

Daniela Remonatto

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS A
PARTIR DE DIFERENTES MATÉRIAS GRAXAS UTILIZANDO
AS LIPASES EOVERSA TRANSFORM E EOVERSA TRANSFORM
2.0**

Tese de doutorado apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina – UFSC, como requisito
parcial para a obtenção do Grau de
Doutora em Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz
Ninow
Coorientadores: Prof. Dr. José
Vladimir de Oliveira e Dr.^a Gloria
Fernandez Lorente

Florianópolis
2017

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

Remonato, Daniela

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS A PARTIR
DE DIFERENTES MATÉRIAS GRAXAS UTILIZANDO AS LIPASES EVERSA
TRANSFORM E EVERSA TRANSFORM 2.0 / Daniela Remonato ;
orientador, Jorge Luiz Ninow ; coorientador, J. Vladimir
Oliveira, coorientadora, Gloria Fernandez Lorente. -
Florianópolis, SC, 2017.

226 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Enzima. 3. Biodiesel. 4.
Óleos de reuso. 5. Biotecnologia. I. Ninow, Jorge Luiz. II.
Oliveira, J. Vladimir. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica na Universidade Federal de Santa Catarina, e no Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (Madrid, Espanha) e contou com recursos de financiamento e bolsas da CAPES e CNPq.

Dedico este trabalho,

à outra parte de mim, minha mãe Inide e meu pai Dorvalino, exemplos de honestidade, coragem e luta.

E em memória à minha querida professora Loreni Moreira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar, pela saúde, pelas pessoas que colocou em meu caminho, enfim, por tornar tudo possível.

Ao meu orientador, Professor Jorge L. Ninow, e à sua esposa, Dora Orth, pela acolhida, confiança, dedicação e incentivo, pelas risadas, apoio e ensinamentos ao longo destes 6 anos de convivência. Vocês são, sem sombra de dúvida, o casal mais incrível que conheci e lhes serei sempre imensamente grata.

Ao meu coorientador, Professor J. Vladimir de Oliveira, e à sua esposa, Professora Débora de Oliveira, por toda a contribuição a esse trabalho, por todo o conhecimento repassado a mim e pela disponibilidade nestes anos de orientação. Vocês são fantásticos.

Ao professor Marco Di Luccio, meu primeiro orientador. Sem seu apoio, com certeza, eu não teria ingressado na pós-graduação. Obrigada por fazer parte de mais esta conquista.

A Gloria F. Lorente por su recibimiento en Madrid, por ayudarme en los momentos difíciles, por hacerme creer en mi potencial de trabajo para el desarrollo de mi Tesis Doctoral, y porque a pesar de la distancia que nos separa, siempre puedo contar contigo. Eres una de las mejores personas que he conocido en mi vida, siempre te llevaré en mi corazón, muchas gracias por todo.

Aos pesquisadores Benevides C. Pessela e José Guisan, pela acolhida em Madri, sempre alegres e dispostos a ajudar.

Aos professores Maria Manuela C. Feltes, Helen Treichel, Willibaldo Schmidell, Lindomar A. Lerin e João Paulo Bender, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Às ICs que fizeram parte deste trabalho, Camila e Luiza, obrigada pela dedicação e carinho.

Aos meus pais, Dorvalino e Inide, exemplos de coragem e força, pelo apoio incondicional, sempre fazendo o possível e impossível para tornarem meus sonhos realidade.

Aos meus irmãos, Alcindo, Célio e Carla, e meus cunhados, Rodrigo e Claíres, pelos momentos alegres e pelos almoços em família.

Aos meus pequenos amores, meus sobrinhos, Fabrício, Ana Letícia, Aline e Arthur.

Aos amigos de sempre para sempre, que se tornaram minha segunda família ao longo dos anos de convivência, Mara Cristina Zenevycz, Leandro Talaska, Lindomar A. Lerin, Luciane Batistella, Alessandra Smaniotto, André Poloni, Viviane Chiaradia, Rafaela R.

Céspedes e Jean Correia. O apoio de vocês foi fundamental e sei que sempre poderei contar com vocês.

Aos meus super amigos que tive o privilégio de conhecer e me aproximar durante o doutorado, Fábio Frozza, Léia Marini, Kellen Zanfonato, Janaína Debon, Gabrieli Nicoletti, Wiaslan Martins, Mariana Mezzaroba, Andréia Tremarin, Fernanda Rosa, Glenise B. Voss, Manoela V. Sousa, Rachel M. Cureau, Andréia Siga, Claudia Trentin, Raquel Loss e Jacqueline Pires, obrigada por encherem minha vida de alegria.

A los amigos que Madrid me presentó, Rosana Henriques, Simone Mazutti, Anne Kamilly Nogueira, Márcia Lacerda, Greice Campos, Paz García, Ana Gutiérrez, Lorena Herranz e Claudio Grasso, que hicisteis que mi vida en Madrid fuera un sueño, os extraño mucho y jamás os olvidaré.

Aos meus colegas e amigos do Engebio, Denise, Ana Paula, Kelin, Mélodi, Pâmela, Camila, Jefferson, Gabriela e Nathiele, obrigada pelo carinho.

Às jorgetes, Juliana, Luciana, Eliane, Cintia, Clarissa, Adriana, Flávia e Manuela.

Aos amigos da central de análises, Leno e Leandro, obrigada pela disponibilidade e competência.

A empresa Transfertech Gestão de Inovação Ltda (Erechim/RS), em especial a Marcelo Cantele e a Luís Fernando Cantele, pelo apoio logístico e pela infraestrutura compartilhada sem os quais este trabalho não teria se concretizado.

Aos laboratórios Engebio e Central de Análises.

À CAPES, ao CNPq e ao PGEA-UFSC, pelo apoio financeiro e de infraestrutura, que permitiu a realização deste trabalho.

Por fim, a todos que fizeram parte desta conquista.

“Se a sua Coragem negar-lhe, vá além de sua Coragem.”
(Emily Dickinson)

RESUMO

Neste trabalho foi investigado o processo de produção de ésteres de ácidos graxos, utilizando as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* em suas formas livres e imobilizadas, a partir de diferentes matérias-primas, em modo batelada alimentada em escala laboratorial e piloto. Primeiramente foi realizado o estudo da lipase livre *Eversa® Transform* na produção de FAME, utilizando os distintos substratos, onde, o óleo ácido residual teve o melhor desempenho (89,01% FAME). Porém, as melhores condições com esse substrato foram com álcool etílico comercial (93,57%) (95% FAEE): na razão molar etanol/óleo ácido residual de 3,5:1, *Eversa® Transform* 1% (m/m, em relação ao substrato), incubado em shaker por 8 h (35 °C/250 rpm), com reuso da lipase por até 4 ciclos. Como o óleo ácido residual teve destaque, foi aplicado juntamente com a gordura ácida residual na produção de FAME em escala piloto utilizando a lipase *Eversa® Transform* nas condições reacionais: matéria graxa (550 kg), água 2% (m/m, em relação ao substrato), lipase 0,7% (m/m, em relação ao substrato) e a razão molar metanol/óleo de 4,5:1, com 35 °C em 13 h para ácido graxo residual. Com a gordura ácida residual os melhores resultados (94,1% FAME) foram com 0,3% de lipase *Eversa® Transform 2.0* em 16 h de reação. No estudo da imobilização das lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*, a máxima produção de FAEE foi com a lipase *Eversa® Transform 2.0* nas reações de transesterificação de óleo de girassol em meio com solvente orgânico, foram: 0,3 g de lipase imobilizada em *Sepabeads-C18*, razão molar álcool/óleo de girassol de 4:1, 4,1 ml de hexano, 0,2 g de peneira molecular, a 40 °C e 150 rpm, em 3 h, onde foi possível sua reutilização por 4 ciclos. No estudo da síntese de ésteres em meio livre de solvente orgânico as melhores condições reacionais para a produção de FAEE (>98% FAEE) foram: 0,5 g de lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, 0,2 g de peneira molecular, razão molar etanol/óleo de girassol de 3,25:1, 40 °C e 150 rpm de agitação em 3 h de reação, com a possibilidade de reuso da lipase por até 5 ciclos. Ambos os biocatalisadores *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* demonstraram que são potenciais para uso em reações de produção de ésteres de ácidos graxos utilizando diferentes matérias-primas em distintos meios reacionais.

Palavras-chave: Lipases. Biodiesel. Transesterificação. Ésteres Etílicos; Ésteres Metílicos.

ABSTRACT

In this work the enzymatic process of fatty acid esters production was investigated, using as biocatalyst the lipases *Eversa® Transform* and *Eversa® Transform 2.0* in their free and immobilized forms, from different raw materials, in fed-batch on a laboratory and pilot scale. Firstly, a study was carried out regarding the use of free lipase *Eversa®* for FAME production using the different substrates, with the residual acid oil affording the best performance (89.01 wt% FAME). However, the best conditions with this raw material was obtained with ethyl alcohol (93.57 wt%) leading to 95 wt% FAEE at following conditions: molar ratio ethanol to acid oil of 3.5: 1, *Eversa® Transform* 1 wt% relative to raw material, orbital shaker for 8 h (35 °C / 250 rpm). As the acid oil was highlighted, it was applied together with the fat acid for the production of FAME in a pilot scale using the *Eversa® Transform* lipase under the reaction conditions of acid oil (550 kg), water 2 wt% relative to raw material, lipase 0.7 wt%, relative to raw material and the molar ratio methanol to oil of 4.5: 1, at 35 °C for 13 h reaction. For the fatty acid the best results (94.1 wt% FAME) was reached using 0.3% *Eversa® Transform 2.0* in 16 h of reaction. In the immobilization study of *Eversa® Transform* and *Eversa® Transform 2.0* lipases, the maximum production of FAEE was found with *Eversa® Transform 2.0* lipase in the transesterification reactions of sunflower oil with organic solvent for: 0.3 g of lipase immobilized on Sepabeads-C18, molar ratio 4:1 alcohol to sunflower oil, 4.1 ml hexane, 0.2 g molecular sieve at 40 °C and 50 rpm at 3 h, for which it was possible to reuse the enzyme for 4 cycles. Regarding the synthesis of esters in organic solvent-free system the best reaction conditions for the production of FAEE (> 98 wt% FAEE) were: 0.5 g of *Eversa® Transform 2.0* lipase immobilized on Sepabeads-C18, 0.2 g molecular sieve, ethanol to sunflower oil molar ratio of 3.25:1, 40 °C and 150 rpm stirring at 3 h of reaction, with the possibility of lipase reuse for 5 cycles. Both the *Eversa® Transform* and *Eversa® Transform 2.0* biocatalysts have demonstrated great potential for use in fatty acid esters production reactions using different feedstocks in different reaction media.

Keywords: Lipase; Biodiesel; Transesterification; Ethyl Esters; Methyl Esters.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1- Organograma do documento de tese. | 29 |
| Figura 1.1- Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil. | 48 |
| Figura 1.2- Reações intermediárias da reação de transesterificação entre um triacilglicerol e um álcool de cadeia curta..... | 56 |
| Figura 2.1- Unidade experimental montada para a produção de ésteres metílicos com a lipase <i>Eversa® Transform</i>, utilizando agitação mecânica..... | 71 |
| Figura 2.2- Unidade experimental utilizada na produção de ésteres metílicos utilizando a lipase <i>Eversa® Transform</i> por meio de erlemeyer aletado de 250 ml e agitação orbital..... | 72 |
| Figura 2.3- Esquema da reação de produção ésteres metílicos utilizando a lipase <i>Eversa® Transform</i> por meio de agitação orbital. | 73 |
| Figura 2.5- Esquema exemplificando o reuso e a etapa de polimento das reações a partir óleo ácido residual e diferentes alcoóis utilizando a lipase <i>Eversa® Transform</i>. | 77 |
| Figura 2.6- Esquema exemplificando a metodologia descrita para o reuso da enzima <i>Eversa® Transform</i> utilizando como substratos óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%). | 78 |
| Figura 2.7- Resultados quanto a verificação da capacidade de hidrólise da lipase <i>Eversa® Transform</i> utilizando óleo de soja com 1% de lipase, 6% de água com e sem NaOH, em shaker (35 °C/250 rpm). | 86 |
| Figura 2.9- Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando a razão molar metanol/óleo de soja 4,5:1, 1% de <i>Eversa® Transform</i> e 2,5% de água, em shaker (35 °C/250 rpm). | 88 |
| Figura 2.10- Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando a razão molar metanol/óleo de soja 4,5:1, 1% <i>Eversa® Transform</i> e 0% de água destilada, em shaker (35 °C/250 rpm). | 89 |
| Figura 2.11 - Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando óleo de soja com 25%, 50% e 75% de ácido oleico na razão molar metanol/óleo de 4,5:1, 1% <i>Eversa® Transform</i> e 2,5% de água em shaker (35 °C/250 rpm). | 91 |
| Figura 2.12- Avaliação cinética da produção de ésteres metílicos com óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual, com | |

| | |
|--|-----|
| 1% de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> , 2,5% de água e razão molar metanol/óleo 4,5:1, em shaker (35 °C/250 rpm)..... | 94 |
| Figura 2.13 - Aspecto visual do óleo ácido residual estudado nas reações de produção de biodiesel enzimático utilizando a lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> | 99 |
| Figura 2.14- Teor de ésteres metílicos de ácido graxo das cinéticas utilizando óleo ácido residual na razão molar metanol/óleo de 3,5:1, 2,5% de água, e as concentrações de 0,25, 0,5 e 1% de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> | 100 |
| Figura 2.15- Resultados quantos ao teor de ésteres etílicos de ácido graxo dos ciclos de uso da enzima <i>Eversa Transform</i> a partir de óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%), realizados com razão molar álcool/óleo de 3,5:1, e 1% de enzima, incubado em shaker por 8 h (35°C/250rpm)..... | 106 |
| Figura 3.1- Plataforma metálica com a unidade experimental montada para a produção enzimática de ésteres metílicos de ácido graxo em planta piloto. | 113 |
| Figura 3.2- Avaliação cinética de produção de ésteres metílicos utilizando óleo ácido residual e álcool metílico na razão molar óleo/álcool 4,5:1, 0,7% de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> e 2% de água, em escala piloto..... | 122 |
| Figura 3.3- Avaliação cinética de produção de ésteres metílicos de ácido graxo utilizando gordura ácida residual e álcool metílico na razão molar óleo/álcool de 1:4,5, 0,7% de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> e 2% de água, em escala piloto. | 125 |
| Figura 3.4- Avaliação cinética da síntese de ésteres metílicos de ácido graxo utilizando gordura ácida residual e álcool metílico na razão molar óleo/metanol de 1:4,5, 0,7% de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 e 2% de água, em escala piloto. | 125 |
| Figura 3.5 - Avaliação cinética da síntese de ésteres metílicos de ácido graxo utilizando gordura ácida residual e álcool metílico na razão molar óleo/metanol 1:4,5, 0,3% de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 e 2% de água, em escala piloto. | 126 |
| Figura 4.1- SDS-PAGE. A: Marcador de pesos molecular. B: Extrato enzimático <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> em diferentes diluições. C: Extrato enzimático <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 em diferentes diluições..... | 140 |
| Figura 4.2- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação. | 142 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.3- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação..... | 142 |
| Figura 4.4- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> imobilizada em diferentes suportes com PEI, utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 mL de hexano, razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação. | 145 |
| Figura 4.5- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 imobilizada em diferentes suportes com PEI, utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 mL de hexano, razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação. | 145 |
| Figura 4.6- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C..... | 146 |
| Figura 4.7- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos recobertos com PEI a 2,5%, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C..... | 147 |
| Figura 4.8- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C..... | 148 |
| Figura 4.9- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos recobertos com PEI, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C..... | 148 |
| Figura 4.10- Efeito de diferentes substratos – álcool etílico e álcool metílico - nas reações de síntese de ésteres etílicos e metílicos das lipases <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> (A) e <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> 2.0 (B) imobilizadas nas condições, 0,3 g de lipase imobilizada em <i>Sepabeads-C18</i> , 4,1 mL de hexano, razão molar álcool/óleo de girassol de 8,5:1 com o álcool etílico e 12,5:1 com o álcool metílico, 40 °C e 150 rpm. | 150 |
| Figura 4.11- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 8,5:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de <i>Eversa</i> ® <i>Transform</i> imobilizada em <i>Sepabeads-C18</i> , 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 152 |
| Figura 4.12- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 8,5:1 e | |

| | |
|---|------------|
| 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de Eversa® Transform 2.0 imobilizada em Sepabeads-C18, 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 152 |
| Figura 4.13- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 6:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de Eversa® Transform imobilizada em Sepabeads-C18, a 40 ° com agitação de 150 rpm. | 153 |
| Figura 4.14- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 6:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de Eversa® Transform 2.0 imobilizada em Sepabeads-C18, a 40 °C com agitação de 150 rpm. | 154 |
| Figura 4.15- Produção de ésteres etílicos utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de Eversa® Transform (A) ou Eversa® Transform 2.0 (B) imobilizadas em Sepabeads-C18 com 0 ou 0,001% PAA, a 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 156 |
| Figura 4.16- Produção de ésteres metílicos utilizando a razão molar metanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de Eversa® Transform (A) ou Eversa® Transform 2.0 (B) imobilizada em Sepabeads-C18 com 0 ou 0,001% PAA, a 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 157 |
| Figura 4.17- Estabilidade a óleo de girassol com as lipases Eversa® Transform (A) e Eversa® Transform 2.0 (B) imobilizadas em Sepabeads-C18 com 0 ou 0,001% de PAA, utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 159 |
| Figura 4.19- Estabilidade a álcool metílico com as lipases Eversa® Transform (A) e Eversa® Transform 2.0 (B) imobilizadas em Sepabeads-C18 com 0 ou 0,001% de PAA, utilizando a razão molar metanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 160 |
| Figura 4.20- Ciclos de uso da lipase Eversa® Transform 2.0 imobilizada em Sepabeads-C18, utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 163 |
| Figura 4.22- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 4:1 e 3,25:1 e 0,5 g de Eversa® Transform imobilizada em Sepabeads-C18, a 40 °C e agitação de 150 rpm..... | 166 |
| Figura 4.23- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 4:1 e | |

| | |
|---|------------|
| 3,25:1 e 0,5 g de <i>Eversa</i>® <i>Transform</i> 2.0 imobilizada em <i>Sepabeads-C18</i>, em 40 °C e agitação de 150 rpm. | 166 |
| Figura 4.25- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 11:1, 5,4:1 e 3:1, 0,5 g de <i>Eversa</i>® <i>Transform</i> 2.0 imobilizada em <i>Sepabeads-C18</i>, a 40 °C e agitação de 150 rpm.... | 168 |
| Figura 4.26- Avaliação dos ciclos de uso das lipases <i>Eversa Transform</i> e <i>Eversa Transform 2.0</i> na síntese de ésteres etílicos utilizando 0,5 g de lipase imobilizada, razão molar etanol/óleo de girassol de 3,25:1, 40 °C, 150 rpm de agitação em 3 horas de reação. | 169 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 2.1- Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos..... | 82 |
| Tabela 2.2- Resultados obtidos nos sistemas de reação com agitação mecânica e agitação orbital para a produção de ésteres metílicos, utilizando lipase <i>Eversa Transform</i> (1%), razão molar óleo de soja/metanol de 1:4,5 e 2,5% de água em diferentes níveis de agitação..... | 97 |
| Tabela 2.3- Escalonamento da produção de biodiesel por meio dos substratos óleo de soja, óleo de soja com 25, 50 e 75% de AGL, óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual, utilizando a enzima <i>Eversa Transform</i> nas condições reacionais, 1% de <i>Eversa® Transform</i> , 2,5% de água e razão molar metanol/óleo de 4,5:1, em shaker (35 °C/250 rpm). | 97 |
| Tabela 2.4- Caracterização dos lotes de óleo ácido residual quanto ao teor de AGL, glicerol, água e ésteres de ácido graxo. | 98 |
| Tabela 2.5- Valores de FAEE e FAME no reuso da lipase <i>Eversa® Transform</i> quanto a produção de ésteres metílicos ou etílicos (%) a partir de óleo ácido residual e álcool metílico e alcoóis etílicos com as distintas formas de separação, realizados com razão molar álcool/óleo de 3,5:1, água de 0 ou 2% e 0,5% de enzima, incubado em shaker por 8 h (35°C/250rpm). | 103 |
| Tabela 2.6- Resultados dos teores de FAME e FAEE da reação 1 e seu polimento, quanto ao teor de ésteres metílicos ou etílicos (%), realizados com razão molar álcool:óleo 3,5:1, água 0 ou 2% e 0,5% de enzima, incubado em shaker por 8 h (35°C/250rpm)..... | 104 |
| Tabela 3.1- Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos..... | 119 |
| Tabela 3.2- Análises realizadas nos lotes de óleo ácido residual utilizados como matéria-prima na etapa de produção piloto de ésteres metílicos de ácido graxo. | 120 |
| Tabela 3.3- Análises realizadas no lote de gordura residual ácida utilizada como matéria-prima na etapa de produção piloto quanto ao teor de AGL, ésteres de ácidos graxos e triacilgliceróis. | 124 |
| Tabela 4.1- Atividade lipolítica referente a síntese de ésteres etílicos a partir da lipase <i>Eversa® Transform</i> imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação. | 143 |
| Tabela 4.2- Atividade lipolítica referente a síntese de ésteres etílicos a partir da lipase <i>Eversa® Transform</i> 2.0 imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, 0, em 24 horas de reação. | 143 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGL- ácidos graxos livres
- FAME- ésteres metílicos de ácidos graxos
- FAEE- ésteres etílicos de ácidos graxos
- HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência
- CG- cromatografia em fase gasosa
- DAG- diacilgliceróis
- RM- razão molar
- E:O- relação molar etanol:óleo
- M:O- relação molar metanol:óleo
- MAG- monoacilgliceróis
- TAG – triacilgliceróis
- m/m – massa/massa dos substratos (g/g)
- m/v – massa/volume (g/ml)
- ppm – parte por milhão
- rpm – rotação por minuto
- U A- unidade de área
- OFU- óleo de fritura usado
- PEI- polietilenimina
- PAA- ácido poli-acrílico
- pNPB- p-nitrofenol butirato

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|----|
| DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO | 27 |
| INTRODUÇÃO | 37 |
| OBJETIVO | 40 |
| Objetivos Específicos..... | 40 |

Capítulo I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| 1.1 Biocombustíveis | 43 |
| 1.1.1 Biodiesel | 44 |
| 1.1.2 Biodiesel: cenário econômico..... | 45 |
| 1.2 Matérias-primas para a Produção de Biodiesel..... | 47 |
| 1.2.1 Óleo de soja | 49 |
| 1.2.2 Óleo de macaúba | 50 |
| 1.2.3 Óleos de reuso | 51 |
| 1.2.3.1 Resíduos das indústrias de alimentos | 52 |
| 1.2.3.2 Óleo de fritura usado | 53 |
| 1.2.3.2.1 Pré-tratamentos | 55 |
| 1.3 Estratégias para a Produção de Biodiesel | 56 |
| 1.3.1 Processo via catálise química..... | 58 |
| 1.3.2 Processo via catálise enzimática | 59 |
| 1.4 Lipases | 61 |
| 1.4.1 Lipases livres..... | 62 |
| 1.4.2 Lipases imobilizadas | 63 |
| 1.5 Considerações finais..... | 65 |

Capítulo II- PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÁLICOS E ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS UTILIZANDO LIPASE LIVRE *EVERSA® TRANSFORM*

