água) e concentração de catalisador enzimático (C_E), fixando o tempo de reação em 2 h, 300 rpm e potência ultrassônica de 132 W. Estes experimentos foram conduzidos conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Variáveis avaliadas na hidrólise enzimática de óleo de soja.

Razão molar (óleo soja: água)	Temperatura (°C)	C_E (% m/m)
1:10	40	1
1:20	40	1
1:10	60	1
1:20	60	1
1:10	40	10
1:20	40	10
1:10	60	10
1:20	60	10

Após a reação, dois diferentes solventes orgânicos foram testados, o n-hexano e o álcool isopropílico, para a lavagem do

catalisador enzimático e a remoção do produto através da filtração a vácuo. O objetivo foi identificar qual seria o melhor solvente em termos de arraste do produto e que não compromettesse a atividade do catalisador. A partir da melhor temperatura, razão molar (óleo: água), concentração de enzima e melhor solvente realizou-se a avaliação cinética destrutiva (0,25; 0,50; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 18; 20 e 24 h). Uma avaliação cinética sem a utilização do ultrassom também foi realizada visando analisar a influência deste.

Após o tempo reacional filtrou-se o hidrolisado para separação do catalisador enzimático e o filtrado foi rotaevaporado para a remoção do solvente e centrifugado para separar o glicerol e a água, obtendo no hidrolisado somente os ácidos graxos livres (AGL), triacilgliceróis (TAG), monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG). A partir do hidrolisado analisou-se o teor de AGL (% , m/m). Mediu-se a atividade hidrolítica do catalisador enzimático recuperado após a reação, tanto com e sem ultrassom para avaliação de sua posterior reutilização. O solvente recuperado foi utilizado em outros ciclos reacionais.

Posteriormente, na condição otimizada da hidrólise enzimática de óleo de soja, realizaram-se testes com óleo de fritura fornecido de restaurantes locais para analisar a produção de AGL a partir desta matéria-prima.

4.2.2 Segunda etapa: *esterificação enzimática*

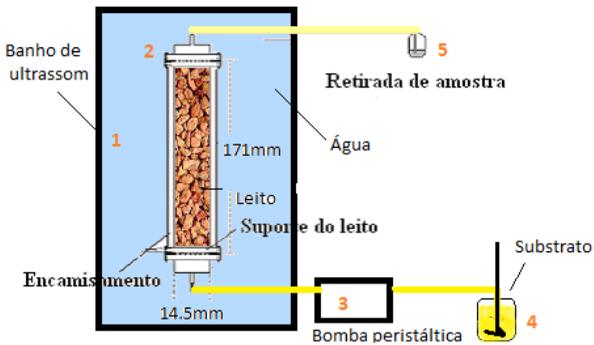
A seguir será apresentada a descrição do aparato experimental e variáveis avaliadas no processo de esterificação enzimática em modo contínuo. Nesta etapa utilizou-se ácido graxo vegetal de soja comercial (AGVS) como substrato modelo para maximização das condições experimentais e após utilizar estas condições para esterificar o hidrolisado gerado na etapa de hidrólise, para posterior integração do processo via reação em duas etapas: a hidroesterificação enzimática.

4.2.2.1 Descrição do aparato experimental

O aparato experimental utilizado na etapa de esterificação consiste num reator de vidro com 14,5 mm de diâmetro interno, comprimento de 175 mm e volume de 29 mL empacotado com aproximadamente 10 g da lipase (Novozym 435), submerso em um banho de ultrassom (Unique UltraSonicCleaner, modelo: USC-1800A, frequência de 40 kHz, potência de 132 W), alimentado com a mistura

reacional de ácido graxo/álcool etílico. As reações de esterificação em modo contínuo foram realizadas em uma unidade experimental, cujos principais componentes estão apresentados esquematicamente na Figura 15.

Figura 15 - a) Aparato experimental utilizado na esterificação enzimática em modo contínuo. b) Visão geral da unidade experimental.



a)



b)

O equipamento apresentado na Figura 15 consiste dos seguintes itens:

1) Banho ultrassônico (Unique, modelo: USC1880A, 220 V, frequência de 40 kHz e potência de 132 W, C/ controlador), com controle de temperatura;

2) Reator em vidro encamisado com 14,5 mm diâmetro interno, 175 mm de comprimento e volume útil de aproximadamente 29 mL. Este reator fica submerso em água dentro do banho ultrassônico durante a reação;

3) Bomba peristáltica (marca MARLOW 323), utilizada para deslocar os componentes da reação para a zona de reação e manter a pressão do sistema;

4) Tanque de alimentação com a mistura dos substratos desejados a serem esterificados, mantido sob agitação contínua durante o tempo reacional;

5) Coletor de amostra.

O procedimento experimental consistiu no empacotamento manual do reator com catalisador enzimático. Após acoplou-se o reator ao sistema reacional e imergindo-o no banho de ultrassom já acondicionado na temperatura e potência a ser utilizada no experimento, a seguir iniciou-se o bombeamento contínuo dos substratos (AGL e álcool etílico), previamente homogeneizados sob a mesma agitação, durante a reação, por um agitador mecânico (modelo RW 20 D, IKA) inserido no frasco contendo a mistura reacional, a uma dada razão molar (AGL: álcool) e vazão volumétrica de alimentação dos substratos, até o completo preenchimento do sistema reacional, usando uma bomba peristáltica (marca MARLOW 323).

O cálculo do volume do reator foi realizado através de seu diâmetro interno e comprimento utilizado. A porosidade do leito foi determinada de acordo com Dalla Rosa (2009) adicionando o cômputo da porosidade interna da enzima. Neste caso, a porosidade do leito deve considerar o volume do soluto (enzimas) que ocupa o leito do reator e o volume de poros da enzima, como mostra a seguinte equação:

$$\varepsilon_L = 1 - \left(\frac{V_S - V_P}{V_R} \right)$$

(Equação 1)

Sendo: ε_L é a porosidade do leito; V_S é o volume ocupado pelas enzimas no leito do reator (mL); V_R é o volume do leito do reator (mL); V_P é o volume de poros das enzimas que ocupam o leito do reator (mL).

Conforme Dalla Rosa (2009) para o cálculo do volume de soluto (V_S) obteve-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa e diâmetro médio das partículas da enzima (calculado pela média da observação do resultado de análise de MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura). O volume de poros (V_P) foi então multiplicado pela massa da amostra de enzima empacotada no leito do reator.

O tempo de residência é dado pela porosidade do leito multiplicado pelo seu volume e dividido pela vazão de alimentação de substratos a serem utilizados no processo (DALLA ROSA, 2009).

$$\tau = \frac{\varepsilon_L * V_R}{q}$$

(Equação 2)

Onde: τ é o tempo de residência (min); V_R é o volume do leito do reator (mL); q é a vazão de alimentação do substrato (mL/min).

Após a mistura reacional percorrer toda a extensão do reator, a coleta das amostras foi realizada em frascos de amostragem (previamente pesados). Depois de decorrido um tempo de residência da mistura na zona reacional foi realizada a coleta de amostra e análise de conversão ésteres etílicos através da metodologia pertinente.

Estudaram-se as razões molares (AGVS: etanol) 1:3 e 1:6 para as vazões de alimentação de substrato de 2,5 e 5 mL/min, temperatura 40 e 65 °C, catalisadores enzimáticos Novozym 435 e Lipozyme TL IM, com e sem a presença da potência ultrassônica. Para as reações de esterificação utilizou-se o ácido graxo vegetal de óleo de soja SGS comercial. A Tabela 6 apresenta as especificações da matéria-prima.

Tabela 6 - Especificações do ácido graxo vegetal de soja (AGVS).

<i>Análises</i>	<i>Especificações</i>
Índice de Acidez (mg KOH/g)	195,0 – 205,00
Índice de Iodo (cgI ₂ /g)	125,0 – 135,00
Umidade (%)	Máximo 0,5
Cor Gardner	Máximo 2,5
Índice de Peróxido (meq O ₂ /Kg)	Máximo 3,0
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	197,0 – 207,00

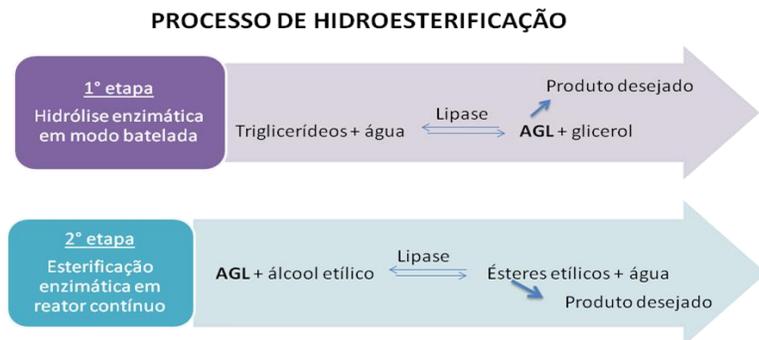
Fonte: SGS Agricultura e Indústria Ltda, Lote: PA 1060 525 A12.

A determinação do índice de acidez foi realizada através da técnica de titulação por KOH, em comparação aos dados fornecidos pela empresa. Na análise realizada obteve-se um índice de acidez de 205 mg KOH/g, concordando com o indicado pelo fabricante.

4.2.3 Integração dos processos: *hidroesterificação*

Na integração dos processos houve a proposta de junção da primeira etapa do trabalho (*hidrólise*) com a segunda etapa (*esterificação*), conforme esquema apontado na Figura 16. Produziu-se o hidrolisado de AGL a partir do óleo de soja e fritura na melhor condição determinada para o óleo de soja, quantidade necessária para alimentar o reator em um determinado tempo.

Em seguida esterificou-se o hidrolisado do óleo de soja e fritura, obtidos na hidrólise enzimática com álcool etílico através das condições otimizadas na etapa de esterificação para produção de ésteres etílicos.

Figura 16 - Esquema do processo de hidroesterificação enzimática.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Métodos utilizados na etapa de *hidrólise enzimática*

Abaixo estão descritas as metodologias utilizadas na etapa de hidrólise enzimática em modo batelada em sistema livre de solvente orgânico utilizando a tecnologia do ultrassom.

4.3.1.1 Determinação da atividade hidrolítica do catalisador

Para a dosagem da atividade de hidrólise utilizou-se metodologia descrita por Cavalcanti- Oliveira et al. (2005). O sistema reacional foi composto por uma emulsão de azeite de oliva 100 g/L e goma arábica 50 g/L em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7, sob agitação mecânica. Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 20 mL desta emulsão e 0,1 g da lipase, agitando-se em shaker (160 rpm) por 20 minutos a 40 °C ou 65 °C. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida, extraíndo-se os ácidos graxos com adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos foram então titulados com uma solução de NaOH 0,05 mol/L até pH 11. Os brancos foram preparados com 20 mL de emulsão, adicionando-se 20 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v). Estes também foram titulados com a solução de NaOH 0,05 mol/L até pH 11.

Uma unidade de atividade de hidrólise (UH) foi definida como a quantidade da lipase que libera 1 mmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, que pode ser determinada através da Equação 3.

$$A_H = \frac{(V_{KOH}^{20} - V_{KOH}^0) * C_{NaOH} * 10^3}{t * M_E}$$

(Equação 3)

Onde: A_H corresponde à atividade hidrolítica do catalisador (U/g); V_{NaOH}^{20} correspondem ao volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após 20 minutos de reação (L); V_{NaOH}^0 corresponde ao volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (L); C_{NaOH} corresponde á concentração da solução de NaOH (mol/L); M_E corresponde á massa de catalisador enzimático utilizado na reação (0,1g); t corresponde ao tempo de reação (min).

Mediu-se em triplicata a atividade da lipase antes e após a cinética descrita no item 4.2.1.6 para obter-se a atividade catalítica inicial e final após a reação, com e sem o uso do ultrassom para poder avaliar sua possível reutilização.

4.3.1.2 Quantificação do teor de ácidos graxos livres

A determinação do teor dos ácidos graxos livres dos hidrolisados foi realizada por titulação com KOH, segundo método IUPAC 2.201. Aproximadamente 3 g de amostra e 3 gotas de solução de fenolftaleína foram diluídas em 50 mL de uma solução etanol:éter 1:1 (v/v). Esta solução foi titulada com uma solução de KOH 0,1 mol/L, sob agitação vigorosa até mudança súbita de coloração branca para rosa. O teor de AGL foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$C_{AGL} = \frac{V_{KOH} * C_{KOH} * MM_{AGL}}{10 * M_a}$$

(Equação 4)

Onde: C_{AGL} corresponde ao teor de ácido graxo livre em porcentagem mássica (% , m/m); V_{KOH} corresponde ao volume da solução de KOH utilizado na titulação (mL); C_{KOH} corresponde à concentração da solução de KOH (mol/L); MM_{AGL} corresponde à massa molecular média dos ácidos graxos presentes no óleo (g/mol); M_a corresponde a massa da amostra (g).

4.3.1.3 Cálculo da velocidade inicial de reação

O cálculo da velocidade inicial de reação é de extrema importância de comparar as diferentes condições avaliadas no estudo cinético. A velocidade inicial de reação (r) foi calculada da seguinte forma:

$$r = \left. \frac{dc_{AGL}}{dt} \right|_{t=0}$$

(Equação 5)

Onde: r corresponde à velocidade inicial de reação ($m/m.h^{-1}$); C_{AGL} corresponde ao teor em AGL no tempo t (m/m); t corresponde ao tempo de reação (h).

4.3.1.4 Recuperação do catalisador enzimático

O catalisador enzimático Lipozyme TL IM foi recuperado após o estudo cinético realizado com e sem a presença do ultrassom através da lavagem com o álcool isopropílico (aproximadamente 100 mL) e separação com papel filtro. Os catalisadores retidos no papel foram levados para estufa com temperatura de 40 °C por 1 h. Após levou-se para dessecador por 24 h e em seguida mediu-se a atividade hidrolítica. O filtrado (produto hidrolisado mais o solvente da lavagem do catalisador enzimático) foi rotaevaporado para remoção do solvente e o produto foi analisado em termos do teor de AGL (% , m/m) e o solvente foi separado para realizar o teste de recuperação.

4.3.1.5 Recuperação do solvente utilizado para lavagem do catalisador

Após a recuperação do catalisador enzimático, do meio reacional o filtrado (produto mais álcool isopropílico) foi levado para rotaevaporador. Foi realizado um teste para saber se poderia ser reutilizado o álcool recuperado no rotaevaporador hidrolisando novamente o óleo de soja na condição ótima e lavando/separando o catalisador com o álcool isopropílico recuperado. Em seguida rotaevaporou-se a amostra e mediu-se o teor de AGL (% , m/m).

4.3.1.6 Determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de soja e fritura

A determinação do perfil de ácidos graxos seguiu as normas da AOCS Ce 2-66, sendo a análise realizada em um cromatógrafo gasoso. O resultado para perfil de ácido graxo é expresso em relação à porcentagem da área do pico. Essa análise foi realizada no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidade La Republica (UDELAR) no Uruguai. O Apêndice A1 apresenta a descrição do procedimento analítico utilizado.

4.3.2 Métodos utilizados na etapa de esterificação enzimática em modo contínuo

4.3.2.1 Determinação da atividade enzimática de esterificação

O procedimento adotado para a determinação da atividade da enzima foi descrito por Oliveira et al. (2006). Sucintamente, a atividade enzimática foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e o álcool n-propílico, à temperatura de 65 °C, com a enzima a 5% (m/m) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Alíquotas de 150 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20 mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e a extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01mol/L. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1mmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas. A Equação 6 foi empregada para o cálculo da atividade do catalisador:

$$A_E = \frac{[(V_{NaOH}^0) - (V_{NaOH}^{40})] * C_{NaOH} * 10^3 * V_f}{t * M_E * V_c}$$

(Equação 6)

Sendo: A_E é a atividade de esterificação do catalisador (U/g); C_{NaOH} corresponde a concentração da solução de NaOH (mol/L); V_{NaOH}^0 corresponde ao volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (L); V_{NaOH}^{40} correspondem volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da

amostra após 40 minutos de reação (L); M_E corresponde á massa de catalisador enzimático utilizada na reação (g); t corresponde a tempo de reação (min); V_f corresponde ao volume final do meio reacional (mL); V_c corresponde ao volume da alíquota do meio reacional retirada para a titulação (mL).

4.3.2.2 Quantificação por método titulométrico dos ésteres obtidos na esterificação dos ácidos graxo comercial (AGVS) e dos hidrolisados de óleo de soja e fritura

A reação de esterificação produz, além dos ésteres, também água. As amostras coletadas foram analisadas através do método da titulação. Este é um método eficiente que substitui, neste caso, a utilização da cromatografia gasosa na quantificação dos ácidos graxos, sem necessidade de secagem para completa remoção da água da amostra e não necessitando de evaporação do excesso de álcool, como podem ser observados os resultados comparando o método cromatográfico e o de titulação. Na literatura são reportados alguns trabalhos (RATTANAPHRA et al., 2012; ZHANG et al., 2012; LEMAIRE et al., 2011; SATYARTHI et al., 2010; MARCHETTI e ERRAZU, 2010; SANTIN, 2014) que comprovaram a efetividade da técnica, com base na comparação realizada entre os dois métodos.

A técnica da titulação foi realizada de acordo com a IUPAC 2.201 o AOCS Cd 3d - 63 e consiste na determinação da acidez do meio, devido á presença dos ácidos graxos livres. Estes ácidos são capazes de reagir com a solução de hidróxido de potássio e o resultado obtido é expresso em mg KOH por (g) de amostra, e normalmente a acidez titulável corresponde ao dobro do percentual do ácido correspondente da amostra.

Este procedimento é realizado com a pesagem de uma alíquota de 2 g de amostra em um erlenmeyer de 300 mL. Em seguida, adiciona-se 50 mL de uma solução etanol anidro:éter etílico (v/v), homogeneizado e à este, adiciona-se 3 gotas de indicador fenolftaleína 1% para indicar o ponto de viragem (mudança de cor) na titulação com solução de KOH 0,1mol/L. Como já mencionado, a amostra não necessita de tratamento prévio por esta técnica, sendo esta, diretamente coletada do reator para ser analisada, sem necessidade de secagem para evaporação da água ou do excesso de solvente. O índice de acidez é determinado pela Equação 7.

$$IA = \frac{(MM_{KOH} * V_{KOH} * C_{KOH})}{M_a}$$

(Equação 7)

Onde: **IA** é índice de acidez (mg KOH/g); **MM_{KOH}** é a massa molar de KOH (56,1 g/mol); **V_{KOH}** volume de KOH gasto na titulação (mL); **C_{KOH}** é a concentração molar do KOH usado na titulação (mol/L); **M_a** é massa de amostra utilizada para titular (g).

Para determinar o percentual de conversão do ácido graxo em ésteres é necessário determinar a acidez da solução alimentada no reator. Determinando-se o índice de acidez inicial e final (após a reação) é possível determinar a conversão de ácidos graxos, que está diretamente relacionada com o teor em ésteres da mistura. O cálculo para a conversão dos ácidos graxos é apresentado na Equação 8.

$$X_{ésteres}(\%) = \frac{(IA_i - IA_t)}{IA_i} * 100$$

(Equação 8)

Onde: **X_{ésteres}** é conversão dos AGL em ésteres (%); **IA_i** é o índice de acidez inicial (mg KOH/g) e **IA_t** é índice de acidez final (mg KOH/g).

O índice de acidez no tempo *t* é calculado pontualmente, de acordo com a cinética realizada, ou seja, assim que a amostra é coletada, já é devidamente pesada e titulada, evitando a evaporação dos componentes.

4.3.2.3 Preparo das amostras e quantificação dos ésteres etílicos por cromatografia em fase gasosa

Após a coleta das amostras procedia-se à evaporação do álcool não reagido das amostras, em estufa a vácuo (Marca Quimis, Modelo Q819V2), na temperatura de 65 °C e 0,05 MPa de vácuo, até a obtenção de peso constante.

As amostras foram previamente preparadas transferindo-se 0,25 g de amostra em balão volumétrico de 10 mL, completando o volume de diluição com n-heptano, (amostra). Retirava-se uma alíquota de 50 µL da solução da amostra para um balão de 1 mL, no mesmo adicionava-se

uma solução de 50 µL de padrão interno (heptadecanoato de metila) na concentração de 5000 mg.L⁻¹, completando este com n-heptano. As amostras foram agitadas e uma alíquota (cerca de 1 mL) transferida para os *vials*, dando sequência à análise cromatográfica.

As amostras foram injetadas em triplicata em um cromatógrafo gasoso conforme EN14103 (2001), com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo 2010) equipado com uma coluna capilar apolar modelo RT-WAX (contendo polietileno glicol na fase estacionária), de 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 150 °C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, taxa de aquecimento de 10 °C/ min até atingir a temperatura final da coluna de 250 °C, permanecendo por 1 minuto nesta condição. A temperatura do injetor e do detector foi estabelecida em 250 °C. A quantidade da solução de amostra injetada foi de 1 µL. A Equação 9 apresenta a equação utilizada para o cálculo da conversão em ésteres:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ei}}{A_{ei}} * \frac{C_{ei} * V_{ei}}{W} * 100$$

(Equação 9)

Onde: **C** corresponde à conversão em ésteres; $\sum A$ corresponde à área total de picos entre os padrões C14 e C 24:1; **A_{ei}** corresponde à área correspondente ao pico do padrão interno, C17: 0; **C_{ei}** corresponde à concentração da solução de padrão interno, C17:0, (mg/mL); **V_{ei}** corresponde ao volume da solução de padrão interna adicionada à amostra; **W** corresponde à massa da amostra, (mg).

A partir dos resultados de conversão em ésteres etílicos pela esterificação do óleo de soja e fritura, resolveu-se analisar o teor de glicerol, água, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis das amostras finais do hidrolisado do óleo de soja e fritura os quais são usados na alimentação do reator a serem esterificados e após passar pelo reator.

4.3.2.4 Quantificação do teor de glicerol

A análise para determinar o teor de glicerol foi realizada somente nas amostras do hidrolisado do óleo de soja e fritura produzido na etapa de hidrólise e nas amostras esterificadas do óleo de fritura em reator contínuo.

O método de periodato de sódio para determinar a concentração de glicerol foi descrito primeiramente por Cocks e Van Rede (1966), o qual consiste na reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio (NaIO_4) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico, este último utilizado como medida do glicerol. O procedimento consiste na diluição da amostra previamente pesada em 50 mL de água bidestilada. De 5 a 7 gotas de azul de bromotimol são adicionadas á amostra e a mesma é acidificada com ácido sulfúrico 0,2 mol/L até pH 4. A solução é então neutralizada com NaOH 0,05 mol/L até coloração azul.

Paralelamente, uma solução em branco deve ser preparada contendo 50 mL de água bidestilada, sem a presença de glicerol e o mesmo procedimento adotado para a amostra a ser analisada deve ser aplicado ao branco. Em seguida, 100 mL de solução de periodato de sódio (60 g/L) são adicionados à amostra e ao branco e mantidas ao abrigo da luz por 30 min. Após este período, 10 mL de solução de etileno glicol (1:1) são adicionadas à mistura que é deixada ao abrigo da luz por mais 20 min. As amostras são, então, diluídas até completar o volume de 300 mL com água bidestilada e tituladas com solução de NaOH 0,125 mol/L usando pH-metro para determinar pH 6,5 para o branco e pH 8,1 para a amostra. O teor de glicerol contido na amostra é determinado através da seguinte equação:

$$C_{GLIC}(\%, m/m) = \frac{[MM_{GLIC} * C_{NaOH} * (V_1 - V_2)]}{M_a} * 100$$

(Equação 10)

Onde: C_{GLIC} é a concentração de glicerol na amostra (% , m/m); MM_{GLIC} é a massa molar do glicerol (92,09 g/mol); C_{NaOH} é a concentração molar da solução de NaOH (mol/L); V_1 é o volume da solução de NaOH gasto na amostra (L); V_2 é o volume da solução de NaOH gasto no branco (L); M_a é a massa de amostra utilizada (g).

4.3.2.5 Quantificação do teor de água por Karl-Fischer

A análise de Karl-Fischer é usada para medir o teor de água presente na amostra. Para a análise foi usado um titulador manual, modelo Q349-2 da marca QUIMIS. Como titulante foi utilizada solução de Karl-Fischer (Merck), composta por uma solução de iodo e dióxido de enxofre em metanol anidro. O método consiste na redução do iodo e dióxido de enxofre, com simultâneo consumo de água. Primeiramente

adicionava-se ao copo do reator o metanol, em quantidade que cobrisse as pontas do eletrodo de platina, em seguida titulava-se com solução de Karl-Fischer até o indicador do aparelho indicar a cor vermelha. A seguir foi realizada a fatoração com água para verificar o fator de correção, segundo a equação abaixo:

$$F_C = \frac{M_a * 1000}{V}$$

(Equação 11)

Onde: F_C é o fator de correção; M_a é a massa da amostra (g); V é o volume gasto de Karl-Fischer (mL).

Com o fator de correção determinado, dava-se seguimento às análises das amostras. A amostra a ser analisada foi pesada e adicionada ao frasco onde está o metanol anidro. O indicador do aparelho estará verde indicando que está molhado, então é titulado com solução de Karl-Fischer até o indicador ficar vermelho indicando que está seco. A partir da massa de amostra e o valor gasto da solução pode ser realizado o calculo segundo a Equação 12.

$$C_{H_2O}(\%, m/m) = \frac{V * F_C}{10 * M_a}$$

(Equação 12)

Onde: C_{H_2O} é o teor de água na amostra (% , m/m); V é o volume gasto da solução de Karl-Fischer (mL); F_C é o fator de correção, M_a é a massa da amostra (g).

4.3.2.6 Quantificação dos teores de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG)

A determinação do teor de MAG, DAG, TAG nas amostras coletadas foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático on-column e detector de ionização de chama (FID), equipado com coluna capilar de 5% de fenil polidimetilsiloxano, comprimento de 10 a 15 m, diâmetro interno de 0,32 mm e filme de 0,1µm, injetor (on-colum), detector de ionização de chama e integrador (computador com software adequado). As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações e método ASTM D 6584. Estas análises foram realizadas em cooperação

com empresa Olfar Alimento e Energia. No Apêndice A2 encontra-se todo o procedimento de análise

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho de hidroesterificação enzimática de óleos de soja e fritura em sistema de ultrassom em duas etapas a hidrólise em modo batelada seguida por esterificação em modo contínuo.

5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM MODO BATELADA

Abaixo estão apresentados os resultados obtidos nos testes da primeira etapa do trabalho: Hidrólise enzimática em modo batelada utilizando tecnologia do ultrassom.

5.1.1 Seleção do catalisador enzimático com potencial para a reação de hidrólise

Os resultados obtidos para a atividade hidrolítica dos catalisadores enzimáticos, comerciais e não comerciais, imobilizados e na forma livre, estão apresentados na Tabela 7. Nesta etapa, foi avaliado o potencial hidrolítico destes catalisadores em duas temperaturas: 40 e 65 °C.

Tabela 7 - Atividade hidrolítica dos catalisadores testados em duas temperaturas.

CATALISADORES	ATIVIDADE HIDROLÍTICA (U/g)	
	40 °C	65 °C
Catalisadores comerciais		
Novozym 435 IM	497 ± 19,41	246 ± 3,00
Lipozyme RM IM	63 ± 5,08	12 ± 4,44
Lipozyme TL IM	761 ± 15,61	90 ± 7,88
Pâncreas de porco (livre)	1326 ± 10,81	82 ± 9,02
Catalisadores não comerciais		
<i>Penicillium brevicompactum</i> IM	28 ± 0,50	14 ± 0,68
<i>Rhizopus</i> sp. IM	8 ± 0,90	14 ± 4,70

Os valores são a média da triplicata ± desvio padrão; IM = imobilizado.

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 7, pode-se notar uma diferença da atividade hidrolítica nas temperaturas testadas, na qual todos os catalisadores, com exceção da lipase de *Rhizopus* sp., apresentaram uma maior atividade na temperatura de 40 °C. De acordo com Scriban (1985), existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para a qual a atividade enzimática é máxima. De modo geral, um aumento na temperatura conduz a um aumento da velocidade das reações, por aumentar a energia cinética das moléculas no sistema. Em reações enzimáticas, esse efeito é observado em uma faixa de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial, pois devido a sua natureza proteica, quando a enzima é exposta a temperaturas elevadas, ocorre sua desnaturação. A desnaturação ocorre devido ao rompimento das pontes de hidrogênio, que são ligações termolábeis, desencadeando uma série de modificações estruturais que alteram a conformação da enzima. Estas modificações reduzem gradativamente a atividade enzimática até o ponto onde ocorre sua completa inativação. A temperatura que provoca a desnaturação está geralmente próxima de sua temperatura ótima, pois qualquer temperatura significativamente superior a do ambiente biológico natural da enzima, pode promover sua desnaturação (BAILEY; OLLIS, 1986).

Na Tabela 7 estão apresentadas as atividades hidrolíticas das lipases imobilizadas e na forma livre. O catalisador lipase de pâncreas suíno (lipase livre) apresentou a atividade hidrolítica de 1326 U/g, e a Lipozyme TL de 761 U/g, ambas na temperatura de 40 °C. Diante disso, para as próximas etapas do trabalho foi utilizado estes catalisadores em condições de temperatura fixadas em 40 °C.

A lipase de pâncreas suíno é uma pequena proteína globular composta de uma única cadeia de 449 aminoácidos, com uma massa molar de 50-52 kDa (DE CARO et al., 1981). A lipase de pâncreas suíno é uma enzima mesófila que possui temperatura ótima na faixa de 35-45 °C e apresenta atividade máxima sobre a hidrólise de triacilgliceróis entre 35 e 40 °C (BAI et al., 2006).

Tradicionalmente, esta enzima é obtida do pâncreas suíno, por diferentes métodos, envolvendo extração com solventes, precipitação com sulfato de amônio, diálise, interações iônicas e hidrofóbicas, entre outros. Ela é uma das lipases mais utilizadas em reações de biotransformação, devido às vantagens que apresenta em relação à sua disponibilidade para compra pois é comercializada por vários fornecedores no mercado internacional; alta estabilidade e especificidade; grande potencial catalítico; além do custo mais acessível quando comparado a outros catalisadores enzimáticos comerciais de fonte microbiana ou animal (MENDES et al., 2012). Outra vantagem

apresentada por essa enzima é a possibilidade de promover sua imobilização, que confere um aumento na estabilidade e possibilita sua recuperação e reutilização. Bagi et al. (1997) promoveram a imobilização de lipase de pâncreas suíno em diversos suportes e observaram aumento da temperatura ótima de atuação da enzima, e uma capacidade hidrolítica superior a enzimas solubilizadas.

De acordo com Zaks e Klibanov (1985), que estudaram o comportamento de lipases em solventes orgânicos, a lipase de pâncreas suíno pode catalisar reações de transesterificação, esterificação, aminólise, tioesterificação e oximólise, em meios orgânicos anidros, exibindo um poder catalítico comparável ao exibido em água. Valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram relatados por Wu et al. (1996), para a atividade hidrolítica da lipase de pâncreas suíno, em um estudo onde avaliou-se o potencial catalítico de 9 enzimas comerciais em relação à capacidade para hidrolisar azeite de oliva e sintetizar ésteres através de reações de esterificação e transesterificação.

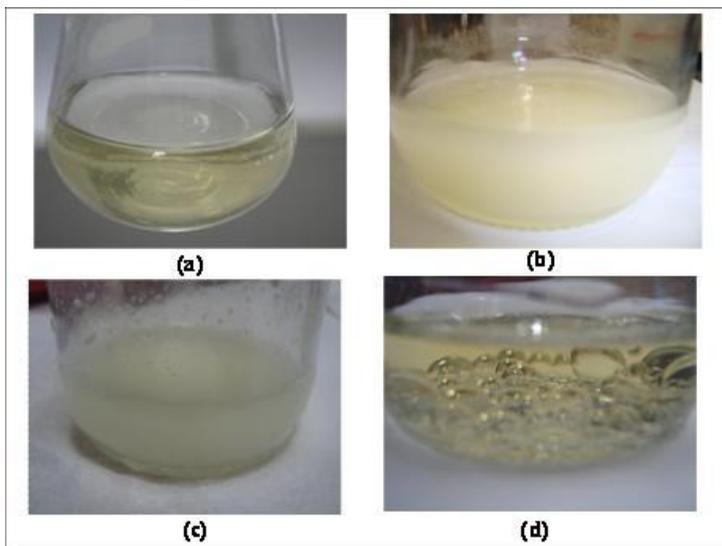
5.1.2 Determinação das condições de preparação da dispersão óleo de soja e água

5.1.2.1 Determinação da razão molar óleo de soja e água

Nesta etapa estão apresentados os resultados obtidos em relação às condições para dispersão óleo e água, nas seguintes razões molares: 1:3, 1:6 e 1:9. Os demais parâmetros foram fixados, sendo eles: potência do ultrassom 132 W; 40 °C e 1000 rpm.

Para as três razões molares óleo e água avaliadas (1:3, 1:6, 1:9), todas apresentaram resultados similares quanto à dispersão, nas condições estudadas. Visualmente, após aproximadamente 1,5 h de agitação sob ação do ultrassom, não era mais possível identificar separação de fases para as três razões molares. A aparência final das dispersões nas três razões molares testadas não diferiu (Figura xx). Desta forma, escolheu-se a razão molar 1:9 para as próximas etapas, pois quantidades mais elevadas de água podem favorecer o deslocamento da reação.

Figura 17 - Imagem das dispersões nas condições 40 °C de temperatura, com potência do ultrassom de 132 W, razão molar óleo: água 1:9 (21,8 g de óleo de soja e 4,05 g de água). As condições de agitação mecânica para a formação da emulsão como etapa prévia foram: (a) 2000 rpm durante 1,5 h, seguida de 300 rpm durante tempo reacional; (b) 1000 rpm durante 1,5 h, seguida de 300 rpm durante o tempo reacional; (c) 300 rpm durante 1,5 h e durante o tempo reacional; (d) sem formação de emulsão prévia e 300 rpm durante o tempo reacional.



Em sistemas que formam emulsão existe uma alta área interfacial entre o óleo e a fase aquosa, e segundo Noor et al. (2003) um aumento dessa área, na qual atua a enzima, pode acarretar em um aumento na velocidade de hidrólise. Beuve e Morison (2010) observaram este efeito, onde uma maior velocidade de hidrólise em óleo de canola foi obtida, nas mesmas condições, variando-se a proporção de óleo e água no sistema de 2:1 para 1:5 (v/v).

5.1.2.2 Determinação das condições de agitação e estabilidade da dispersão

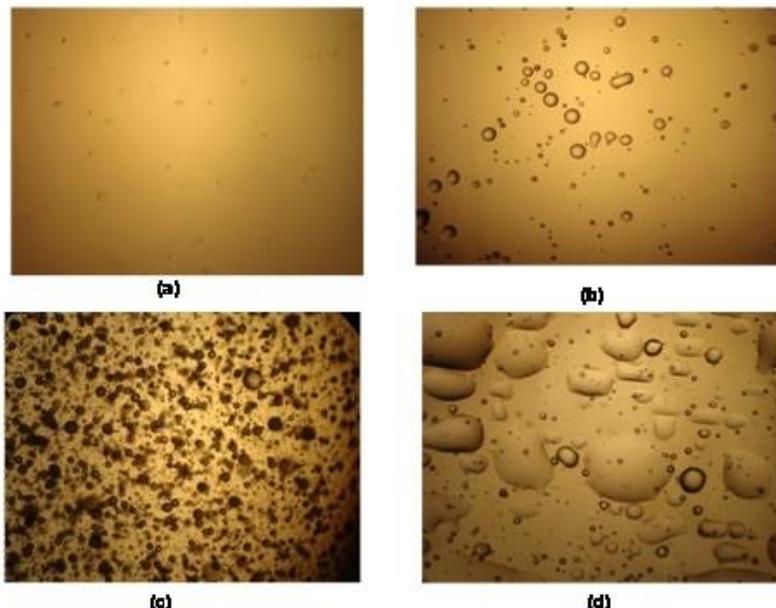
Nesta etapa foram realizados testes para observar a estabilidade da dispersão em relação à intensidade de agitação do meio sem a utilização de surfactante. Foi utilizada a razão molar de 1:9 (óleo de soja: água) nas mesmas condições fixadas no item anterior: potência do ultrassom 132 W; 40 °C e 1000

rpm. Promoveu-se a agitação mecânica do meio sob a ação de ultrassom durante 1,5 h e, após a formação da dispersão retirou-se a agitação mecânica, mantendo-se somente a ação do ultrassom. Diante disso, foi possível observar que após a retirada de toda a agitação mecânica do meio, a dispersão não se manteve estável somente com a ação do ultrassom, ocorrendo à separação de fases no sistema em poucos instantes. Portanto, como a dispersão não se manteve estável com a retirada total da agitação, em outro teste, após a formação da dispersão (nas mesmas condições do teste anterior), manteve-se o ultrassom com potência máxima e a agitação mecânica foi reduzida para 300 rpm. Neste caso, foi possível observar que visualmente a dispersão se manteve estável, não apresentando separação de fases. Com o resultado destas análises, pôde-se identificar a importância da ação da agitação mecânica do meio para a manutenção da estabilidade da dispersão.

Grandes aumentos da velocidade de agitação podem ter um efeito negativo sobre a velocidade de hidrólise, uma vez que também aumenta-se o cisalhamento sobre a enzima, podendo conduzir a sua desnaturação (NOOR et al., 2003; SHAMEL et al., 2005). Entretanto, Yu et al. (2010) observaram que a ação combinada da agitação mecânica (50 - 200 rpm) e ultrassom podem ter um efeito benéfico, elevando a velocidade de reações enzimáticas. Em outro estudo, Babicz et al. (2010) obtiveram melhores resultados para hidrólise enzimática de óleo de soja visando à obtenção de diacilgliceróis, em condições mais brandas de agitação (400 e 700 rpm). Outros trabalhos também relatam o uso de agitação mecânica variando de 200 - 500 rpm para reações enzimáticas (ROONEY; WEATHERLEY, 2001; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). Diante disso, optou-se pelo uso da agitação mecânica de 300 rpm, menor valor que o agitador utilizado pode operar, pois esta intensidade forneceria uma agitação razoável ao meio, não comprometendo a estabilidade da emulsão e atuação enzimática.

A Figura 17 apresenta a imagem através de microscópio óptico com ampliação de 10x, da dispersão do óleo de soja e água nas condições de 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, razão molar óleo de soja e água 1:9 (21,8 g de óleo de soja e 4,05 g de água). As condições de agitação mecânica para a formação da dispersão como etapa prévia foram: (a) 2000 rpm durante 1,5 h (b) 1000 rpm durante 1,5 h, (c) 300 rpm durante 1,5 h (d) sem formação de emulsão prévia (somente mistura óleo de soja e água), sem a presença do catalisador.

Figura 18 - Imagem da dispersão óleo e água a 40 °C, com potência ultrassônica de 132 W, razão molar óleo e água 1:9 (21,8 g de óleo de soja e 4,05 g de água).



As condições de agitação mecânica (rpm) para a formação da dispersão como etapa prévia foram: (a) 2000 (b) 1000 (c) 300 (tempo de 1,5 h) e (d) sem formação de emulsão prévia.

Através da Figura 17 pode-se observar que a aparência da dispersão, nas diferentes condições foram diferenciadas, onde as imagens mostram que conforme ocorre o aumento da agitação diminui a formação de micelas.

Segundo Lyssant (1974), a viscosidade da emulsão e sua aparência são controladas em parte pelo tamanho das partículas da fase dispersa e a proporção entre as fases internas e externas. A energia necessária para produzir uma emulsão por ultrassom é menor do que a necessária nos métodos convencionais. Dispersão geradas por ultrassom podem ser mais estáveis, requerem mínimas quantidades de surfactantes e, em muitos casos, a presença de surfactantes é desnecessária; têm um tamanho submicrônico e uma distribuição de tamanho extremamente estreito (FEITEN, 2013).

Trabalhos como os de Abismail et al. (1999), Ramachandran et al. (2006) e Hang et al. (2010) mostram estudos comparativos de emulsificação de

óleo e água e afirmam que o ultrassom apresenta algumas vantagens diante da agitação mecânica mas, em alguns casos, a agitação mecânica garante algumas vantagens. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a aplicação destas duas ferramentas (agitação mecânica e ultrassom) podem ser utilizadas para a obtenção de resultados bastante satisfatórios.

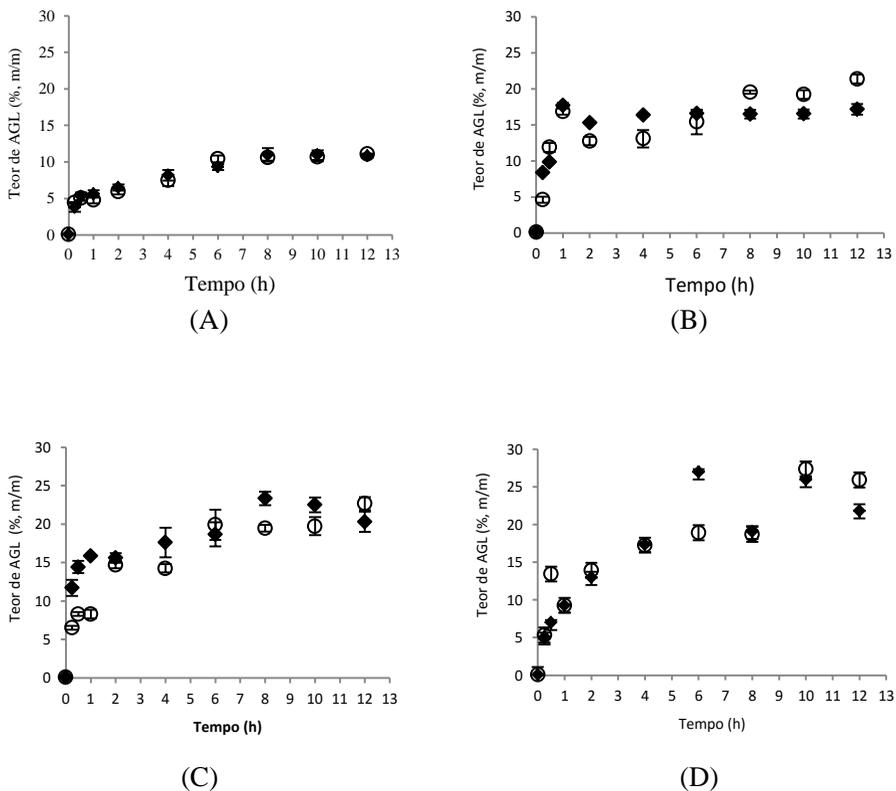
5.1.3 Cinética enzimática da hidrólise em banho de ultrassom em modo batelada avaliando o tipo de agitação

Nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados das cinéticas enzimáticas destrutivas realizadas com e sem ultrassom em diferentes condições da dispersão do óleo e água como etapa prévia.