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.1 Introdução..... | 68 |
| 2.2 Material e Métodos..... | 70 |
| 2.2.1 Material..... | 70 |
| 2.2.2 Procedimento Experimental..... | 71 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.2.1 | Pré-tratamento do óleo de fritura usado..... | 71 |
| 2.2.2.2 | Produção de ésteres metílicos de ácido graxo em modo batelada com agitação mecânica..... | 71 |
| 2.2.2.3 | Produção de ésteres metílicos de ácido graxo em modo batelada utilizando agitação orbital | 72 |
| 2.2.2.4 | Verificação da capacidade hidrolítica da enzima <i>Eversa® Transform</i> com e sem NaOH | 74 |
| 2.2.2.5 | Avaliação da cinética reacional na produção de ésteres metílicos de ácido graxo com agitação orbital utilizando diferentes substratos | 74 |
| 2.2.2.6 | Escalonamento em laboratório com agitação orbital utilizando diferentes substratos | 75 |
| 2.2.2.7 | Avaliação da cinética reacional da produção de ésteres metílicos com óleo ácido residual e distintas concentrações de <i>Eversa® Transform</i> | 76 |
| 2.2.2.8 | Reuso da enzima livre e adição da etapa de polimento do biodiesel utilizando óleo ácido residual e diferentes alcoóis..... | 76 |
| 2.2.3.9 | Reuso da enzima <i>Eversa® Transform</i> utilizando óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%)..... | 77 |
| 2.2.3 | Métodos Analíticos..... | 78 |
| 2.2.3.1 | Teor de ácidos graxos livres | 78 |
| 2.2.3.2 | Teor de glicerol livre | 79 |
| 2.2.3.4 | Determinação do teor de ésteres | 80 |
| 2.2.3.5 | Determinação do teor de mono-, di- e triacilgliceróis | 81 |
| 2.2.3.6 | Avaliação das velocidades iniciais de reação de esterificação..... | 82 |
| 2.3 | Resultados e Discussão..... | 83 |
| 2.3.1 | Produção enzimática de ésteres metílicos utilizando óleo de soja..... | 83 |
| 2.3.1.1 | Seleção do sistema reacional para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos..... | 84 |
| 2.3.1.2 | Lipase <i>Eversa Transform</i> na hidrólise de óleo de soja com e sem NaOH..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.1.3 Avaliação da cinética reacional para a produção de ésteres metílicos utilizando óleo de soja..... | 86 |
| 2.3.1.4 Avaliação cinética da reação utilizando <i>Eversa Transform</i> e óleo de soja com alto teor de ácido oleico..... | 90 |
| 2.3.2 Síntese enzimática de ésteres metílicos utilizando óleos de baixo valor agregado..... | 93 |
| 2.3.3 Escalonamento das reações de produção de ésteres metílicos com as matérias-primas estudadas..... | 96 |
| 2.3.4 Estudo dos parâmetros da produção de ésteres de ácido graxo com a lipase <i>Eversa® Transform</i> a partir de óleo ácido residual | 97 |
| 2.3.4.1 Caracterização do óleo ácido residual..... | 98 |
| 2.3.4.2 Cinética de óleo ácido residual com diferentes concentrações da lipase <i>Eversa® Transform</i> | 99 |
| 2.3.4.3 Estudo de reuso da lipase <i>Eversa Transform</i> e adição da etapa de polimento do produto recuperado do meio reacional..... | 101 |
| 2.3.4.3.1 Reuso da enzima livre e polimento do biodiesel utilizando óleo ácido residual e diferentes alcoóis..... | 102 |
| 2.3.4.3.2 Estudo de reuso da lipase <i>Eversa® Transform</i> na síntese de ésteres etílicos..... | 105 |
| 2.4 Considerações Finais..... | 107 |

Capítulo III- PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE REUSO, UTILIZANDO AS LIPASES LIVRES *EVERSA® TRANSFORM* E *EVERSA® TRANSFORM 2.0* EM PLANTA PILOTO

| | |
|---|-----|
| 3.1 Introdução..... | 110 |
| 3.2 Material e Métodos..... | 112 |
| 3.2.1 Material..... | 112 |
| 3.2.2 Procedimento Experimental..... | 113 |
| 3.2.2.1 Descrição da unidade piloto..... | 113 |
| 3.2.2.2 Produção de ésteres metílicos por meio de batelada alimentada em escala piloto..... | 114 |
| 3.2.3 Métodos Analíticos..... | 115 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.3.1 Teor de ácidos graxos livres | 115 |
| 3.2.3.2 Teor de glicerol livre | 116 |
| 3.2.3.3 Determinação do teor de ésteres metílicos de ácido graxo | 117 |
| 3.2.3.4 Determinação do teor de mono-, di- e triacilgliceróis | 118 |
| 3.2.3.5 Avaliação das velocidades iniciais de reação de esterificação | 119 |
| 3.3 Resultado e Discussão | 120 |
| 3.3.1 Produção de ésteres metílicos com óleo ácido residual | 120 |
| 3.3.1.1 Caracterização do óleo ácido residual..... | 120 |
| 3.3.1.2 Produção de ésteres metílicos em escala piloto utilizando óleo ácido residual..... | 121 |
| 3.3.2 Produção de ésteres metílicos utilizando com gordura residual | 123 |
| 3.3.2.1 Caracterização da gordura residual ácida..... | 123 |
| 3.3.2.2 Produção de ésteres metílicos de ácidos graxos em escala piloto utilizando gordura ácida residual..... | 124 |
| 3.4 Considerações Finais..... | 127 |

**Capítulo IV- IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES *EVERSA*[®]
TRANSFORM E *EVERSA*[®] *TRANSFORM 2.0* EM SUPORTES
HIDROFÓBICOS**

| | |
|--|-----|
| 4.1 Introdução | 130 |
| 4.2 Material e Métodos | 132 |
| 4.2.1 Material..... | 132 |
| 4.2.2 Procedimentos Experimentais..... | 133 |
| 4.2.2.1 Caracterização das lipases livres <i>Eversa</i> [®] <i>Transform</i> e <i>Eversa</i> [®] <i>Transform 2.0</i> | 134 |
| 4.2.2.2 Imobilização em diferentes suportes hidrofóbicos | 134 |
| 4.2.2.2.1 Imobilização das lipases <i>Eversa</i> [®] <i>Transform</i> e <i>Eversa</i> [®] <i>Trasnform 2.0</i> | 134 |
| 4.2.2.2.2 Modificação das lipases imobilizadas com polietileno imina..... | 135 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2.2.3 Modificação das lipases imobilizadas em <i>Sepabeads-C18</i> com polietilenimina combinada com ácido poliacrílico | 135 |
| 4.2.2.3 Síntese de ésteres em meio com solvente | 136 |
| 4.2.2.3.1 Síntese de ésteres etílicos e metílicos em solvente orgânico..... | 136 |
| 4.2.2.3.2 Estabilidade das lipase <i>Eversa Transform</i> e <i>Eversa Transform 2.0</i> | 137 |
| 4.2.2.3.2 Ciclos de uso dos derivados em meio com solvente orgânico..... | 138 |
| 4.2.2.4 Síntese de ésteres em meio livre de solvente orgânico..... | 138 |
| 4.2.2.4.1 Síntese de ésteres etílicos e metílicos em meio livre de solvente orgânico | 138 |
| 4.2.2.4.2 Ciclos de uso dos derivados em meio livre de solvente orgânico..... | 139 |
| 4.2.3 Métodos Analíticos | 139 |
| 4.2.3.1 Determinação do teor de ésteres, mono-, di- e triacilgliceróis..... | 139 |
| 4.3 Resultados e Discussão..... | 140 |
| 4.3.1 Caracterização das lipases livres <i>Eversa® Transform</i> e <i>Eversa® Transform 2.0</i> | 140 |
| 4.3.2 Síntese de ésteres em reações de transesterificação com solvente orgânico | 141 |
| 4.3.2.1 Produção de ésteres etílicos em meio com solvente orgânico utilizando as lipases imobilizadas em distintos suportes hidrofóbicos..... | 141 |
| 4.3.2.2 Síntese de ésteres etílicos e estabilidade a solvente orgânico utilizando diferentes suportes hidrofóbicos recobertos com PEI.. | 144 |
| 4.3.2.3 Produção de ésteres metílicos e etílicos com lipases imobilizadas em <i>Sepabeads-C18</i> | 150 |
| 4.3.2.1.1 Efeito de diferentes razões molares de álcool/óleo de girassol na produção de ésteres etílicos e metílicos com derivado de <i>Sepabeads-C18</i> | 151 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2.2 Produção de ésteres utilizando as lipases <i>Eversa® Transform</i> e <i>Eversa® Transform 2.0</i> immobilizadas <i>Sepabeads-C18</i> revestidos com 0,001% de PAA | 155 |
| 4.3.2.2.2 Avaliação dos ciclos de uso utilizando a lipase immobilizada em <i>Sepabeads-C18 Eversa® Transform 2.0</i> na produção de ésteres etílicos..... | 162 |
| 4.3.3 Síntese de ésteres a partir das lipases <i>Eversa® Transform</i> e <i>Eversa® Transform 2.0</i> em meio livre solvente orgânico | 163 |
| 4.3.3.2 Efeito de diferentes razões molares dos substratos álcool:óleo de girassol na produção de ésteres etílicos e metílicos | 165 |
| 4.3.3.3 Avaliação dos ciclos de uso utilizando a lipase immobilizada <i>Eversa® Transform</i> e <i>Eversa® Transform 2.0</i> na produção de ésteres etílicos em meio livre de solvente orgânico | 169 |
| 4.5 Considerações Finais..... | 171 |
| CONCLUSÕES | 173 |
| SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS | 175 |
| PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA..... | 177 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 179 |
| APÊNDICE A- Laudo de qualidade do produto óleo ácido residual..... | 215 |

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*

Por quê?

- Necessidade de sistema de produção de ésteres enzimático viável industrialmente;
- Investigar desafios impostos pelo escalonamento de um processo;
- Comportamento das lipases imobilizadas no sistema de produção de ésteres.

Quem já fez?

- São escassos os estudos na literatura que aliem a produção enzimática de ésteres de ácidos graxos utilizando enzimas comerciais livres e seu reuso; a aplicação das lipases comerciais *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0* em escala piloto e a sua imobilização não é encontrada na literatura.

Hipóteses?

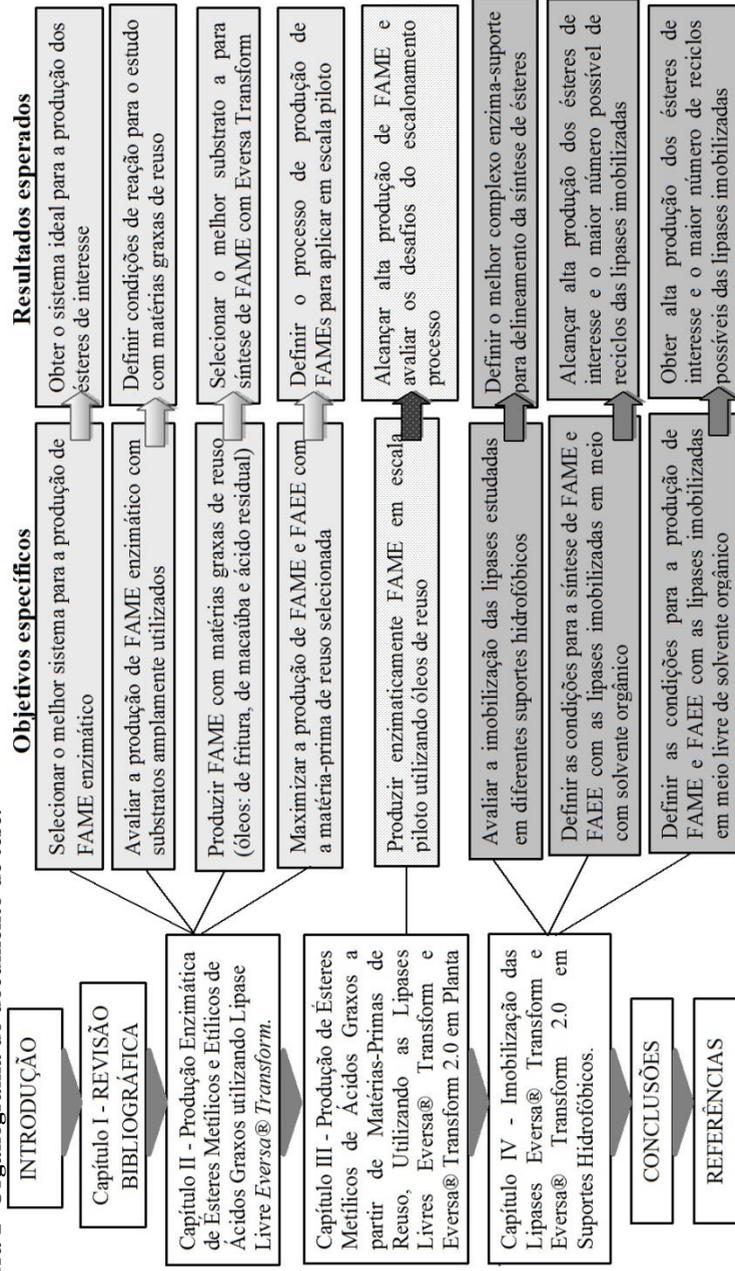
- É possível obter altas conversões de ésteres de ácidos graxos a partir de matérias-primas de baixo custo usando baixa concentração de biocatalisador?
- É possível melhorar a atuação destas lipases mediante sua imobilização?

Como fazer?

- Estudar a produção de ésteres de ácidos graxos com matérias-primas já estudadas e com óleos de baixo custo;
- Empregar a matéria-prima com maior produção de ésteres de ácidos graxos obtida em escala laboratorial para escala piloto;
- Imobilizar as lipases comerciais livres e aplicar na produção de ésteres de ácidos graxos.

A fim de estruturar o trabalho e apresentar os assuntos de forma organizada este trabalho foi estruturado conforme disposto na Figura 1. Os capítulos II, III e IV foram subdivididos em introdução, material e métodos, resultados e discussão e considerações finais.

Figura 1- Organograma do documento de tese.



INTRODUÇÃO

Devido à crescente preocupação com a utilização de combustíveis fósseis, o uso de óleos vegetais para a produção de biocombustíveis como o biodiesel vem ganhando importância significativa nos últimos anos. Comparado com o diesel de petróleo, o biodiesel apresenta vantagens ambientais consideráveis. Estudos do *National Biodiesel Board* (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) mostram que a queima de biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono, 47% menos material particulado (absorvido pelo pulmão) e 67% menos hidrocarbonetos (ANP, 2016). Essas características, aliadas à necessidade de adoção imediata de medidas mitigadoras ou de reversão dos danos já causados ao meio-ambiente, destacam o biodiesel como uma alternativa importante e ambientalmente correta de produção de energia, visando a busca pelo desenvolvimento sustentável (TAN et al., 2010; ATADASHI et al., 2010).

Porém, com a produção do biodiesel, surgiram novos desafios econômicos para a sua comercialização, isso porque a maior parte deste biocombustível é obtida a partir de óleos vegetais, tais como canola, girassol, palma, amendoim e, principalmente soja. Estas matérias-primas têm alto custo, chegando a representar até 80% do custo final do produto, tornando seu valor muito elevado para permitir a sua competitividade no mercado de combustíveis automotivos (ZHANG et al., 2003). Além de que o uso extensivo de óleos comestíveis pode levar a alguns impactos negativos, como a escassez e/ou uma forte alta dos preços destes óleos em países em desenvolvimento e também acaba por provocar impacto negativo no meio ambiente, uma vez que requer grandes quantidades de terras disponíveis (BALAT, 2011; AHMAD et al., 2011).

Com a demanda global de biocombustível renovável crescendo, a exploração de novas matérias-primas para a produção de biocombustíveis é essencial e crítica (BORA et al., 2014). Hoje, a produção de biodiesel sem subsídios ou incentivos fiscais torna-se inviável. Assim, para escolha da matéria-prima adequada e do método correto para a produção de biocombustíveis devem observar-se os aspectos técnico-econômicos do processo. A busca de óleos não-comestíveis para produção de biodiesel é fundamental. Sendo inegavelmente um passo necessário para contornar o problema do abastecimento de energia. E, ao mesmo tempo, apoiar outras atividades

de investigação relacionadas com a química verde, biologia e bioenergia (ACHTEN et al., 2008; SHARMA; SINGH, 2009). Com isso, para a manutenção deste biocombustível no mercado, faz-se necessária a busca de novas fontes de matérias-primas, como as matérias graxas obtidas a partir de rejeitos como óleo de fritura e subprodutos da indústria de óleos, como a borra, óleos com alta acidez, resíduos obtidos da destilação/refino de óleos comestíveis, que se constituem em matérias-primas alternativas e mais baratas, reduzindo o custo final do produto (HAAS, 2005; ECHIM et al., 2009; SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013). Entretanto, esses óleos residuais geralmente apresentam alto teor de ácidos graxos livres (AGL) e, desta forma, não poderiam ser usados diretamente como substrato para a catálise química tradicional, a qual baseia-se no emprego de catalisadores alcalinos, pois a presença de AGL provoca problemas como a neutralização do catalisador e a conseqüente formação de sabões (SHAH; PARIKH; MAHERIA, 2014).

Para contornar os problemas da catálise química, temos a catálise enzimática que mostra-se tolerante à altas quantidades de AGL presente na matéria-prima, além de proporcionar baixa geração de subprodutos, fácil recuperação do biodiesel, glicerina de elevada pureza, condições brandas de reação e possibilidade de reuso do biocatalisador (KULKARNI; DALAI, 2006). A utilização de biocatalisadores como as enzimas na produção de biodiesel apresenta um grande potencial, principalmente por ser uma tecnologia considerada *eco-friendly*. No entanto, ainda existem algumas restrições na aplicação em larga escala, como seu alto custo, a velocidade de reação lenta e possibilidade de desnaturação da enzima (BAJAJ et al., 2010; LAM; LEE; MOHAMED, 2010).

Atualmente, investigam-se duas formas de aplicação de lipases ao processo de produção de biocombustíveis: uso de lipases livres, em meio aquoso, e o uso de lipases imobilizadas em diferentes matrizes. O uso de lipases livres é a alternativa de menor custo, já que não possui custos adicionais com suportes e reagentes para a imobilização; porém são mais instáveis, susceptíveis a desnaturação, e sua reutilização no processo é difícil em comparação às lipases imobilizadas. Já as lipases imobilizadas têm maior valor comercial, porém, a sua atividade e estabilidade são melhoradas; características estas que possibilitam o reuso por diversos ciclos de reação, diluindo assim o alto custo e tornando-se atrativa do ponto de vista industrial.

Com isso, a utilização da biocatálise enzimática para a produção de ésteres de ácidos graxos utilizando óleos residuais é uma alternativa

promissora, combinando benefícios econômicos e ambientais. A utilização de enzimas apresenta-se como uma alternativa viável para operações em larga escala, aliada à alta disponibilidade de resíduos graxos no Brasil, como é caso dos óleos de fritura residuais e demais matérias graxas provenientes das indústrias de óleos e alimentos em geral, que apresentam baixo custo de aquisição, tornam a rota enzimática de produção de biodiesel atraente. O uso de tais matérias residuais evita que estes passem por processos de tratamento onerosos ou que sejam liberados para o meio ambiente sem nenhum tratamento prévio, contaminando solos, rios e mananciais de água, propiciando a produção de biocombustíveis menos poluente, renovável e se apresenta como um passo significativo para o desenvolvimento de processos sustentáveis.

OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o processo enzimático utilizando como biocatalisador as lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* livres e imobilizadas para a produção de ésteres de ácidos graxos, a partir de diferentes matérias-primas, em modo batelada alimentada desde escala laboratorial até escalonamento - planta piloto.

Objetivos Específicos

Capítulo II:

- a) Estudar a síntese de ésteres metílicos com a lipase *Eversa*[®] *Transform* a partir óleo de soja em diferentes sistemas reacionais;
- b) Avaliar a lipase *Eversa*[®] *Transform* na hidrólise de óleo de soja em diferentes condições reacionais;
- c) Avaliar a cinética reacional da produção enzimática de ésteres metílicos utilizando óleo de soja e óleo de soja com alto teor de ácido oleico;
- d) Selecionar um substrato graxo de baixo valor agregado (óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual) para a síntese enzimática de ésteres metílicos utilizando *Eversa*[®] *Transform*;
- e) Investigar o escalonamento em laboratório das reações de síntese enzimática de ésteres metílicos com os substratos graxos estudados;
- f) Estudar a cinética reacional com diferentes concentrações de lipase *Eversa*[®] *Transform* para a obtenção de ésteres metílicos utilizando óleo ácido residual;
- g) Avaliar os ciclos de uso da lipase *Eversa*[®] *Transform* livre na produção de ésteres etílicos e metílicos utilizando óleo ácido residual;
- h) Avaliar o polimento do meio reacional como estratégia para favorecer a formação de ésteres de ácidos graxos.

Capítulo III:

- a) Aplicar a produção enzimática de ésteres metílicos em escala piloto utilizando óleo ácido residual e como biocatalisador a lipase *Eversa*[®] *Transform*, nas condições reacionais investigadas em laboratório;
- b) Verificar a síntese enzimática de ésteres metílicos a partir de gordura ácida em escala piloto utilizando os biocatalisadores *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0*, nas condições reacionais estudadas em laboratório.

Capítulo IV:

- a) Imobilizar as lipases livres *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* em diferentes suportes hidrofóbicos (*Sepabeads-C18*, *Lewatit 1600*, *Purolite-C18*, *Purolite Divinyl*);
- b) Estudar a estabilidade em solvente orgânico (hexano) das enzimas imobilizadas revestidas ou não com polietilenoimina (PEI), para a produção enzimática de ésteres etílicos de ácidos graxos;
- c) Investigar a produção enzimática de ésteres etílicos de ácidos graxos utilizando as lipases imobilizadas revestidas ou não com polietilenoimina (PEI);
- d) Avaliar o efeito da razão molar dos substratos (álcool:óleo de girassol) na produção de ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos utilizando as lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18* em sistema com e livre de solvente orgânico;
- e) Estudar a estabilidade aos substratos com as lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18* modificados com os polímeros iônicos: polietilenoimina (PEI) combinado com ácido poliacrílico (PAA);
- f) Avaliar os ciclos de uso das lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18* na produção de ésteres etílicos de ácidos graxos em sistema com e livre solvente orgânico.

Capítulo I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo consta a fundamentação teórica deste trabalho, trazendo uma breve explanação sobre os biocombustíveis, bem como a apresentação do biodiesel como alternativa ao diesel de petróleo, sua análise no cenário econômico e os desafios para a manutenção da produção, o apontamento de fatores relevantes em seu processo, como as matérias-primas, catalisadores e rotas de produção, apresentando estratégias que visam diminuir seu custo final, e métodos alternativos aos processos de catálise química convencional, utilizando lipases livres e/ou imobilizadas como biocatalisadores.

1.1 Biocombustíveis

Atualmente, a análise do cenário energético mundial indica que ainda vivemos em uma situação de elevada dependência dos combustíveis fósseis, razão pela qual o desenvolvimento de fontes renováveis de energia é uma escolha decisiva para o crescimento sustentável da sociedade (SHAH; PARIKH; MAHERIA, 2014). Esse fator, aliado ao surto de crescimento populacional e ao aumento da demanda por combustíveis, devido ao grande desenvolvimento econômico no setor automotivo, impulsionaram muitos países a buscar fontes de energia alternativas e renováveis, como os biocombustíveis. Assim, a energia renovável tornou-se um dos principais focos de pesquisa na última década, buscando contornar as dificuldades quanto ao abastecimento de petróleo e as implicações que a queima de combustíveis fósseis causa ao meio ambiente.

Embora existam muitas fontes de energia renováveis, como a energia solar, energia eólica e energia hidráulica, os biocombustíveis estão sob acelerado desenvolvimento (GU et al., 2015). No Brasil, aproximadamente 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos são renováveis. Em todo o mundo, 86% da energia provém de fontes de energia não renováveis. Porém, como pioneiro no uso de biocombustíveis, o Brasil avança com pesquisas na busca por fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo (ANP, 2012; ARAÚJO et al., 2013).

O cenário atual nos mostra como os combustíveis de petróleo desempenham um papel significativo no desenvolvimento de diferentes setores, de transportes, industrial e setor agrícola, entre outras aplicações fundamentais para as necessidades humanas (RASHEDUL et al., 2014). Mesmo com a reserva do total desse combustível sendo encurtada a cada dia e que a maioria das energias renováveis cause menor impacto ao ambiente, sua aceitação é muito mais lenta, isso devido a fatores como a falta de oferta de produto e restrições econômicas (MISRA, 2010).

Neste contexto, o biodiesel, mistura de ésteres monoalquílicos resultantes da reação entre um álcool de cadeia curta e um substrato graxo, vem ganhando grande destaque, como um combustível biodegradável e não poluente. Além disso, obtido de uma fonte renovável de energia com maior ponto de fulgor e excelente lubrificidade. Para o meio ambiente, os benefícios do uso de biodiesel incluem as reduções das emissões de gases de escape de material particulado, CO₂ e SO_x (JIANG et al., 2014; JO et al., 2014; KUO et al., 2013).

1.1.1 Biodiesel

Há mais de cem anos, em 1900 a ideia de aproveitar os óleos vegetais como matéria-prima para combustíveis surgiu, sendo que essas experiências com motores de combustão por compressão foram conduzidas por Rudolf Diesel, com o intuito de desenvolver um combustível barato para motores a diesel (SHAY, 1993). Segundo relatos, utilizou-se óleo de amendoim como combustível para fins de demonstração em um protótipo de motor na Exposição Mundial de Paris (SANTIN, 2013). Inúmeras tentativas de utilizar diferentes óleos vegetais e misturas de diesel com óleos vegetais, como combustíveis foram testadas, sem sucesso (ANON, 1982; ADAMS et al., 1983; PETERSON et al., 1983; SCHLICK et al., 1988; SCHLAUTMAN et al., 1986; GOERING, 1984; PRYOR et al, 1983; STRAYER et al., 1983).