A Figura 18 mostra a cinética enzimática realizada nas quatro diferentes condições de dispersão do óleo de soja em água estudadas, com e sem o emprego do ultrassom. Na figura 19, mostra-se a velocidade inicial das reações das cinéticas apresentadas no gráfico 18.

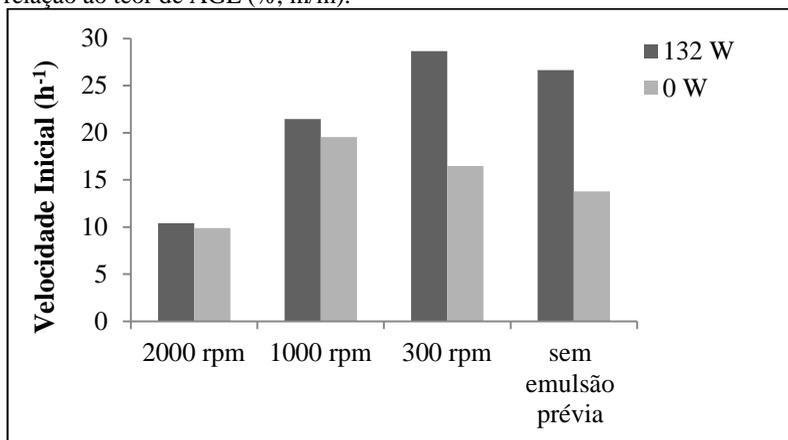
Nesta figura 18 é possível observar que o uso de ultrassom interferiu nas reações de hidrólise enzimática, sendo que as maiores velocidades iniciais foram obtidas nas reações conduzidas no banho de ultrassom. Quando a agitação foi de 2000 rpm (A) a velocidade inicial da reação foi de $10,40 \text{ h}^{-1}$ e $9,90 \text{ h}^{-1}$; com e sem o uso de ultrassom, respectivamente. Para a agitação de 1000 rpm (B) a velocidade inicial da reação foi de $21,47 \text{ h}^{-1}$ e $19,55 \text{ h}^{-1}$ com e sem o uso de ultrassom, respectivamente; quando a agitação foi de 300 rpm (C) a velocidade inicial da reação foi de $28,65 \text{ h}^{-1}$ e $16,46 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, e, quando não houve dispersão prévia foi onde apresentou maior diferença na velocidade inicial da reação onde apresentou velocidade inicial de $26,66 \text{ h}^{-1}$ com ultrassom e $13,78 \text{ h}^{-1}$ sem a presença de ultrassom. Também se pode observar que, quando não houve dispersão prévia (D), melhores resultados em teor de ácidos graxos livres são obtidos (27 %, m/m).

Figura 19– Cinética enzimática do óleo de soja nas diferentes condições de dispersão do óleo e água como etapa prévia em relação ao teor de AGL (% , m/m).



Condições experimentais: (A) 2000 rpm; (B) 1000 rpm; (C) 300 rpm; (tempo de 1,5 h e 300 rpm durante tempo reacional) e (D) sem formação de emulsão prévia e 300 rpm durante o tempo reacional, fixou-se razão molar óleo de soja e água 1:9, 40 °C, C_E de 10 % (m/m) lipase de pâncreas suíno, potência ultrassônica de 0 W (○) e 132 W (◆).

Figura 20 – Velocidade inicial das cinéticas enzimática do óleo de soja apresentadas na figura 18 nas diferentes condições de dispersão do óleo e água como etapa prévia em relação ao teor de AGL (% , m/m).



O ultrassom é reconhecidamente um agente que contribui para a formação de partículas de emulsão microscópicas, que aumentam a área interfacial e conseqüentemente, elevam as velocidades de reação. As velocidades de agitação mecânica maiores favoreceram uma maior redução no tamanho das gotículas da emulsão, o que também pode ter aumentado a velocidade de evaporação das gotículas de água sob a ação do ultrassom (fato este comprovado a partir da análise de teor de água presente no meio nas diferentes condições de dispersão estudadas). Estes resultados estão apresentados na Tabela 8, onde foram realizadas dispersões do óleo de soja e água retirando alíquotas durante o tempo de 1,5 h.

Tabela 8 - Teor de água presente nas diferentes condições de dispersão do óleo de soja e água, sem presença de enzima, 40 °C e potência ultrassônica de 132 W.

Tempo (min)	Dispersão em 2000 rpm	Dispersão em 1000 rpm	Dispersão em 300 rpm
	Teor de água (% , m/m)		
0	15,67	15,67	15,67
30	0,94	2,93	2,65
60	0,25	2,84	2,43
90	0,20	0,74	2,30

Como pode-se perceber na Tabela 8, conseguiu-se comprovar que a água do meio reacional evapora rapidamente, constatando que antes mesmo de adicionar a enzima praticamente não tem-se mais água para que ocorra a reação, lembrando que o frasco onde foi realizada a reação há aberto, favorecendo a evaporação. Para as próximas reações fechou-se o frasco contendo meio reacional.

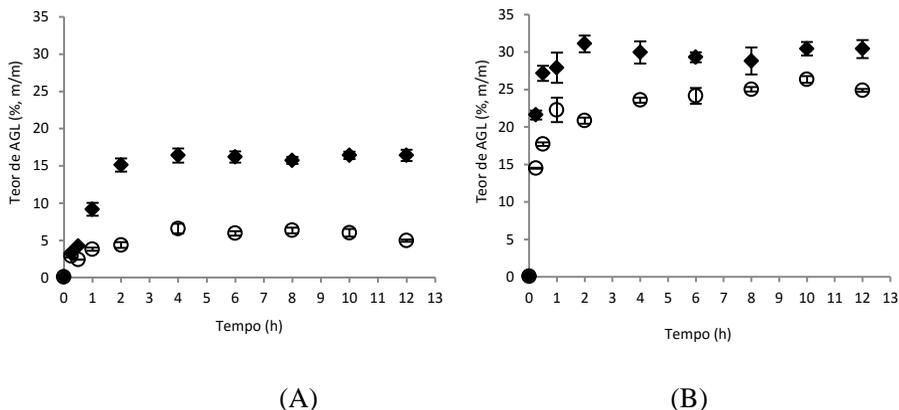
Como a água é um reagente da reação de hidrólise, essa perda pode ter prejudicado no teor de ácidos graxos livres formados, conforme observado na Figura 18 (A), (B) e (C).

Feiten (2013) realizou cinéticas enzimáticas da hidrólise do óleo de soja em banho de ultrassom nas condições: razão molar 1:9, C_E de 10 % da lipase Lipozyme TL IM, 600 rpm (aparência transparente), 100 % potência de ultrassom e 65 °C, comparando a cinética assistida por ultrassom com a cinética na qual somente a emulsão (90 min) foi assistida por ultrassom. O autor obteve concentração de ácido graxo em torno de 26 % para ambas as condições. A fim de encontrar possíveis razões para tão baixas concentrações, foram realizadas análises de Karl Fisher para determinar o teor de água presente após a formação da emulsão em ultrassom (90 min). Foi constatado que antes mesmo de dar-se início à reação pela adição da enzima estava ocorrendo grande perda de água por evaporação, em torno de 90 %. Estes dados justificam os resultados das cinéticas das diferentes condições de emulsificação do presente trabalho, quando se obteve menores conversões quando se utilizou maiores agitações. Quando se aumentou a área interfacial elevou-se a velocidade de reação e conseqüentemente as conversões.

Awadalak (2012) identificou altas velocidades de evaporação de água, acima de 33 % em 4 horas, quando empregou sonda ultrassônica na emulsificação de óleo de palma a 55 °C, para posterior reação de hidrólise catalisada por Lipozyme RM IM. Quando expôs a mistura reacional somente 3 minutos à sonda para formação da emulsão como etapa prévia à reação de hidrólise, suas conversões aumentaram cerca de 5 vezes frente à mesma reação de hidrólise assistida pela sonda (50 e 10 %, respectivamente).

Após avaliar os resultados das cinéticas ilustradas na Figura 18, a qual pode observar os melhores resultados para a cinética (D) nas condições experimentais: razão molar óleo de soja e água 1:9, potência ultrassônica de 132 W, 40 °C, 300 rpm e C_E de 10 % (m/m), foram realizados novos experimentos cinéticos empregando C_E de 1 % (m/m) de dois diferentes catalisadores enzimáticos: a lipase de pâncreas suíno e Lipozyme TL IM. Os resultados são apresentados na Figura 19.

Figura 21 - Hidrólise enzimática de óleo de soja catalisada por lipase de pâncreas suíno (A) e Lipozyme TL IM (B) com e sem emprego do ultrassom.



Condições experimentais: razão molar óleo e água 1:9, 40 °C, C_E 1 % (m/m) de enzima (baseado no total do substrato), potência ultrassônica de 0 W (○) e 132 W (◆) e 300 rpm.

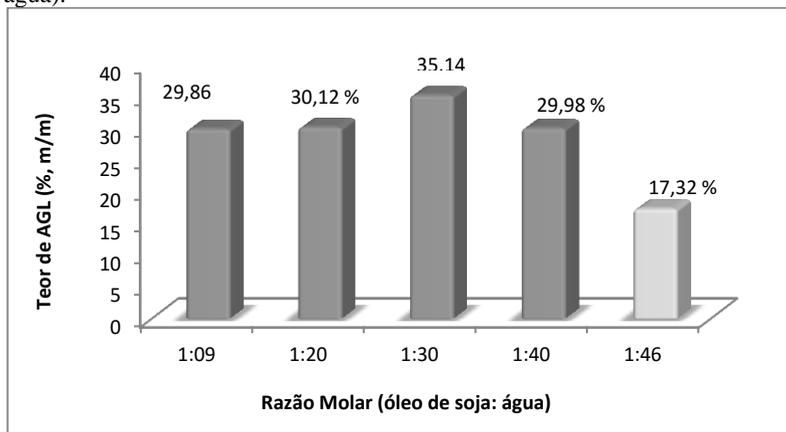
A Figura 19 apresenta a hidrólise enzimática de óleo de soja na melhor condição encontrada no teste de dispersão do óleo de soja e água (Figura 17 (D) - sem formação de emulsão prévia) catalisada por lipase de pâncreas suíno (A) e por Lipozyme TL IM (B). Pode-se observar que empregando a lipase de pâncreas suíno, o teor de AGL não ultrapassa 16 % (m/m) quando o ultrassom é empregado. Neste caso pode-se notar a influência do ultrassom na velocidade inicial da reação quanto no teor se compararmos sem a presença do mesmo. Com a Lipozyme TL IM foram alcançados cerca de 30 % (m/m) de teor de AGL em 2 horas de reação quando é empregado o ultrassom.

Através deste teste não foi possível chegar a um teor de ácidos graxos relevantes, desta forma resolveu-se estudar outras variáveis, tendo como base os estudos acima citados.

5.1.4 Influência das variáveis razão molar, temperatura, concentração de enzima e solvente adequado na recuperação da lipase em relação ao teor de ácidos graxos

Na Figura 20 estão apresentados os resultados expressos em teor de AGL (% m/m) obtidos na hidrólise enzimática de óleo de soja em sistema de ultrassom nas condições fixas de 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, C_E de 1 % (relação ao total do substrato) e 300 rpm, onde variou-se a razão molar óleo de soja:água. Utilizou-se n-hexano para lavagem e separação da enzima. Decidiu-se utilizar como solvente, em um primeiro momento, o n-hexano, tendo como base diversos trabalhos na literatura (Cavalcanti- Oliveira et al., 2011; Rodrigues e Ayub, 2011; Aguleiras et al., 2014; Feiten et al., 2013).

Figura 22 – Hidrólise enzimática do óleo de soja variando a razão molar (óleo de soja: água).



Condições fixas de 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, C_E de 1 % (m/m) de catalisador Lipozyme TL IM (relação ao total do substrato), 300 rpm e 2 h de reação.

Avaliando os resultados expressos em teor de AGL (% m/m) em relação à razão molar, pode-se notar que a razão molar 1:10 conduziu a um teor de 30,12 % (m/m) de AGL e a razão molar 1:20 35 % (m/m) em AGL. Por apresentarem resultados semelhantes, ambos foram escolhidos para os próximos testes. Sabe-se que para ocorrer a hidrólise de óleos e gorduras, é preciso ter a presença de água no meio, também se sabe através da

estequiometria da reação que, para cada mol de triacilglicerol precisa-se de 3 mols de água para produção de 3 mol de AGL e 1 mol de glicerol. O excesso de água no sistema poderá favorecer o deslocamento da reação no sentido da formação de produtos. Entretanto, um excesso muito elevado pode prejudicar a obtenção dos ácidos graxos. Provavelmente, este fato está relacionado aos resultados obtidos, pois quando uma quantidade elevada de água (1:46) foi utilizada, o teor de AGL diminuiu. Registros na literatura indicam que um leve aumento na quantidade de água da reação, leva a um aumento de atividade enzimática devido à melhor conformação enzimática e maior área de interface. Porém, a partir de uma quantidade máxima, pode ocorrer a inibição da atividade catalítica da lipase pelo alto teor de água (Chu; Quek; Baharin, 2002; You e Baharin, 2006). De acordo com Yadav e Devi (2004), a adição de água além de um valor crítico, pode aumentar a espessura da camada da água formada em torno da enzima. Isto faz com que os reagentes e os produtos orgânicos com fraca solubilidade em meio aquoso tenham mais dificuldade de se difundir através da camada de água para os centros ativos da enzima.

Tendo como base os testes avaliando o efeito da razão molar, os melhores resultados foram obtidos quando o óleo de soja na razão molar de 1:10 e 1:20 foi hidrolisado. Novos testes foram realizados, Tabela 9, variando a razão molar, temperatura e concentração de catalisador enzimático Lipozyme TL IM e fixando a potência ultrassônica em 132 W, 2 h de reação, 300 rpm. A recuperação da enzima foi realizada através de lavagem com n-hexano.

Tabela 9 – Teor de AGL em função das variáveis de processo como razão molar, temperatura e concentração de catalisador enzimático Lipozyme TL IM.

Razão molar (óleo:água)	T (°C)	C _E (%, m/m)	Teor de AGL (%, m/m)
1:10	40	1	30,12
1:20	40	1	35,11
1:10	60	1	22,64
1:20	60	1	31,23
1:10	40	10	39,00
1:20	40	10	39,83
1:10	60	10	29,60
1:20	60	10	45,18

Condições fixas: potência ultrassônica de 132 W, 2 h de reação, 300 rpm e lavagem do catalisador para recuperação com n-hexano).

Pode-se observar pela da Tabela 9 que, quando o óleo de soja foi hidrolisado nas condições de razão molar 1:20 (óleo: água), 60 °C, C_E de 10 % de enzima Lipozyme TL IM, 300 rpm, potência ultrassônica de 132 W e lavou-se a enzima para separação do meio reacional com n-hexano, se obteve o maior teor de AGL, o qual foi de 45 % (m/m). Por se obter um teor de AGL não satisfatório (~45 %), resolveu-se testar outro solvente (álcool isopropílico) para separação da enzima do meio reacional, pois se notou que em contato com o n-hexano, o ácido graxo formado não diluía e não se desprendia totalmente da enzima, dificultando a quantificação dos AGL total, a realização da lavagem, a recuperação da enzima e a incapacidade de medir a atividade final da enzima.

Na Tabela 10 estão apresentados os novos testes nas mesmas condições realizadas com n-hexano, mas agora lavando a enzima para separação do meio reacional com álcool isopropílico, com o intuito de conseguir separar com maior eficiência o ácido graxo da enzima, podendo medir sua atividade após a reação e realizar sua reutilização.

Tabela 10 – Teor de AGL em função das variáveis de processo como: razão molar, temperatura e concentração de catalisador enzimático Lipozyme TL IM.

Razão molar (óleo:água)	T (°C)	C_E (%, m/m)	Teor de AGL (% m/m)
1:10	40	1	34,49
1:20	40	1	40,98
1:10	60	1	29,94
1:20	60	1	36,02
1:10	40	10	50,09
1:20	40	10	60,68
1:10	60	10	43,00
1:20	60	10	50,42

Condições fixas de potência ultrassônica de 132 W, 2 h de reação, 300 rpm e lavou-se o catalisador para recuperação com álcool isopropílico).

Pode-se notar através dos resultados da Tabela 10 que quando o óleo de soja foi hidrolisado nas condições de razão molar (óleo: água) 1:20, 40 °C, C_E de 10 % da enzima Lipozyme TL IM nas condições fixas de 2 h de reação, 300 rpm, potência ultrassônica de 132 W e lavou-se a enzima com álcool isopropílico obteve-se um teor de AGL de 60 % (m/m), sendo este considerado um resultado satisfatório.

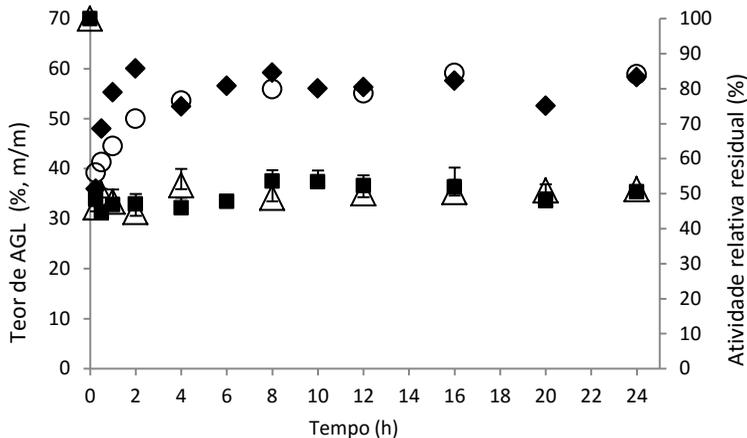
O n-hexano se mostrou um solvente ineficiente para dissolver a amostra, acredita-se que o n-hexano não é capaz de dissolver moléculas polares nelas contidas, como a água e o glicerol. Já o álcool isopropílico é um solvente polar capaz de dissolver água e glicerol que são polares, diglicerídeos, monoglicerídeos, triglicerídeos e o ácido graxo que são levemente polares. Assim, este solvente foi capaz de formar uma única fase capaz de passar pelo filtro retendo somente o catalisador enzimático. Além disso, a estrutura do álcool é uma cadeia ramificada, podendo dificultar que se formem micelas em volta da enzima que está imobilizada, facilitando assim a limpeza da mesma e sua recuperação.

Pelo mesmo motivo, verifica-se que solventes orgânicos com polaridade adequada são importantes para o substrato, para a solubilidade do produto e para a transferência de massa no sistema reacional (LV et al., 2007). Diferentes solventes orgânicos têm capacidades diferentes de distorcer a camada de água essencial em torno da lipase imobilizada. O log P (constante de polaridade, definido como o coeficiente de partição do solvente entre octanol e água) é amplamente utilizado para representar as características da fase orgânica e prever a atividade enzimática (LAANE et al., 1987; CUI et al., 1997).

A partir da condição de razão molar (óleo:água) 1:20, 40 °C, C_E de 10 % Lipozyme TL IM nas condições fixas de 300 rpm, potência ultrassônica de 132 W e lavagem do catalisador com álcool isopropílico decidiu-se realizar uma avaliação cinética (0,25-24 h) para investigar se realmente o tempo de 2 h era o melhor tempo para se obter o maior teor de ácidos graxos. Também nesta mesma condição foi realizada outra avaliação cinética sem a presença do ultrassom para poder observar qual a influência do mesmo sobre a hidrólise e a atividade da lipase.

A Figura 21 apresenta a comparação da cinética com e sem a presença do ultrassom na hidrólise de óleo de soja para obtenção do teor de AGL, e a atividade relativa residual (%) das lipases após cada tempo de reação. Ambas as cinéticas foram realizadas na melhor condição encontrada no estudo acima, sendo a razão molar de 1:20 (óleo de soja: água), 40 °C, C_E de 10 % Lipozyme TL IM e potência ultrassônica de 132 W, quando utilizado, fixado 300 rpm e lavou-se o catalisador com álcool isopropílico (para recuperação).

Figura 23- Influência do ultrassom na cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja a 0 W (○) e 132 W (◆) de potência ultrassônica e na atividade relativa residual (%) da lipase após cada tempo de reação nas condições de potência ultrassônica de 0 W (Δ) e 132 W (◼).



Condições fixas de razão molar 1:20, 40 °C, C_E de 10 % Lipozyme TL IM, 300 rpm e lavou-se o catalisador com álcool isopropílico (para recuperação).

Pode-se observar na Figura 21 que quando utilizou o ultrassom, o máximo de teor de ácido graxo foi obtido em duas horas de reação, cerca de 60 % (m/m) e se manteve constante com algumas oscilações até o tempo máximo estudado (24 h). Estas oscilações são devido à cinética ser destrutiva e, dependendo da localização do frasco da reação que está exposto no banho de ultrassom, podem ocorrer mudanças nas vibrações fornecidas pelo ultrassom, fato confirmado em testes anteriores e observado neste trabalho. Outra possível interação para essas oscilações no meio reacional é a presença de agitação mecânica, a qual está presente devido o meio reacional ter elevada quantidade de óleo presente, cerca de 70 %, e somente o ultrassom não ser capaz de homogeneizar o meio. Dependendo da localização da haste, variação no teor de AGL (% m/m) também foi observada.

Para os testes sem a presença do ultrassom obtiveram-se valores próximos de 60 % (m/m) somente a partir de 16 h de reação, mostrando que o ultrassom contribui para a obtenção dos ácidos graxos em um tempo muito menor do que quando não utiliza-se o mesmo. Estes resultados foram similares a trabalhos encontrados na literatura, como de Chen et al., (2000) que realizaram a reação de hidrólise do 4,4-disubstituído-2-fenil-2-oxazolin-5-ina

em uma solução alcalina sob sonicação, e mostraram que a reação pode ser concluída em 15 minutos, enquanto que, sem ultrassom, para uma hidrólise similar, são necessárias 24 horas de reação. Babicz et al. (2010) avaliaram a hidrólise enzimática em banho de ultrassom, utilizando diferentes lipases para produção de diacilgliceróis. Os autores relataram que, com frequência de 47 kHz e potência de 12 W, utilizando 1 % de enzima, a produção de diacilgliceróis foi de 40 % com Lipozyme TL IM, 41 % com Lipozyme RM IM e de 32 % utilizando Novozym 435. Os experimentos foram conduzidos em pressão atmosférica, temperatura de 55 °C e taxa de agitação de 700 rpm, por 90 minutos.

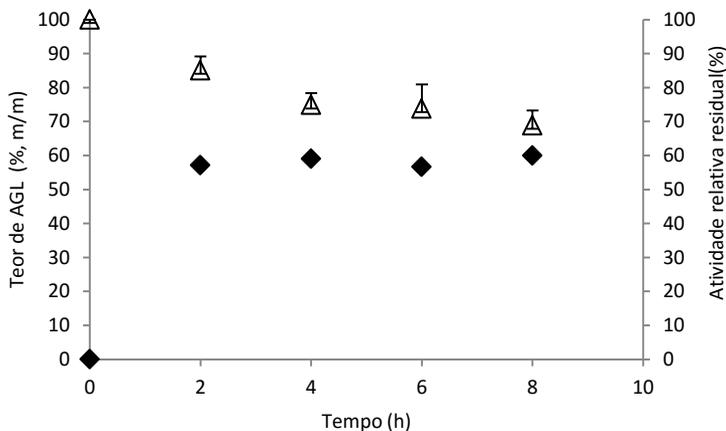
Da mesma forma, na Figura 21 constata-se que a maior velocidade inicial de reação foi observada quando o ultrassom foi empregado. A velocidade inicial de reação com e sem ultrassom foi de 95,48 h⁻¹ e 82,02 h⁻¹, respectivamente. Acredita-se que a velocidade inicial da reação com ultrassom foi maior, pois o ultrassom é reconhecidamente um agente que contribui para a formação de partículas de emulsão microscópicas, que aumentam a área interfacial e, conseqüentemente, elevam as velocidades de reação. Pilarek e Szewczyk (2007) relatam que, normalmente, as velocidades de reação elevadas em sistemas de cavitação estão associados com radicais livres, temperaturas locais, pressões elevadas e taxas de transferência de massa altas.

Quando se comparou a cinética na presença do ultrassom e a atividade relativa da lipase utilizada em cada tempo de reação (Figura 21), a atividade hidrolítica inicial da lipase Lipozyme TL IM era de 761,38 U/g e quando, submetida ao ultrassom, observou-se que ela manteve sua atividade relativa residual (%) cerca de 50 % até o tempo estudado de 24 h. Para a cinética sem a exposição ao ultrassom, a atividade relativa residual (%) apresentou comportamento semelhante; quando utilizado o ultrassom cerca de 50 % de sua atividade inicial. Resultados satisfatórios mostram que a enzima não apresenta desnaturação com o passar do tempo quando utilizado o ultrassom. Acredita-se que a perda de atividade (50 %) não esteja relacionada ao quanto de triacilgliceróis ela catalisou para converter em ácido graxo, mas sim ao choque de pH com o meio (contato da enzima com os substratos). Fato observado, pois se mediu o pH inicial da reação na presença da água e o óleo e constatou-se um pH de 3,9, este relativamente ácido para a enzima, apesar da lipase Lipozyme TL IM se adaptar em uma faixa ampla de pH, este está abaixo. Segundo Dong; Wong; Chang (2010) as enzimas sofrem grande influência do pH, sendo que biocatalisadores, em pH extremos, podem perder totalmente a atividade. Porém, com variações mais brandas pode haver uma desnaturação parcial da

enzima acarretando uma diminuição na atividade enzimática. O catalisador reutilizado na reação propicia o maior aproveitamento do catalisador, por este motivo resolveu-se testar a reutilização da lipase.

Na Figura 22 estão apresentados os resultados da reutilização da lipase Lipozyme TL IM, expressa em teor de AGL (% m/m) e sua atividade relativa residual após a cada reação, com e sem a presença de ultrassom. Os catalisadores reutilizado foram recuperados da cinética que está expressa na Figura 21. Após as reações de hidrólise separou-se a lipase e mediu-se sua atividade após. A lipase recuperada foi armazenada e reutilizada. Misturaram-se todas as lipases da cinética apresentada na Figura 22 (como apresentaram praticamente a mesma atividade). Mediu-se novamente a atividade hidrolítica (359,50 U/g) e utilizou-se para a reutilização nas condições de razão molar (óleo: água) 1:20, C_E de 10 % (relação ao total do substrato), 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, 300 rpm e uso do álcool isopropílico para recuperação do catalisador Lipozyme TL IM.

Figura 24 – Reutilização do catalisador enzimático Lipozyme TL IM na hidrólise enzimática de óleo de soja (♦) e a atividade relativa residual (%) (Δ).



Condições de razão molar (óleo soja: água) 1:20, C_E de 10 % (relação ao total do substrato), 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, 300 rpm e uso do álcool isopropílico para recuperação do catalisador.

De acordo com a Figura 22 observa-se que após 4 h, o teor de AGL se manteve estável com o tempo não ultrapassando de 60 % (m/m), o qual encontrou o mesmo valor na primeira reação realizada com a enzima. Para a

atividade relativa residual da lipase, a mesma foi diminuindo com o tempo devido à enzima já ter sido utilizada e, por ser recuperada, acredita-se que danifique seu suporte ficando mais sensível ao pH mais ácido e maior tempo de exposição. São poucos os trabalhos relatados na literatura que realizam a recuperação e reutilização do catalisador em reações de hidrólise enzimática, fato este mais comum em reações de transesterificação e esterificação.

Rodrigues e Ayub (2011) realizaram hidrólise de óleo de soja e recuperaram a lipase (mistura Lipozyme TL e RM) com auxílio de n-hexano e sem lavagem com solvente e constataram que, quando se lavou a lipase com n-hexano pode-se reutilizá-la por 10 bateladas, já a lipase que não foi lavada notou-se que pode ser utilizada em três ciclos. Os autores sugerem que o tratamento de lavagem pode ser realizado de três em três bateladas.

Zhao et al. (2013), a fim de investigar a estabilidade da lipase (*Aspergillus niger*) imobilizada em resina macroporosa D3520 para a produção de biodiesel, a lipase para catalisar várias bateladas de transesterificação. A lipase apresentou, relativamente, boa estabilidade num sistema com *tert*-butanol. Depois de reciclagem por 20 bateladas, o rendimento em biodiesel diminuiu somente cerca de 15 % quando o tempo de reação foi de 16 h.

Batistella et al. (2012) realizaram a recuperação da lipase Lipozyme TL IM da reação de transesterificação e observaram que até o segundo ciclo, tanto a atividade quanto a conversão a ésteres etílicos se mantiveram estáveis até o segundo ciclo, após diminuiu cerca de 30 % da atividade e conversão, e após o terceiro ciclo diminuiu significativamente até chegar ao sexto ciclo zerando a atividade e conversão.

Michelin et al. (2015) recuperara lipase Novozym 435 na reação de transesterificação de óleo de macaúba assistida por ultrassom com auxílio de n-hexano na lavagem da lipase. A atividade enzimática apresentou diminuição semelhante na produção dos ésteres etílicos, sendo que sua reutilização só é vantajosa até 5 ciclos.

Em um estudo realizado por Yu et al. (2010), pôde-se observar que o uso de solvente orgânico ajudou a manter a atividade enzimática durante cinco ciclos. Uma queda de 4% na atividade da enzima foi observada após cinco usos. Segundo os autores, as reações foram realizadas com álcool *tert*-amílico (4 mL), óleo de soja (4 mmol), metanol (24 mmol), potência ultrassônica de 50 % (500 W e frequência de irradiação de 40 kHz), enzima Novozym 435 (6 % baseado em massa de óleo), teor de água de 0,5 %, temperatura de 40 °C e vibração de 50 rpm sob irradiação ultrassônica em 2 horas. Cabe mencionar

que os autores apresentam apenas resultados em termos de atividade enzimática, e não em termos de conversão do processo.

Para o teste onde ocorreu a recuperação e reutilização do solvente (álcool isopropílico) de lavagem da lipase, notou-se que esta etapa não interferiu nem no teor de AGL e nem na atividade da lipase, podendo ser utilizado em vários ciclos o mesmo solvente.

Poucos pesquisadores direcionam suas atividades para catálise enzimática assistida por ultrassom e, subsequentemente, para avaliar o comportamento da atividade da enzima, a estabilidade e otimização de variáveis operacionais. No entanto, apenas alguns relatos na literatura de estudos atuais sobre as mudanças de conformação com a estrutura e sítio ativo da enzima. Isso é fundamental para compreender o verdadeiro mecanismo de ação do ultrassom em lipase que deve ser mais explorado. Todos esses esforços se justificam pela grande versatilidade do uso do ultrassom (Lerin et al., 2014).

5.1.5 Efeito da razão molar (AGVS: etanol) na esterificação do ácido graxo vegetal em modo contínuo em ultrassom

Com o intuito de chegar a uma condição ótima para o óleo de soja e a partir desta, aplicar para o óleo de fritura adquirido de restaurantes locais, na Tabela 11 está apresentado o perfil de ácidos graxos presente no óleo de fritura utilizado neste trabalho. Esta análise foi realizada no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidade de La Republica (UDELAR) no Uruguai.

Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos constituintes do óleo de fritura.

Ácido graxo	Nomenclatura	Teor de ácidos graxos (%, m/m)
C16:0	Palmítico	11,5
C16:1	Palmitoleico	0,1
C18:0	Estearico	3,9
C18:1	Oleico	25,6
C18:2	Linoleico	52,1
C18:3	Linolênico	4,7
C20:0	Araquidônico	0,7
Total		98,6

Como pode-se observar através da análise apresentada na Tabela 11, o perfil de ácidos graxos constituintes do óleo de fritura utilizado é muito semelhante ao do óleo de soja apresentado na Tabela 1 deste trabalho.

O óleo de fritura apresentou um Índice de acidez inicial de 1,26 mg KOH/g mais elevado, se compararmos com o índice de acidez inicial do óleo de soja (0,29 mg KOH/g) utilizado neste trabalho. Os ácidos graxos são constituintes dos óleos e gorduras na forma de mono, di e triacilgliceróis, uma grande quantidade de ácidos graxos livres indica que o produto está em acelerado grau de deterioração. Um elevado índice de acidez indica, portanto, que o óleo ou gordura está sofrendo hidrólises em sua cadeia, liberando seus constituintes principais, os ácidos graxos (ALVES et al., 2009). Fato este que acontece com o óleo de fritura, aumenta o grau de deterioração através de diferentes fenômenos, aumentando sua acidez que neste caso, naturalmente, já estão sendo liberados os constituintes principais: os ácidos graxos, o que é positivo para a hidrólise.

A partir das condições otimizadas para a hidrólise do óleo de soja em sistema de ultrassom, as mesmas condições (razão molar (óleo: água) 1:20, C_E de 10 % (relação ao total do substrato), 2 h de reação, 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, 300 rpm e uso do álcool isopropílico para recuperação da enzima) foram testadas para o óleo de fritura, onde, após a hidrólise obteve-se um teor de ácido graxo de fritura em torno de 60,68 % (m/m). Este resultado foi promissor, mostrando que estas condições se adequaram para óleos reciclados, diminuindo gastos de processo e podendo reutilizar os óleos dando destinos adequados para os mesmos.

Através de uma importante varredura na literatura científica, observa-se uma carência de trabalhos sobre hidrólise enzimática em sistema de ultrassom. Este trabalho demonstra uma importante contribuição devido aos diferenciais estudados quando comparado com outros trabalhos. Este diferencial se destaca por utilizar temperaturas amenas (40 °C), não utilizar emulsificantes, pois em escala industrial, a hidrólise de óleos e gorduras realizada sem a adição de agentes emulsificantes é economicamente mais atrativa, porque reduz os custos do processo e permite a fácil separação do produto de interesse (concentrados de ácidos graxos) (Avelar et al., 2013); e o ultrassom, considerado como uma “tecnologia verde”; utilizar agitação mecânica moderada, não danificando a enzima e tornando o meio mais homogêneo; não utilizar solventes orgânicos (somente na lavagem e separação do catalisador enzimático podendo ser reutilizado); utilizar catalisador enzimático imobilizado facilitando a remoção do catalisador, permitindo o seu reuso. Um importante resultado é a obtenção

do mesmo teor de ácidos graxos quando hidrolisou o óleo de fritura, através das condições otimizadas do óleo de soja, pois, atualmente, a reciclagem de óleos de fritura de um modo geral, vem se mostrando cada vez mais necessária e vantajosa no setor empresarial, seja pelas razões econômicas, seja pelas ambientais.

5.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM MODO CONTÍNUO

A produção de ésteres etílicos pode ser realizada em modo batelada e modo contínuo. No modo batelada, as fases de reação e separação são geralmente efetuadas no mesmo tanque, de modo que requer um maior volume do reator e tempos de reação e separação mais longos (THANH et al., 2010). O processo contínuo proporciona um menor custo de produção, a qualidade do produto é uniforme, facilita o controle do processo e proporciona a possibilidade de diminuição do volume do reator, e o tempo de retenção necessário para atingir conversões desejadas também é reduzido (VELJKOVIĆ et al., 2012). Diante deste fato, abaixo estão apresentados os resultados obtidos nos testes da segunda etapa do trabalho, a esterificação enzimática em modo contínuo, utilizando ultrassom. Nesta etapa, foi utilizado o ácido graxo vegetal comercial (AGVS) como substrato, visando obter as condições otimizadas de esterificação e após aplicar estas condições para os hidrolisados provindos da etapa de hidrólise, possibilitando a integração das etapas, através da consecução do processo conhecido como hidroesterificação.

5.2.1 Seleção do catalisador enzimático com potencial para a reação de esterificação

Em um primeiro momento realizou-se um *screening* de lipases para definir o catalisador a ser utilizado nesta etapa. Os resultados obtidos para atividade de esterificação das lipases comerciais testadas a 65 °C estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Atividade de esterificação das lipases testadas.

Catalisador enzimático	Atividade U/g
Novozym 435 IM	47 ± 0,06
Lipozyme RM IM	39 ± 0,26
Lipozyme TL IM	50 ± 1,31

Os valores são média de triplicata ± desvio padrão; IM= imobilizado.

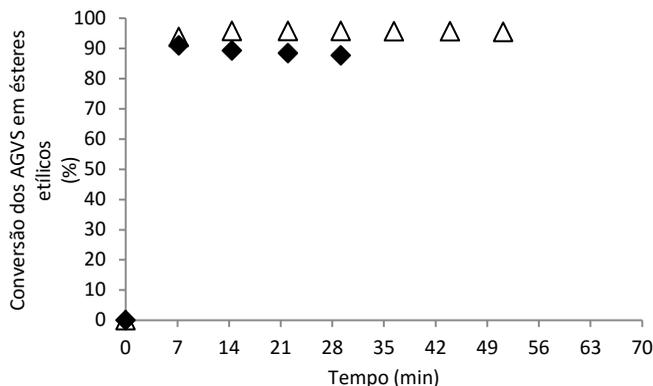
Como pode-se observar na Tabela 12 o catalisador enzimático Novozym 435 e Lipozyme TL IM apresentaram atividades semelhantes. Os dois catalisadores foram testados, em um primeiro momento a Novozym 435 e após a substituição para Lipozyme TL IM.

5.2.2 Efeito da razão molar (AGVS: etanol) na esterificação do ácido graxo vegetal em modo contínuo em ultrassom

A escolha em usar o álcool etílico e não testar o álcool metílico veio da experiência obtida por Santin (2013), a qual faz parte de nosso grupo de pesquisa, onde a esterificação do mesmo ácido graxo foi testada avaliando a potencialidade do uso do etanol e metanol como substrato. O autor observou que o etanol apresenta vantagens sobre o metanol. Marciniuk et al. (2007) simularam a reação de esterificação do ácido oleico com metanol e etanol. Os autores observaram que a reação com etanol é endotérmica e, desta forma, a conversão de equilíbrio aumenta com o aumento de temperatura. Já a reação com metanol é exotérmica, apresentando comportamento oposto.

Na Figura 23 encontram-se os resultados expressos em termos de conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação em modo contínuo na presença do ultrassom, nas condições potência ultrassônica de 132 W, 65 °C, vazão de alimentação do substrato de 2,5 mL/min, catalisador Novozym 435 e tempo de residência de 7 min, para duas razões molares (AGVS:etanol), 1:3 e 1:6.

Figura 25 - Efeito da razão molar sobre a conversão dos AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo na presença do banho de ultrassom com a Novozym 435.



Razão molar AGVS e etanol 1:3 (◆) e 1:6 (Δ), vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 132 W e tempo de residência de 7 min.

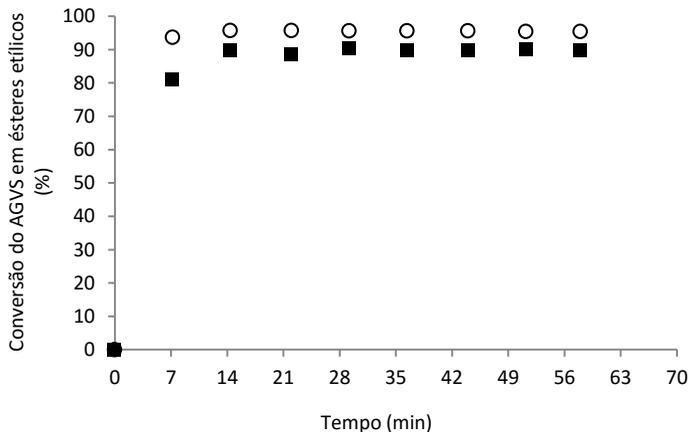
Com base na Figura 23 verifica-se que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou a razão molar 1:6 sendo que a partir de 7 min de reação obtiveram-se em torno 93 a 95 % de conversão em ésteres etílicos se mantendo constante ao longo dos 60 min estudados. Para a razão molar 1:3 em 7 min de reação conversões de 90,98 % foram obtidas, seguidas de uma pequena queda, diminuindo para 87,34 % em 36 min. Para a cinética com razão molar 1:3 coletamos os pontos somente até o tempo de 36 min devido a um problema no reator, ocorrendo vazamentos. Este resultado é comum quando se adiciona excesso de álcool em uma reação de esterificação, pois como se sabe através da estequiometria, para cada 1 mol de AGL, precisamos 1 mol de álcool para produzir 3 mols de ésteres mais 1 mol de água. Quando utilizado em excesso, o álcool tende a deslocar a reação no sentido da formação dos produtos. Conforme Patel et al. (2013), a reação de esterificação é uma reação de equilíbrio limitado. Visando transpor a limitação de equilíbrio, a esterificação de ácidos graxos livres geralmente é realizada utilizando o álcool em excesso, a fim de favorecer a reação.

Hanh et al. (2009) estudaram a produção de ésteres etílicos de ácido graxo a partir de ácido oleico com alcoóis de cadeia curta (etanol, propanol e butanol) sob irradiação ultrassônica e verificaram que a condição ideal para o

processo de esterificação foi para a razão molar de álcool para ácido oleico de 3:1 com 5 % em massa do catalisador H_2SO_4 a 60 °C com um tempo de irradiação de 2 h. A partir desses resultados, os autores concluíram que para a esterificação de ácido oleico, o tempo para alcançar a máxima conversão á ésteres etílicos é muito maior do que aqueles necessários para a transesterificação da trioleína, e a conversão máxima á ésteres etílicos é menor do que aquela obtida a transesterificação de trioleína sob irradiação ultrassônica.

A partir dos resultados apresentados para a razão molar 1:6 (AGVS:etanol), que conduziu à melhor conversão em ésteres etílicos (Figura 23), esta condição foi escolhida para o próximo teste, onde foi avaliada a influência do ultrassom sobre a reação de esterificação dos AGVS para produção de ésteres etílicos em modo contínuo. Neste teste realizou-se uma cinética onde se fixou a razão molar 1:6 (AGVS:etanol), 65 °C, vazão de alimentação do substrato de 2,5 mL/min, catalisador enzimático Novozym 435 e tempo de residência de 7 min, com e sem a potência do ultrassom de 132 W. Os resultados são apresentados na Figura 24.