A vantagem de óleos vegetais como combustível era a grande disponibilidade, o conteúdo de calor (80% do combustível diesel) e a renovabilidade. Porém, a viscosidade e a baixa volatilidade e a reatividade de cadeias de hidrocarboneto insaturados eram grandes desvantagens (PRYDE, 1983). Os problemas aparecem apenas quando o motor está fazendo uso de óleos vegetais como combustível por longos períodos, especialmente em motores de injeção direta. Além da combustão incompleta do óleo, outro problema grave estava associado à rápida deterioração dos óleos (PETERSON et al., 1983). Durante o

armazenamento, os ácidos graxos poli-insaturados são muito susceptíveis à polimerização, causando a formação de gomas. A goma formada não queimava completamente, resultava em depósitos de carbono e dava espessamento ao óleo (MA; HANNA, 1999). Assim, a ideia de óleos vegetais como combustível foi abandonada, e os derivados do petróleo tornaram-se amplamente disponíveis, dominando o mercado de combustíveis (SHAY, 1993).

A crise energética de 1970, aliada à preocupação sobre a depleção dos recursos não-renováveis no mundo, proveram incentivos para a busca de alternativas aos combustíveis convencionais à base de petróleo (DALLA ROSA, 2009; TALEBIAN-KIAKALAEH et al., 2013). Assim, em 1977, foi registrada a primeira patente para um processo industrial para a produção de um novo biocombustível “biodiesel”, por Expedito Parente, um cientista brasileiro da Universidade Federal do Ceará (UFC), que pesquisou um novo processo com base na biomassa para encontrar fontes alternativas de energia (LIM; TEONG, 2010). As experiências acabaram revelando um novo combustível originário de óleos vegetais e com propriedades semelhantes às do óleo diesel, o biodiesel (PARENTE, 2003). Assim, o nome “biodiesel” foi dado ao óleo vegetal transesterificado para descrever seu uso como combustível em motores do ciclo diesel (CERBIO, 2006).

Numa definição mais completa, o biodiesel é uma mistura de ésteres monoalquílicos resultantes de uma reação química entre um álcool de cadeia curta e um substrato graxo, geralmente óleo vegetal ou gordura animal, na presença de um catalisador (GERPEN, 2005). É considerado um substituto ao combustível diesel, ou seja, pode ser utilizado em veículos automotivos e motor diesel sem necessidade de grandes modificações no motor (LUQUE et al., 2010).

1.1.2 Biodiesel: cenário econômico

Em caráter mundial observa-se que novas políticas são propostas para apoiar a produção de biodiesel, na forma de subsídios e isenções fiscais (FERNANDEZ; LIU; ZHAO 2017; GERALDES et al., 2014). Um dos pioneiros a estabelecer esse apoio é o Brasil, que atualmente é o segundo maior produtor em combustíveis renováveis, tanto o biodiesel como o etanol, ficando apenas atrás dos Estados Unidos em ambas as categorias (REN21, 2015). O Brasil contou com a produção anual de 3,5 bilhões de litros em 2016, e uma capacidade

instalada, no mesmo ano, para cerca de 7,9 bilhões de litros. Essa produção teve incentivo devido à inserção pelo Governo Federal, em dezembro de 2004, do biodiesel na matriz energética brasileira com a criação de seu marco regulatório, por meio da Medida Provisória 214, convertida na Lei 11.097/2005, que autorizou a mistura de 2% em volume de biodiesel ao diesel (B2). Nos dias atuais, todo óleo diesel comercializado em todo o território nacional contém a mistura obrigatória de 7% de biodiesel, estabelecido pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). Todo o biodiesel produzido no Brasil deve atender à especificação estabelecida pela Resolução ANP n° 7/2008. Atualmente, existem 56 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 21 mil m³/dia (ANP, 2016).

De acordo com a Agência Internacional de Energia (*International Energy Agency*), os biocombustíveis têm potencial para atender a mais de um quarto da demanda mundial por combustíveis de transporte até 2050 (WORLD AGROFORESTRY CENTRE, 2009). A rápida expansão da capacidade de produção está sendo observada não só nos países desenvolvidos, como a Alemanha, Itália, França e Estados Unidos, mas também em países em desenvolvimento, como o Brasil, Argentina, Indonésia e Malásia (SANTOS et al., 2012). O biodiesel é o principal biocombustível nos transportes europeus: numa quota de 78% do consumo total de biocombustíveis, 57% correspondem a biodiesel e 21% a bioetanol (KOÇAR; CIVAS, 2013).

O fator limitante para o desenvolvimento e uso de biodiesel é o seu alto custo de produção, do qual a despesa com matéria-prima representa cerca de 80% do custo total de obtenção (LIM; TEONG, 2010). O preço da matéria-prima é um fator crucial na estratégia de produção para que o biodiesel se torne competitivo com os combustíveis fósseis, hoje maioria no mercado (HUANG et al., 2015). Essas matérias-primas de alto custo são as chamadas de “primeira geração” baseadas em óleos vegetais comestíveis, como por exemplo, óleos de girassol e de soja. O seu uso deve-se à grande disponibilidade e também à necessidade de matérias-primas de alta qualidade, com baixos teores de ácidos graxos livres, fundamental para a catálise via química, que hoje representa a principal rota de produção de biodiesel industrial.

Com o uso destas matérias-primas, a produção deste biocombustível passou a ser confrontada com muitas críticas a partir do contexto da segurança alimentar (TAKASE et al., 2015). O plantio em larga escala de culturas alimentares para o biodiesel tem levado muitos países a demolir suas florestas, o que resultou em um grave

desequilíbrio ecológico, além do fato de não destinar terras férteis ao plantio de alimentos à população, agravando problemas como a fome e a desnutrição que afetam principalmente países em desenvolvimento (GUI; LEE; BHATIA, 2008). Assim matérias-primas chamadas de “segunda geração” ganharam destaque, destinadas a reduzir a dependência de óleos vegetais comestíveis, e são baseadas em fontes não alimentares, tais como pinhão manso, óleo de macaúba, óleos usados, óleos reciclados e gorduras de origem animal (AHMAD et al., 2011; PINZI et al., 2014).

As matérias-primas de segunda geração trazem vantagens, como a possibilidade de ser cultivadas a partir de terras não agrícolas, eliminando assim a concorrência com a produção de alimentos e o reaproveitamento de matérias-primas que não tem destino rentável, que, se descartados incorretamente, são grandes poluidores de nascentes, mananciais e rios. A investigação da produção de biodiesel a partir de óleos não comestíveis é uma estratégia que traz múltiplos benefícios, como o combate à pobreza para a população rural pobre, ajudando a melhorar o setor rural não agrícola, e garantir a produção sustentável de energia (TAKASE et al., 2015).

1.2 Matérias-primas para a Produção de Biodiesel

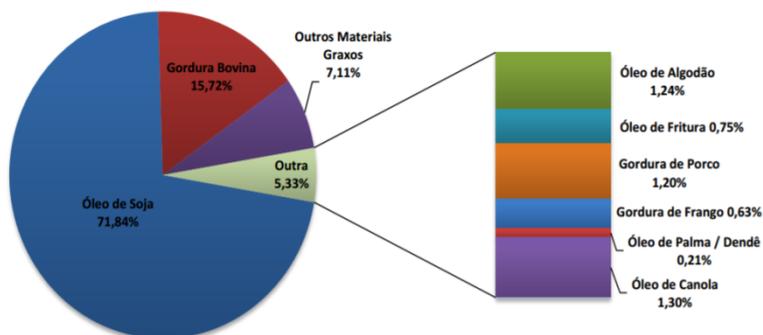
Óleos e gorduras são substâncias de origem vegetal, animal ou microbiana, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. São formados, principalmente, por triacilgliceróis (TAG) compostos por três moléculas de ácidos graxos esterificados em uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, com cadeia alifática longa, não ramificada, saturada, monoinsaturada ou poli-insaturada (CURI et al., 2002; BACKES, 2011). Os ácidos graxos saturados apresentam apenas ligações simples, sendo principalmente encontrados em alimentos de origem animal. Os ácidos insaturados possuem uma dupla ligação ou mais na cadeia, e estão presentes em óleos vegetais e peixes de origem marinha (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; CURI et al., 2002).

As matérias-primas para a produção do biodiesel podem ser de origem vegetal (óleo de soja, mamona, canola, palma, girassol e amendoim, entre outros) ou animal (sebo bovino, suíno e de aves), podendo-se também incluir o uso de matérias-primas como óleo de fritura usado e outros óleos de reuso. Como pode ser observado na Figura 1.1, no Brasil, a principal matéria-prima para a produção do

biodiesel é o óleo de soja refinado, que representa mais de 70% da matéria-prima utilizada na produção biodiesel. A gordura bovina desempenha um papel importante e outras matérias-primas, como óleo de semente de algodão, óleo de fritura, óleo de palma, óleo de canola, gordura de frango e de porco, representam menos de 10%. No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor em óleo vegetal, produtividade, adaptação territorial e a região produtora (RAMOS et al., 2003). Um fato a ser considerado para baixar custos de fabricação é a utilização de óleos degomados que apresentam menor custo que óleos refinados, além da possibilidade da reciclagem de óleos na produção deste biocombustível (AKGUN; IYSCAN, 2007; SILVA, 2009).

Figura 1.1- **Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.**

novembro/ 2016



Fonte: ANP (2016).

Outro fator importante na produção desses biocombustíveis é o tipo de álcool a se utilizar na reação de transesterificação. No Brasil, atualmente, uma das vantagens da rota etílica frente à metílica, pode ser considerada a oferta desse álcool, de forma disseminada em todo território nacional. O metanol é o álcool mais usado para a síntese do biodiesel, em grande parte devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo (REYERO et al., 2015). No entanto, a transesterificação dos TAGs presentes nos óleos vegetais e gorduras animais, pode ser realizada com ambos os álcoois de cadeia curta, etanol (etanólise), o que

dá origem aos correspondentes ésteres etílicos (FAEEs) e com metanol (metanólise) os ésteres metílicos (FAMEs) (STAMENKOVIĆ; VELIČKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2011; BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

1.2.1 Óleo de soja

A soja representa 55% da produção mundial de oleaginosas e representa 90% do óleo vegetal produzido no Brasil, justamente uma das oleaginosas com uns dos menores teores de óleo por unidade de peso, cerca de 17 a 22%. A razão por que a soja responde pela maior parcela do óleo vegetal brasileiro tem outras causas: uma cadeia produtiva bem estruturada, conta com tecnologias de produção bem definidas, modernas e existe uma ampla rede de pesquisa que assegura pronta solução de qualquer novo problema que possa aparecer na cultura. Ainda, oferece rápido retorno do investimento (ciclo de 4 a 5 meses) é dos produtos mais fáceis para vender, porque são poucos os produtores mundiais (EUA, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai), pouquíssimos os exportadores (EUA, Brasil, Argentina e Paraguai), mas muitíssimos os compradores (todos os países), resultando em garantia de comercialização.

Também, pode ser armazenada por longos períodos, aguardando a melhor oportunidade para comercialização, é um dos óleos mais baratos, só é mais caro do que o óleo de algodão e que a gordura animal, e seu óleo pode ser utilizado tanto para o consumo humano, quanto para produzir biodiesel ou para usos na indústria química (BIODIESELBR, 2015). Esses fatores, aliados à boa estabilidade do óleo e ao seu baixo teor de AGL, o tornam o óleo mais utilizado para a produção de biodiesel, cerca de 80% da produção brasileira, o que acaba encarecendo o biodiesel pelo alto custo e pela competição com o consumo alimentar.

A soja pertence à família Leguminosae e a espécie cultivada é a *Glycine max* (L.) Merrill., o grão de soja contém, como citado anteriormente, entre 17 e 22% de óleo em sua composição e 40% de proteína (MARCOS FILHO, 1987). É uma cultura com várias características favoráveis: primeiro, a soja tem a capacidade de fixar nitrogênio, o que faz com que ela se constitua em uma boa opção de rotação de cultura, em segundo lugar, a soja é adaptável a uma vasta gama de solos e climas; em terceiro lugar, a soja tem a notável capacidade de produzir proteína comestível, mais que qualquer outra leguminosa conhecida, e responde por 69% e 94% do farelo consumido

mundialmente e nacionalmente, respectivamente (LIU, 2004; BIODIESELBR, 2015). Considerando-se toda a produção mundial de soja, 16,21% tornam-se óleo. Explica-se esta diferença por que parte da soja é consumida *in natura* na alimentação humana e animal, apesar do consumo ser preponderantemente industrial (ALAMBERT, 2010).

As evidências históricas e geográficas indicam que a soja teve origem no norte da China, e seu cultivo na região começou há cerca de 5.000 anos. Gradualmente, a soja foi transformada em vários alimentos pelos chineses, incluindo tofu, leite de soja, pasta de soja e molho de soja, entre outros. Assim, o cultivo da soja foi introduzido no Japão, Coreia, entre outros países do Extremo Oriente há cerca de 1.100 anos atrás. A soja foi introduzida pela primeira vez na Europa e América do Norte no século 18. No entanto, somente em meados de 1900 a produção começou a despertar interesse nos Estados Unidos.

Milhares de novas variedades foram trazidas, principalmente da China, durante este período. Até 1954, a China liderou o mundo na produção de soja. Desde então, os Estados Unidos tornaram o líder mundial (LIU, 2004). No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia em 1882 e levada para São Paulo em 1892. No Rio Grande do Sul, foi cultivada pela primeira vez em 1900 e, em 1936 ocorre o início da expansão desta cultura no Estado (COSTA, 1996). Na década de 1980, foi introduzida na região dos Cerrados, tornando-se a cultura anual de maior área plantada no país (ALAMBERT, 2010).

1.2.2 Óleo de macaúba

A fim de aumentar a competitividade comercial do biodiesel, para assegurar a disponibilidade de biocombustíveis e melhorar o uso dos recursos regionais, espera-se que oleaginosas não comestíveis irão aumentar a sua participação como matéria-prima alternativa para a produção de biodiesel (BERGMANN et al., 2013; HAMA, KONDO 2013). A Macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart é uma palmeira oleaginosa nativa do Cerrado brasileiro, amplamente distribuída nas Américas tropicais e subtropicais (HENDERSON et al., 1995; LORENZI, 2010). É amplamente conhecida pelas propriedades do óleo de sua fruta, concentradas no mesocarpo e na amêndoa, com aplicações variadas e numerosas nos setores industriais e de energia, atingindo diferentes mercados de consumo (FORTES; BAUGH, 2004; BORA; ROCHA, 2004).

Com potencial para ser usada como uma matéria-prima alternativa às indústrias regionais no Brasil, devido à sua alta

produtividade e rusticidade (HIANE et al., 2005, TEIXEIRA, 2005; BANDEIRA, 2008). Esta palma apresenta alta produtividade com um potencial de produção de 6.000 kg de óleo por hectare. Essa característica é de extrema importância, especialmente em um país como o Brasil, onde o biodiesel é produzido principalmente a partir de óleo de soja (80%). Considerando-se que um terço da produção de soja no Brasil é destinado à produção de biodiesel e em comparação com a produtividade de óleo de soja, 400-700 kg de óleo por hectare por ano, a macaúba aparece como uma fonte alternativa promissora (USDA, 2011; CAIRES; FERRARI; MORGANO, 2003).

O óleo extraído da polpa da macaúba é rico em ácido oleico, em torno de 50% e de 25% de ácido palmítico (COIMBRA; JORGE, 2012), portanto, quando se considera a estabilidade termo-oxidativa e a viscosidade relacionada com a composição química, os ésteres de óleo de polpa de macaúba constituem uma excelente matéria-prima para a produção de biodiesel (BASSO et al., 2013; LOPES et al., 2013). No entanto, este óleo tem teor de AGL elevado e não pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel por meio da rota alcalina convencional. Neste caso, a síntese de biodiesel pode ser realizada pelo processo via catálise enzimática, rota esta que traz inúmeras vantagens, entre elas a possibilidade de empregar matérias-primas consideradas de baixa qualidade, pela alta concentração de ácidos graxos, e que geralmente apresentam menor preço de mercado (AGUIEIRAS et al., 2014).

1.2.3 Óleos de reuso

Os conceitos intrínsecos da química verde e da biorefinaria compreendem a concepção de produtos químicos que sejam menos agressivos ao ambiente e que utilizem matérias-primas provenientes de recursos renováveis ou a partir de resíduos abundantes (SHELDON et al., 2007; SANTOS et al., 2010). A partir desta perspectiva, a escolha de matérias-primas deve ser feita com base em considerações técnicas e econômicas para que se consiga um processo sustentável.

O uso extensivo de óleo alimentar, como discutido anteriormente, pode levar a alguns impactos negativos, como a fome e os preços mais altos dos alimentos nos países em desenvolvimento (BALAT, 2011). Por exemplo, na Malásia, as refinarias de biodiesel criaram escassez de óleo de palma. Portanto, o preço do óleo de palma para cozinhar aumentou 70% (TENENBAUM, 2008). A subida dos preços

dos alimentos pode ser benéfica para os produtores agrícolas pobres, mas, ao mesmo tempo, eles não representam o mesmo benefício para a população urbana pobre (THOMPSON, 2011). Com isso, muitos dos pesquisadores concordam que os óleos não comestíveis são a alternativa adequada para substituir os óleos comestíveis na produção de biodiesel. Assim, o foco recente é encontrar matérias-primas de óleo não-comestíveis para a produção de biodiesel (CHHETRI, 2008).

1.2.3.1 Resíduos das indústrias de alimentos

Os resíduos, como borra, óleos ácidos e destilados desodorizados, obtidos durante a refinação de óleos vegetais, são apontados como matérias-primas alternativas e mais baratas para o biodiesel (HASS, 2005; ECHIM et al., 2009; SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013). Os principais componentes de óleos ácidos são os AGL, apesar destes possivelmente conterem conteúdos de TAGs, MAGs e DAGs. Com isso, estes óleos são praticamente sólidos à temperatura ambiente, já que o ponto de fusão dos AGL é mais elevado.

Tais óleos com um elevado teor de AGL não poderiam ser aproveitados como matéria-prima em métodos de processamento convencionais, utilizando catalisadores alcalinos homogêneos (SHIBASAKI-KITAKAWA et al., 2015). Pois, na catálise alcalina, grandes quantidades de sabões são formadas a partir da reação entre AGL e o catalisador alcalino. Com a formação de sabões, o catalisador alcalino será consumido, e como consequência, o desempenho catalítico diminuirá, já que a concentração do catalisador será reduzida. Além disso, também irá ocorrer a emulsão da mistura (ésteres, óleo residual, ácidos, sabões e glicerol), de modo que a separação dos ésteres formados será muito difícil (SHU, 2015).

O limite aceitável de teor de AGL para a reação de transesterificação convencional, por meio de catalisador alcalino, é de 2% (HAYYAN et al., 2013; HAYYAN et al., 2011a). Muitos pesquisadores vêm estudando a produção de biodiesel a partir de óleos de ácido residuais (LEUNG; WU; LEUNG, 2010; LEE; SAKA, 2010; ATADASHI, 2013; ISLAM et al., 2013). Porém, ainda não há um processo comercialmente viável para converter óleos ácidos em biodiesel que satisfaça plenamente as especificações internacionais (SHIBASAKI-KITAKAWA et al., 2015).

Alguns estudos utilizando óleos de alto teor de AGL para a produção de biodiesel utilizam em sua maioria catalisadores, como líquidos iônicos combinados a catalisadores alcalinos (MAN et al.,

2013), ácidos heterogêneos e homogêneos (MENGYU et al., 2009), catalisadores ácidos heterogêneos à base de carbono (NAKAJIMA ; HARA; 2007; SHU et al., 2010; HARA, YOSHIDA; TAKAGAKI; 2004; SHU et al., 2009; TODA; TAKAGAKI; OKAMURA , 2005; SHU et al., 2011; MO et al., 2008), resinas de troca iônica (FENG et al., 2010; SHIBASAKI-KITAKAWA et al., 2015) e tecnologia supercrítica (LUQUE et al., 2008; MARCHETTI; ERRAZU, 2008).

Porém, a aplicação com catalisadores ácidos na produção de biodiesel é limitada devido a questões como segurança e elevado custo, fazendo-se necessário o estudo da reciclagem do catalisador como meio de viabilizar o processo (HAYYAN; HASHIM; HAYYAN 2014). Outras características negativas da catálise ácida, em comparação com o processo alcalino são: menores velocidades de reação, condições mais severas de produção (temperaturas elevadas, maior razão molar entre metanol e óleo e maiores quantidades de catalisador) e a formação de produtos secundários indesejáveis, tais como éteres ou dialquílicos, tornando-se menos atraente para os fins industriais (KHAN et al., 2014; LUQUE et al., 2008). E, quando o ácido é heterogêneo, pode ocorrer a desativação desse devido à presença de água, a qual é normalmente produzida a partir da reação de esterificação (MARCHETTI, 2012).

Assim, acredita-se que as enzimas são as melhores opções para a produção de biodiesel, pois elas podem facilmente converter AGL, bem como os TAGs, em biodiesel a partir de óleos não comestíveis com conversões elevadas (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). No entanto, seu alto custo de produção limita a sua empregabilidade (BAJAJ, et al., 2010). Sendo assim, há a necessidade de mais pesquisas para explorar novas tecnologias para a produção enzimas, considerando a viabilidade econômica para a atração industrial. São escassos na literatura os estudos envolvendo a produção de biodiesel a partir de enzimas utilizando como substrato óleos ácidos residuais.

1.2.3.2 Óleo de fritura usado

Óleo de fritura usado (OFU) é uma excelente matéria-prima para a produção de biodiesel, que apresenta grande disponibilidade em termos globais. Em todo o mundo a quantidade anual de OFU depende do consumo de óleo vegetal refinados. Países como os Estados Unidos geram 0,7-1 milhões de toneladas de OFU por ano (HAMZE; AKIAA; YAZDANIA, 2015). O Reino Unido e Canadá produzem anualmente

0,2 e 0,135 milhões de toneladas, respectivamente. A geração anual na China e no Japão é estimada em cerca de 4,5 e 0,6 milhões de toneladas, respectivamente (BALAT; BALAT, 2010; DIYA'UDDEEN et al., 2012). No Brasil, o consumo de óleos vegetais por família é de aproximadamente 7 kg/ano (IBGE, 2013a). Assumindo uma perda percentual máxima de 18%, devido à quantidade de óleo absorvido pelo alimento durante a fritura, supondo que existem 57.320.555 famílias no país, é possível chegar a uma estimativa de geração de óleos usados 0,3 milhões de toneladas ano (AMORIM; JUNQUEIRA; JOKL 2010; IBGE, 2013b).

Portanto, a produção de biodiesel a partir de óleos de fritura usado não só fornece uma solução para a poluição ambiental, devido ao descarte incorreto desse, ele também poderia melhorar a economia viabilizando a produção de biodiesel com menores custos, inclusive menores que o diesel de petróleo (FARAG et al., 2011; ESCOBAR et al., 2009; MENG et al., 2008). Assim, o aproveitamento dos óleos residuais de fritura para a produção de biodiesel representa uma solução de múltiplas vantagens, contribuindo tanto para a revalorização de um resíduo que, não sendo tratado adequadamente, acaba por poluir o meio ambiente ou provocar entupimentos na tubulação de esgotos, como também para a melhoria da qualidade do ar nas grandes cidades por meio da substituição do óleo diesel por um combustível renovável e mais limpo, trazendo benefícios ambientais e econômicos para a produção de biodiesel nos grandes centros metropolitanos (BOTELHO, 2012).

Atualmente, a produção mundial de óleos e gorduras é de cerca de 154 milhões de toneladas (MPOC, 2008). A maior parte desse óleo é usada para fritura, e pode causar problemas de eliminação após seu uso. O aproveitamento destes óleos residuais em outros setores, como no de ração animal, é proibido, isso porque, durante processo fritura, muitos compostos nocivos são formados. Eventualmente, estes compostos nocivos entrarão em nossa cadeia alimentar novamente durante consumo de carne animal (KULKARNI; DALAI, 2006).

Durante a fritura, o óleo é aquecido sob condições atmosféricas à temperatura de 160-190 °C (GAZMURI; BOUCHON, 2009). Com isso, ele desencadeia várias reações químicas, tais como a polimerização, a hidrólise e a oxidação, devido à sua reação à luz, ao calor e ao oxigênio. Como resultado, forma diferentes compostos químicos, tais como dímeros, polímeros, TAGs oxidados, DAGs e AGL (SHARMA et al., 2012). Com isso, o óleo de cozinha usado pode conter entre 0,5 e 15 % de AGL, o que o torna por muitas vezes inviável na

rota alcalina de produção de biodiesel (KNOTHE; JURGEN, 2004). O uso de lipase como catalisador elimina o problema de saponificação dos AGL, transformando toda a matéria graxa em biodiesel, alargando assim a gama de matérias-primas a serem aproveitadas (HALIM; KAMARUDDIN, 2008; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; BERCHMANS; HIRATA, 2008).

Geralmente, tendo em vista a qualidade do óleo de fritura, muitas vezes é necessária a aplicação de algum método de pré-tratamento, com o intuito de cumprir os padrões de qualidade exigidos para a reação de transesterificação. Poucos estudos na literatura avaliam os custos adicionais devido à etapa de pré-tratamento. No entanto, mesmo com esse custo adicional, ainda é possível ver uma melhora significativa na viabilidade econômica do processo de produção do biodiesel a partir de óleos residuais, em comparação com óleos refinados (YAAKOB et al., 2013). Alcançando redução de até 45% dos custos diretos de produção do biocombustível, mesmo com os custos adicionais de pré-tratamento (ZHANG et al., 2003b).

1.2.3.2.1 Pré-tratamentos

O óleo de fritura que será submetido ao processo de transesterificação passa por uma análise para identificar a presença de compostos indesejáveis e impurezas que devem ser eliminadas. Geralmente, o óleo necessita apenas de um processo de filtração para a remoção de partículas sólidas em suspensão. No entanto, em alguns casos, o óleo apresenta um alto nível de degradação, o que pode levar a menor rendimento de ésteres, com isso, surge a necessidade de algum pré-tratamento, tais como: injeção de vapor, neutralização, evaporação a vácuo ou filtração a vácuo (KULKARNI; DALAI, 2006).

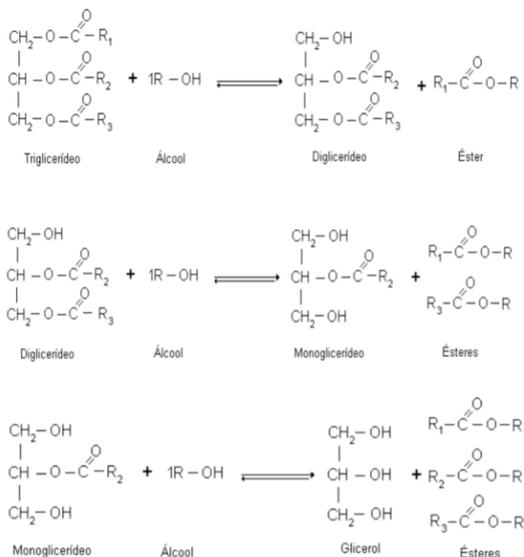
Outros métodos de pré-tratamento também são relatados na literatura, como: métodos de filtração para remoção de sólidos em suspensão, secagem em forno microondas, neutralização de AGL (catálise química), remoção de polímeros por meio do uso de carvão ativado, adição de sulfato de magnésio como agente de secagem, uso de ácidos fosfórico para remoção de gomas, centrifugação para a remoção de sólidos em suspensão e secagem com cloreto de cálcio (CVENGROS; CVENGROSOVA, 2004; SAIFUDDIN; CHUA, 2004; FELIZARDO et al., 2006; PREDOJEVIC, 2008). Embora a remoção de compostos indesejáveis, como água, AGL e polímeros, antes de transesterificação, possa melhorar o desempenho da reação de produção

de ésteres, pré-tratamentos tendem a aumentar os custos do processo. Com isso, é crucial uma análise minuciosa dos métodos a serem empregados em cada processo (ARAÚJO et al., 2013).

1.3 Estratégias para a Produção de Biodiesel

O biodiesel pode ser obtido por diferentes estratégias como a pirólise, diluição (mistura direta), microemulsão, esterificação e transesterificação. Processos de diluição, pirólise e microemulsão não são preferidos devido ao longo tempo reacional para a obtenção de alta produção, apesar da simplicidade desses (LIN et al., 2011). Assim, o método mais comum de produção é a partir de óleos vegetais, gorduras animais, ou de óleo de microalgas, por meio da transesterificação de triacilglicerol com um álcool de cadeia curta, usando catalisadores alcalinos, ácidos ou enzimas. A Figura 1.2 apresenta as reações intermediárias da reação de transesterificação entre um triacilglicerol e um álcool de cadeia curta.

Figura 1.2- **Reações intermediárias da reação de transesterificação entre um triacilglicerol e um álcool de cadeia curta.**



Fonte: TRENTIN (2010).

Na reação de transesterificação dos óleos vegetais, um triacilglicerol reage com um álcool na presença de um catalisador (enzimático, ácido ou base), produzindo uma mistura de ésteres e glicerol. Conforme Meher et al. (2006), a reação estequiométrica exige 1 mol de um triacilglicerol e 3 moles do álcool, resultando na produção de 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol. Acredita-se que três sucessivas e reversíveis reações aconteçam. O primeiro passo é a conversão de um triacilglicerol (TAG) a um diacilglicerol (DAG), seguido pela conversão de um diacilglicerol a monoacilglicerol (MAG) e do monoacilglicerol para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídio a cada fase da reação (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000).

Os processos convencionais apresentam pelo menos dois obstáculos: o primeiro refere-se a uma limitação na transferência de massa e de baixa velocidade da reação devido ao sistema bifásico de mistura entre óleo e álcool. O segundo é a dificuldade de purificação do produto (isto é, a remoção de impurezas, tais como sabões, catalisadores residuais, vestígios de metanol, glicerol e água) (DORADO et al., 2004). Para superar esses obstáculos, uma série de novas abordagens vem sendo estudadas, como catalisadores heterogêneos, catalisadores nano cristalinos MgO (VERZIU et al., 2008), óxidos metálicos CaO (YOOSUK et al., 2010), catalisador magnético sólido composto de Ca/Al/Fe₃O₄ (TANG et al., 2012), funcionalizante SBA-15 (XIE et al., 2014) desenvolvidos para facilitar a separação entre catalisadores e volume reacional, e aumentar os rendimentos de biodiesel.

Novos processos de reação e reatores também são investigados, tais como processos supercríticos (WARABI et al., 2004, TRENTIN et al., 2011a,b) e uso de ultrassom (HSIAO et al., 2010, CHOUDHURY et al., 2013, BATISTELA et al., 2012). Além disso, co-solventes, tais como hexano, benzeno, tetrahidrofurano (THF) (GRYGLEWICZ et al., 1999) e líquidos iônicos (GUO et al., 2011; LAPIS et al., 2009), são introduzidos para melhorar a miscibilidade entre óleo e álcool. Apesar dos avanços tecnológicos, muitos destes novos métodos apresentam limitações, como: baixo rendimento, processos sofisticados, alto consumo de energia, altos custos, e riscos ambientais (GU et al., 2015).

Diversos aspectos, incluindo o tipo de catalisador (enzimático, alcalino ou ácido), relação molar entre álcool/óleo vegetal, temperatura, pureza dos reagentes, temperatura da reação, tipo de álcool utilizado, uso de co-solvente e presença de água e de AGL, afetam a velocidade de reação (SCHUCHARDA et al., 1998). Neste sentido, a seguir, são

apresentadas de forma sucinta as principais rotas tecnológicas utilizadas para a produção de biodiesel.

1.3.1 Processo via catálise química

Processos industriais atuais para a produção de biodiesel utilizam amplamente a transesterificação alcalina homogênea de óleos comestíveis, com alto rendimento (cerca de 98%) e em um curto tempo de reação (cerca de 1 h). No entanto, este processo tem algumas desvantagens: dificuldade de separar o catalisador do glicerol, produção de águas residuais altamente alcalinas e exigência de alta qualidade/alto preço de matérias-primas, pela exigência do baixo teor de AGL e de baixo teor de água, a fim de evitar a formação de sabões (AGUIEIRAS et al., 2014).

As bases homogêneas geralmente utilizadas são o hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) (FELIZARDO et al., 2006; KULKARNI; DALAI, 2006). Estes catalisadores são amplamente disponíveis e econômicos (LOTERO et al., 2005). De fato, foi relatado que a velocidade para a reação catalisada por base seria 4.000 vezes mais rápida em comparação com catalisador ácido (FUKUDA et al., 2001; KULKARNI; DALAI, 2006). No entanto, a utilização do presente catalisador é limitado apenas por óleo vegetal refinado com menos do que 0,5% de AGL ou o índice de acidez inferior a 1 mg de KOH/g (WANG et al., 2006; FELIZARDO et al., 2006). Alguns investigadores relataram que o catalisador básico pode tolerar maior teor de AGL, 0,5-2%. Assim, para os resíduos de óleo de cozinha, óleos ácidos, borras, etc., com um teor médio de AGL superior a 5%, o catalisador alcalino não é adequado para ser utilizado no processo (LOTERO et al., 2005; LAM; LEE; MOHAMED et al., 2010).

Além de que, com elevado teor de água em óleos residuais, o rendimento do éster também pode ser afetado (LAM; LEE; MOHAMED et al., 2010). Quando a água está presente, particularmente a temperaturas elevadas, pode ocasionar a hidrólise TAG, DAG e MAG formando AGL. Além das demais desvantagens, os sabões tendem a solidificar à temperatura ambiente e, assim, uma mistura de reação pode formar uma massa semi-sólida que é muito difícil de recuperar (FELIZARDO et al., 2006).

Diversos estudos têm investigado as variáveis que afetam o desempenho e as características do biodiesel produzido a partir de óleo frito usado, empregando como catalisadores KOH e NaOH. Reefat et al. (2008) e Phan e Phan (2008) utilizaram estes catalisadores KOH e

NaOH nas concentrações (0,5% e 1,0%), temperatura de reação (25 e 65 °C) e razão molar metanol/óleo (3:1, 6:1 e 9:1), sendo os melhores rendimentos em ésteres alcançados com KOH. Ou seja, o KOH proporciona a maior velocidade de reação em relação ao catalisador NaOH (DORADO et al., 2004). Já catálise ácida é uma alternativa que não enfrenta limitações pelo teor de AGL do óleo, pois o ácido pode catalisar simultaneamente esterificação e transesterificação. No entanto, apesar de sua insensibilidade para AGL na matéria-prima, a transesterificação catalisada por ácido deixa a reação relativamente mais lenta, é necessário uma grande quantidade de energia e os fluidos são difíceis de manusear, causando problemas de corrosão em equipamentos e produção de resíduos ácidos, com graves impactos ambientais (AL-ZUHAIR et al., 2007; WANG et al., 2006). Jacobson et al. (2008) estudaram diferentes tipos de catalisadores ácidos sólidos, como $\text{MoO}_3/\text{SiO}_2$, $\text{MoO}_3/\text{ZrO}_2$, WO_3/SiO_2 , Al_2O_3 e estearato de zinco em suporte de sílica, quanto à produção de biodiesel a partir de óleo fritura, sendo o estearato de zinco imobilizado em sílica gel considerado o catalisador mais estável e eficaz. O catalisador foi reutilizado várias vezes sem qualquer perda na atividade e a conversão de ésteres foi de 98%.

Embora a transesterificação química proporcione níveis elevados de conversão dos TAG aos seus correspondentes alquil ésteres de ácidos graxos, este processo traz uma série de desvantagens, como: grande gasto de energia, a recuperação do glicerol é difícil, o catalisador ácido ou alcalino tem que ser retirado do produto, o efluente alcalino requer tratamento, além de não ser um processo considerado “verde” (MEHER et al., 2006; FUKUDA et al., 2001).

1.3.2 Processo via catálise enzimática

A síntese de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores vem atraindo o interesse de pesquisadores e produtores de biodiesel, por ser uma abordagem verde para a produção de um combustível renovável por meio de um catalisador biológico. A catálise enzimática mostra elevado grau de pureza dos produtos, maior flexibilidade na matéria-prima, menor geração de efluentes e exige condições de reação brandas. A capacidade catalítica das lipases é muito grande e a vantagem de sua utilização frente a rota convencional é a possibilidade de uso de matérias-primas oleosas com índice de acidez elevado (GULDHE et al., 2015).

Desenvolvimentos recentes na transesterificação enzimática aumentaram as perspectivas desse processo como uma técnica de escala industrial para a produção de biodiesel. Em 2007, Lvming Co. Ltd., Xangai, China, estabeleceu uma unidade piloto de produção de biodiesel enzimático com uma capacidade de 10.000 toneladas utilizando óleo de cozinha como matéria-prima e como catalisador uma lipase, de baixo custo, extraída de *Candida* sp. 99-25, ($\$ 0,03 \text{ kg}^{-1}$ biodiesel) (YUN et al., 2013). Em 2012, Piedmont Biofuels, da Carolina do Norte, desenvolveram uma nova tecnologia (FAESTER) para a produção de biodiesel contínuo usando Lipase B de *C. Antarctica* (CALB) da Novozymes (CHRISTOPHER et al., 2014). No primeiro trimestre de 2014, tanto Blue Sun Biodiesel em St. Joseph, Missouri e Viesel Fuel LLC em Stuart, Flórida, anunciaram a produção em grande escala de biodiesel enzimático, catalisado pela lipase Novozymes Callera Trans, sendo possível produzir biodiesel a partir de uma ampla variedade e qualidade de óleos. A capacidade de produzir biodiesel a partir de matéria-prima, independentemente do seu teor de AGL, em última análise, torna o processo, de certa forma, mais eficiente em termos de custo para produzir biodiesel (NIELSEN, 2014).

O principal desafio encontrado no aumento de escala é o custo da lipase, que é muito mais elevado em comparação aos catalisadores químicos convencionais. Entretanto com o desenvolvimento recente de aplicações biotecnológicas, a procura por novas fontes de enzimas de baixo custo cresceu, gerando novas possibilidades. Processos enzimáticos também geram alta qualidade do subproduto/co-produto glicerol, possibilitando a obtenção de melhores preços de mercado em sua comercialização e um leque maior de aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas (SINGH et al., 2014). O aprofundamento em estudos quanto à estabilidade e atividade catalítica possibilitaria o prolongamento da reutilização destes catalisadores, gerando assim economia ao processo. Com esses avanços, as reações catalisadas por enzimas na produção de biodiesel são uma abordagem ecológica e sustentável, que pode ser implementada em usinas de biodiesel em grande escala (GULDHE et al., 2015).

A fim de diminuir o custo do biodiesel, Su e Wei (2014) investigaram o uso de borra de óleo como a matéria-prima para a produção de biodiesel. O processo foi realizado utilizando um terc-álcool, a otimização do processo gerou rendimento em ésteres metílicos de 95,2% em 10 h, para a razão molar metanol/óleo de 5:1, 4% de lipase, com adição de peneira molecular (3 Å), e a temperatura de 45 °C em sistema de reação com a adição de terc-pentanol.

Ribeiro et al. (2012) estudaram as variáveis que afetam a transesterificação do óleo de coco na produção de biodiesel utilizando enzimas imobilizadas como catalisadores e etanol. As reações de transesterificação foram realizadas em reatores de vidro fechado e mantido sob agitação de 200 rpm e catalisada pela lipase comercial Novozym 435, com temperatura (40-60 °C), concentração de enzima (3-7%) e razão molar óleo/etanol (1:6 - 1:10). O melhor resultado, 80,5% de conversão, foi obtido com a maior temperatura, razão molar e concentração de enzima. Santin et al. (2014) estudou a viabilidade da técnica de produção de biodiesel utilizando a lipases *C. Antartica B* (CALB) imobilizada em um suporte de poliuretano de baixo custo. Os experimentos foram realizados em modo batelada sob irradiação de ultrassom e conversão em ésteres de ácidos graxos foi de 81%, com 132 W.cm⁻² de potência ultrassônica, razão molar de 1:6 (ácido graxo de soja/etanol), 65 °C e 10 % m/m de enzimas em 3 horas de reação.

1.4 Lipases

As lipases são reconhecidas como eficientes catalisadores para a biotransformação de óleos e gorduras em sistema aquoso e não aquoso, são também resistentes à presença de altos teores de AGL, permitindo assim redução significativa do custo com matéria-prima a ser processada. São inúmeras as aplicações destas enzimas, incluindo refino ou reestruturação de óleo e gorduras, hidrólise de óleos, esterificação e incorporação de outros compostos em moléculas lipídicas (KHAN e ALZOHAIYRÝ, 2010). Além disso, sabe-se que o uso de lipases acaba por reduzir a unidade de processamento de biodiesel, tornando o processo mais simples através da redução de etapas no tratamento para a purificação de biodiesel e também para sub/co-produtos gerados, resultando em um processo ambiental compatível (GOG et al., 2012).

As lipases (EC 3.1.1.3 triacilglicerol acil-hidrolases) são enzimas que pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3, sendo designadas como uma sub-classe 1 devido a sua especificidade pelas ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos, tendo como função biológica a conversão catalítica em DAG, MAG, AGL e glicerol (PATIL et al., 2011; STERGIOU et al., 2013). As lipases, em geral, apresentam massa molecular entre 20 e 75 kDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, atuam na faixa de pH entre 4 a 9 e na temperatura entre 25 e 70 °C (DE CASTRO et al., 2004; KAPOOR;

GUPTA, 2012). Estes biocatalisadores apresentam importantes aplicações industriais, tais como: de síntese orgânica, de produtos farmacêuticos, de detergentes, de alimentos, de panificação, de bebidas, de cosméticos, de couro, de papel, de tratamento de resíduos, entre outras (BADGUJAR et al., 2013).

As enzimas podem ser empregadas em processos de diferentes formas, livres, ou seja, em sua forma solúvel ou também em sua forma imobilizada, aderida a diferentes matrizes. Em ambas as formas, os biocatalisadores apresentam muitas vantagens, assim como muitas restrições. Para a sua aplicação se deve levar em conta o tipo de processo, o designer dos reatores, as características das matérias-primas e os produtos de interesse a serem formados.

Desde o início da década de 90, o biodiesel é considerado uma alternativa promissora na comunidade científica. Em dezembro de 2014, uma nova lipase solúvel chamada *Eversa® Transform* foi lançada pela Novozymes S/A (Dinamarca) com potencial para uso em processos de produção de biodiesel enzimático industrial. Após, em maio de 2016, a empresa anunciou a segunda geração da lipase, a *Eversa Transform 2.0*, com maior termoestabilidade (NOVOZYMES, 2016). Ambas as lipases são comercializadas em fase aquosa e apresentam elevada atividade na transesterificação de glicéridos e na esterificação de ácidos graxos livres, suas formulações asseguram uma elevada estabilidade e uma longa vida útil do produto (NOVOZYMES, 2015). A lipase *Eversa Transform 2.0* é uma hidrolase de éster carboxílico (EC 3.1.1.3), produzida pela fermentação submersa de um microrganismo de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado (NOVOZYMES, 2016).

1.4.1 Lipases livres

As lipases livres têm o mérito de reduzir o custo de preparação, já que não tem gastos com suporte e reagentes para a imobilização, sua velocidade de reação é mais rápida, se destacando como uma abordagem promissora para a produção de biodiesel e atraindo crescente atenção nos últimos anos (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013; REN et al., 2013; REN et al., 2011; CESARINI et al., 2014b).

Essas podem ser produzidas e vendidas a preços 30-50 vezes mais baixos em comparação às enzimas imobilizadas, tornando todo o processo mais competitivo, em relação a processos convencionais (CESARINI; PASTOR; DIAZ, 2014). E, segundo Cesarini et al. (2013) essas lipases poderiam ser reutilizadas no processo após a recuperação a partir da fase de glicerina formada, o que pode tornar um processo

enzimático viável comercialmente (CESARINE; DIAZ; NIELSEN, 2013). Mesmo assim, ainda existem poucos trabalhos relatados na literatura sobre o uso de lipases solúveis nas reações de transesterificação (PEDERSEN et al. 2014; CESARINI, DIAZ; NIELSEN, 2013; LV et al., 2010). Essas reações estão ganhando atenção devido à possibilidade de aceitar água no processo de produção de biodiesel, água que é essencial para manter a estrutura tridimensional específica de algumas lipases, especialmente se forem utilizados na forma solúvel (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

Por outro lado, as enzimas em sua forma livre apresentam algumas vantagens, pois, são muito sensíveis ao calor e ao pH e a possibilidade de reuso no processo é dificultada (LIU, WANG, JIANG et al., 2012). Para ultrapassar estas desvantagens, as enzimas podem ser imobilizadas sobre vários tipos de matriz (materiais poliméricos, nanomateriais, entre outros), proporcionando enzimas mais estáveis e mais eficazes (DOĞAÇ et al. 2017).

Chen et al. (2008a,b,c), relataram que a lipase solúvel NS81006 poderia ser capaz de catalisar a metanólise de TAG para produzir biodiesel em sistema bifásico óleo/água com rendimentos de biodiesel superior a 90%, após 8 h de reação. Onde o mecanismo de reação utilizado em reações em sistemas óleo/água ainda deve ser explorado para compreender melhor o processo, e possibilitar o maior controle das variáveis da reação de produção de biodiesel.

Segundo Firdaus et al. (2016), que estudaram a aplicação da *Eversa transform* nas condições de 2-20% de água, 0-10% de glicerol, razão molar óleo de canola/metanol de 1:4,5, testadas experimentalmente e por meio de simulações computacionais, os maiores teores de ésteres metílicos, próximos às especificações do biodiesel, podem encontrados em 24 h utilizando 1% de enzima (35° C).

1.4.2 Lipases imobilizadas

O uso de lipases como catalisadores vem contribuindo para o rápido crescimento da área de síntese orgânica. As pesquisas nesta área buscam enzimas mais eficientes que as atuais, novos compostos alvos, e também novos suportes sólidos capazes de sustentar a atividade enzimática em meio orgânico. Uma enzima imobilizada é definida como a enzima fisicamente confinada a um determinado suporte, mantendo ou aumentando sua atividade catalítica (JEGANNATHAN et al.,

2008). Para reduzir o custo de produção de transesterificação enzimática, algumas estratégias podem ser modificadas nas etapas *upstream*, *midstream* e *dowstream* do processo. Especificamente, a melhora na estabilidade catalítica e na atividade da lipase pode ser realizada por meio do estudo da engenharia de proteínas, otimização de técnicas de engenharia metabólica e imobilização de enzimas (HWANG et al., 2014).

No contexto de química verde, ressalta-se a reutilização de enzimas imobilizadas, uma excelente abordagem, que possibilita a redução do custo e redução da quantidade necessária desses biocatalisadores em processos para síntese de compostos de alto valor agregado (ANDRADE et al., 2010). Além disso, a imobilização de enzimas em processos industriais apresenta vantagens importantes, como controle da formação de produto de interesse e maior eficiência do processo, além de permitir que a enzima se torne mais estável e resistente a condições severas, com aplicação em uma ampla gama de pH e temperatura (CIPOLATTI et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; CIPOLATTI et al., 2014, BENASSI et al., 2013; DICOSIMO et al., 2013).

A ligação entre suportes e a enzima pode ocorrer por métodos, como: adsorção, ligação covalente, iônica, encapsulamento, entre outras técnicas mais sofisticadas de imobilização (BARBOSA et al., 2011; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; GUISÁN, 1988; KIM; GRATE; WANG, 2006). No caso específico das lipases, a adsorção em suportes hidrofóbicos é um método muito utilizado, devido à facilidade destas enzimas em se adsorver por interação reversível do suporte com as áreas hidrofóbicas das lipases (BASSI et al., 2006; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

No entanto, este método tem uma limitação importante: as moléculas de lipase podem ser libertadas do suporte ao longo de sua incubação (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016, HIRATA et al., 2016; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2011). Os fatores que induzem esta dessorção podem ser a alta temperatura e o tempo de incubação, porém, a principal causa são alguns componentes de meios de reação, como, por exemplo, meios reacionais que contêm elevadas concentrações de co-solventes (metanol e etanol), e outros intermediários de reação como os ácidos graxos de cadeia longa e mono- e diacilgliceróis que apresentam propriedades tensoativas (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2016; MURT; BHAT; MUNISWARAN, 2002; MAAG, 1984).