Figura 26 - Efeito do ultrassom sobre a conversão dos AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo com a Novozym 435.

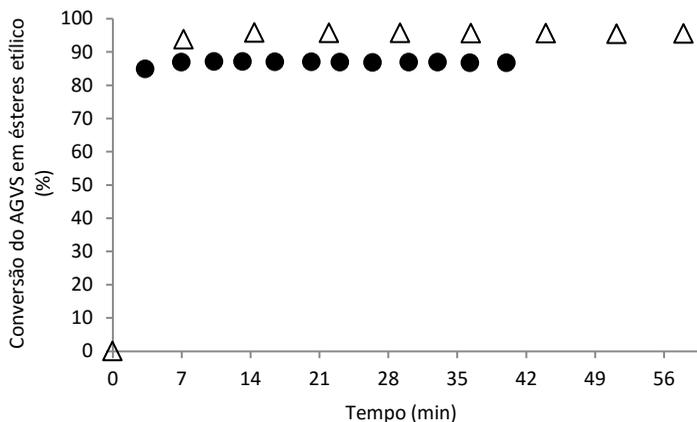


Condições: Razão molar (AGVS: etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 W (●) e 132 W (○), tempo de residência de 7 min.

De acordo com a Figura 24, é possível constatar que a potência ultrassônica não apresentou influência em relação à conversão em ésteres na esterificação do AGVS. Fato este também observado no trabalho de Santin (2013) onde foi estudado o efeito da potência ultrassônica sobre a produção de biodiesel por meio da reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom na razão molar (carga ácida:etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154 W. O autor observou que a potência ultrassônica não exerceu nenhuma influência sobre a reação de esterificação e a atividade enzimática ao final da reação para a reação realizada a 154 W foi de 45,85 U/g e para a reação realizada a 0 W foi de 45,80 U/g, comprovando também que a utilização do ultrassom não interfere na atividade enzimática.

Com base nos resultados com o uso do ultrassom, resolveu-se estudar o efeito da vazão de alimentação do substrato, variando em 2,5 e 5 mL/min, fixando a razão molar 1:6 (AGVS:etanol), potência ultrassônica de 132 W, 65 °C e catalisador enzimático Novozym 435. Os resultados são apresentados na Figura 25. Este teste foi realizado para verificar se aumentando a vazão de alimentação um aumento na conversão em ésteres etílicos seria observado.

Figura 27 - Efeito da vazão de alimentação dos substratos na conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação em modo contínuo com Novozym 435.

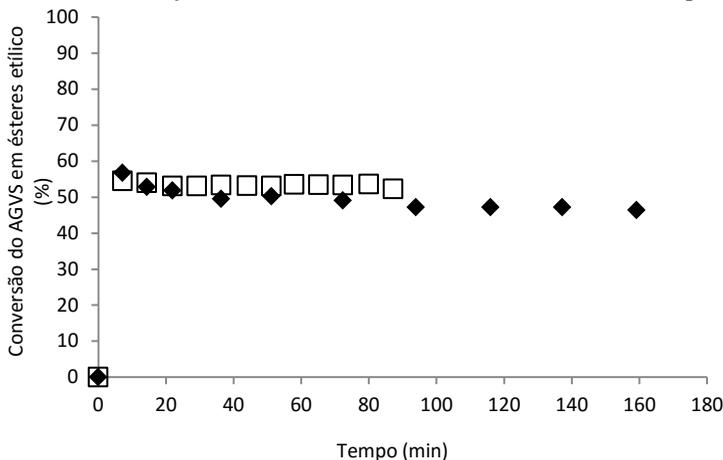


Condições fixas: razão molar (AGVS: etanol) 1:6, 65 °C, potência ultrassônica de 132W, tempo de residência de 7 min para vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min (Δ) e 3 min para vazão de alimentação de 5 mL/min (●).

De acordo com a Figura 25 pode-se constatar que o aumento da vazão de alimentação diminuiu a conversão, apresentando em torno de 86 % em ésteres etílicos, se mantendo estável no tempo estudado. Isto deve ter ocorrido pela diminuição do tempo de contato do substrato com o catalisador. Da mesma forma, quando a vazão de alimentação de 2,5 mL/ min foi utilizada, aumentou-se o tempo de contato substrato/enzima, conduzindo a conversões mais elevadas, da ordem de 95 % em ésteres etílicos, mantendo-se estável ao longo do tempo estudado (58 min). Conforme Trentin (2010), ao aumentar o fluxo volumétrico de alimentação dos reagentes, a conversão pode ser reduzida, fato atribuído ao menor tempo de residência. O autor realizou a esterificação de ácidos graxos de soja comerciais com a lipase Novozym 435 em reator contínuo com vazão de alimentação de 2,5 mL/min, razão molar (AGVS:etanol) de 1:6, 65 °C e potência ultrassônica de 61,6 W e obteve cerca de 97,86 % em 6 minutos de reação e de 96,97 % em 72 minutos, comportamento semelhante ao obtido neste trabalho.

Com o intuito de testar um catalisador de menor custo resolveu-se realizar uma avaliação cinética utilizando o catalisador enzimático Lipozyme TL IM nas condições de vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, tempo de residência de 7 min, potência ultrassônica de 132 W, em razões molares (AGVS:etanol) de 1:3 e 1:6. Os resultados estão apresentados na Figura 26.

Figura 28 - Efeito da razão molar sobre a conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo utilizando-se Lipozyme TL IM.

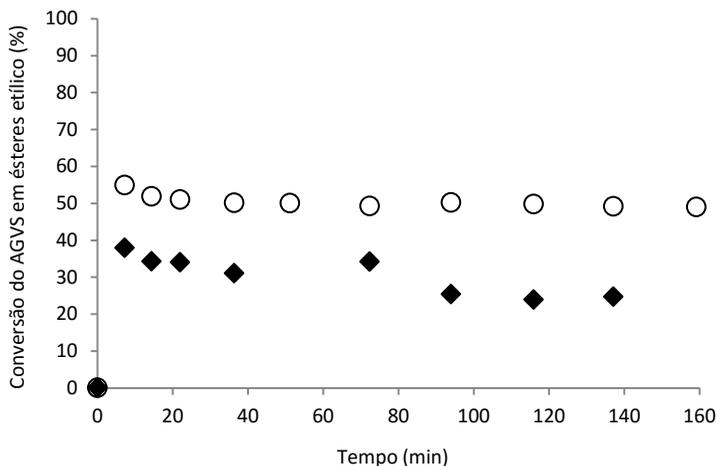


Condições fixas de 65 °C, potência ultrassônica de 132 W, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, tempo de residência de 7 min, variando a razão molar (AGVS: etanol) 1:3 (◆) e 1:6 (□).

Pode-se observar na Figura 26 que a razão molar 1:6 apresentou conversões em torno de 53 % em 7 min de reação e se manteve estável durante o tempo estudado. Já a razão molar 1:3 apresentou comportamento com leve diminuição da conversão com o tempo, iniciando com conversões em torno de 56 % e diminuindo até cerca de 46 % no tempo final estudado (168 min). Estes resultados foram considerados não satisfatórios, comparados com os obtidos com a Novozym 435.

Quando testou-se o catalisador enzimático Lipozyme TL IM, testou-se com temperatura de 65 °C. Como a temperatura ótima desta lipase varia de 30 a 70 °C, uma avaliação cinética a 40 °C foi também realizada. Na Figura 27 encontram-se os resultados da cinética utilizando-se a lipase Lipozyme TL IM nas condições de vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, tempo de residência de 7 min e razão molar (AGVS:etanol) 1:3 e 1:6.

Figura 29 - Efeito da razão molar sobre a conversão do AGVS em ésteres etílicos através da esterificação enzimática em modo contínuo utilizando-se a Lipozyme TL IM.

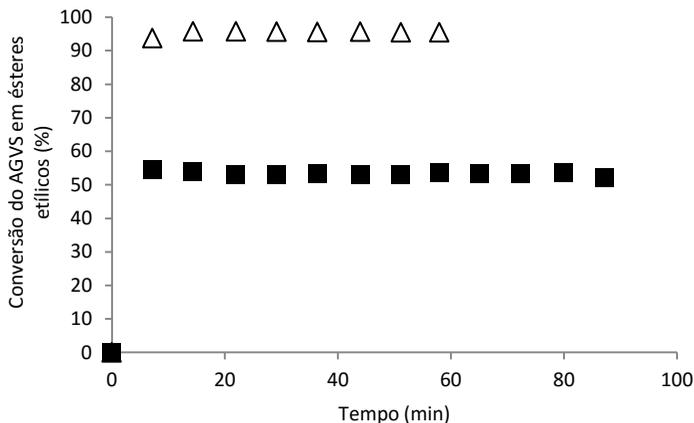


Razão molar (AGVS: etanol) 1:3 (◆) e 1:6 (○), vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, tempo de residência de 7 min, 40 °C, potência ultrassônica de 132 W.

Pode-se observar através dos resultados expressos na Figura 27, que, quando a Lipozyme TL IM foi utilizada como catalisador, a 40 °C, razão molar 1:6, apresentando conversões em torno de 50 % em 7 min de reação, se mantendo estável no decorrer do tempo, já a razão molar 1:3 apresentou um comportamento um pouco diferente, com conversão inicial em torno de 37 %, diminuindo com o tempo, chegando a 23 % em 140 min de reação.

De um modo geral, ao se comparar estas mesmas condições testadas para a Lipozyme TL IM (Figura 27) com a Novozym 435 (Figura 25), compiladas na Figura 28, pode-se concluir que a diferença em termos de conversão é grande.

Figura 30 – Cinética enzimática de esterificação enzimática comparando os catalisadores enzimáticos Lipozyme TL IM (*) e Novozym 435 (Δ) na conversão do AGVS em ésteres etílicos na melhor condição encontrada neste estudo.



Condições de razão molar (AGVS: etanol) 1:6, vazão de alimentação de 2,5 mL/min, tempo de residência de 7 min, 65 °C, potência ultrassônica de 132 W.

Tendo como base estes resultados, os quais evidentemente a Novozym 435 apresentou maior afinidade pelo substrato e maior potencial de esterificação para a conversão do AGVS em ésteres etílicos em reator contínuo, foram definidas estas condições e esta lipase para utilizar na etapa subsequente deste trabalho, a integração dos processos de hidrólise e esterificação enzimática.

Kelkar et al. (2008) realizaram reação de esterificação com um catalisador ácido de (C8-C10), com metanol em condições de reação ótimas, e reportaram níveis de conversão de 98 % em 75 min. Com o acréscimo da proporção molar (álcool/óleo) de 5/1 a 10/1, o rendimento foi aumentado de cerca de 91 % em 3 horas para cerca de 98 % em 2 h.

Vários métodos diferentes de desenvolvimento de biodiesel, reduzindo os custos de produção, estão sendo atualmente investigados, tal como a otimização dos fatores de processo, utilizando métodos estatísticos, o desenvolvimento de modelos cinéticos de processos, o ultrassom aplicado à reação de transesterificação, a utilização do processo contínuo e a concepção de novos tipos de reatores ultrassônicos. Uma atenção especial deve ser dada para a utilização de novos tipos de reatores ultrassônicos com um melhor

desempenho do que os atualmente utilizados. Uma combinação entre o ultrassom e reatores de fluxo contínuo é um caminho promissor. Espera-se que o futuro dos reatores ultrassônicos encontre-se no desenho de reatores com múltiplas frequências e transdutores baseados em funcionamento de forma contínua. Por certo, mais estudos sobre a ligação do reator com as características dinâmicas de bolhas, a cavitação, a reologia da mistura de reação em diferentes aplicações de escala são necessários (VELJKOVIĆ et al., 2012).

5.3 INTEGRAÇÃO DAS DUAS ETAPAS: HIDROESTERIFICAÇÃO

Nesta seção, estão expostos os resultados da integração das duas etapas do trabalho. A primeira etapa, a hidrólise enzimática em modo batelada, para a produção dos hidrolisados, e a etapa de esterificação enzimática operado em sistema contínuo, para a esterificação dos ácidos graxos. As condições definidas anteriormente utilizadas nas duas etapas foram:

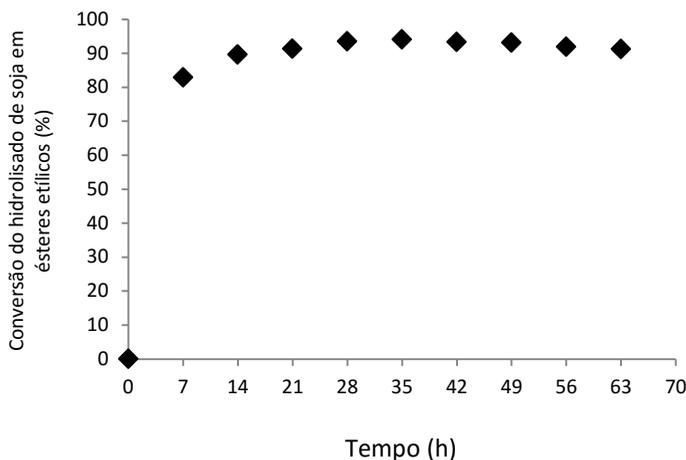
Hidrólise enzimática em modo batelada: 40 °C; razão molar (óleo soja ou fritura:água) 1:20, C_E de 10% Lipozyme TL IM (em relação à massa total de substratos); potência ultrassônica de 132 W, 2 h de reação e 300 rpm.

Esterificação enzimática em modo contínuo: 65 °C; razão molar (hidrolisado de soja ou fritura:etanol) 1:6; potência ultrassônica 132 W e vazão de alimentação de substrato de 2,5 mL/min e catalisador enzimático Novozym 435.

5.3.1 Hidroesterificação enzimática de óleo de soja e óleo de fritura

Primeiramente, realizou-se a hidroesterificação enzimática de óleo de soja, nas condições citadas acima, onde o hidrolisado de óleo de soja produzido apresentou um índice de acidez de 120 mg KOH/g. A quantificação dos produtos e subprodutos formados estão apresentados na Tabela 13. Hidrolisado foi utilizado como substrato para a esterificação, como mostra a Figura 29.

Figura 31 – Esterificação enzimática do hidrolisado de soja em reator contínuo utilizando o ultrassom.

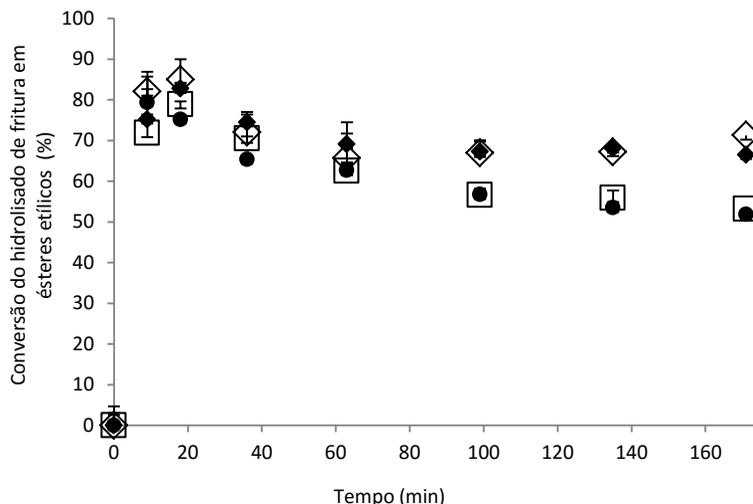


Condições de temperatura de 65 °C; razão molar (AGL de soja: etanol) 1:6; potência ultrassônica 132 W, tempo de residência de 7 min e vazão de alimentação de substrato de 2,5 mL/min. *Hidrólise enzimática em modo batelada para produção do hidrolisado de soja*: 40 °C; razão molar (óleo de soja:água) 1:20; C_E de 10 % (relação à massa total); potência ultrassônica 132 W e 300 rpm.

A partir da Figura 29 pode-se observar que a esterificação do hidrolisado de soja obtido na etapa de hidrólise apresentou conversões em ésteres etílicos em torno de 82,85 % em apenas 7 min de reação e em 28 min apresentou 93,46 %, se mantendo constante ao longo do tempo de reação (70 min). Este teste foi realizado para uma avaliação prévia do comportamento do sistema reacional.

Como o intuito principal era hidroesterificar o óleo de fritura, realizou-se a hidrólise do mesmo nas condições definidas para a etapa de hidrólise enzimática em batelada, obtendo o hidrolisado com um I.A de 122 mg KOH/g e dos resultados das análises de quantificação dos produtos e subprodutos formados estão apresentados na Tabela 14. Posteriormente, esterificou-se o hidrolisado com etanol para a obtenção dos ésteres etílicos. A Figura 30 mostra o efeito do ultrassom sobre a esterificação enzimática do hidrolisado de fritura em reator contínuo e a comparação dos dois métodos de análise de ésteres (CG e titulação).

Figura 32 – Efeito da potência do ultrassom sobre a conversão em ésteres etílicos comparando-se a quantificação por titulação a 0 W (◆) e 132 W (●) de potência ultrassônica e a técnica EN 14103 (CG) a 0 W (◇) e 132 W (□) de potência ultrassônica na esterificação enzimática do hidrolisado de fritura.



Condições de *Esterificação enzimática em modo contínuo*: 65 °C; razão molar (hidrolisado: etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato de 2,5 mL/min, tempo de residência de 9 min e catalisador enzimático Novozym 435 IM. *Hidrólise enzimática em modo batelada para obtenção do hidrolisado de fritura*: 40 °C; razão molar (óleo de fritura: água) 1:20; C_E de 10 % Lipozyme TL IM (relação à massa total); potência ultrassônica de 132 W e 300 rpm.

Pode-se observar na Figura 30 que a potência do ultrassom não exerceu nenhuma influência na obtenção dos ésteres etílicos. O fato observado neste trabalho onde o ultrassom não apresentou contribuições para conversão em ésteres também foi observado por Xiao et al. (2005), avaliando a produção de éster de açúcar através de reação catalisada por lipase em diferentes solventes, empregando energia ultrassônica e “shaker” e não observaram aumento na conversão em éster quando acetonitrila foi empregada como solvente. Rufino et al. (2010) avaliaram o efeito do ultrassom na produtividade de ésteres de xilitol via esterificação catalisada por diferentes lipases, e observaram que para alguns catalisadores o ultrassom não contribuiu para o aumento das conversões. Já o trabalho de Wang et al. (2015) o ultrassom

contribuiu para a redução do tempo reacional e aumento da velocidade da reação, mas não para aumento da conversão.

Lee et al. (2011) estudaram os efeitos das ondas ultrassônicas sobre o processo de produção de biodiesel a partir de óleo vegetal e verificaram que o ultrassom apresentou efeitos sobre o aquecimento e mistura dos reagentes. Os autores concluíram que o rendimento de biodiesel aumentou com o aumento da energia ultrassônica de 150-450 W.

Do mesmo modo, na Figura 30, são apresentados os resultados em conversão em ésteres etílicos, onde pode-se notar que quando a reação exposta a uma potência de 132 W em 9 min tem-se uma conversão de 79,33 % e durante o curso da reação, a conversão em ésteres etílicos diminuiu ficando em torno de 51,87 % em 171 min de reação. Para cinética sem potência ultrassônica notou-se que em 9 min de reação obteve-se em torno de 75,19 % de ésteres etílicos, diminuindo para 66,44 % em 171 min.

Em relação à comparação dos métodos analíticos, as análises de conversão foram realizadas através do método de titulação, mas, para comprovar a eficiência do método adotado realizou-se a análise comparativa em cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010). Conforme mostra a Figura 30, pode-se observar que os dois métodos tiveram uma boa reprodutibilidade, confirmando que o método de titulação pode ser utilizado para a análise de ésteres etílicos. Estes resultados foram semelhantes ao obtido por Santin (2013).

São poucos os trabalhos encontrados na literatura que utilizam o processo de hidroesterificação de óleos. O trabalho de Aguiéiras et al. (2014) foi o único encontrado até o momento relatando a hidroesterificação (enzima/enzima) de óleo ácido de macaúba para produção de biodiesel. Os ésteres etílicos foram produzidos pela hidrólise de óleo vegetal utilizando enzima *Ricena nos communs L.* obtido a partir de sementes de rícino dormentes nas condições de hidrólise de 30 °C, 1 atm, 50 % (v/v) óleo e tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4 , seguidos por esterificação dos ácidos graxos livres libertados (AGL) com etanol catalisadas por fermentado seco da lipase de *Rhizomucor miehei*. A hidrólise catalisada por enzima vegetal produziu 99,6 % de AGL após 6 h sem solvente orgânico e emulsificante. Para a reação de esterificação, o melhor resultado foi obtido com uma mistura de etanol:AGL na razão molar de 2: 1 e 15,1 L de sólido seco por g de AGL a 40 °C, o que proporcionou 91 % de conversão após 8 h em um sistema livre de solvente.