O revestimento de enzimas imobilizadas com polímeros iônicos é proposto como uma forma de ultrapassar essa barreira, sendo uma

ferramenta que atua na melhora da estabilidade enzimática, sem influenciar na reversibilidade da imobilização e dificultar o acesso dos substratos às lipases imobilizadas (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016; PEIRCE et al., 2016). A polietilenoimina (PEI) e ácido poliacrílico (PAA) são polímeros iônicos altamente hidrofílicos, que atuam a fim de aprisionar fisicamente a enzima imobilizada ao suporte, minimizando, assim, problemas como a dessorção da lipase, aumentando sua estabilidade tanto térmica quanto no meio orgânico, sem que haja a necessidade de modificação superficial do suporte (RICCARDI et al., 2014; RICCARDI et al., 2016; MORENO-PEREZ et al., 2016).

Uma das soluções para o elevado custo de lipases para a produção de biodiesel é aumentar seu tempo de vida na reação, o que pode ser obtido por meio do reuso da enzima, o que se torna mais fácil quando se utiliza enzimas imobilizadas. No entanto, as lipases imobilizadas ainda apresentam várias desvantagens para aplicações industriais, tais como a atividade das enzimas imobilizadas diminuir no reuso contínuo devido à dessorção, inibição ao substrato e muitas vezes ao produto (BAJAJ et al., 2010).

Existe ainda a possibilidade de perda de atividade enzimática durante a imobilização, o elevado custo dos suportes comerciais, a baixa estabilidade em sistemas óleo-água e a exigência de novos reatores que possam melhorar a homogeneização do meio, maximizando a conversão de óleo em biodiesel, demonstrando que técnicas de imobilização comerciais ainda são consideradas muito caras para a aplicação na produção de biodiesel em larga escala (ZHAO et al., 2015). Porém, muitos estudos atuais têm enfoque na busca pelo "suporte ideal", que permite a obtenção de um biocatalizador eficiente, baixo custo, síntese simples que conduza a maior produção do composto de interesse em um processo viável economicamente (CIPOLATTI et al., 2016).

1.5 Considerações finais

A busca constante pelo aperfeiçoamento das tecnologias existentes se faz necessária da mesma forma com que se buscam novas tecnologias. O uso de recursos renováveis surge como uma alternativa verde aos combustíveis fósseis, porém o estudo da produção destes a partir de vias sustentáveis, que causem menos danos ao ambiente é uma alternativa promissora e necessária para a manutenção dos recursos naturais. O reaproveitamento de resíduos, que, muitas vezes, acabam por poluir nossos recursos hídricos, só traz vantagens, pois além de seu

baixo custo de mercado e da necessidade de encontrar o destino correto para seu descarte, esses podem originar combustíveis de qualidade, que causem menor impacto que os derivados de petróleo, e que sejam capazes de impulsionar a economia do país.

A investigação de rotas enzimáticas viáveis para a aplicação em larga escala por meio da produção utilizando lipases em sua forma livre com baixo custo de aquisição ou capazes de serem produzidas pela própria unidade de processamento de biodiesel, assim como a busca de novos suportes e técnicas de imobilização que consigam aliar alta eficiência do biocatalisador no processo ao baixo custo final das lipase imobilizadas, despontam como uma alternativa viável para a manutenção da produção de biocombustíveis, que a cada ano necessita de maior demanda para suprimir as necessidades de mercado, recebendo assim cada vez mais destaque e ganhando cada vez mais espaço no setor energético.

Capítulo II

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS E ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS UTILIZANDO LIPASE LIVRE EVERSA® TRANSFORM

Este capítulo aborda o desenvolvimento da primeira etapa deste trabalho, referente ao estudo da produção enzimática de ésteres, primeiramente ésteres metílicos de ácido graxo utilizando como catalisador a lipase solúvel *Eversa® Transform* (*Eversa® Transform*), avaliando o seu comportamento frente a diferentes matérias-primas graxas (óleo soja, óleo de macaúba) e também as matérias-graxas de reuso (óleo de fritura usado e óleo ácido residual), buscando a definição das melhores condições para a máxima produção de ésteres metílicos de ácido graxo, com menores custos de produção e melhor aproveitamento dos substratos e do biocatalisador envolvidos no processo. Com essas condições pré-estabelecidas, aprofundar a investigação da produção de ésteres com diferentes alcoóis, etílico e metílico, e avaliar o estudo de reuso da lipase *Novozymes Eversa® Transform* (*Eversa® Transform*) em reações de esterificação utilizando óleo ácido residual, com possibilidade de polimento da reação final.

2.1 Introdução

Há alguns anos, o biodiesel ganhou destaque como uma alternativa viável aos combustíveis fósseis, porém, sua produção sem incentivos fiscais e governamentais enfrenta grandes dificuldades. Fatores, como o alto custo da matéria-prima envolvida no processo, podem ocasionar sua inviabilidade, já que o alto custo final desse pode proporcionar um valor não competitivo no mercado de combustíveis. Com isso, fica evidente a necessidade de adoção de novas estratégias de produção de biodiesel, e se torna relevante o estudo e pesquisa na área de biocombustíveis, assim como a busca de novas fontes alternativas e economicamente viáveis para a sua produção.

Tanto em nível nacional como em nível mundial, somos grandes geradores de matéria graxa residual. Esses resíduos são resultado de uma somatória que têm origem por meio do descarte gerado pelo consumo em domicílios e em pequenos estabelecimentos comerciais, até grandes volumes produzidos pelas indústrias químicas e de alimentos. Essa grande quantidade de material acaba tornando-se um grande problema ambiental, caso descartado incorretamente. Assim, seu aproveitamento como matéria de baixo custo para produção de biodiesel é uma opção com múltiplos benefícios, tanto no setor de economia quanto no de preservação ambiental.

Como visto neste trabalho, a via mais comum para produção de biodiesel (ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa) na indústria é a transesterificação via catálise química alcalina dos triacilgliceróis (TAGs) com um álcool de cadeia curta. Embora esse processo tenha uma elevada produtividade, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de excesso de álcool para o deslocamento de equilíbrio da reação, alto consumo de energia e principalmente a necessidade de minimizar o nível de ácidos graxos livres no óleo (<1%) para evitar a formação de sabões, o que tem consequências com uso de grandes volumes de água para sua remoção no produto final (MADALOZZO et al., 2014). O álcool a ser utilizado no processo é de cadeia curta, comumente metanol ou etanol. O metanol é o álcool mais empregado na produção de biodiesel mundialmente, devido ao seu baixo custo, e por possuir a cadeia mais curta em comparação com outros álcoois (ANDRADE et al., 2012). No entanto, no contexto brasileiro, o etanol também se torna uma opção viável, devido sua predominância em território nacional, o que o torna mais acessível e diminui seu custo (BENETI et al., 2014).

A escolha do catalisador é fundamental para um processo eficiente: ele deve ser capaz de maximizar a obtenção de produtos, minimizando a geração de resíduos (GONG e LUQUE, 2014). Neste contexto, o uso de lipases em reações para produção de biodiesel vem ganhando cada vez mais espaço, principalmente as lipases livres, que são uma alternativa às lipases imobilizadas de alto custo, já que estas podem ser produzidas e comercializadas a um valor bem inferior, até 30 a 50 vezes menor. Também podem ser reutilizadas no processo quando recuperadas a partir da fase de glicerina formada, o que pode tornar o processo enzimático viável comercialmente (CESARINE; DIAZ; NIELSEN, 2013). As lipases são amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas, onde as lipases microbianas são as que possuem maior estabilidade térmica (DE CASTRO et al., 2004; CIPOLATTI et al., 2016).

O objetivo deste capítulo é o estudo da produção enzimática de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos, utilizando como biocatalisador a lipase livre *Eversa® Transform* em sua forma livre a partir de diferentes matérias-primas. Avaliou-se a lipase *Eversa® Transform* quanto à síntese de ésteres metílicos a partir óleo de soja em diferentes sistemas reacionais e quanto à hidrólise do óleo de soja e cinética reacional da produção enzimática de ésteres metílicos utilizando óleo de soja e óleo de soja com alto teor de ácido oleico. Também para: selecionar um substrato graxo de baixo valor agregado (óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual) para a síntese enzimática de ésteres metílicos; investigar o escalonamento em laboratório das reações de síntese enzimática de ésteres metílicos com os substratos graxos estudado; estudar a cinética reacional com diferentes concentrações de lipase sobre a conversão de ésteres metílicos utilizando óleo ácido residual; avaliar os ciclos de uso da lipase na produção de ésteres etílicos e metílicos utilizando óleo ácido residual e avaliar o uso da etapa de polimento dos ésteres etílico e metílico produzidos.

2.2 Material e Métodos

Neste item serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a primeira etapa deste trabalho, relacionados à caracterização das matérias-primas e à produção de ésteres etílicos e metílicos utilizando agitação mecânica e agitação orbital com distintas matérias graxas e reuso enzimático e polimento da reação utilizando o substrato óleo ácido residual.

2.2.1 Material

Enzima

Eversa® Transform - Lipase solúvel produzida e gentilmente cedida pela Novozymes® (Dinamarca).

Reagentes

- Heptano (Vetec, 99,5%);
- Derivatizante MSTFA (N-methy-N-trimethylsilylfluoroacetamida).

Substratos

- Óleo de soja refinado (Soya);
- Óleo de polpa de Macaúba (COCAL Óleos Especiais Ltda-Abateté/MG);
- Ácido oleico (Synth, 99,9%);
- Óleo ácido residual (cedido pela Olfar Alimentos, Erechim/RS);
- Óleo de fritura usado (cedido pelos restaurantes locais, Florianópolis/SC);
- Alcool etílico (93,57%, adquirido na rede de postos Ipiranga);
- Álcool etílico (Vetec, 99,9%);
- Álcool metílico (Vetec, 99,9%);
- Água destilada.

Padrões químicos

Os padrões químicos utilizados para as análises em cromatógrafo de gases:

- Ésteres metílicos, heptadecanoato de metila (Sigma-Aldrich, 95%);
- Monoacilgliceróis, monoleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza);
- Diacilgliceróis, dioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza);

- Triacilgliceróis, trioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza).

2.2.2 Procedimento Experimental

2.2.2.1 Pré-tratamento do óleo de fritura usado

Antes da utilização do substrato óleo de fritura usado, foi necessário fazer um pré-tratamento com ácido fosfórico a fim de reduzir o teor de gomas e possíveis resíduos de alimentos de seu conteúdo. Adicionou-se 50 ppm de ácido fosfórico 85% ao óleo, este foi agitado, após filtrado com papel filtro para retirar a goma.

2.2.2.2 Produção de ésteres metílicos de ácido graxo em modo batelada com agitação mecânica

A primeira unidade experimental montada para o desenvolvimento do trabalho consistiu na utilização de um balão de vidro com fundo redondo de 250 mL imerso em banho termostático. A agitação foi controlada por meio de agitador mecânico (IKA, modelo RW 20), com controlador digital, utilizando diferentes velocidades de agitação mecânica. Na Figura 2.1 é apresentada a primeira unidade experimental montada, com agitação mecânica.

Figura 2.1- Unidade experimental montada para a produção de ésteres metílicos com a lipase *Eversa® Transform*, utilizando agitação mecânica.



Para as reações, foram pesados e adicionados a um balão de vidro os substratos óleo de soja e álcool metílico na razão molar metanol/óleo de 4,5:1, 1% (m/m, em relação ao substrato) de biocatalisador (lipase *Eversa® Transform*), onde o metanol foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação e água destilada 2,5% (m/m, em relação ao substrato) (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013). Em seguida, a temperatura foi ajustada a 35°C iniciando a reação, utilizaram-se distintas velocidades de agitação mecânica de 250, 360 e 700 rpm. Ao final do tempo da reação, retirou-se o balão do sistema para que todo o conteúdo reacional fosse recolhido e centrifugado (3500 rpm/10 min), após a fase topo, fase de interesse, foi encaminhada para as análises. A massa molar adotada para os cálculos das razões molares entre os substratos foi de 870 g/mol para o óleo de soja (REMONATTO et al., 2015). O acompanhamento da reação por meio da análise do meio reacional foi feito por cromatógrafo de gases (GC).

2.2.2.3 Produção de ésteres metílicos de ácido graxo em modo batelada utilizando agitação orbital

A produção por meio de agitação orbital consistiu na utilização de erlemeyer de 250 ml, contendo aletas incubados em shaker (New Brunswick, Incubated Excella E24 & E24R) com controle de temperatura e agitação. Na Figura 2.2 é apresentada a segunda unidade experimental adotada, com agitação orbital.

Figura 2.2- Unidade experimental utilizada na produção de ésteres metílicos utilizando a lipase *Eversa® Transform* por meio de erlemeyer aletado de 250 ml e agitação orbital.



Foram pesados e adicionados ao erlemeyer os substratos: óleo de soja e álcool metílico na razão molar metanol/óleo de 4,5:1, o metanol foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação; 2,5% de água destilada (m/m, em relação ao substrato) e por fim 1% (m/m, em relação ao substrato) da enzima *Eversa® Transform* (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013). Em seguida, os reatores foram fechados hermeticamente com tampas de silicone e a temperatura ajustada a 35 °C com agitação de 250 rpm e a reação iniciou-se. Ao final do tempo da reação, o erlemeyer foi retirado do sistema para que todo o conteúdo reacional fosse recolhido e centrifugado (3500 rpm/10 min), a fase topo, fase de interesse, encaminhada para as análises em GC. Na Figura 2.3 podemos observar um esquema com as etapas descritas neste item para a produção de ésteres utilizando agitação orbital. A massa molar adotada para os cálculos das razões molares entre os substratos foi de 870 g/mol para o óleo de soja (REMONATTO et al., 2015). É possível visualizar as fases após a separação por centrifugação na Figura 2.4, onde nesta a fase topo ou fase apolar constituída pelos ésteres de interesse, a interface que contém a enzima *Eversa® Transform* e a fase de fundo ou fase polar, que contempla, majoritariamente, uma mistura de água, glicerol e álcool que não reagiu.

Figura 2.3- Esquema da reação de produção ésteres metílicos utilizando a lipase *Eversa® Transform* por meio de agitação orbital.



Figura 2.4- Visualização do sistema trifásico após a centrifugação do volume reacional.



2.2.2.4 Verificação da capacidade hidrolítica da enzima *Eversa*® *Transform* com e sem NaOH

Realizaram-se testes preliminares para a verificação da capacidade de hidrólise da enzima *Eversa*® *Transform*, utilizando óleo de soja com e sem adição de NaOH. Os ensaios continham 100 g de matéria graxa, 6% de água (m/m, em relação ao substrato), 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa*® *Transform* e concentração de zero a 10 ppm de NaOH, incubados em shaker (35°C/250 rpm) nos tempos de 8 e 16 h. Após, as reações foram centrifugadas e seu teor de AGL analisado.

2.2.2.5 Avaliação da cinética reacional na produção de ésteres metílicos de ácido graxo com agitação orbital utilizando diferentes substratos

Realizaram-se estudos cinéticos (destrutivos), para verificar o comportamento e determinar o tempo adequado de reação. Foram estudadas as matérias graxas: óleo de soja, óleos de soja com 25, 50 e

75% de ácido oleico (óleos com alta concentração de AGL), óleo de macaúba e óleo ácido residual. Utilizaram-se as condições: matéria graxa e álcool metílico na razão molar metanol/matéria graxa de 4,5:1, onde o metanol foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação; 0 a 2,5% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada, e por fim foi adicionada de 0,5 a 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa® Transform*. Incubado em shaker (35°C/250 rpm). Experimentos destrutivos foram realizados, sendo as reações conduzidas nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 28, 32, 40 e 48 h de reação. O acompanhamento das reações ocorreu por meio de GC. Para os cálculos da razão molar dos substratos, como foram alvo desta fase do estudo distintas matérias graxas, muitas delas de reuso onde o perfil de ácidos graxos poderia variar muito, optamos por, quando trabalhou-se com óleos (constituídos majoritariamente por TAGs), considerar a massa molar 870 g/mol, e quando a matéria-prima era rica em AGL, levou-se em conta a massa molar do ácido oléico 282 g/mol, também utilizaram-se a massa molar do álcool metílico e do álcool etílico, 32,04 g/mol e 46,06 g/mol, respectivamente (REMONATTO et al., 2015)..

Como esclarecimento:

- Os substratos óleos com diferentes concentrações de AGL foram preparados ao adicionarem-se ao óleo de soja refinado comercial diferentes concentrações de ácido oleico, sendo de 25% de ácido oleico (m/m em relação ao óleo de soja) a primeira mistura, 50% ácido oleico (m/m em relação ao óleo de soja) a segunda e 75% ácido oleico (m/m em relação ao óleo de soja) a última mistura estudada.
- O intitulado “óleo ácido residual” é constituído por uma mescla de resíduos advindos da indústria de óleo, com alto conteúdo de AGL.

2.2.2.6 Escalonamento em laboratório com agitação orbital utilizando diferentes substratos

Após a avaliação da produção de ésteres metílicos com as diferentes matérias graxas, definiu-se a melhor condição para a produção de biodiesel e estudou-se uma alternativa de escalonamento do processo de 100g para 600g de matéria graxa na reação, utilizando erlenmeyers de 1000 mL. Utilizaram-se as condições: matéria graxa e álcool metílico na razão molar metanol/matéria graxa de 4,5:1, onde o

metanol foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação; 2,5% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada, 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa*® *Transform* e incubação em shaker (35 °C/250 rpm).

2.2.2.7 Avaliação da cinética reacional da produção de ésteres metílicos com óleo ácido residual e distintas concentrações de *Eversa*® *Transform*

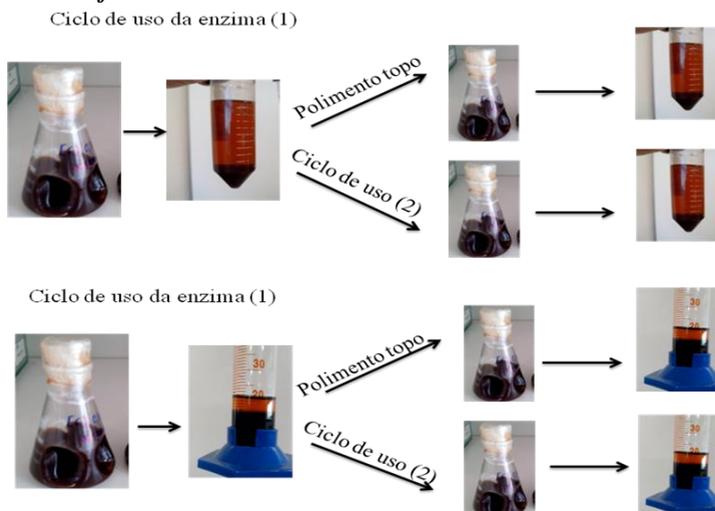
Realizaram-se estudos cinéticos (destrutivos), para verificar o comportamento da reação de produção de ésteres metílicos, com óleo ácido residual (100 g) e com diferentes concentrações de lipase *Eversa*® *Transform*. Utilizaram-se as condições: óleo ácido residual e álcool metílico na razão molar metanol/óleo de 3,5:1, onde o metanol foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação; 2% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada, e por fim era adicionada 0,25 a 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa*® *Transform* 0,25-1% (m/m, em relação ao substrato). Incubado em shaker (35 °C/250 rpm). Experimentos destrutivos foram realizados, sendo as reações conduzidas nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 e 28 h de reação.

2.2.2.8 Reuso da enzima livre e adição da etapa de polimento do biodiesel utilizando óleo ácido residual e diferentes alcoóis

O reuso e o polimento do biodiesel foram realizados primeiramente com o álcool metílico, após com álcool etílico (98%) e, por fim com álcool etílico comercial (93,57%). A primeira reação (ciclo da enzima 1/reação 1) do processo foi conduzido por 8 horas nas condições: óleo ácido residual e álcool (álcool metílico ou etílico (99,5%) e álcool etílico comercial (93,57%)) na razão molar álcool/óleo de 3,5:1, onde o álcool foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação; 0 a 2% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada, 0,5% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa*® *Transform* e incubado em shaker (35 °C/250 rpm). Após as 8 h de reação o volume reacional, ciclo 1/reação 1, foi submetido a separação topo (sobrenadante: fase rica em ésteres) e fundo (sedimentado: fase contendo a lipase) por meio de centrifugação (3500 rpm/10 min) ou de decantação em provetas (12h). A decantação foi estudada como uma alternativa mais barata e prática à centrifugação utilizada até o momento.

O topo da reação foi recuperado e encaminhado para a etapa de polimento, com nova carga dos reagentes: álcool na razão molar 3,5:1 (em relação ao óleo não convertido), água destilada 0-2% (m/m, em relação ao óleo não convertido), e a enzima *Eversa*[®] *Transform* 0,5 % (m/m, em relação ao óleo não convertido), e incubado em shaker por mais 8 h (35°C/250rpm). Para os cálculos da quantidade de substrato necessária para o polimento da reação, assumiu-se com base em estudos realizados no laboratório não apresentando aqui, que a fase topo (rica em ésteres) continha 20% de matéria graxa a ser convertida em ésteres. Por sua vez, o fundo (fase que contém a lipase) obtido por separação, foi recolhido e encaminhado para o reuso (ciclo de uso da enzima 2) com nova carga dos reagentes iniciando uma nova reação. O esquema exemplificando a metodologia descrita neste item encontra-se na Figura 2.5.

Figura 2.5- Esquema exemplificando o reuso e a etapa de polimento das reações a partir óleo ácido residual e diferentes alcoóis utilizando a lipase *Eversa*[®] *Transform*.



2.2.3.9 Reuso da enzima *Eversa*[®] *Transform* utilizando óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%)

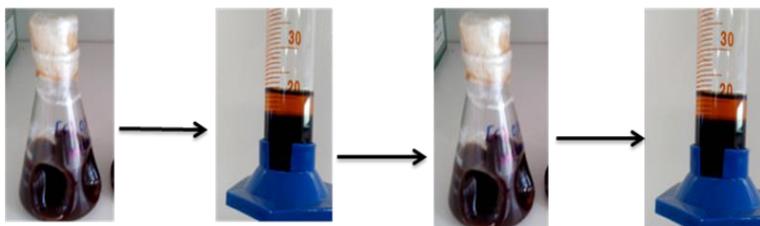
Foi realizado o reuso utilizando 1% de enzima *Eversa*[®] *Transform*, óleo ácido residual (100 g) e álcool etílico comercial (93,57%) na razão molar álcool/óleo de 3,5:1, onde o álcool etílico

comercial foi alimentado em 6 frações iguais de hora em hora durante as primeiras 6 horas de reação, em shaker por 8 h (35 °C/250 rpm). A separação de fases ésteres/lipase foi realizada por meio de decantação de 12 horas, onde topo da reação (ésteres) foi analisado quanto ao teor de ésteres de ácidos graxos e teor de AGL. Já o fundo (fase contendo a lipase) foi recolhido e 20 ml deste encaminhado para um novo reator com nova carga dos reagentes nas quantidades e com a mesma metodologia descrita anteriormente neste item, assim sucessivamente até o máximo de reusos possíveis. O esquema exemplificando a metodologia descrita neste item encontra-se na Figura 2.6.

Figura 2.6- **Esquema exemplificando a metodologia descrita para o reuso da enzima *Eversa*[®] *Transform* utilizando como substratos óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%).**

Ciclo de uso da enzima (1)

Ciclo de uso da enzima (2)



2.2.3 Métodos Analíticos

Antes da utilização dos substratos nas reações de produção de ésteres e ao longo do processo de transformação das matérias-primas, foram necessárias algumas análises, descritas ao longo deste item, para determinação do teor de ácidos graxos livres e ésteres metílicos/etílicos e, em alguns casos, a verificação da presença de mono-, di- e triacilgliceróis e do teor de glicerol livre.

2.2.3.1 Teor de ácidos graxos livres

A determinação do teor de AGL das matérias graxas foi realizada segundo metodologia AOCS Cd 3d – 63. Primeiramente, pesou-se de 4 a 15 g de amostra, em um béquer se 250 ml. A seguir, o óleo foi dissolvido em uma solução neutralizada de 150 mL de etanol/éter etílico (1:1 v/v). Adicionaram-se 2 mL do indicador (solução

de fenolftaleína 1% em etanol 95%) e titulou-se com solução padronizada de KOH 0,1 mol L⁻¹. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como teor de ácidos graxos livres (AGL) em ácido oleico, calculado pela Equação (2.1):

$$\text{Teor de AGL (\% ácido oleico)} = \frac{\left(\frac{56,1 V M}{m}\right)}{2}$$

(Equação 2.1)

Onde:

V = volume de base gasto na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de KOH, padronizada (mol L⁻¹);

m = massa da amostra (g).

2.2.3.2 Teor de glicerol livre

O método de periodato para determinação da concentração de glicerol foi descrito por Cocks e Van Rede (1966), o qual consiste na reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio (NaIO₄) 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 à amostra e a mesma é acidificada com ácido sulfúrico 0,2 mol L⁻¹ até pH 4. A solução é então neutralizada com NaOH 0,05 mol L⁻¹ até coloração azul.

Paralelamente, um branco reacional foi preparado contendo 50 mL de água destilada, sem a presença de glicerol e o mesmo procedimento adotado para a amostra a ser analisada foi aplicado ao branco. Em seguida, 100 mL de solução de periodato de sódio (60 g L⁻¹) 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 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⁻¹ usando pH-metro para determinar pH 6,5 para o branco e pH 8,1 para a amostra. O teor de glicerol livre contido na amostra é determinado pela seguinte equação (2.3):

$$\text{Glicerol livre (\%)} = \frac{9,209 M(V_1 - V_2)}{m} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde:

M = Molaridade da solução de NaOH (mol L^{-1});

V_1 = volume da solução de NaOH gasto na amostra (mL);

V_2 = volume da solução de NaOH gasto no branco (mL);

m = massa de amostra utilizada (g).

2.2.3.4 Determinação do teor de ésteres

A determinação do teor de ésteres foi feita por meio de cromatógrafo de fase gasosa (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm (Restek, n° de série: 1208976) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. Sendo a programação de temperatura da coluna: 120 °C por 1 min, seguido pelo aumento de 15 °C/min até 180 °C permanecendo por 2 min e 5 °C/min até 250 °C permanecendo por 2 min. A temperatura do detector e injetor foi de 250 °C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 μL .

Preparação das amostras

As amostras foram preparadas, transferindo-se 250 mg das mesmas para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume até o menisco do mesmo com heptano. Após, transferia-se uma alíquota de 50 μL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e adicionava-se 50 μL do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000 mg L^{-1} e completava-se o volume com heptano.

Calculo do teor de ésteres

Após a injeção e análises dos cromatogramas gerados foi determinado a porcentagem de conversão em ésteres pela Equação 2.3:

$$\text{Teor de ésteres (\%)} = \frac{(\sum A) - A_{pi}}{A_{pi}} \frac{C_{pi} V_{pi}}{m} 100$$

(Equação 2.3)

Onde:

ΣA = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1;

A_{pi} = área correspondente ao pico do padrão interno, heptadecanoato de metila;

C_{pi} = concentração da solução de padrão interno heptadecanoato de metila (mg/mL);

V_{pi} = volume da solução de padrão interno adicionado à amostra;

m = massa, da amostra (mg).

2.2.3.5 Determinação do teor de mono-, di- e triacilgliceróis

A determinação do teor de MAG, DAG, TAG nas amostras coletadas foi realizada a fim de conhecer o comportamento da reação ao final do tempo (MAG e DAG). As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar MTX®-5 (5% difenil, 95% dimetil polixiloxano) de 30m x 0,25mm x 0,1µm (RESTEK, nº de série: 1193990). As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50°C por 1min, seguido pelo aumento de 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C e 10°C/min até 380°C, permanecendo por 8min. A temperatura do detector foi de 380°C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80kPa e o volume injetado foi de 1µL.

Preparação das Amostras

Na preparação das amostras reacionais para a análise cromatográfica foram pesadas 100 mg de cada amostra em balão volumétrico de 10 mL, após foram adicionados 100 µL do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada e esta foi deixada em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o volume foi aferido (10 mL) com heptano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e levadas para análise em cromatógrafo gasoso.

Determinação dos teores de mono-, di- e triacilgliceróis

Para a quantificação dos produtos MAG, DAG e TAG utilizaram-se padrões externos monooleína, dioleína e trioleína. Para a

construção das curvas de calibração preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo, e a partir destas prepararam-se 8 soluções de calibração em diferentes concentrações para os glicerídeos, conforme a Tabela 2.1. As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram realizadas segundo a Norma nº 14.105 (2001) do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos conforme metodologia adaptada por Krüger (2010). Nas soluções de calibração foi adicionado derivatizante MSTFA, o qual transforma os glicérides em seus respectivos derivados voláteis, para que possam ser quantificados por cromatografia gasosa. Após, a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 min para que o derivatizante agisse. Em seguida, aferiu-se o volume (10 mL) com heptano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e o volume de 1µL injetado em cromatógrafo gasoso.

Tabela 2.1- Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos.

| Padrão externo | Soluções de calibração | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Monooleína (mg/L) | 1500 | 1000 | 500 | 300 | 100 | 50 | 40 | 20 |
| Dioleína (mg/L) | 1500 | 1000 | 700 | 400 | 150 | 100 | 80 | 50 |
| Trioleína (mg/L) | 2000 | 1500 | 1000 | 800 | 500 | 300 | 100 | 50 |

2.2.3.6 Avaliação das velocidades iniciais de reação de esterificação

Em cada estudo cinético realizado com os diferentes substratos avaliados, foi verificada velocidade inicial de reação. O cálculo da velocidade inicial de reação (r) foi realizado dividindo-se a variação de conversão a ésteres metílicos e etílicos num determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear da curva cinética, conforme Equação 2.4.

$$r = \frac{dC}{dt_{t=0}}$$

(Equação 2.4)

Onde:

r= velocidade inicial de reação (min^{-1});

C= conversão de ésteres etílicos/metílicos no tempo t (% , m/m teor de ésteres);

C0= conversão de ésteres etílicos/metílicos no tempo 0 (% , m/m teor de ésteres);

t= tempo (min);

t0= tempo do início da reação (min).

2.3 Resultados e Discussão

Neste item serão apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento da primeira etapa deste trabalho, relacionados à definição do melhor sistema para a produção dos ésteres de interesse, estudos relativos à capacidade e aplicabilidade da enzima *Eversa® Transform*, estudos cinéticos da produção de ésteres metílicos e desempenho da lipase frente ao estudo do escalonamento do processo em laboratório, utilizando óleo de soja refinado, óleo de soja com diferentes concentrações de ácido oleico (substrato de alto teor de AGL), óleo de macaúba, e também as matérias-graxas de reuso, (óleo de fritura e óleo ácido residual). Após, o aprofundamento do estudo utilizando o substrato óleo ácido residual, com distintas concentrações de lipase, possibilidade do reuso da enzima em reações de esterificação utilizando álcool etílico e metílico, juntamente com a adição da etapa de polimento da reação, visando à máxima produção de ésteres, com menores custos de produção e melhor aproveitamento dos substratos e catalisadores envolvidos no processo.

2.3.1 Produção enzimática de ésteres metílicos utilizando óleo de soja

Neste subitem, serão apresentados os resultados dos estudos realizados utilizando o óleo de soja refinado comercial, e misturas deste com frações de ácido oléico, que representam substratos de alto teor de AGL. O óleo de soja é uma matéria-prima muito utilizada na produção de ésteres, por ser um óleo estável e de grande disponibilidade, por isso escolhido como matéria-prima base para os primeiros testes de produção de ésteres metílicos.

2.3.1.1 Seleção do sistema reacional para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos

Primeiramente, foram analisados dois sistemas para produção de ésteres metílicos via catálise enzimática com a lipase *Eversa® Transform*: o sistema de produção por meio de agitação mecânica por meio de pás (250, 360 e 700rpm) e o sistema utilizando agitação orbital com erlemeyers aletados (incubação em shaker 250 rpm). Os resultados dos rendimentos quanto ao teor de ésteres obtidos pelos diferentes sistemas podem ser observados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2- Resultados obtidos nos sistemas de reação com agitação mecânica e agitação orbital para a produção de ésteres metílicos, utilizando lipase *Eversa Transform* (1%), razão molar óleo de soja/metanol de 1:4,5 e 2,5% de água em diferentes níveis de agitação.

| | Agitação Mecânica | | | Agitação Orbital |
|---------------|-------------------|---------|---------|------------------|
| | 250 rpm | 360 rpm | 700 rpm | 250 rpm |
| Teor FAME (%) | 1,5 | 21,4 | 25 | 95,3 |

O sistema utilizando agitação orbital, *shaker*, apresentou maiores conversões de ésteres metílicos utilizando o óleo de soja como substrato, como pode ser observado na Tabela 2.2. Nesse estudo, a concentração enzimática (1%), o tempo de reação (16 h), assim como os demais substratos, óleo, metanol e água, foram mantidos iguais para diferentes reações nos dois sistemas, entretanto, a intensidade da agitação teve diferentes níveis, com o intuito de melhorar a mistura reacional nos reatores. Os melhores resultados atribuídos a utilização do sistema em *shaker*, tem relação com a melhor vedação do meio reacional e a maior eficiência de mistura, propiciados pelos erlemeyers aletados.

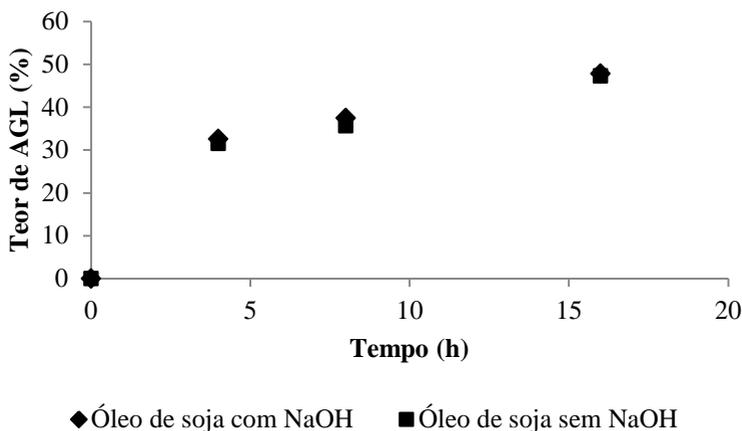
Os erlemeyers têm melhor vedação do sistema reacional, pois levam tampas de silicone, diferente do sistema com agitação mecânica, que necessita de uma abertura para entrada da pá agitadora. A vedação

pode ser um fator crucial no rendimento da reação, pois a agitação aliada com a elevação da temperatura pode contribuir para a evaporação do álcool metílico, substrato essencial para a produção dos ésteres. Entretanto, a maior eficiência de mistura pode ser atribuída às aletas feitas nos erlenmeyers, que promovem o movimento oscilatório dos fluidos da reação, assim melhorando performance reacional. Com isso, a produção por meio de agitação orbital e erlenmeyers aletados foi selecionado como o sistema padrão para as demais reações de produção de ésteres em modo batelada alimentada utilizando a lipase *Eversa Transform* e os distintos substratos.

2.3.1.2 Lipase *Eversa Transform* na hidrólise de óleo de soja com e sem NaOH

Buscando a melhor compreensão da reação para a produção de biodiesel, da verificação da capacidade hidrolítica da enzima e do comportamento da enzima em meio reacional básico, foram realizados testes preliminares utilizando os substratos óleo de soja com adição de NaOH (10 ppm) e óleo de soja sem adição de NaOH (0 ppm) e avaliado o teor de AGL ao final dos tempos 8 e 16 h, como pode ser observado na Figura 2.7. Os ensaios continham matéria graxa (100 g), água destilada (6% m/m, em relação ao substrato), enzima *Eversa® Transform* (1% m/m, em relação ao substrato) e concentração de NaOH (0-10 ppm), incubados em shaker (35 °C/250 rpm).

Figura 2.7- Resultados quanto a verificação da capacidade de hidrólise da lipase *Eversa® Transform* utilizando óleo de soja com 1% de lipase, 6% de água com e sem NaOH, em shaker (35 °C/250 rpm).



Como pode ser observado na Figura 2.7, não houve diferença quanto ao teor de AGL entre o meio reacional com ou sem adição de NaOH. Assim a adição de NaOH, não se mostrou favorável ao aumento da velocidade de hidrólise da reação. Também, a enzima demonstrou tolerância a meios com a presença de NaOH, demonstrando a flexibilidade desta a diferentes substratos. Também é possível concluir que a enzima *Eversa® Transform* possui uma boa capacidade de hidrólise, ampliando assim sua gama de aplicações em catálise enzimática e compreendendo melhor sua atuação em reações de produção de biodiesel.

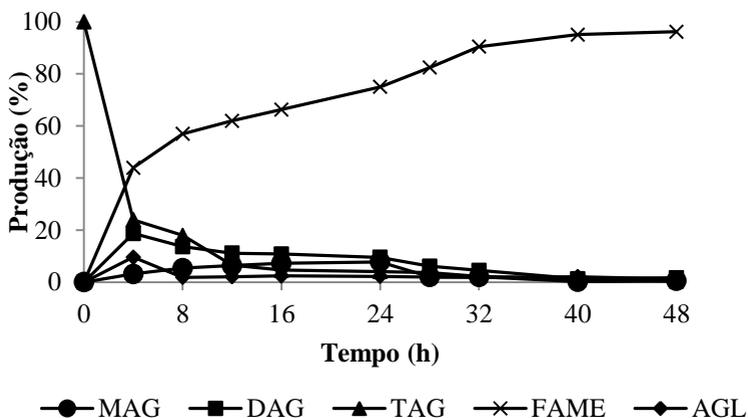
2.3.1.3 Avaliação da cinética reacional para a produção de ésteres metílicos utilizando óleo de soja

Foram realizados diferentes estudos cinéticos para verificar o comportamento da reação utilizando óleo de soja como substrato, mediante diferentes concentrações de *Eversa® Transform* e a presença e ausência de água no meio reacional, com objetivo de determinar as melhores condições reacionais, a necessidade da adição de água no sistema e o tempo necessário para a reação de transesterificação. Foram utilizadas as condições: óleo de soja e álcool metílico na razão molar metanol/óleo de 4,5:1, onde o metanol foi alimentado em frações iguais

durante as primeiras 6 horas de reação, 0 a 2,5% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada e 0,5 a 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa® Transform*, incubado em shaker (35°C/250rpm). Os experimentos foram destrutivos, sendo as reações conduzidas nos tempos de 0, 4, 8, 12, 16, 24, 28, 32, 40 e 48 horas de reação.

Na Figura 2.8 estão expostos os resultados quanto aos teores de: FAME, MAG, DAG, TAG e AGL, nos diferentes tempos reacionais utilizando 2,5% água na reação e 0,5 % de *Eversa® Transform*.

Figura 2.8- Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando razão molar metanol/óleo de soja 4,5:1, 0,5% *Eversa Transform* e 2,5% de água, em shaker (35 °C/250 rpm).

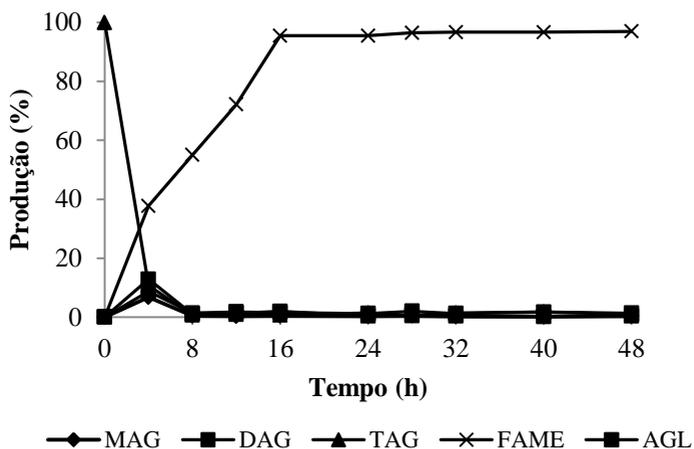


Juntamente com os estudos cinéticos da reação foram realizados brancos reacionais, para cada caso, onde foram adicionados todos os reagentes utilizados na cinética, exceto a enzima e incubado em shaker (35 °C/250 rpm/16 h). Os resultados da produção de ésteres sem o biocatalizador foi zero, assim como o teor de AGL, comprovando que a produção de ésteres metílicos apenas ocorre na presença do catalisador enzimático *Eversa® Transform*. Também foi calculada a velocidade inicial de reação, para cada curva cinética da formação de ésteres.

Através da análise da Figura 2.8, observamos que a reação apresentou grande formação de ésteres (95,1%), porém, no tempo reacional de 40 h, o que representa um tempo relativamente longo de reação. Também observamos os valores de AGL (2,1%) no mesmo tempo (40 h), seguidos por DAG (1,4%), TAG (1,3%) e MAG (0,2%).

A velocidade inicial referente à formação de ésteres metílicos foi de $0,196 \text{ min}^{-1}$. Os resultados quanto aos teores de ésteres metílicos, MAG, DAG, TAG e AGL nos diferentes tempos reacionais, utilizando 2,5% água e 1% de *Eversa® Transform* podem ser observados na Figura 2.9.

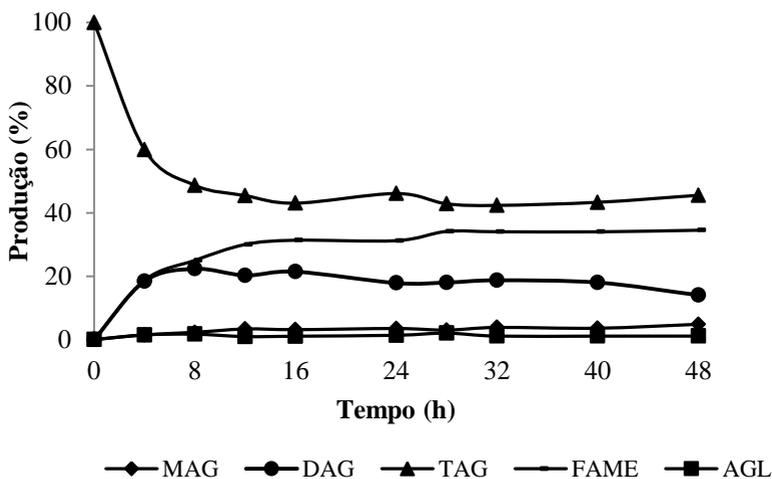
Figura 2.9- Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando a razão molar metanol/óleo de soja 4,5:1, 1% de *Eversa® Transform* e 2,5% de água, em shaker ($35 \text{ °C}/250 \text{ rpm}$).



Nessa condição (Figura 2.9) houve alta formação de ésteres metílicos (95,5%), no tempo de reação de 16 h, um tempo reacional mais curto se comparada a cinética anterior (Figura 2.8) e também se notou o aumento da velocidade inicial de reação que neste caso foi de $0,22 \text{ min}^{-1}$, evidenciando a melhora na produção por meio do aumento da concentração de *Eversa® Transform* de 0,5% para 1%. Em relação a quanto à formação de outros produtos de reação no mesmo tempo (16h), os valores encontrados foram de DAG (1,9%), AGL (1,4%), MAG (0,4%) e TAG (0,6%).

Os resultados quanto aos teores de ésteres metílicos, MAG, DAG, TAG e AGL, nos diferentes tempos reacionais utilizando 0% água destilada e 1% de *Eversa® Transform* podem ser observados na Figura 2.10.

Figura 2.10- Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando a razão molar metanol/óleo de soja 4,5:1, 1% *Eversa® Transform* e 0% de água destilada, em shaker (35 °C/250 rpm).



Na Figura 2.10 observamos que os valores máximos de ésteres metílicos (22%) foram obtidos em 8 h, e se mantiveram uniformes nas demais 40 h de reação. Esse valor de ésteres é considerado baixo se comparado às cinéticas anteriores com 2,5% de água (Figuras 2.8 e 2.9). Conseqüentemente, a velocidade inicial de reação, assim como a produção de ésteres, também foi menor em comparação as cinéticas anteriores com 2,5% de água (Figuras 2.8 e 2.9), sendo esta $0,089 \text{ min}^{-1}$.

As lipases, em sua forma livre principalmente, são muito sensíveis a altas concentrações de metanol. Segundo Pessoa e Kilikian (2014), a alta concentração de solventes orgânicos combinado a altas temperaturas (maior que 10 °C) pode acabar por desnaturar algumas proteínas. Com isso, a adição de água ao meio reacional atuaria diluindo a concentração do metanol no meio, e ele se torna menos agressivo a lipase. Segundo Nielsen et al. (2008), a água é um componente essencial para manter a estrutura tridimensional específica de algumas lipases, especialmente se forem utilizadas na forma solúvel. Assim, a água proporciona maior proteção para a lipase em reações de transesterificação, evitando assim a inibição por substratos e produtos durante a reação (REMONATTO et al., 2016).

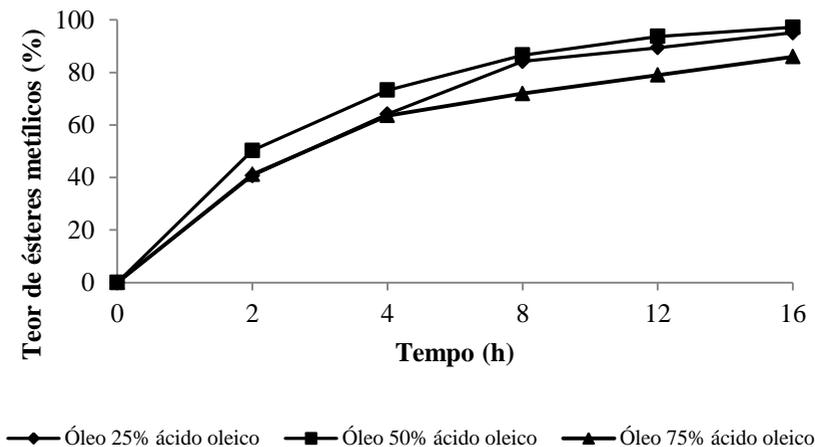
A partir dos resultados apresentados nas reações com as concentrações de 0,5 e 1% de *Eversa® Transform* e de 0 e 2,5% de

água, em distintos tempos reacionais, os melhores resultados encontrados para a produção de biodiesel utilizando óleo de soja com o catalisador enzimático livre *Eversa® Transform*, foram na condição: 1% de enzima, 2,5% de água, razão molar metanol/óleo de 4,5:1 em 16 h de incubação (35 °C/250 rpm), com produção de 95% em ésteres metílicos.

2.3.1.4 Avaliação cinética da reação utilizando *Eversa Transform* e óleo de soja com alto teor de ácido oleico

Foram realizados estudos cinéticos para verificar o comportamento da reação, bem como o comportamento da enzima com matérias graxas parcialmente hidrolisadas, com alto teor de AGL. Utilizou-se o óleo de soja refinado com acréscimo de 25%, 50% e 75% de ácido oleico; razão molar metanol/óleo de 4,5:1, onde o metanol foi alimentado em frações iguais durante as primeiras 6 horas de reação; 2,5% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada e 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa® Transform*, incubado em shaker (35 °C/250 rpm). Os tempos reacionais avaliados foram de 0, 2, 4, 8, 12 e 16 horas. Os resultados quanto ao teor de FAME com os diferentes substratos, óleo de soja com 25%, 50% e 75% de ácido oléico, pode ser observado na Figura 2.11, e o resultado quanto ao teor de AGL final dos melhores resultados serão informados ao longo da discussão.

Figura 2.11 - Estudo cinético da produção de ésteres metílicos utilizando óleo de soja com 25%, 50% e 75% de ácido oleico na razão molar metanol/óleo de 4,5:1, 1% *Eversa® Transform* e 2,5% de água em shaker (35 °C/250 rpm).



Os melhores resultados com ambos os substratos foram obtidos no tempo de reação 16 horas. Sendo o substrato com 25% de AGL com valores de 95,1% de ésteres metílicos e 3,51% de AGL, o substrato com 50% AGL com 97,2% de ésteres e 3,50% de AGL, e o óleo com 75% de AGL com a conversão de ésteres metílicos de 85,9% e teor de AGL de 17,45%).

Quanto à velocidade inicial, os substratos apresentaram valores distintos sendo de $0,281 \text{ min}^{-1}$ com o substrato de 25% de AGL, de $0,328 \text{ min}^{-1}$ com o de 50% de AGL e $0,28 \text{ min}^{-1}$ com o de 75% de AGL. Essas velocidades iniciais refletem a atuação da lipase, diante aos diferentes substratos. A maior velocidade de formação de ésteres, referente ao substrato com 50% de AGL, demonstra que, em amostras parcialmente hidrolisadas, a formação de ésteres é mais rápida.

Contudo, como pode ser visto o substrato com 75% de AGL, teve o menor teor de ésteres (85,97% FAME) em 16 horas, apesar de esse ser considerado um excelente resultado, levando em conta as dificuldades reacionais impostas pela presença de alto teor de AGL no substrato. O alto teor de AGL pode acarretar maior formação de água devido à esterificação desses, muitas vezes reações com altos níveis de AGL necessitam de maior tempo de reação, pois a presença de água pode diluir o meio. Segundo Shibasaki-Kitakawa et al. (2015), em

reações com altos teores de AGL, o ideal seria a remoção de água durante a reação e a adição de excesso de álcool, necessários para deslocar o equilíbrio da reação em direção a formação de produto, devido à natureza reversível do éster formado.