Soares et al. (2013) produziram biodiesel a partir de óleo ácido de borra de soja por hidrólise em água supercrítica sem utilização de catalisador nas

condições de hidrólise de 250 °C, 60 atm, óleo ácido (1:1v/v) e esterificação através do sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na temperatura de 50 °C, 1 atm, AGL e etanol (1:3) em reator leito empacotado. Para a reação de hidrólise, o melhor resultado foi 95 % de AGL em 1 h de reação, já a esterificação apresentou conversão em ésteres de 93 %.

Trabalhos de Cavalcanti et al. (2011) mostraram o processo de produção de biodiesel por hidroesterificação (enzima/química), onde o primeiro passo consistiu na hidrólise do triacilgliceróis catalisada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TL 100L) para gerar os ácidos graxos livres (AGL). Este passo foi seguido por esterificação dos AGL com álcool, catalisada por ácido nióbio em pelets e também na ausência de catalisador. O melhor resultado para a hidrólise catalisada por enzima foi obtida sob condições de reação de 50 % (v/v) de óleo de soja e 2,3 % (v/v) de lipase (25 U/mL de meio de reação) em água destilada e de 60 °C. Uma conversão de 89 % de AGL foi obtida após 48 horas de reação. Para a reação de esterificação, o melhor resultado de AGL:metanol nas condições de razão molar 1:3, catalisado por ácido nióbio a uma concentração de 20 % (m/m AGL), e 200 °C, o que proporcionou 92 % de conversão para os ésteres metílicos de soja após 1 hora de reação. De Souza et al. (2010) também estudaram a hidroesterificação (enzima/química), empregando como catalisadores a lipase de sementes germinadas de *Jatropha curcas* e ácido nióbio em pelets, e também obtiveram altas conversões.

Talukder et al. (2010) estudaram o processo de hidroesterificação (enzima/química) utilizando lipase de *Candida rugosa* como catalisador no reação de hidrólise e o catalisador químico Amberlyst 15 (resina de troca iônica ácida sulfonados de estireno-divinilbenzeno) para reação de esterificação, e obtiveram conversões completas na hidrólise enzimática e esterificação química.

Gomes (2009) realizou hidroesterificação de óleo residual da indústria pesqueira. Na etapa de hidrólise, ácidos graxos livres foram obtidos por duas vias: hidrólise química e hidrólise enzimática. Na hidrólise química, o óleo residual de indústria pesqueira (contendo 25 % de água em sua composição) foi adicionado ao reator a 300 °C e 500 rpm, por 1 hora. A hidrólise enzimática foi realizada pela enzima de *Penicillium simplicissimum* (produzida pelo autor por fermentação estado sólido), durante 48 horas, a 45 °C. Após 1 hora a 300 °C, a hidrólise química resultou em 93 % de conversão em ácidos graxos e após 48 horas a 45 °C, a hidrólise enzimática resultou em 81 % de conversão. A esterificação do ácido graxo obtido por via enzimática foi realizada sob a condição de 200 °C, em 15 % de concentração de catalisador (ácido nióbio) e

razão molar de metanol/ácido graxo de 3,0, atingindo uma conversão máxima de 56,57 %. Nesta reação de esterificação, os efeitos da razão molar metanol/ácido graxo (1,2; 2,1; e 3), da temperatura (150, 175 e 200 °C) e da concentração de catalisador (5, 10 e 15 %) sobre a conversão e a taxa inicial da reação, foram avaliados, atingindo, em condições maximizadas, uma conversão máximo de 92 %.

Minami e Saka (2006) estudaram um catalisador por hidroesterificação para processo de obtenção de biodiesel, envolvendo uma hidrólise subcrítica e uma esterificação supercrítico com metanol, e obtiveram taxas de conversão superior a 90 % nas duas etapas (ambos conduzidos a uma temperatura de 270 °C e uma pressão de 20 MPa).

Acredita-se que o motivo do óleo de fritura não ter o mesmo comportamento linear da hidroesterificação do óleo de soja, seja devido a alguns resíduos, impurezas e até mesmo o óleo de fritura ser exposto a altas temperaturas degradando-o e formando compostos indesejados, prejudicando o contato com a enzima.

A qualidade da matéria-prima a ser utilizada pode interferir na qualidade do produto. Óleos residuais (óleo de fritura) normalmente apresentam elevados teores de ácidos graxos livres, logo, isto irá requerer inicialmente uma reação de esterificação e em seguida a reação de transesterificação (RABU, JANAJREH, HONNERY, 2013), mas quando se utiliza a técnica de hidroesterificação não existe esta necessidade, favorecendo a utilização de óleos residuais. Porém, além dos ácidos graxos livres, outros componentes ou possíveis impurezas devem ser considerados, até mesmo um componente comum em diversos óleos vegetais como os fosfolipídios, que têm sido reportados como inibidores da atividade de lipases. Isto foi reportado em experimentos de Watanabe et al.(2002) utilizando 3 amostras de óleos de soja (cru, degomado e refinado).

Através da obtenção das condições maximizadas definidas neste trabalho, as quais conduziram à produção de 60,01 % de AGL (m/m) para óleo de soja e 60,93 % de AGL para o óleo de fritura. Além dos AGL, neste meio (hidrolisado) tem-se monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis não reagidos, podendo ter também alguns traços de água e glicerol que não foram separados totalmente. Desta forma, resolveu-se realizar a quantificação da fase lipídica dos hidrolisados gerados (óleo de soja e de fritura) na etapa de hidrólise e utilizada como substrato na esterificação enzimática no reator em modo contínuo e da amostra final depois de passado pelo reator (hidroesterificação do óleo de fritura) em relação ao teor de monoacilgliceróis,

diacilgliceróis, triacilgliceróis, glicerol, água, ésteres e teor de AGL (soja/fritura) para se obter uma resposta mais precisa do real comportamento do sistema reacional. Estes resultados estão apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13- Composição da fase lipídica do produto da hidrólise enzimática do óleo de soja em modo batelada.

<i>Amostra</i>	C_{MAG} (%, m/m)	C_{DAG} (%, m/m)	C_{TAG} (%, m/m)	C_{AGL} (%, m/m)
Hidrolisado de óleo de soja	2,45	15,99	17,80	60,01

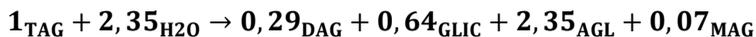
Condições de 40 °C; razão molar (óleo de soja: água) 1:20; 2 h de reação, C_E de 10 % Lipozyme TL IM (relação a massa total); potência ultrassônica de 132 W e 300 rpm.

A Tabela 13 apresenta a composição do hidrolisado do óleo de soja obtido na reação de hidrólise enzimática, sendo que nesta amostra realizou a separação do glicerol e da água. No hidrolisado do óleo de soja, obteve-se um teor de AGL de 60,01 %, teor de TAG de 17,80 % (TAG que não reagiu), teor de DAG de 15,99 % e teor de MAG de 2,449 %, não apresentado água residual da reação. A ausência da água no hidrolisado é um fator muito importante para realizar a esterificação com sucesso. Nesta amostra de hidrolisado analisou-se a glicerina o qual se constatou um teor de 4,78 % (m/m), a quantidade de glicerina presente na amostra é um valor razoavelmente alto, sinal que não foi conseguido retirar/separar totalmente a glicerina da amostra durante o processo de separação. A presença de glicerol no hidrolisado pode em alguns casos prejudicar a reação de esterificação podendo ocorrer reações paralelas.

O glicerol dificulta a difusão do substrato na molécula da lipase reduzindo a eficiência reacional (SHIMADA et al., 2002). Isto ocorre porque o glicerol é um líquido viscoso de caráter hidrofílico, que absorve na superfície da enzima imobilizada, formando uma camada hidrofílica, limitando a atuação da enzima em substratos hidrofóbicos, por consequência prejudicando o rendimento da reação (HAMA et al., 2011B; XU et al., 2011).

Conhecendo a estequiometria de hidrólise de óleos onde, para cada 1 mol de TAG, precisa-se de 3 moles de H_2O para se obter 3 moles de AGL e 1 mol de glicerol (conversão total do substrato em produto). No caso da hidrólise de triacilgliceróis nem todo o triacilgliceróis pode ser hidrolisado totalmente, podendo ocorrer à hidrólise parcial obtendo-se intermediários como MAG e DAG.

A partir da determinação da composição do hidrolisado de soja, verificou-se a estequiometria (mol).



A partir da estequiometria, verificou-se que 78 % do TAG consumido foi convertido a AGL, 19,33 % a DAG e 2,33 % a MAG. Calculou-se a massa de TAG convertida a produto e a massa de TAG não reagido em relação á massa de TAG inicial na reação (21,8 g), sendo que cerca de 17,07 g do TAG inicial foram convertidos em produto e 4,72 g de TAG não reagiram. A eficiência da conversão a AGL foi em torno de 61 % (calculado), sendo que, através da análise por titulação (experimental) obteve-se um teor de AGL em torno de 60 % (m/m).

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados da composição do produto da esterificação enzimática do óleo de fritura, sendo que o hidrolisado do óleo de fritura foi produzido pela etapa de hidrólise enzimática em modo batelada, resultando um Índice de Acidez de 121,86 mgKOH/g, o qual foi utilizado para ser esterificado com etanol em reator contínuo. Também está apresentada a quantificação da amostra final em intervalos de tempos (tempo de residência) em que as amostras foram coletadas com e sem a presença do ultrassom.

Tabela 14- Composição do substrato e do produto da esterificação do óleo de fritura, e conversão de hidrolisado de fritura a ésteres efílicos.

REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO HIDROLISADO DE FRITURA (referente á cinética apresentada na figura 30)									
	<i>Tempo (min)</i>	<i>C_{MAG} (%, m/m)</i>	<i>C_{DAG} (%, m/m)</i>	<i>C_{TAG} (%, m/m)</i>	<i>C_{Glicerol} (%, m/m)</i>	<i>C_{Água} (%, m/m)</i>	<i>C_{AGL} (%, m/m)</i>	<i>X_{Ésteres} (%)</i>	
Entrada do reator		9,97	9,05	1,38	1,76	0,06	60,93	-	
Saída do reator	9	4,44	3,68	1,30	1,80	0,31	10,46	82,83	
	36	6,17	4,36	1,108	2,32	0,25	10,63	82,56	
	99	0,75	1,67	2,22	0,66	0,28	13,8	77,35	
	171	1,08	1,74	2,47	0,78	0,25	14,47	76,24	
Saída do reator	9	5,57	4,23	1,35	2,17	0,2	7,16	88,25	
	36	5,17	3,81	1,98	1,98	0,35	12,47	79,53	
	99	0,78	1,81	0,70	0,70	0,29	7,13	71,88	
	171	7,49	4,76	2,73	2,73	0,29	9,72	67,63	

Condições de *Hidrólise enzimática em modo batelada*: 40 °C; razão molar (óleo:água) 1:20; C_E de 10 % Lipozyme TL IM (relação a massa total); potência ultrassônica de 132 W e 300 rpm e *Esterificação enzimática em modo contínuo*: 65 °C; razão molar (hidrolisado: etanol) 1:6; potência ultrassônica (0 e 132 W) e vazão de alimentação de substrato de 2,5 mL/min e enzima Novozym 435 IM.

A Tabela 14 apresenta a composição do hidrolisado do óleo de fritura gerado pela reação de hidrólise enzimática (substrato inicial). Após esterificou-se este hidrolisado com etanol com e sem a presença do ultrassom para a obtenção dos ésteres etílicos em reator contínuo. Foram coletadas as amostras após passar pelo reator em tempos de residência (9, 36, 99 e 171 min de reação).

A análise do hidrolisado (substrato inicial a ser esterificado) obtido na hidrólise enzimática de óleo de fritura apresentou um teor de AGL de 60,93 %, 9,93 % de MAG, 9,05 % de DAG e 1,38 % de TAG. Antes da esterificação realizou-se o procedimento de separação do glicerol e de água. Constatou-se a presença de 1,76 % de glicerol e teores baixos de água, cerca de 0,065 %, o que indica que não foi possível retirar totalmente o glicerol e a água. Acredita-se que este teor de água não prejudique a reação de esterificação.

A água desempenha várias funções na catálise enzimática, apresentando forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da enzima (GOG et al., 2012; Lu et al., 2009). Diversos estudos revelam que a adição de uma pequena quantidade de água no meio reacional favorece as reações de síntese de ésteres de ácidos graxos (HSU et al., 2004; NIE et al., 2006; LU et al., 2008; SHAH; GUPTA, 2007). Entretanto, as lipases são hidrolases, se ocorrer o excesso de água irá favorecer a reação de hidrólise, causando redução das conversões (GOG et al., 2012).

A quantificação dos compostos presentes no hidrolisado do óleo de fritura, pelas análises realizadas, permitiu-nos verificar que o balanço da quantificação dos compostos não correspondeu a 100 %. Acredita-se que devido, ao fato do óleo de fritura ser usado e exposto a altas temperaturas, o mesmo pode sofrer degradação, formando outros compostos, não quantificados neste trabalho. Este fato foi também mencionado e observado nos trabalhos de Marquez et al. (1995) e Velasco et al. (2004), considerando que os óleos usados para processos de fritura podem conter vários compostos não conversíveis em ésteres de alquila, tais como monômeros, dímeros oxidados, polímeros, monômeros cíclicos, etc.. Desta forma, a conversão máxima atingível a partir destes óleos pode não corresponder a 100%.

Os óleos e gorduras usados em frituras são submetidos a altas temperaturas em presença de ar e água. Esta condição propicia a formação de um número considerável de substâncias oriundas de reações térmicas, oxidativas e hidrolíticas (DOBARGANES; PÉREZ-CAMINO, MÁRQUEZ-RUÍZ, 1995; FRITSCH, 1981; GASPAROLI, 1998; JORGE et al., 1996; MÁRQUEZ-RUÍZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995;

NAWAR, 1998; SCHWARTZ; RADY; CASTAÑEDA, 1994; VELASCO et al., 2004).

Como já mencionado anteriormente, conhecendo a estequiometria de hidrólise de óleos e gorduras onde, para cada 1 mol de TAG, necessita-se de 3 moles de água para se obter 3 moles AGL mais 1 mol de glicerol (conversão total do substrato em produto).

A partir da quantificação do hidrolisado de fritura, realizou-se a análise para obtenção da estequiometria a partir dos resultados experimentais em relação aos teores de MAG, DAG e AGL (% , m/m) na fase lipídica, apresentada abaixo.

Estequiometria (mol) para hidrolisado de fritura:



A partir da estequiometria, verificou-se que em torno de 82 % do TAG consumido foi convertido a AGL, 9 % a DAG e 8 % a MAG. Calculou-se a massa de TAG convertida a produto e massa de TAG não reagido em relação à massa de TAG inicial na reação (21,8 g), sendo que cerca de 17,87 g do TAG inicial foram convertidos em produto e 3,92 g de TAG não reagiram. A eficiência da conversão em AGL foi em torno de 67 % (calculado) sendo que, através da análise por titulação (experimental) obteve-se um teor de AGL em torno de 61 % (m/m).

Quando se esterificou o hidrolisado do óleo de fritura em reator contínuo observou-se um comportamento na cinética (Figura 30) no qual as conversões são significativas, mas, em poucos minutos de reação começa a diminuir com o tempo tanto com e sem a presença do ultrassom. Acredita-se que alguns fatores possam estar interferindo na formação dos ésteres etílicos e o declínio da cinética em poucos minutos. Uma hipótese é a água formada na reação de esterificação que pode estar sendo consumida. Outra é que como o hidrolisado utilizado tem além dos ácidos graxos, uma certa quantidade de MAG, DAG e TAG, acredita-se que além da reação de esterificação pode estar ocorrendo transesterificação, pois a lipase utilizada tem poder de catalisar este tipo de reação.

Por este motivo, para tentar compreender um pouco mais o que poderia estar ocorrendo no meio reacional realizou-se análises de quantificação da amostra final (Tabela 14) em diferentes intervalos de tempos (tempo de residência). Com estes testes, pôde-se observar que os resultados não seguiram uma tendência clara, de um modo geral observou-se que diminuiu a quantidade

inicial tanto de mono, di e triacilgliceróis, a quantificação de glicerol em alguns casos aumentou em outros diminuiu não podendo se ter conclusão precisa. Na análise do teor de água notou-se que ocorre formação de água, mas ela também pode estar sendo consumida para hidrolisar os triacilgliceróis disponíveis no meio.

Com o embasamento de todos os componentes no meio reacional produzidos através da esterificação do hidrolisado do óleo de fritura, com o intuito de verificar se além da esterificação poderiam estar ocorrendo a transesterificação, pode-se concluir que ocorre a formação de água e ésteres produtos provindos da esterificação. Para a hipótese de ocorrer juntamente com a esterificação a transesterificação não se pode ter uma conclusão precisa, para isso deve-se realizar outras análises, aprofundando mais este estudo.

6 CONCLUSÕES

Como parte do que se propôs, investigou-se como primeira etapa do trabalho a hidrólise enzimática em modo batelada do óleo de soja em sistema de ultrassom estudando as variáveis que podem influenciar na obtenção dos AGL. Na melhor condição experimental definida para o óleo de soja, utilizou-se o óleo de fritura, realizando o reuso da lipase e do solvente utilizado na lavagem da enzima. Como segunda etapa investigou-se a esterificação enzimática em sistema de ultrassom em modo contínuo, utilizando AGVS para o estudo das variáveis do processo. Após o estabelecimento das melhores condições operacionais, realizou-se a integração do processo. A hidroesterificação foi realizada a partir do hidrolisado (soja e fritura) formado e posterior esterificação do mesmo em reator contínuo para obtenção de ésteres etílicos. Foram realizadas análises de quantificação de componentes nos hidrolisados e após ser esterificados (amostra final).

De um modo geral, este trabalho atendeu o objetivo geral proposto sendo a hidroesterificação enzimática de óleos de soja e fritura utilizando, a tecnologia do ultrassom, em duas etapas, a hidrólise em modo batelada seguida pela esterificação do hidrolisado proveniente da hidrólise em reator operado em modo contínuo.

Como parte do que se propôs nos objetivos específicos, a partir dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

Hidrólise enzimática em modo batelada utilizando ultrassom

- Dentre as lipases comerciais e não comerciais testadas neste trabalho, a lipase de pâncreas suíno, na sua forma livre, apresentou a melhor atividade hidrolítica (1326,59 U/g), seguida pela lipase Lipozyme TL IM (761,38 U/g), ambas na temperatura 40 °C.
- Nos estudos de determinação das condições de dispersão do óleo e água, como razão molar (óleo de soja: água), agitação mecânica e estabilidade observou-se que não houve a necessidade de emulsão prévia para obter maiores teor de AGL. A lipase Lipozyme TL IM apresentou melhor potencial para hidrólise.
- Quando se testou a influência das variáveis, razão molar (óleo de soja: água), temperatura, concentração de enzima e solvente para recuperação da lipase, realizou-se o estudo de recuperação da lipase utilizada na hidrólise e o solvente (álcool isopropílico) usado na separação e recuperação da lipase. A

lipase quando recuperada apresentou 50 % da sua atividade relativa residual podendo ser reutilizada, e o ultrassom não interferiu na atividade relativa residual da lipase. No teste do solvente, quanto à recuperação e reutilização do mesmo, observou-se que este pode ser reutilizado, não interferindo na produção dos AGL e nem na atividade da lipase.

- De um modo geral, o ultrassom apresentou comportamento positivo na reação de hidrólise em modo batelada aumentando a velocidade inicial da reação e em alguns casos conduzindo a um maior teor de AGL em menor tempo de reação.
- A melhor condição para a hidrólise do óleo de soja (óleo modelo) foi razão molar (óleo: água) 1:20, 40 °C, potência ultrassônica de 132 W, C_E de 10 % Lipozyme TL IM, 300 rpm, utilizando álcool isopropílico para lavagem e separação da lipase. Quando hidrolisado o óleo de soja nestas condições obteve-se teor de AGL de aproximadamente 60 % (m/m) e para o óleo de fritura em torno de 60,93 % (m/m).

Esterificação enzimática em modo contínuo utilizando ultrassom

- Dentre os catalisadores enzimáticos comerciais testados neste trabalho, a lipase Novozym 435 apresentou atividade de esterificação de 47,71U/g, e Lipozyme TL IM uma atividade hidrolítica de 50,69U/g na temperatura de 60 °C. Ambas as lipases apresentaram atividades semelhantes e foram utilizadas nos testes subsequentes.
- Através dos estudos dos efeitos das variáveis como razão molar (AGVS:etanol), vazão de alimentação, catalisador ideal e uso do ultrassom para a produção de ésteres etílicos em reator contínuo, chegou-se à condição maximizada de razão molar 1:6 (AGVS:etanol), vazão de alimentação 2,5 mL/min, lipase Novozym 435 e 65 °C, apresentando conversões em ésteres etílicos de 95 %.
- Para as reações de esterificação enzimática do AGVS em modo contínuo, o ultrassom não apresentou benefícios.

Integração dos processos (hidroesterificação)

- Na hidroesterificação produziu-se o hidrolisado do óleo de soja e posteriormente esterificou-se este substrato em reator contínuo utilizando ultrassom. Obteve-se conversão em ésteres etílicos em torno de 82,85 % em 7

min e 93,46 % em 28 min, mantendo-se este valor constante ao longo do tempo avaliado.