He et al., (2017) na avaliação da produção de monoacilgliceróis a partir de ácidos graxos poli-insaturados utilizando a lipase *Eversa Transform*, constataram que esta lipase é insensível à variação do teor de água, ou seja, o seu comportamento catalítico é semelhante em uma ampla gama de conteúdos de água, porém, com um conteúdo de água muito elevado, a hidrólise começa a dominar a reação gerando mais AGL.

Os valores de FAME dos substratos óleo de soja com 25 e 50% de AGL foram semelhantes aos valores encontrados no estudo anterior utilizando o óleo de soja (com 2,5% de água e 1% de *Eversa® Transform*), ou seja, apresentaram altos teores de formação de ésteres etílicos. Porém, as velocidades iniciais de formação de ésteres foram superiores à obtida no estudo anterior ($0,22 \text{ min}^{-1}$), o que é justificável por serem amostras parcialmente hidrolisadas.

Por meio dos resultados obtidos com os substratos óleo de soja com diferentes concentrações de ácido oleico, fica evidente o excelente desempenho da enzima *Eversa® Transform* frente a matérias-primas de alto teor de AGL. A utilização de catalisadores enzimáticos reduz os requisitos com pré-tratamento da matéria prima, pela alta qualidade do produto obtido, com isso reduzem-se os custos da planta. Além disso, a glicerina produzida tem maior valor agregado em comparação com a produzida em operações de biodiesel convencional (catálise alcalina). O teor de sal na glicerina bruta obtida da produção de biodiesel convencional, utilizando catalisadores alcalinos, varia de 5% a 7%, o que torna a técnica convencional de purificação mais dispendiosa, enquanto que num processo de transesterificação catalisada por lipase a qualidade da glicerina bruta é melhor tornando esse processo muito mais simples e econômico (AARTHY et al., 2014; YANG et al., 2012).

Li et al. (2014) estudaram a produção de ésteres utilizando óleos com diferentes teores de fosfolipídios, muito presente em óleos vegetais brutos e que tendem a afetar a estabilidade térmica das enzimas, com adição de 50% e 80% de ácido oleico, os resultados mostraram que a presença de 50% de AGL conduziu a uma queda de 6% em rendimento ésteres metílicos em relação ao controle (sem fosfolipídios), já com 80% de AGL uma melhoria de 4% em rendimento de ésteres, ou seja, a presença de AGL no sistema reacional pode contribuir para diminuir o efeito inibidor causado pela coexistência de fosfolípidos e metanol.

Cesarini et al. (2013) avaliaram a produção de biodiesel com a lipase solúvel *Callera Trans L*. e o óleo de soja bruto com teor inicial de AGL de 7,8%, onde alcançaram a produção de 96% de ésteres metílicos após 24 h de reação à 35 °C em 200 rpm de agitação, na presença de água. O bom desempenho da enzima *Eversa® Transform* frente a óleos com alto teor de AGL foi de grande valia, pois com a possibilidade de produção de biodiesel a partir de óleos com alto teor de AGL abre uma nova perspectiva para a produção de biodiesel, a partir de óleos ácidos, provenientes muitas vezes de reuso ou de matérias-primas não comestíveis, que não têm destino nobre e correto.

2.3.2 Síntese enzimática de ésteres metílicos utilizando óleos de baixo valor agregado

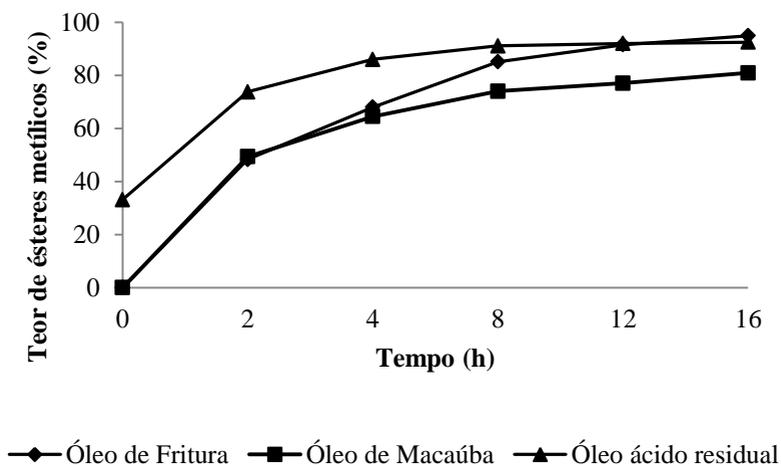
A possibilidade do uso de substratos como óleo de macaúba, uma matéria-prima com características interessantes, com alto teor de ácido oleico e ampla disponibilidade; óleo de fritura usado, que trata-se de um óleo considerado um dos mais abundantes resíduos, tanto doméstico quanto industrial, juntamente com resíduos advindos da indústria de óleos, os quais geralmente são misturas heterogêneas de diferentes correntes residuais, como substratos contemplam múltiplos benefícios. Visto que existem barreiras no aproveitamento destas matérias-primas, para a produção de biodiesel utilizando as rotas convencionais (catálises química), e considerando seus grandes potenciais como matérias-primas de baixo custo, foram realizados estudos de produção de ésteres metílicos com os óleos: de macaúba, de fritura usado e ácido residual (resíduos industriais), utilizando como o catalisador a enzima *Eversa® Transform*.

Assim como as demais matérias-primas estudadas, buscou-se primeiramente avaliar o estudo cinético da reação, com as condições: razão molar metanol/matéria graxa de 4,5:1, onde o metanol foi alimentado em frações iguais durante as primeiras 6 horas de reação, 2,5% (m/m, em relação ao substrato) de água destilada e 1% (m/m, em relação ao substrato) de enzima *Eversa® Transform*, incubado em shaker (35 °C/250 rpm). Os tempos reacionais avaliados foram de 0, 2, 4, 8, 12 e 16 h. Foi realizado um branco reacional, sem a presença da enzima, e incubado em shaker (35 °C/250 rpm/16 h), para cada matéria graxa estudada, comprovando que a produção de ésteres metílicos

apenas ocorre na presença do catalisador enzimático *Eversa*® *Transform*.

O óleo ácido residual utilizado continha um teor de ésteres inicial considerável (33%) e teor elevado de AGL (42%). Esses valores devem-se a natureza complexa do óleo, composto por correntes residuais da produção e refino de óleo de soja e também de biodiesel (via catálise química). Os óleos de macaúba e de fritura usado também foram analisados, quando aos teores de ésteres e acidez, onde, quanto a ésteres nenhuma das matérias-primas apresentou valores iniciais, e quanto à acidez, o óleo de macaúba continha 60,5% e o de fritura usado 0,6%. A avaliação cinética da produção de FAME com óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual pode ser observado na Figura 2.12, e o resultado quanto ao teor de AGL final dos melhores resultados serão informados ao longo da discussão.

Figura 2.12- Avaliação cinética da produção de ésteres metílicos com óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual, com 1% de *Eversa*® *Transform*, 2,5% de água e razão molar metanol/óleo 4,5:1, em shaker (35 °C/250 rpm).



Como podemos observar na Figura 2.12, com o óleo de fritura usado, os melhores resultados foram encontrados em 16 h, totalizando 94,99% de ésteres metílicos e 2,71% de AGL, e a velocidade inicial de reação deste foi de $0,307 \text{ min}^{-1}$. Utilizando óleo de macaúba, que continha teor de inicial de 60,5%, ou seja, um óleo de alto teor de AGL,

os maiores valores de ésteres encontrados foram de 80,89%, em 16 horas, sendo velocidade inicial de reação do óleo de macaúba foi de $0,297 \text{ min}^{-1}$, muito próxima à do óleo de fritura usado.

O menor conteúdo de ésteres produzido pela reação utilizando óleo de macaúba, em comparação aos demais óleos de reuso, pode ter sido ocasionado pela presença de compostos não convertíveis a ésteres. Segundo estudos realizados por Michelin et al. (2015) para produção de biodiesel a partir óleo de macaúba, utilizando a lipase Novozym 435 e sob a influência de ultrassom, um novo parâmetro chamado "convertibilidade" foi estabelecido, que representa a máxima conversão de ésteres que pode ser atingida a partir de uma matéria-prima graxa. Ainda de acordo com Michelin et al. (2015), a partir da análise da composição química dos principais ácidos graxos presente no óleo de macaúba, concluiu-se que a convertibilidade máxima do óleo é de 80,1%, implicando, portanto, que 19,9% de compostos não contribuem para a formação de ésteres, independentemente da eficiência do processo de conversão utilizado. Deste ponto de vista, o valor máximo de teor de ésteres metílicos haveria sido alcançado.

Lopes et al. (2013) estudaram a viabilidade econômica da produção de biodiesel no Brasil, utilizando o óleo de macaúba como matéria-prima. Para isso utilizou o software SIMB-E, em que um modelo de fluxo de caixa aplicado à produção de biodiesel foi implementado, índices econômicos relacionados aos recursos de produção de biodiesel, competitividade entre os preços de venda de biodiesel e do diesel do petróleo foram considerados. Verificou-se que para o biodiesel ser competitivo é preciso fábricas de óleo com transesterificação alcalina, e o sucesso da produção de biodiesel ainda requer as adaptações ao processo, e aproveitamento dos co-produtos de matérias-primas e glicerol. A macaúba teve excelentes resultados e desponta como potencial de cultura a ser utilizado na produção de biodiesel. No entanto, há muito a ser investigado para isso, como mais estudos envolvendo a catálise enzimática e a otimização da produção. A domesticação da planta e melhoramento no processamento do óleo também são fatores indispensáveis para garantir a sua disponibilidade de uso a longo prazo.

Os valores da síntese de ésteres metílicos utilizando óleo ácido residual apresentaram valores de 92% em 8 h de reação, alta conversão com a metade do tempo necessária para os demais substratos. Apesar do alto conteúdo inicial de ésteres no substrato, estes valores são muito altos para o curto tempo reacional. A velocidade inicial também foi

elevada $0,409 \text{ min}^{-1}$, a maior encontrada levando-se em conta todos os óleos até então estudados neste trabalho.

Carvalho et al. (2013) avaliaram o potencial de matérias-primas não-comestíveis para produzir biodiesel via enzimática. Foram utilizados na etanólise catalisada por lipase imobilizada produzida por *Burkholderia cepacia* os óleos de andiroba (*Carapa guianensis*), babaçu (*Orbignya* sp.), pinhão-manso (*Jatropha curcas*), macaúba (*Acrocomia aculeata*), palmeira (*Elaeis guineensis*) e resíduos industriais (sebo bovino), onde os melhores resultados 92% foram obtidos em 24 h de reação.

2.3.3 Escalonamento das reações de produção de ésteres metílicos com as matérias-primas estudadas

Baseado nos resultados obtidos nas cinéticas realizadas anteriormente com cada uma das matérias-primas, (óleo de soja, óleo de soja com 25, 50 e 75% de AGL, óleo de fritura usado, óleo de macaúba e óleo ácido residual), foi realizado um estudo de escalonamento laboratorial do processo, com a melhor condição definida para a produção de ésteres. Utilizou-se erlenmeyers de 1000 mL com 600g de matéria graxa, álcool metílico (razão molar metanol/matéria graxa 4,5:1), água destilada 2,5% (m/m, em relação ao substrato), enzima *Eversa® Transform* 1% (m/m, em relação ao substrato) e incubação em shaker (35°C e 250rpm), no tempo de 8 h para o óleo ácido residual e de 16 h para as demais matérias-primas. Os resultados quanto ao teor de AGL inicial, AGL final e teor final de ésteres metílicos, estão descritos na Tabela 2.3, lembrando que apenas o óleo ácido residual continha teor de ésteres no início da reação (33%).

Analisando os dados da tabela 2.3, no qual foram feitas as reproduções das reações anteriores (100 g), porém em escala maior (600 g), os resultados foram similares aos encontrados nas cinéticas. Os óleos de soja com 25 e 75% de AGL, apresentaram o teor de ésteres um pouco menor, provavelmente devido a algum ajuste de processo pelo aumento de escala. No entanto, os demais óleos mantiveram excelentes resultados, com isso, é possível observar que um provável aumento de escala não enfrentará grandes barreiras, visto que as reações são relativamente simples e o aumento de 6 vezes da escala inicial não implicou em problemas e o processo não necessitou de adaptações. Assim, os resultados demonstram que a enzima *Eversa® Transform* pode ser aplicada em maior escala, sendo um catalisador com grande versatilidade e que não exige um sistema complexo e oneroso de reação.

Tabela 2.3- Escalonamento da produção de biodiesel por meio dos substratos óleo de soja, óleo de soja com 25, 50 e 75% de AGL, óleo de macaúba, óleo de fritura usado e óleo ácido residual, utilizando a enzima *Eversa Transform* nas condições reacionais, 1% de *Eversa® Transform*, 2,5% de água e razão molar metanol/óleo de 4,5:1, em shaker (35 °C/250 rpm).

| | Teor de AGL inicial (%) | Teor de AGL final (%) | Teor FAME (%) |
|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------|
| Óleo de soja | 0,30 | 3,80 | 95,8 |
| Óleo de soja com 25% ácido oleico | 23,12 | 3,00 | 93,83 |
| Óleo de soja com 50% ácido oleico | 46,53 | 4,35 | 97,30 |
| Óleo de soja com 75% ácido oleico | 68,91 | 29,68 | 84,30 |
| Óleo ácido residual | 44,30 | 3,07 | 96,20 |
| Óleo de fritura usado | 0,63 | 3,10 | 97,29 |
| Óleo de macaúba | 60,54 | 7,30 | 80,53 |

Baseado nestes resultados e no excelente desempenho do substrato óleo ácido residual em seu estudo cinético para a produção de ésteres metílicos estudou-se sua aplicação na produção de ésteres metílicos e etílicos, também a caracterização do substrato, estudo do efeito da concentração da lipase *Eversa® Transform* e reuso da lipase para a produção de ésteres.

2.3.4 Estudo dos parâmetros da produção de ésteres de ácido graxo com a lipase *Eversa® Transform* a partir de óleo ácido residual

Os resíduos advindos da indústria de óleos, como descrito anteriormente, geralmente são misturas heterogêneas de diferentes correntes residuais, inclusive de mais de uma fonte de gordura ou óleo. As etapas como refino, destilação, tanto do óleo como de outros produtos produzidos a partir deles, geram uma grande carga de ácidos graxos, mono-, di- e triacilgliceróis. Devido à complexibilidade dessa mistura, seu descarte acaba por se tornar um problema para a indústria. Visto que existem barreiras em seu aproveitamento para a produção de biodiesel utilizando as rotas convencionais, considerando seu baixo custo e seu excelente desempenho nos testes preliminares realizados em esse trabalho, realizou-se neste item a caracterização do substrato

(dividido em lotes de recebimento), estudo do efeito da concentração da lipase e reuso da enzima para a produção de ésteres metílicos e etílicos com o catalisador enzimático *Eversa® Transform*.

2.3.4.1 Caracterização do óleo ácido residual

Como citado acima, a matéria-prima óleo ácido era muito heterogênea. Então foram feitas análises a cada lote recebido. Ao longo deste capítulo, foram estudados 3 lotes de óleo ácido residual, os quais serão identificados a cada estudo nas sessões seguintes. Onde o lote 1 foi utilizado na primeira cinética realizada (item 2.3.2) e no escalonamento (item 2.3.3). Como pode ser observado na Tabela 2.4, a matéria-prima apresentava alto teor de AGL, baixo teor de água, baixo teor de glicerol e teor apreciável de ésteres, provavelmente resíduos vindos da produção e processamento de biodiesel da empresa doadora. Diante do teor apreciável de ésteres, optou-se por reduzir a quantidade de álcool empregado nas reações utilizando óleo ácido residual, da razão molar metanol/óleo de 4,5:1 para 3,5:1 gerando assim economia no processo, pelo menor emprego de reagentes e pela quantidade de metanol desnecessário para a reação, que apenas contribuiriam para o aumento do volume de efluentes ao final do processo.

Tabela 2.4– Caracterização dos lotes de óleo ácido residual quanto ao teor de AGL, glicerol, água e ésteres de ácido graxo.

| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Teor de AGL (%) | 42,09 | 44,03 | 45,09 |
| Glicerol (%) | 2,57 | 2,44 | 0,43 |
| Água (%) | 0,22 | 0,40 | 0,31 |
| Ésteres (%) | 33,15 | 21,60 | 28,01 |
| Sabões (%) | 19,40 | 19,40 | 19,40 |

Segundo laudo anterior emitido pela empresa, Apêndice A, a matéria-prima poderia conter teor apreciável de sabões, cerca de 20%, que se trataria de fato em material não passível de conversão a ésteres. Não foi possível reproduzir a metodologia de análise do percentual de sabões para a confirmação dos valores, com isso adotou-se para os todos

os lotes o mesmo valor quanto ao teor de sabões, de 19,4%. Na Figura 2.13 é possível observar o aspecto visual do óleo ácido residual estudado.

Figura 2.13 - Aspecto visual do óleo ácido residual estudado nas reações de produção de biodiesel enzimático utilizando a lipase *Eversa® Transform*.

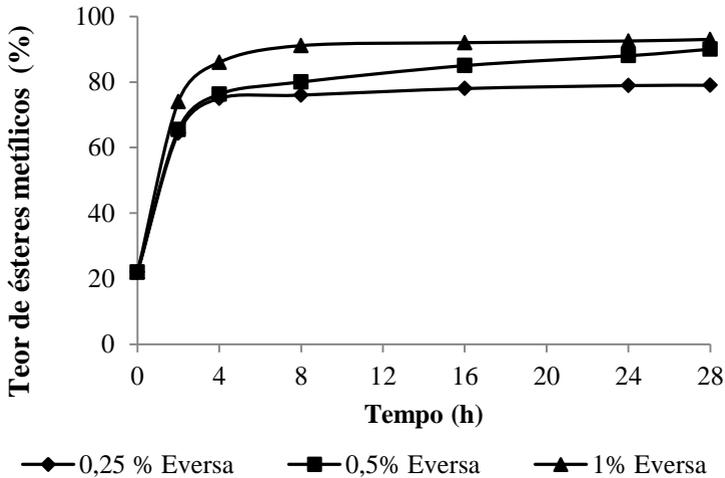


2.3.4.2 Cinética de óleo ácido residual com diferentes concentrações da lipase *Eversa® Transform*

Realizaram-se estudos cinéticos (destrutivos), para verificar o comportamento da reação com diferentes concentrações de enzima *Eversa® Transform*. Utilizou-se as condições óleo ácido residual (lote 2) (100g), álcool metílico (razão molar metanol/óleo de 3,5:1), água destilada 2,5% (m/m, em relação ao substrato) e enzima *Eversa® Transform* nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1% (m/m, em relação ao substrato) e incubado em shaker (35°C/250rpm). As reações conduzidas nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 28 h de reação. Na Figura 2.14 é possível verificar o perfil da formação de ésteres metílicos utilizando óleo ácido residual com 0,25, 0,5 e 1% de *Eversa® Transform*, todavia

o resultado quanto ao teor de AGL nas maiores produções de FAME será apresentado ao longo da discussão.

Figura 2.14- Teor de ésteres metílicos de ácido graxo das cinéticas utilizando óleo ácido residual na razão molar metanol/óleo de 3,5:1, 2,5% de água, e as concentrações de 0,25, 0,5 e 1% de *Eversa® Transform*.



Na Figura 2.14 é possível verificar que todas as concentrações permitiram o alcance de bons resultados, especialmente quando utilizado 1% de enzima. Os experimentos com 0,5% de enzima apresentaram teores de FAME, ao final do processo, bem próximos aos alcançados com 1% de enzima. Em 8 horas de reação, foram obtidos com 0,25% de enzima 76% de ésteres metílicos, já com 0,5% de *Eversa® Transform* 80% de ésteres metílicos e com 1% de lipase 92% de ésteres metílicos e cerca de 9% de AGL para a concentração de 0,25% de *Eversa® Transform* e de 5% de AGL para 0,5 e 1%. Resultados excelentes ao utilizar pequenas concentrações da enzima, num tempo curto de reação e com um substrato de baixo custo.

As velocidades iniciais de reação foram $0,361 \text{ min}^{-1}$ utilizando 0,25% de lipase, $0,363 \text{ min}^{-1}$ utilizando 0,5% de lipase e $0,407 \text{ min}^{-1}$ com 1% de lipase, todas as velocidades foram altas, com valores crescentes a medida que aumentou-se a concentração de *Eversa® Transform*. A concentração da enzima livre *Eversa® Transform* de 0,5% foi suficiente para a obtenção de altos conteúdos de ésteres em um

curto tempo de reação, 80% de ésteres em 8 horas, fato que demonstra o grande poder catalítico da enzima. As demais reações também apresentaram resultados excelentes, porém, com 0,5%, tem-se uma concentração moderada de lipases com resultados satisfatórios. O baixo percentual de uso da lipase em reações significa maior economia de processo, assim como o curto tempo de reação necessário para propiciar elevado teor do produto de interesse, características que evidenciam a excelente escolha do catalisador lipase *Eversa Transform*.

Hayyan et al. (2014), utilizaram uma mistura de óleos de rejeitos e óleos brutos com alto teor de AGL para a produção de biodiesel utilizando o ácido orgânico (1R) - canfor-10-sulfônico como catalisador, onde o teor de AGL foi reduzido de 8% a menos de 1% sob condições ótimas. Shah et al. (2014) também estudaram a produção de biodiesel a partir de óleo de ácido utilizando catalisador químico, ácido sulfônico meso-estruturado SBA-15, onde foi alcançada alta conversão, 99% de ésteres, obtida nas condições ótimas de temperatura 100 °C com 4% de catalisador e a razão molar de óleo/metanol 1:15, no tempo de 8 h. Pedersen et al. (2014) avaliaram o processo de produção de biodiesel a partir de óleo de canola em modo batelada utilizando a lipase aquosa *Callera Trans L.*, alcançando 98% de ésteres, utilizando excesso de álcool etílico (razão molar metanol/óleo 4,5:1), 20% de água em relação a massa de óleo, agitação de 1400 rpm e 1% de lipase em 24 h de reação.

2.3.4.3 Estudo de reuso da lipase *Eversa Transform* e adição da etapa de polimento do produto recuperado do meio reacional

Visando o melhor aproveitamento da enzima e a possibilidade de aperfeiçoar a produção, optou-se por utilizar nesta etapa 0,5% de lipase *Eversa® Transform* nas reações, com intuito de produzir cerca de 80% de ésteres ao final de 8 horas, e após adicionar ao processo uma etapa de polimento final, para obtenção de maior concentração de ésteres no meio reacional. Também foi estudado, em paralelo com o polimento, o reuso da enzima livre *Eversa® Transform* utilizada na produção dos ésteres de ácido graxo. Simulando também rotas mais econômicas para a indústria, onde foram estudados dois processos de separação: a centrifugação e a decantação. Utilizaram-se dois tipos de alcoóis, etanol e metanol, para avaliar o comportamento da lipase mediante cada um deles.

Como no caso do óleo ácido residual a água é adicionada teoricamente para maior proteção da enzima perante aos substratos, visto que a este substrato é parcialmente hidrolisado (rico em AGL), e também como a concentração da enzima caiu pela metade nestes experimentos, 0,5% apenas, optou-se por reduzir a quantidade de água de 2,5% para 2% (m/m em relação ao substrato), reduzindo assim a quantidade de água que deve ser eliminada ao final do processo. Essas condições foram escolhidas para as etapas de reuso e polimento do processo, que serão apresentadas a seguir.

2.3.4.3.1 Reuso da enzima livre e polimento do biodiesel utilizando óleo ácido residual e diferentes alcoóis

O reuso da enzima e o polimento do biodiesel foram realizado primeiramente com o álcool metílico, após com álcool etílico (99,5%) e por fim, com álcool etílico comercial (93,57%). A primeira reação (ciclo da enzima 1/ reação 1) do processo foi conduzida por 8 horas nas condições: óleo ácido residual (lote 2) (100 g); álcool metílico ou álcool etílico (99,5%) ou álcool etílico comercial (93,57%) (razão molar álcool:óleo 3,5:1), adicionado de hora em hora em 6 frações iguais nos tempos iniciais de reação; água destilada (2%, m/m, em relação ao substrato, para álcool metílico e etílico 99,5% e 0% para o álcool etílico comercial 93,57%), e enzima *Eversa® Transform* (0,5 % m/m, em relação ao substrato) e incubado em shaker (35 °C/250 rpm). Após as 8 h de reação, o volume reacional, ciclo 1/reação 1, foi submetido a separação (ésteres/lipase) por centrifugação (3500 rpm/ 10min) e também por decantação em provetas (12h). Onde somente foram realizadas sem água as reações utilizando álcool etílico 93,57%, isso porque este álcool comercial continha cerca de 6% de água, com isso ele supria sua quantidade necessária para a produção de ésteres.