- Para a esterificação do hidrolisado do óleo de fritura em reator contínuo com ultrassom obteve-se conversões em torno de 79,33 % em 9 min, com o passar do tempo reacional a conversão diminuiu para 51,87 % em 171 min, utilizando ultrassom; para a reação sem o uso do ultrassom conversões em torno de 75,19 % em 9 min de reação foram obtidas, diminuindo com o passar do tempo reacional até 66,44 % em 171 min.

- Quando se comparou o método de titulação com o método de CG observou-se que os dois métodos tiveram uma boa reprodutibilidade, confirmando que o método de titulação pode ser utilizado para a análise de ésteres etílicos.

- Na quantificação do hidrolisado provindo do óleo soja conseguiu-se quantificar os teores de AGL, MAG, DAG, TAG, água e glicerol. Através dos dados experimentais chegou-se a estequiometria da reação.

- Para a hidroesterificação de óleo de fritura quantificou-se os teores de AGL, MAG, DAG, TAG, água e glicerol tanto do hidrolisado como das amostras após serem esterificadas com o intuito de verificar se além da esterificação poderiam estar ocorrendo a transesterificação, pode se concluir que ocorre a formação de água e ésteres produtos provindos da esterificação. Para a hipótese de ocorrer juntamente com a esterificação a transesterificação não se pode ter uma conclusão precisa, para isso deve-se realizar outras análises, aprofundando mais este estudo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Hidrólise enzimática em modo batelada:

- Testar outras enzimas que apresentem potencial para a hidrólise;
- Realizar teste de aumento de escala para a reação de hidrólise em modo batelada;
- Testar alternativas para remoção do glicerol formado e a água não reagida na hidrólise enzimática;

Esterificação enzimática em modo contínuo:

- Testar outras enzimas de menor custo;
- Realizar recuperação da lipase e reuso do catalisador;
- Testar outras condições de vazão de alimentação do substrato;

Hidroesterificação enzimática:

- Realizar um estudo detalhado para o melhoramento dos resultados para o óleo de fritura;
- Testar outros resíduos e óleos ácidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABISMAIL, B.; CANSELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: Drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 6, p. 75-83, 1999.

AGUIEIRAS, E. C.G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M. M.; A.P. LANGONE, FREIRE, D.M.G. 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. 135, p. 315–321, 2014.

AL-ZUHAIR, S; ALMENHLI, A; HAMAD, I; ALSHEHHI, M; ALSUWAIDI, N; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of pilot plant. *Renewable Energy*, v. 36, p. 2605-2614, 2011.

ALVES, R.F.; GUIMARÃES, S.M.; ABREU T. C.; SILVA, R. D. Índices de Acidez Livre e de Peróxido. Relatório para a Disciplina de Bioquímica, Curso Técnico de Química Industrial, Centro de Educação Profissional Hélio Augusto de Sousa, São José dos Campos, SP, 2009.

ARANDA, D. A. G.; GONÇALVES, J. A.; PERES J. S.; RAMOS A. L. D.; MELO - JUNIOR C. A. R. ; ANTUNES, O. A. C.; FURTADO, N. C.; TAFT C. A, The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 22, p. 709-716, 2009.

ARANDA, D. A. G.; BRITTO, P. P.; CARVALHO, L. G.; CAMACHO, L. Estudo de catalisadores homogêneos na produção de biodiesel a partir da esterificação de ácidos graxos. 13º Congresso Brasileiro de Catálise – CBCat, Foz do Iguaçu, 2005.

ASHOKKUMAR, M.; MASON, T. "Sonochemistry", *Kirk-Othmer Encyclopedia de Tecnologia Química*, John Wiley & Sons, 2007, doi:10.1002/0471238961.1915141519211912, 2007.

ASHOKKUMAR, M.; SUNARTIO, D.; KENTISH, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; VILKHU, K.; VERSTEEG, C. Modificação de ingredientes alimentares por ultra-som para melhorar a funcionalidade: um estudo preliminar sobre um modelo de sistema Inovadora Food Science tecnologia emergente, v.9, p 155-160, 2008.

AWADALLAK, J. A. Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: síntese de diacilglicerol. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo, 2012.

AWADALLAK, J. A.; VOLL, F.; RIBAS, M. C.; SILVA, C.; FILHO, L. C.; SILVA, E. A. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. *Ultrason Sonochem.*, v. 20, p. 1002-1007, 2013.

AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; CASTRO H. F.; MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds; *Ind. Crops Prod.*, v. 44, p. 452, 2013.

BABICZ, I. Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de Química - EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O.A.C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, v.17, p.4-6, 2010.

BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJPNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.20, p.531-535, 1997.

BAI, Y. X.; LI, Y. F.; YANG, Y.; YI, L. X. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports. *Process Biochem.* v.41, p.770-777, 2006.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical engineering fundamental. New York: McGraw-Hill, 1986, 2a Ed.

BALTARU, R; GALACTION, A. I; CASCAVAL, D. Bioreactors of “Basket” type with immobilized biocatalysts. in: wseas international conference on biomedical electronicz and biomedical informatics, 2., 2009. P. 238-243-ISBN: 978-960-474-110-6, ISSN: 1790-5125.

BARBOSA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultrassom: Influência do ultrassom na química. Química Nova, v.15, p.302-316,1992.

BATISTELLA, L.; LERIN, L. A.; BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, A. J.; TRENTIN, C. M.; POPIOLSKI, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system, Ultrasonics Sonochemistry, v.19, p.452-458, 2012.

BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Estudos sobre a cinética e a estabilidade térmica de um invertase de novo a partir de ácido *Fusarium solani*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, p.4617-4623, 2006.

BEUVE, R. S.; MORISON, K.R. Enzymatic hydrolysis of canola oil with hydrodynamic cavitation. Chemical Engineering and Processing, v.49, p.1101–1106, 2010.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectivas. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Soja: Tecnologia de produção II. Piracicaba: FEALQ, p.1-17, 2000.

BORTHWICK, K. A. J.; COAKLEY, W. T.; MCDONNELL, M. B.; NOWOTNY, H. BENES, E.; GROSCHL, M. Development of a novel compact sonicator for cell disruption J. Microbiol. Meth., v. 60, p. 207–221, 2005.

BOLDYREV, V. V. Mechanochemistry and sonochemistry. Ultrasonics Sonochemistry, v. 2, p. 143- 145, 1995.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Informe Técnico nº 11, de 5 de outubro de 2004.

BURKERT J. F. DE M. Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Campinas RJ, 2002. Tese de Doutorado, (Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.

BURKERT J. F. M., MAUGERI F., RODRIGUES M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v.91, p.77-84, 2004.

CAVALCANTI E.A.C., GUTARRA M.L.E., FREIRE D.M.G., CASTILHO L.R., SANT'ANNA G.L.; Lipase production by solid-state fermentation in Fixed-Bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p.79-84, 2005.

CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO₂ as co-solvent. *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 3148-3156, 2005.

CARDOSO, A. L. Estudo cinético das reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Lewis e de Bronsted para produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa . Viçosa, MG, 2008.

CARREA, G; RIVA, S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents, *Chem. Int. Ed.* v. 39, p. 2226-2254, 2000.

CARVALHO, P. O.; PASTORE, G. M. Enrichment of γ -linolenic acid from fungal oil by lipases. *Food Biotechnol.*, v.12, p. 57- 71, 1998.

CASEY, J.; MACRAE, A. R. Biotechnology and the oleochemical industry. *Information*, v. 2, p. 203- 207, 1992.

DE CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17 (3), p. 237-241, 1997.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. *Química Nova*, v. 18, p. 544–554, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

CASTELLANELLI, C. A. Estudo da viabilidade de produção do biodiesel, obtido através do óleo de fritura usado, na cidade de Santa Maria – RS. 111 pp. (Mestrado). Centro de Tecnologia, UFSM, Santa Maria – RS. 2008.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'A.; SILVA, P. R. DA; 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 Article ID 618692, 8 doi:10.4061/2011/618692. Volume 2011.

CAVALIERI, F.; ASHOKKUMAR, M.; GRIESER, F.; CARUSO, F. Síntese de ultrassom de microbolhas estáveis, lisozima funcionais *Langmuir*, v.24, p 10.078-10.083, 2008.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing, *Ultrasonics Sonochemistry*, v.19, p.975–983, 2012.

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B:Enzim*. V. 11, p.11, 949, 2001.

CHAND, P.; CHINTAREDDY, V.R.; VERKADE, J.G.; GREWELL, D. Enhancing biodiesel production from soybean oil using ultrasonics. *Energy Fuels*, v. 24, p. 2010–2015, 2010.

CHANG, C; CHEN, C. J; WU, T; SHIEH, C. Otimização of lipase-catalyzed biodiesel by isopropamolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. *New Biotechnology*, v. 26, N. 3-4, P. 187-192, 2009.

CHEN, H.C.; CHEN, J.; CHANG, C.; SHIEH, C. Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.18, p.455-459, 2011a.

CHEN, H. C.; KUO, C. H.; TWU, Y. K.; CHEN, J. H.; CHANG, C. J.; LIU, Y. C.; SHIEH, C. J. A continuous ultrasound-assisted packed-bed bioreactor for the lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 86, p. 1289-1294, 2011b.

CHEN, Z.F.; ZONG, M.H.; WU, H. Improving enzymatic transformation of waste edible oil to biodiesel by adding organic base. *Div. Fuel Chem.* v.50, 2, 2005.

CHEN, J. P.; LIN, G. H. Optimization of biodiesel production catalyzed by fungus cells immobilized in fibrous supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 181-194, 2010.

Chen, T. C.; Ju, Y.H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000, 77, 425.

CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity *Trends Biotechnol.*, v. 21, p. 89–93, 2003.

Chu, B. S., Quek, S. Y., Baharin, B. S. Optimization of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate. *Food Chemistry*, v. 80 p. 295-302, 2003.

CLAUSS, J. Interesterificação de óleo de palma. *Óleos Grãos*, v.5, n.28, p.31-37, 1996.

CUI, Y. M.; WEI, D. Z.; YU, J. T. Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen. *Biotechnology Letters*, v. 19, p. 865-868, 1997.

DALLA ROSA, C. Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, 2009.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

DARIO, M., Recuperação de glicerina oriunda no processo de produção de biodiesel- Um processo químúrgico, Monografia de graduação em química bacharelado. Universidade Federal do Mato Grosso- Brasil. 2006.

DE CARO, J.; BOUDOUARD, M.; BONICEL, J.; GUIDONI, A; DESNUELLE, P.; ROVERY, M. *Biochim. Biophys. Acta* v.671, p.129-138, 1981.

J. S. DE SOUSA, E. D. CAVALCANTI-OLIVEIRA, D. A.G. ARANDA, AND D. M.G. FREIRE, "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*, vol. 65, no. 1-4, pp. 133–137, 2010.

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.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. *Grasas y Aceites*, v. 46, n. 2, p. 115-120, 1995.

H.P. Dong, Y.J. Wang, Y.G. Zheng, Enantioselective hydrolysis of diethyl 3- hydroxyglutarate to ethyl (S)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010) 90–94.

EMBRAPA. Soja: Dados econômicos. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17. Acesso: Junho de 2013.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. Geração de biodiesel pelos processos de Transesterificação e hidroesterificação, Uma avaliação econômica. Rio de

Janeiro, 2008, Tese de Mestrado. Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry. 3ed. Berlin: Springer Produktion-Gesellschaft,. p.234, 1997.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui. Quím. Nova, v. 21, n. 1, p.16-19, 1998.

FEITEN, M. C. Hidrólise enzimática de óleo de soja em banho de ultrassom Dissertação de Mestrado. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2013.

FEITEN, M. C.; DALLA ROSA, C.; TREICHEL, H.; FURIGO JR. A.; ZENEVICZ, M. C OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Short Communication 2013

FIAMETTI, K. G., USTRA, M. K., OLIVEIRA, D., CORAZZA, M. L., FURIGO JR., A., OLIVEIRA, J. V. Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system. Ultrason. Sonochem. v. 19, p. 440–451, 2012.

FOGLIA, T. A.; SONNET, P. E. Fatty acid selectivity of lipase: Erucic acid from rape seed oil. J. Am. Oil Chem. Soc. v.72, p. 417, 1993.

FREIRE D. M. G.; Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.

FROST, G. M.; MOSS D. A. Production of enzymes by fermentation. J. F. Kennedy (ed), Biotechnology Enzyme Technology, v.7, VCH Publishers, 1987.

FRITSCH, C. W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 58, n. 3, p. 272-274, 1981.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Monoglicerídios: produção por via enzimática e algumas aplicações. Química Nova, v.31, p.1514-1521, 2008.

FU, X.; ZHU, X.; GAO, K.; DUANT, J.- Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp.- J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, v. 72, p. 527-530, 1995.

GAIKWAD, S.G. e PANDIT, A.B. Ultrasound emulsification: Effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size. Ultrasonics Sonochemistry, v. 15, p. 544-563, 2008.

GANDHI, N. N. Applications of lipases. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 74, p. 621-634, 1997.

GAO, C.; WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, E. N. Enzymatic synthesis of dimeric and trimeric sugar fatty acid esters. Enzyme Microb Technol, v. 25, p. 264-270, 1999.

GASPAROLI, A. The formation of new compounds. Grasas y Aceites, v. 49, n. 3-4, p. 303-309, 1998.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p.788-794, 2006

GARCIA, T.; COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst - The role of enzyme localization in relation to its selectivity. Chem. Eng. Sci., v. 55, P., 55, 1411, 2000.

GATFIELD, I. L. Food Science and Tecnology Today, v.9, p. 237, 1005.

GERIS R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja: reação de

transesterificação para aulas práticas de química orgânica. Quím. Nova, São Paulo, v. 30, p. 1369-1373, 2007.

GHORI, M. I.; IQBAL, M. J.; HAMEED, A. Caracterização de uma nova lipase de *Bacillus* sp. isolado a partir de resíduos de curtume. Brazilian Journal of Microbiology, 42, p. 22-29, 2011.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D. K. - Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology- J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, v. 72, p. 1541-1544, 1995.

GIOIELLI, L. A.; PITOMBO, R. N. M.; VITOLO, M.; BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N.; MORENO, P. C. - Enzymatic hydrolysis of oil and fats- Riv. Ital. Sostanze Grasse, Milano, v. 72, p. 115-117, 1995.

GOMES, M.M.R. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo residual de peixe. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de Química - EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

GONÇALVES, L.R.B. Estudo do processo de obtenção do etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

GONG, Y. S.; ZHAO, B. L.; WANG, Z. W.; JIN, Z. Q.; SUN, H. The genetic diversity of cultivated soybean grow in China. Theoretical Applied Genetics, v. 108, p. 931-936, 2004.

GONÇALVES, K. M.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; DE SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. L. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation – the use of experimental design as a tool for variables evaluation. Ultrason. Sonochem. v.19, 232–236, 2012.

GOODMAN, L. P.; DUGAN, L. R. The Effect of Sonication on Lipase Activity. Lipids, v. 5, n. 3, 1970.

GRAMPONE, M. A. Propriedades dos óleos vegetais modificados por hidrogenação, interesterificação e fracionamento. *Revista Óleos & Grãos* n.5, p. 5-9, 1993.

GUNSTONE, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, n. 12, p. 1535-1549, 1999.

GOG, A; ROMAN, M; TOSA, M; PAIZS, C; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification- Current state and perspectives. *Renewable Energy*, v. 39, p. 10-16, 2012.

HA, S. H.; HIEP, N. M.; KOO, Y. Enhanced Production of Fructose Palmitate by Lipase-catalyzed Esterification in Ionic Liquids. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.15, p.126-130, 2010.

HABULIN, M.; KRMEJLJ, V.; KNEZ, Z. Synthesis of oleic acid esters catalysed by immobilized lipase. *J. Agric. Food Chem.* V.44, p. 338, 1996.

HALIM, S.F.A.; KAMARUDDIN, A.H.; FERNANDO, W.J.N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, v.100, p.710-716. 2009.

HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. *EM Food Biotechnology*; Kling, R. D.; Cheetham, P. S. J., eds.; Elsevier Publishers Limited, vol. 2, p. 173-217, 1988.

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

HASAN F., SHAH A. A., HAMEE A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.235-251, 2006.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible Oil Analysis by HighResolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Recent Advances and Future Perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, v. 14, p. 499-506, 2003

HINGU, S.M.; GOGATE, P.R.; RATHOD, V.K. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, p. 827–832, 2010.

HUANG, J.; LIU, Y.; SONG, Z., JIN, Q.; LIU, Y.; WANG, Y. Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soybean oil: study of interfacial area and the initial rates. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, 521- 525, 2010.

HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Continuous production of ethyl esters of grease of grease using an immobilized lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 81, p. 749-752, 2004.

HUMA, S; TAMALAMPUDI, S; YOSHIDA, A; TAMADANI, N; KURATANI, N; NADA, H; FUKUDA, H; KONDO, A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. *Bioresource technology*, v. 102, p. 10419-10424, 2011.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.151, p.29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; DIJSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review Microbiology*, v. 53, p. 315-351, 1999.

JANSSEN, R. A.; BUTER, J.; STRAATSMA, E.; HEIJN, A. A.; SLEIJFER, D. T.; DE VRIES, E. G.; MULDER, N. H.; THE, T. H.; DE LEIJ, L. HLA-Dr-expressing CD8bright cells are only temporarily present in the circulation during subcutaneous recombinant interleukin-2 therapy in renal cell carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* v. 36, p. 198–204, 1993.

JI, J.; WANG, J.; LI, Y.; YU, Y.; XU, Z. Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics*, v.44, p.411-414, 2006.

JORGE, N., MARQUEZ-RUIZ, G.; MARTIN-POLVILLO, M.; RUIZ-MENDEZ, M. V.; DOBARGANES, M. C. Influence of Dimethylpolysiloxane Addition to Edible Oils: Performance of Sunflower Oil in Discontinuous and Continuous Laboratory Frying. *Grasas y Aceites*, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.

KAETHONG, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1525-1530, 2005.

KAPTUROWSKA, A.U.; STOLARZEWICZ, I.A.; KRZYCZKOWSKA, J.; FLORJANCZYK, E.B. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, p. 186-191, 2012.

KELKAR, M. A.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B., Intensification of esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 188-194, 2008.

KHOR, H. T., TAN, N. H., CHUA, C. L.- Lipase-catalysed hydrolysis of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 63, n. 4, p. 538-540, 1986.

KIATSIMKUL, P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Selective hydrolysis of epoxidized soybean oil by commercially available lipases: Effects of epoxy group on the enzymatic hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 41, p. 55-60, 2006.

KOLAKOWSKA, A. e SIKORSKI, Z.E. Chemical and functional properties of food lipids. CRC Press, p. 38-68, 2002.

KUO, C. H.; HSIAO, F. W.; CHEN, J. H.; HSIEH, C. W.; LIU, Y. C.; SHIEH, C. J. Kinetic aspects of ultrasound-accelerated lipase catalyzed acetylation and optimal synthesis of 40-acetoxyresveratrol. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 20, p. 546- 552, 2013.

KUMAR, G.; KUMAR, D.; POONAM; JOHARI, R.; SINGH, C.P., Enzymatic transesterification of Jatrophacurcas oil assisted by ultrasonication, *UltrasonicsSonochemistry*, v. 18, p. 923-927, 2011.

KWIATKOWSKA B.; BENNETT, J.; AKUNNA, J.; WALKER, G. M.; BREMNER D. H., Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, v.29, p. 768-780, 2011.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 30, p. 81-87, 1987.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. Editora: Sarvier, São Paulo, 2000.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; PARK, C.; TAE, B.; HAN, S. O.; KIM, S. W. Development of batch and continuous processes on biodiesel production in a packed-bed reactor by a mixture of immobilized *Candida rugosa* and *Rhizopus orzae* lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 365-3711, 2010.

LEE, S. B.; LEE, J. D.; HONG, I. K. Ultrasonic energy effect on vegetable oil based biodiesel synthetic process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 17, p. 138–143, 2011.

LEMAIRE, A.; WANGA, Q. Y.; WEI, Y.; LIU, Z.; SU, B. L. Hierarchically structured meso-macroporous aluminosilicates with high tetrahedral aluminium content in acid catalysed esterification of fatty acids. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 363, p. 511-520, 2011.

LERIN, L. A; LOSS, R. A; REMONATTO, D.; ZENEVICZ, M. C; BALEN, M.; OENNING NETTO, V.; NINOW, J. L.; TRENTIN, C. M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems *Bioprocess Biosyst Eng* DOI 10.1007/s00449-014-1222-5; 2014

LIMA, J. R.; NASSU, R. T. Substituição de gorduras em alimentos: características e aplicações. *Quim. Nova*, v.19, p.127-134, 1996.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS, JR; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya Sp.*) obtido por via etanólica. *Química Nova*, v. 30, p. 600-603, 2007.

LINFIELD, W. M.; BARUSKAS, R. A.; SIVIERI, L.; SEROTA, S.; STEVENSON, JR. - Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 61, p. 191-195, 1984.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43, 58–62, 2006.

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

LORTIE, R.; TRANI, M.; AND ERGAN, F. Kinetic study of the lipase catalyzed synthesis of triolein. *Biotechnol. Bioeng.* v. 41, p. 1021-106, 1993.

LORIMER, J. P.; MASON, T. J. Sonochemistry parte 1: The Physical Aspects. *Chem. Soc. Rev.*, v.16, p.239, 1987.

LU, J; CHEN, Y; WANG, F; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp* 99-125 in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic*, v. 56, p. 122-125, 2009.

LYSSANT, K. Emulsions and Emulsions Technology: Surfactant Science Series. v.6, New York, cap.1, 2 e 13, 1974.

LV, L. X.; PAN, Y.; LI, Y. Q. Biosynthesis of ascorbyl benzoate in organic solvents and study of its antioxygenic and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1626-1632, 2007.

MACRAE, A.R. e HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Reviews*, v. 3, 1985.

MARCINIUK, L. L.; GARCIA, C. M.; MUTERLE, R. B.; SCHUCHARDT, U. Produção de ésteres metílicos e etílicos de óleo de soja via catálise com fosfatos ácidos de metais trivalentes. In: Anais do 14º Congresso Brasileiro de Catálise, Porto de Galinhas-PE, Set. 2007.

MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Biodiesel production from acid oils and ethanol using a solid basic resin as catalyst. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, p. 272-277, 2010.

MARQUES, B. A. Considerações Ambientais e Energéticas na Fase de Pós-Colheita de Grãos: Estudo de Caso do Estado do Paraná. Curitiba, Pós-graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2006. Dissertação de Mestrado.

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

MARTINEZ, M., VICENTE, G., ARACIL, J. Kinetics of Brassica carinata oil methanolysis. *Energy & Fuels*, v. 20, p. 1722-1726, 2006.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; TASIOULA-MARGARI, M.; DOBARGANES, M. C. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 72, n. 10, p. 1171-1176, 1995.

MASON, T. J. *Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry*. Ed.; The Royal Society of Chemistry; Cambridge, cap. 1, p.1, 1990

MASON, T. J. Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future *Ultra. Sonochem.*, v.10, p. 175–179, 2003.

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

MATOS, L. M. C. Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol. Dissertação de

Mestrado em Química – Instituto de Química - IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; ICHIKAWA, S.; NABETANI, H.; FURUSAKI, S.; SEKI, M. Óleo-água ativação interfacial de lipase por interesterificação de ácido graxo e triglicéridos. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 77, p. 1121-1127, 2000.

MEDINA, A. R.; CERDÁN, L. E.; GIMÉNEZ, A. G.; PÁEZ, B. C.; GONZÁLEZ, M. J. I.; GRIMA, E.M. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *Journal of Biotechnology*, V.70, P. 379–391, 1999.

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

MERÇON, F.- Hidrólise enzimática de óleo de babaçu em reatores com membrana. Rio de Janeiro, 1995. 73p. (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MET, S.; DANDIK, L.; AKSOY, H. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 50, p. 333, 1995.

MINAMI, E.; SAKA, S. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification to biodiesel production process in two steps supercritical methanol. *Fuel*. v. 85, p. 17-18 :2479-2483, 2006.

MICHELIN, S.; PENHA, F. P.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R. P.; TREICHEL, H.; VALERIO, A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. *Renewable Energy*, v. 76, p. 388 -393, 2015.

MOOTABADI, H.; SALAMATINIA, B.; BHATIA, S.; ABDULLAH, A. Z. Ultrasonic-assisted biodiesel production process from palm oil using alkaline earth metal oxides as the heterogeneous catalysts. *Fuel*, v. 89, p. 1818–1825, 2010.

MUKHERJEE, K. D. lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*, v. 3, p. 277-293, 1990.

NAGAO, T.; WATANABE, H.; GOTO, N.; ONIZAWA, K.; TAGUCHI, H.; MATSUO, N.; YASUKAWA, T.; TSUSHIMA, R.; SHIMASAKI, H.; ITAKURA, I.; Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial, *J. Nutr.* v. 130, 792–797, 2000.

NAWAR, W. W. Volatile components of the frying process. *Grasas y Aceites*, v. 49, n. 3-4, p. 271-274, 1998.

NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in food industry: a backward glance. *Food Technology*, v. 45, p. 88-91, 1991.

NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. 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.

NETO, M. C. Biocombustíveis – Brasil (Biobras). Disponível em: <<http://biocombustiveis-brasil.blogspot.com/2008/05/hidroesterificao-tecnologia-de-segunda.html>>. Acesso em: 16 junho. 2013.

NEVES, A. A. Avaliação do aproveitamento de óleos alimentares usados para produção de biodiesel na área metropolitana do Porto. Dissertação de Mestrado - Universidade do Porto . Porto, 2008.

NICHOLS, D.S.; SANDERSON, K. The Nomenclature, Structure, and Properties of Food Lipids. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. Chemical and functional properties of food lipids. Flórida, CRC Press, p. 38-68, 2003.

NIE, K; XIE, F. WANG, F; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Otimization of the biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, v. 43, p. 142-147, 2006.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, v.39, p.13-20, 2003.

OLIVEIRA, D.; NASCIMENTO FILHO, I.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; DALLA ROSA, C.; BENDER, J.P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. Kinetics of enzyme catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, p.231-241, 2005.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, n. 3, p. 373-382, 2006.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; DALLA ROSA, C.; BENDER, J.P.; LIPKE, N.; MENONCIM, S.; AMROGINSKI, C.; , J.V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, p. 771–780. 2004

PADILHA, M. E. S. e AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de peixe. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 285-290, 2007.

PARK, Y. K.; PASTORE, G. M.- Esterificação de ácidos graxos por lipases microbianas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.,Campinas*, v. 9, n. 2, p. 163-171, 1989.

PARK, J.Y.; WANG, Z.M.; KIM, D. K.; LEE, J. S. Effects of water on the esterification of free fatty acids by acid catalysts. *Renewable Energy*, v. 35, p. 614–618, 2010.

PATEL, A.; BRAHMKHATRI, V.; SINGH, N. Biodiesel production by esterification of free fatty acid over sulfated zirconia. *Renewable Energy*, v. 51, p. 227-233, 2013.

PAUL, S. P.; MITTAL, G. S. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, v.37, n.7, p.635e662, 1997.

PILAREK, M., & SZEWCZYK, K. W. Kinetic model of 1, 3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *Journal of biotechnology*, v. 127(4), p. 736-744, 2007.

PRIMOZIC M, HABULIN M, KNEZ Z. Kinetic Modeling for enzymatic hydrolysis of sunflower oil in a high pressure reactor *JAACS, Jornal da Sociedade da American Oil Chemists* v. 82, 543-547, 2005.

RAMACHANDRAN, K. B.; AL-ZUHAIR, S.; FONG, C. S.; GAK, C. W. Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification. *Biochemical Engineering Journal*, v.32, p.19-24, 2006.

RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOIANA, N., Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert butanol system. *Processes Biochemistry*, v. 45, p. 829-834, 2010.

REDÓN, X.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E. Solvent engineering applied to lipasecatalyzed glycerolysis of triolein, *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 78, 1061–1066, 2001.

REIS, M. F. P.; ELLWANGER, R. M.; FLECK, E. Destinação de óleos de fritura. 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007.

REMONATTO, D. Síntese de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleos de soja e canola em sistema livre de solvente orgânico sob agitação mecânica e em sistema assistido por ultrassom. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade federal de Santa Catarina-SC, 2013.

RODRIGUES, R.C. e AYUB, M.A.Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.

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

D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 648.

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

RABU, R. A; JANAJREH, I; HONNERY, D. Transesterification of waste cooking oil; Process optimization and conversion rate evaluation. *Energy Conversion and Management*, v. 65, p. 764-769, 2013.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 47, p. 5–9, 2010.

SAMBANTHAMURTHI, R; SUNDRAM, K.; TAN Y. Chemistry and Biochemistry of palm oil. *Progress in Lipid Research, Malaysia*, v. 39, p. 507-558, 2000.

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

SABESP (2011). Projeto “Fabriquinha de sabão” da ABB recicla óleo vegetal usado. *Revista óleos e Gorduras: Alimentos e Tecnologia*.

SANTIN, C. M. T.; SCHERER, R. S.; NYARI, N. L. D.; DALLA ROSA, C.; DALLAGO, R. M. OLIVEIRA, D.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. V. Batch esterificação de ácidos graxos encargos sob irradiação ultrassom usando *Candida Antarctica B* imobilizada em espuma de poliuretano. *Biocatálise e Biotecnologia Agrícola*. Volume 3, Issue 3, julho de 2014, páginas 90-94.

SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Influence of surface hydrophobicity on the esterification of fatty acids over solid catalysts. *Energy Fuels*, v. 24, p. 2154-2161, 2010.

SILVA M. F., FREIRE D. M. G., CASTRO A. M., DI LUCCIO M., MAZUTTI M. A., OLIVEIRA J. V., TREICHEL H., OLIVEIRA D.; Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010; 34:145-152 DOI 10.1007/s00449-010-0455-1.

SCRIBAN E. *Biotecnologia*. Editora Malone: São Paulo. p.498, 1985.

SCHMITT-ROZIERES, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. C. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification. *Journal of the American Oil Chemists Society*, V. 77, P. 329–332, 2000.

SCHWARTZ, D. P.; RADY, A. H.; CASTAÑEDA, S. The formation of oxo- and hydroxy-fatty acids in heated fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 71, n. 4, p. 441-444, 1994.

SHAMEL, M.M.; RAMACHANDRAN, K.B.; HASAN, M. Operational stability of lipase enzyme: effect of temperature and shear. *Dev. Chem. Eng. Min. Process.* v.13, n.5/6, p. 599-604, 2005.

SIMONNE, A. H.; SMITH, M.; WEAVER, D. B.; VAIL, T.; BARNES, S.; WEI, C.I. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame), during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p. 6061-6069, 2000.

SOARES D, PINTO AF, GONÇALVES AG, MITCHELL DA, 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. *Biochem Eng J* 2013;81:15–23.

SONNET, P. E; FOGLIA, T. A.; BAILLARGEON, W. Fatty acid selectivity of lipases of *Geotrichum candidum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 70, p. 1043, 1993.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de Triglicérides em Combustíveis, *Materiais*

Poliméricos e Insumos Químicos: Algumas Aplicações da Catálise na Oleoquímica. Química Nova, v.30, p. 667-676, 2007.

SHAH, S; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. Process Biochemistry, v. 42, p. 409-414, 2007.

Sharma, A.; Chaurasia, P. S.; Dalai, A. K.; Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. Catalysis Today, v. 207, p 93-100, 2012.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 17, p. 133-142, 2002.

TALUKDER, MDMR.; WU, J. C.; CHUA, L.P. Converting used cooking oil into biodiesel by enzymatic hydrolysis followed by esterification. Chemical Energy and Fuels., v. 24 , p. 2016-2019, 2010.

THANH, L.T.; OKITSU, K.; SADANAGA, Y.; TAKENAKA, N.; MAEDA, Y. E BANDOW, H., A two-step continuous ultrasound assisted production of biodiesel fuel from waste cooking oils: A practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel. Bioresource Technology, v.101, p. 5394-5401, 2010.

TRENTIN, C. M. Estudo da cinética de transesterificação não-catalítica de óleo de soja com co-solvente em reator micro tubo. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2010.

TSITSIMPIKOU, C.; DAFLOS, H.; KOLISIS, F. N.; J. Mol. Catal. B: Enzim., v. 3, p. 189, 1997.

USDA. Hidroesterificação: tecnologia de segunda geração na produção de biodiesel. Disponível em:< <http://usda.com.br/index.html>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

VALENZUELA, A.; AND NIETO, S. Biotechnology of lipids: The use of lipases for the structural modification of fats and oils. *Grasas y Aceites* v. 45, p. 337-343, 1994.

VAN DER PADT, A.; Enzymatic acylglycerol synthesis in membrane reactor. Ph.D. dissertation, Land bouw universiteit te Wageningen, Holanda, 1993.

VARMA, R.S. Solvent-free organic syntheses using supported reagents and microwave irradiation. *Green Chemistry*, v.1, p.43-55, 1999.

VELASCO, J.; MARMESAT, S.; BORDEAUX, O.; MÁRQUEZ-RUIZ G.; DOBARGANES, C. Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying Oilz from restaurants and food outlets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 14, p. 4438-4443, 2004.

VELJKOVIĆ, V.B.; AVRAMOVIĆ, J. M.; STAMENKOVIĆ, O. S. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16, 1193

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; D. Bates Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review *Int. Food Science Emerging Technology*, v. 9, p. 161–169, 2009.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, v.25, p.515-536, 2007.

VOLL, F. A. P. Produção e separação de diacilglicerol a partir do triacilglicerol do óleo de palma. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2011.

VULFSON, E. N. Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application; Woolley, P.; Petersen, S. B, Cambridge University Press: Grã Bretanha, p.271, 1994.

WANG, Y. J., SHEU, J. Y., WANG, F. F., SHAW, J. F.- Lipase-catalysed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier.- *Biotechnol. and Bioeng.*, New York, v. 31, p. 628-633, 1988.

WANG, F.; ZHANG, H.; WANG, J.; CHEN, G.; FANG, X.; WNAG, Z.; WANG, L. Ultrasound Irradiation Promoted Enzymatic Transesterification of (R/S)-1-Chloro-3-(1-naphthylloxy)-2-propanol. *Molecules*, v. 17, p. 1-11, 2012.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M.H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technology*, v.99, p.7232–7237, 2008.

WANG, X., DOU, P., ZHAO, P., ZHAO, C., DING, Y., XU, P. Immobilization of lipases onto magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for application in biodiesel production. *Chem. Sus. Chem.* v. 2, p. 947–950, 2009.

WANG, X; LIU, X; ZHAO, CM; DING, Y; XU, P. Biodiesel production in packed- bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. *Bioresoure Technology*, v. 102, p. 6352-6355, 2011.

WANG, J.; WANG, S.; LI, Z.; GU, S.; WU, X.; WU, F. Ultrasound irradiation accelerates the lipase-catalyzed synthesis of methyl caffeate in an ionic liquid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 111, p. 21-28, 2015.

WANTANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v.78, n.7, p.703-707, 2001.

WU, X. Y.; JEISKELIINEN, S.; LINKO, Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*, v.19, p.226-231, 1996.

YACHMENEV, V.G.; BLANCHARD, E.J.; LAMBERT, A.H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton. *Ultrasonics*, v.42, p.87-91, 2004.

YAN, J.; LIU,S.; HU, J.; GUI, X.; WANG, G.;YAN, Y. Enriquecimento enzimática de ácidos graxos poliinsaturados, utilizando novas preparações de

lipase modificado pela combinação de tratamento de óleo de imobilização e peixes. *Bioresource Tecnologia*, v. 102, p. 7154-7158, 2011.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfurylbutyrate: comparison and kinetic modeling, *Chemical Engineering Science* 59 (2004) 373–383.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. *Process Biochemistry*, v.45, p.519-525, 2010.

YOU, L. L.; BAHARIN, B. S. Effects IF enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Food Lipids* v. 13, p. 73-87, 2006.

XUE, F.; ZHANG, X.; LUO, H. TAN, T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1644 – 1702, 2006.

YONG-MEI XIAO, QI WU, YING CAI, XIAN-FU LIN. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydrate Research*, Volume 340, Issue 13, 26 September 2005, Pages 2097-2103

XIAO, Y.; YANG, L.; MAO, P.; ZHAO, Z.; LIN, X. Ultrasound-promoted enzymatic synthesis of troxerutin esters in nonaqueous solvents. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 303-309, 2011.

XU, Y; NORDBLAD, M; NIELSEN, P. M; BRASK, J; WOODLEY, J. M. In situ visualization and effect of glycerol in lipase- catalyzed ethanolized ethanolysis of rapeseed oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 213-219, 2011.

ZHAO, X.; FAN, M.; ZENG, J.; DU, W.; LIU, C.; LIU, D. Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 226–233, 2013.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, v.82, p.3192-3196, 1985.

ZHANG, Q.; SALEH, A. S. M.; CHEN, J.; SHEN, Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review. Chemistry and Physics of Lipids. v. 165, p. 662-681, 2012.

ZHU, K.; LIU, H.; HAN, P.; WEI, P. Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester. Frontiers of Chemical Engineering in China, 2010. DOI10.1007/s11705-009-031.

ANEXO I

APÊNDICE A – TÉCNICAS ANÁLITICAS

A1- DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Foi pesado entre 40 a 90 mg da amostra de óleo em um tubo de ensaio com tampa. Com uma pipeta graduada adicionou-se 1,5 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N no tubo. O tubo foi fechado e colocado num banho de água com temperatura de 100 °C por 10 minutos. Após esse tempo, retirou o tubo do banho e deixou esfriar, então, adicionou-se 2 mL de solução metanólica de BF₃ 14 % e 236 colocou-o novamente no banho por 5 minutos. Em seguida, deixou o tubo com a amostra esfriar por 1 minuto, adicionou-se 2 mL de heptano e agitou-se por 30 segundo. Então, adicionou-se 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e agitou-se novamente por 30 segundos. Depois, deixou ocorrer a decantação das fases, na fase superior contém o solvente orgânico com os ésteres metílicos e na inferior é a fase aquosa. Com uma pipeta de Pasteur retirou-se a fase superior e coloca-se em um tubo de centrífuga. Em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro para secar a amostra e realizou-se a centrifugação do mesmo. Transferiu-se a amostra para um vial e realizou-se a análise com um cromatógrafo gasoso da Shimadzu GC-14B, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar SGE BPX70. O programa de temperatura utilizado no cromatógrafo foram: início a 160 °C, após aquecimento a 4 °C.min⁻¹ até 230 °C, com permanência nessa temperatura por 10 minutos. O resultado para perfil de ácido graxo são expressos em relação a porcentagem da área do pico. Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidad de La Republica (UDELAR) no Uruguai.

A 2 - QUANTIFICAÇÃO DE MONOACILGLICERÍDEOS, DIACILGLICERÍDEOS E TRIACILGLICERÍDEOS

1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

A amostra é analisada por cromatografia gasosa, depois da sililação com Piridina e MSTFA (n-methyl-n-trimethylsilyltrifluoracetamide). A calibração é alcançada através da utilização de dois padrões internos e quatro

materiais de referência. Mono-, di-, e triacilglicerol são determinados por comparação com monooleína, dioleína, trioleína e padrões respectivamente. Fatores de conversão médios são aplicados à mono-, di-, e triacilglicerol para calcular o teor de glicerina ligada à amostra.

2. REFERÊNCIAS NORMATIVAS

- ASTM D 6584 - “Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides, Total Diglycerides, Total Triglycerides, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography.”
- Manual do Equipamento

3. PREPARO DE SOLUÇÕES

Preparo das soluções de calibração

Em 05 frascos (vial) de 15 mL, adicionar (com auxílio de microseringas) cada padrão nas quantidades descritas no Quadro 01. Numerar os frascos.

Quadro 01: Preparação das soluções de calibração.

PADRÕES	Sol. 1	Sol. 2	Sol.3	Sol. 4	Sol. 5	Seringas
Glicerina	10 µL	30 µL	50 µL	70 µL	100 µL	250 µL
Monooleína	20 µL	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL	250 µL
Dioleína	10 µL	20 µL	40 µL	70 µL	100 µL	100 µL
Tioleína	10 µL	20 µL	40 µL	70 µL	100 µL	100 µL
Butanotriol	100 µL	250 µL				
Tricaprina	100 µL	250 µL				
MSTFA	100 µL	250 µL				

Em seguida, fechar os frascos e homogeneizar a solução removendo todas as gotas que possam estar aderidas na parede do frasco. Deixar as soluções padrão reagindo por um período de 15 à 20 minutos. Adicionar 8 mL de n-heptano. Homogeneizar a solução. Transferir uma alíquota de cada ponto para um vial de 2mL e fechar numerando-os.

4. Procedimento para realização da curva de calibração.

Padronização do método.

Para a realização da curva de calibração são preparadas soluções padrões a partir de padrões comerciais com concentrações conhecidas dos compostos analisados na amostra. O método é configurado com as concentrações reais de cada solução padrão e os pontos são integrados no equipamento obtendo um sinal (em Hz) para cada componente, obtendo uma padronização entre o sinal do equipamento e a concentração dos padrões. Utilizam-se padrões internos com a finalidade de obter a correlação entre as concentrações dos padrões em função da evaporação do solvente de diluição (esta técnica é adotada para análises que utilizam solventes voláteis, podendo minimizar o erro em função da variação do volume em função da evaporação do solvente). O cálculo utilizado para corrigir a área do padrão em função da evaporação do solvente é a área da substância de referência dividida pela área do padrão interno.

$$\text{Área corrigida} = A_{sr} / A_{pi}$$

Onde:

A_{sr} = Área da substância de referência

A_{pi} = Área do padrão interno

O mesmo cálculo de correção da área se aplica para a interpretação dos compostos na amostra e está descrito abaixo:

5. Procedimento para preparação da amostra.

Este procedimento é realizado em duplicata. Pesar $0,1000 \pm 0,01g$ da amostra em um vial de 15 mL. Registrar a massa no Formulário 01 deste Procedimento e no Banco de Dados da planilha de incerteza da análise. Adicionar 100 μ L de butanotriol (padrão interno), 100 μ L de tricaprina (padrão interno) e 100 μ L de MSTFA. Homogeneizar e deixar por 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionar 8 mL de n-heptano, fechar o vial imediatamente com tampa e septo inerte e homogeneizar. Transferir para um vial de 2mL, fechar e colocá-lo na posição desejada no carrossel do injetor

automático. Analisar 1 μ L da mistura de reação por cromatografia em fase gasosa.