O topo da reação foi recuperado e encaminhado para a etapa de polimento, com nova carga dos reagentes: álcool na razão molar 3,5:1 (em relação ao óleo não convertido), água destilada 0-2% (m/m, em relação ao óleo não convertido), e a enzima *Eversa® Transform* 0,5 % (m/m, em relação ao óleo não convertido), e incubado em shaker por mais 8 h (35°C/250rpm). Por sua vez, o fundo (fase que contém a lipase *Eversa® Transform*), obtido pela separação, foi recolhido e encaminhado para o reuso (ciclo de uso da enzima 2) com nova carga dos reagentes: razão molar álcool/óleo 3,5:1, sendo o álcool alimentado em 6 frações iguais nas 6 horas iniciais de reação, incubados em shaker por mais 8 h (35°C/250rpm). Na Tabela 2.5 é possível observar os

resultados quanto ao teor de FAME e FAEE no reuso utilizando os diferentes alcoóis como substrato, e os resultados quanto ao teor de AGL destes tempos são apresentados ao longo da discussão. Para ambos os substratos, foram realizados os estudos de apenas 1 reuso, ou seja, 2 ciclos de uso da enzima *Eversa® Transform*.

Tabela 2.5- Valores de FAEE e FAME no reuso da lipase *Eversa® Transform* quanto a produção de ésteres metílicos ou etílicos (%) a partir de óleo ácido residual e álcool metílico e alcoóis etílicos com as distintas formas de separação, realizados com razão molar álcool/óleo de 3,5:1, água de 0 ou 2% e 0,5% de enzima, incubado em shaker por 8 h (35°C/250rpm).

| Ciclos de uso | Teores de ésteres (%) | | | | | |
|---------------|-------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| | Álcool metílico (99,5%) | | Álcool etílico (99,5%) | | Álcool etílico (93,7%) | |
| | Decantado | Centrifugado | Decantado | Centrifugado | Decantado | Centrifugado |
| 1 | 89,0 (±0,3) | 87,2 (±0,2) | 89,9 (±0,1) | 93,4 (±0,2) | 68,0 (±6,6) | 59,3 (±0,8) |
| 2 | 35,3 (±0,2) | 35,7 (±0,5) | 81,1 (±1,1) | 82,9 (±0,4) | 80,8 (±4,0) | 67,4 (±3,1) |

Como pode ser observado nos resultados na Tabela 2.5, o segundo ciclo de uso da lipase *Eversa® Transform* utilizando álcool metílico não foi satisfatório, pois, o teor de ésteres obtidos foi muito baixo. Isso ocorreu, possivelmente, pela ação do álcool metílico que acaba por afetar a atividade da enzima, provocando sua inibição após o primeiro ciclo de uso. O metanol pode ter efeito inibidor sobre enzima, podendo causar sua desnaturação, por isso é necessário sua adição fracionada quando se trabalha com metanólise (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; SHIMADA et al., 2002).

Porém, quanto aos resultados do teor de ésteres etílicos obtidos quando se utilizou álcool etílico (99,5%), como observados na Tabela 2.5, foram elevados, tanto quando utilizada a separação ou a centrifugação. O reuso (ciclo 2) utilizando o álcool etílico apresentou resultados excelentes, pois os valores encontrados, cerca de 82% de ésteres e cerca de 8% de AGL final, foram bem próximos aos encontrados na primeira reação, ciclo 1 para ambos os alcoóis etílicos. Segundo Modi et al. (2006), a substituição do metanol, que é usado no processo tradicional de produção de biodiesel por outros alcoóis, tais

como etanol é uma boa estratégia no intuito de transformar o biodiesel produzido em um produto totalmente sustentável (devido a natureza renovável do etanol) e também por que este álcool é menos agressivo para as enzimas.

O álcool etílico (99,5%) se mostrou mais eficiente nas reações de produção de ésteres enzimáticos, em comparação ao álcool metílico, possibilitando maiores valores de ésteres etílicos e o reuso da enzima. Porém, a utilização de um substrato com esse grau de pureza impossibilitaria a produção dos ésteres devido a seu alto custo. Assim optou-se por estudar a aplicação de álcool etílico comercial (93,57%) ao processo, utilizado comercialmente como combustível, sendo esse substrato de menor valor, possibilitando sua aplicação em níveis industriais. Os resultados utilizando álcool etílico (93,57%), também expostos Tabela 2.15, demonstram que os teores de ésteres encontrados nos ciclos de uso 1 e 2 da *Eversa® Transform* não foram tão elevados em comparação com as reações realizadas com álcool metílico e com o álcool etílico 99,5%. Isso se deve provavelmente ao maior conteúdo de água desse substrato, que acarreta a maior acidez ao final do processo da produção de ésteres, devido à alta hidrólise provocada no meio. O alto conteúdo de ácido ao final do processo é indesejável, porém, após o polimento, o teor de AGL tende a diminuir, aumentando o teor de ésteres. Com isso, a quantidade de água não seria um empecilho na produção dos ésteres. Na Tabela 2.6 estão apresentados os resultados quanto ao polimento realizado da reação 1 ou ciclo 1, com os diferentes alcoóis estudados.

Tabela 2.6- Resultados dos teores de FAME e FAEE da reação 1 e seu polimento, quanto ao teor de ésteres metílicos ou etílicos (%), realizados com razão molar álcool:óleo 3,5:1, água 0 ou 2% e 0,5% de enzima, incubado em shaker por 8 h (35°C/250rpm).

| | Teores de ésteres (%) | | | | | |
|------------------|-------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| | Álcool metílico (99,5%) | | Álcool etílico (99,5%) | | Álcool etílico (93,7%) | |
| | Decantado | Centrifugado | Decantado | Centrifugado | Decantado | Centrifugado |
| Reação 1 | 89,0 (±0,3) | 87,2 (±0,2) | 89,9 (±0,1) | 93,4 (±0,2) | 68,0 (±6,6) | 59,3 (±0,8) |
| Polimento | 90,38 (±0,8) | 87,0 (±1,2) | 94,7 (±1,0) | 95,16 (±0,8) | 95,0 (±2,2) | 92,1(±0,1) |

Na Tabela 2.6 observamos que nas reações utilizando o álcool metílico o polimento realizado com o resultado do 1 ciclo de reação não apresentou melhora importante nos valores de ésteres anteriormente obtidos. O polimento utilizando álcool etílico (99,5%) apresentou melhora de até 5% no teor de ésteres produzidos na primeira fase de reação o que caracteriza excelentes resultados, cerca de 95% de ésteres etílicos em média após o polimento. Em relação ao álcool etílico (93,57%) após o polimento, foi obtido cerca de 95% de ésteres nas reações, valores elevados de ésteres etílicos e cerca de 4% de AGL em ambas as reações, valores também considerados satisfatórios. Analisando os resultados quanto ao tipo de separação, centrifugação e decantação, estes foram muito semelhantes, demonstrando que ambas as separações podem ser utilizados no processo.

Através da análise em relação aos distintos alcoóis e seus resultados quanto ao reuso e ao polimento, é possível concluir que o álcool etílico comercial (93,57%) se destacou nas reações de produção de ésteres enzimáticos em modo batelada alimentada, já que apresentou bons resultados no reuso da lipase, assim como o polimento demonstrou ser uma ótima alternativa ao processo de produção do biodiesel, propiciando a produção de elevados índices de ésteres e menores teores de AGL, com menor valor de aquisição, com isso tornando possível a continuidade de estudos sobre o reuso da enzima utilizando esses substratos, o que pode ser observado no próximo item.

A transesterificação enzimática utilizando etanol em vez de metanol tem sido sugerida como uma alternativa mais limpa e mais sustentável para a produção de biodiesel (STAMENKOVIC et al., 2011). Além disso, o etanol é um álcool mais longo e de maior massa molar que o metanol, o que significa um aumento de rendimento em massa final na síntese enzimática de ésteres etílicos, resultando em maior produção de biodiesel por unidade de óleo (BRUNSCHWING et al., 2012). Assim, o ganho de volume extra ao usar etanol em vez de metanol pode se tornar um dos principais argumentos de vendas (STAMENKOVIC et al., 2011 e BRUNSCHWING et al., 2012).

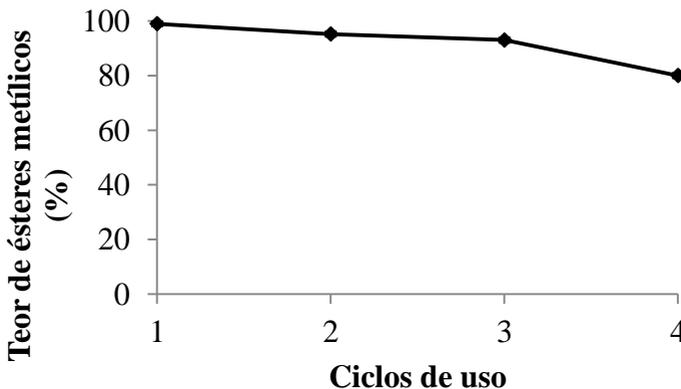
2.3.4.3.2 Estudo de reuso da lipase *Eversa*® *Transform* na síntese de ésteres etílicos

No intuito de simular condições mais próximas a uma aplicação em escala industrial, foi realizado o reuso utilizando 1% de enzima

Eversa®, óleo ácido residual (lote 3) e álcool etílico comercial (93,57%) (razão molar metanol/óleo de 3,5:1) e água destilada (0%, m/m, em relação ao substrato), incubados em shaker por 8 h (35°C/250rpm) e separação de fases do biodiesel por meio de decantação por 12 horas. Após, 20 mL do fundo da separação foi recolhido e encaminhado para um novo reator onde foi adicionada nova carga dos reagentes óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%) (razão molar metanol/óleo de 3,5:1), incubados em shaker por mais 8 h (35 °C/250rpm), assim sucessivamente até o máximo número de ciclos de uso possível da lipase.

Na Figura 2.15 é possível observar os teores de ésteres produzidos nos ciclos de uso da enzima. Cabe ressaltar que nos ensaios apresentados o desvio padrão médio foi menor que 0,7, para todos os ensaios. Os ciclos 1 e 2 apresentam os maiores teores de ésteres, 98 e 95% respectivamente; o ciclo 3 apresenta cerca de 93% de ésteres, que é um valor considerado alto; porém, a partir do ciclo 4, a produção de ésteres decresce para 80%, que é considerado um valor relevante, porém menor que dos demais ciclos. Contudo, cabe salientar que os valores alcançados nos 4 ciclos podem ser considerados excelentes, ainda mais considerando o aproveitamento de um substrato de baixo custo e bem heterogêneo como o óleo ácido residual.

Figura 2.15- Resultados quantos ao teor de ésteres etílicos de ácido graxo dos ciclos de uso da enzima *Eversa Transform* a partir de óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%), realizados com razão molar álcool/óleo de 3,5:1, e 1% de enzima, incubado em shaker por 8 h (35°C/250rpm).



Conforme Aguiéiras et al. (2014), o excesso de etanol e a água pode ser facilmente removido por meio de destilação do biodiesel final. Quando a reação apresenta conteúdos de água muito baixo, os teores de MAG e DAG aumentam porque ocorre a hidrólise incompleta de TAG durante o processo hidrolítico. Contudo, o excesso de AGL causa a baixa estabilidade oxidativa, que pode ser resolvida pela formulação com aditivos. Assim, embora alguns parâmetros não se encontrem dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente, a maioria deles pode ser melhorada pela utilização de processos relativamente simples. É importante ressaltar que o produto bruto biodiesel pode e deve ser purificado por meio de processos físicos e químicos, para atender as normas vigentes e assim ser utilizado adequadamente nos motores de ciclo diesel (CHATTOPADHYAY; SEN, 2013).

Em contraste com lipases imobilizadas, o número necessário de ciclos de uso de uma lipase livre para sua viabilidade na aplicação em um processo pode ser muito menor, devido à grande diferença no custo para a obtenção de cada enzima (CESARINE et al., 2014a). A utilização de lipase livre em vez de imobilizada resulta na significativa simplificação do processo de transesterificação de matérias graxas, o que é fundamental para aplicação em escala industrial de produção de um biocombustível inovador e de valor comercial competitivo.

2.4 Considerações Finais

Os resultados aqui apresentados representam alternativas de tecnologia para a produção de biocombustíveis, bem como no desenvolvimento de novas rotas de produção de biodiesel a partir de um biocatalisador e diferentes substratos. O catalisador enzimático *Eversa® Transform* apresentou-se como potencial, possibilitando elevada conversão em ésteres a partir de substratos complexos, como óleos com alto teor de AGL e óleos de reuso, em um tempo razoável de reação e condições brandas de processo.

As condições com matéria graxa e álcool metílico na razão molar metanol/matéria graxa de 4,5:1, água destilada 2,5% (m/m, em relação ao substrato), enzima *Eversa® Transform* 1% (m/m, em relação ao substrato) e incubação de 16 horas em shaker (35°C/250rpm) foram as que resultaram nas maiores conversões de ésteres para os substratos: óleo de soja (96,7% FAME); misturas de óleo de soja refinado com 25%

(95,1% FAME), 50 % (97,2% de FAME) e 75% (85,97% FAME) de ácido oleico; óleo de macaúba (80,89% FAME) e óleo de fritura usado (94,89% FAME).

Para experimentos realizados com a matéria graxa óleo ácido residual, foram avaliados dois alcoóis de cadeia curta, o álcool etílico e o álcool metílico. Sendo que as melhores condições para a obtenção de ésteres utilizando álcool metílico foram: óleo ácido residual e álcool metílico na razão molar metanol/óleo de 3,5:1, água destilada 2,0% (m/m, em relação ao substrato), e enzima *Eversa® Transform* 0,5 % (m/m, em relação ao substrato) e incubado em shaker por 8 horas (35°C/250rpm), obtendo rendimento de 89,01% de ésteres metílicos. No entanto, para o álcool etílico, os melhores resultados foram obtidos utilizando álcool etílico comercial (93,57%), sendo as melhores condições: óleo ácido residual e álcool etílico comercial (93,57%) na razão molar etanol/óleo de 3,5:1, sem adição de água destilada e enzima *Eversa® Transform* 1% (m/m, em relação ao substrato), incubado em shaker por 8 horas (35°C/250rpm), obtendo rendimento de 95,0% de ésteres etílicos. Também, utilizando álcool etílico (93,57%), foi possível o reuso da enzima *Eversa® Transform* por 4 ciclos de uso com obtenção de teores relevantes de ésteres etílicos. Com isso, o óleo ácido residual juntamente com o catalisador enzimático *Eversa® Transform*, em sua forma livre, receberam destaque por constituírem alternativa promissora ao processo tradicional de produção de biodiesel e contribuem para tornar o biodiesel enzimático viável economicamente.

Capítulo III

PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE REUSO, UTILIZANDO AS LIPASES LIVRES *EVERSA® TRANSFORM* E *EVERSA® TRANSFORM 2.0* EM PLANTA PILOTO

Este capítulo é a complementação da investigação de produção de ésteres de ácidos graxos iniciada no capítulo II, trazendo a aplicação industrial da produção enzimática de ésteres metílicos a partir de óleo ácido residual realizada na empresa Transfertechn, que foi destaque na primeira etapa desse estudo, e também uma nova matéria graxa de baixo custo, a gordura ácida residual, aplicados em sistema batelada alimentada em planta piloto com capacidade de 1.000 L, catalisada pela lipase até o momento investigada, *Eversa® Transform*, e também avaliando, na produção de ésteres metílicos uma nova lipase potencial, *Eversa® Transform 2.0*, a ser explorada desta etapa do trabalho em diante.

3.1 Introdução

A produção atual de biodiesel se concentra na utilização de um catalisador básico para a conversão de um óleo refinado e metanol. Sem surpresas a matéria-prima acaba por elevar o preço do biodiesel final, o tornando menos competitivo. Buscando o aproveitamento de matérias-primas de baixo custo, como óleos de reuso, surgem os processos catalisados por lipases, que dentre as principais vantagens, apresentam flexibilidade quanto a matéria-prima e um processo que traz menores impactos ambientais. Além de que as lipases, assim como as demais enzimas, são biodegradáveis, não tóxicas, e facilitam a recuperação do produto final (ésteres) e do glicerol (SUWANNO et al., 2017; ZHENG et al., 2012; YAN et al., 2012; CHEN et al., 2011)

A produção mundial de biodiesel aumentou 13%, o equivalente a 29,4 bilhões de litros em 2014, tendo destaque como principais países produtores os Estados Unidos (60 bilhões de litros), o Brasil (29,9 bilhões de litros), a Alemanha (4,3 bilhões de litros), a China (3,9 bilhões de litros) e Argentina (3,6 bilhões de litros) (ABOMOHRÁ et al., 2016). Em 2016, o governo brasileiro aprovou o aumento da mistura de biodiesel ao diesel de petróleo dos atuais 7% para 8%, que ocorrerá ao longo de 2017, e a estimativa é que este valor passe a 9% em 2018, 10% em 2019, chegando a 15% nos anos subsequentes (SOCCOL et al., 2017). O aumento da demanda por biodiesel, juntamente com o aumento do debate mundial sobre a utilização de óleos comestíveis, na produção de biocombustíveis, impulsionam cada vez mais o desenvolvimento do chamado biodiesel de "segunda geração" a partir de óleos vegetais não comestíveis como óleos usados (SOCCOL et al., 2017; SITEPU et al., 2014).

Avaliando a produção industrial de biodiesel, o uso de lipases livres ou solúveis é capaz de reduzir substancialmente o custo de produção, e de acordo com a atividade catalítica da lipase, escolhida a utilização única do catalisador, é considerado uma opção viável (CESARINI et al., 2013). Entre as principais vantagens das lipases livres frente às imobilizadas está a economia de processo, levando em conta que estas não necessitam de suportes caros e/ou sofisticados e nem de um processo complexo de imobilização (KUO; SHAW; LEE, 2015; CHEN et al., 2008). Além disso, em processos envolvendo enzimas imobilizadas, o glicerol liberado durante a transesterificação pode ligar-se aos suportes causando entupimentos nos poros desse, conduzindo a efeitos negativos sobre a atividade e a estabilidade operacional das

enzimas (YANG et al., 2016; CESARINE et al., 2014a; CHEN; DU; LIU 2008).

Em processos catalisados por lipases, necessita-se apenas de 50% de excesso de metanol (em base molar) para alcançar altos conteúdos de ésteres metílicos, enquanto com catalisador químico é necessário 100% de excesso deste para a completa transesterificação do óleo (FJERBAEK et al., 2009; MEHER et al., 2006). Ainda, o processo enzimático de produção do biodiesel traz a possibilidade do reciclo do metanol que não reagiu no processo anterior e sua aplicação em um novo ciclo de produção sem a necessidade de pré-tratamento, o que não é possível na catálise alcalina (PRICE et al., 2016). No entanto em processos envolvendo lipases, devido a sua sensibilidade a alta concentração de metanol, é necessária a adição gradual deste álcool com o intuito de preservar a atividade enzimática (FIRDAUS et al., 2016; YUSOFF; XU; GU 2014).

Neste contexto, este capítulo teve como objetivo a produção enzimática de ésteres metílicos de ácidos graxos em escala piloto, onde em um primeiro estudo, investigou-se a produção a partir de óleo ácido residual utilizando como biocatalisador a lipase *Eversa*[®] *Transform*, nas condições reacionais encontradas em laboratório, descritas no capítulo II, e em um segundo estudo, a síntese enzimática de ésteres metílicos a partir de gordura ácida residual, em escala piloto, utilizando os biocatalisadores *Eversa*[®] *Transform* e a *Eversa*[®] *Transform 2.0*, também por meio das condições reacionais definidas em laboratório.

3.2 Material e Métodos

Neste item serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos adotados durante a segunda etapa deste trabalho, relacionados à produção de ésteres em escala piloto industrial, utilizando reatores de 1.000 L, no estudo da produção de ésteres metílicos com distintas matérias graxas de reuso utilizando como catalisador as lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*.

3.2.1 Material

Enzimas

- *Eversa Transform* - Lipase solúvel produzida e gentilmente cedida pela Novozymes® (Dinamarca).
- *Eversa Transform 2.0* - Lipase solúvel produzida e gentilmente cedida pela Novozymes® (Dinamarca) produzida pelo micro-organismo *Aspergillus oryzae modificado geneticamente* (Novozymes, 2016).

Reagentes

- Heptano (Vetec, 99,5%);
- Derivatizante MSTFA (*N-methy-N-trimethylsilylfluoroacetamida*).

Substratos

- Óleo ácido residual (cedido pela Olfar Alimentos, Erechim/RS);
- Gordura animal residual (cedido pela Olfar Alimentos, Erechim/RS);
- Álcool metílico;
- Água destilada.

Padrões químicos

Os padrões químicos utilizados para as análises em cromatógrafo de gases:

- Ésteres metílicos, heptadecanoato de metila (Sigma-Aldrich, 95%);
- Monoacilgliceróis, monoleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza);
- Diacilgliceróis, dioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza);

- Triacilgliceróis, trioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza).

3.2.2 Procedimento Experimental

Este item traz a descrição da unidade piloto montada para as reações em escala piloto industrial, juntamente com os procedimentos adotados para a produção de ésteres metílicos e as matérias-primas escolhidas para o desenvolvimento desta etapa.

3.2.2.1 Descrição da unidade piloto

A unidade experimental piloto encontra-se nas dependências da empresa Transfertech Gestão e Inovação Ltda (Erechim/RS). Esta foi montada sobre uma plataforma metálica de 1 andar, com acesso ao piso superior através de escada (Figura 3.1).

Figura 3.1- Plataforma metálica com a unidade experimental montada para a produção enzimática de ésteres metílicos de ácido graxo em planta piloto.



No primeiro andar era possível ter acesso a dois reatores, identificados como R1 e R2. Estes continham capacidade de 1000 L cada, eram constituídos de inox, e contavam com controle de temperatura e pressão. Nestes reatores estava acoplada uma bomba centrífuga, BCI E603 TM 06 J (Fabo Bombas), para a agitação do meio reacional, e também três bombas dosadoras, IEC EN 60034 (Bonfiglioli), utilizadas no controle da entrada dos substratos metanol e água, e do catalisador *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*. Os substratos e as lipases estavam dispostos abaixo da plataforma, em containers com capacidade de 1.000 litros, tipo IBC com pallet de ferro galvanizado. A entrada de reagentes nos reatores era controlada por meio de um painel eletrônico com controladores, também disposto abaixo da plataforma. A adição das matérias graxa ao reator, bem como a retirada do meio reacional após o tempo de reação, ocorria com o auxílio da bomba centrífuga. A separação do produto final ocorria por meio de decantação, em container tipo IBC.

3.2.2.2 Produção de ésteres metílicos por meio de batelada alimentada em escala piloto

Primeiramente, cada matéria-prima de reuso recebida para a produção de ésteres foi submetida à análise quanto aos teores de: ésteres, ácidos graxos livres, glicerina livre e mono-, di- e triacilgliceróis. Após, a matéria-prima selecionada (550 kg) foi adicionada ao reator piloto de interesse com auxílio da bomba centrífuga, em seguida, por meio das bombas dosadoras, foi adicionado: a água (2%, m/m, em relação ao substrato), o catalisador enzimático (0,3-0,7%, m/m, em relação ao substrato) e, por fim, o álcool metílico, na razão molar metanol/matéria graxa de 4,5:1, alimentado em 8 frações iguais de hora em hora nas 8 horas iniciais de reação. Todas as adições foram controladas por meio do painel de controle programado antes do início da reação. Em seguida os reatores foram fechados, a temperatura ajustada (35-40°C) e a reação iniciada.

Ao longo e ao final do tempo da reação, foram recolhidas alíquotas do conteúdo reacional. Estas foram centrifugadas (3500 rpm/10 min), e, após a fase topo, fase de interesse, encaminhada para as análises químicas necessárias em cromatógrafo de gases (GC). Para os cálculos da razão molar dos substratos, como foram alvo desta fase do estudo duas matérias graxas, quando trabalhou-se com gordura ácida residual (constituídos majoritariamente por TAGs), considerar a massa molar 870 g/mol, já na matéria-prima óleo ácido residual, rica em AGL,

levou-se em conta a massa molar do ácido oléico 282 g/mol, também utilizou-se a massa molar do álcool metílico 32,04 g/mol (REMONATTO et al., 2015).

3.2.3 Métodos Analíticos

Antes da utilização dos substratos, óleo ácido residual e gordura ácida residual, nas reações de produção de ésteres metílicos e ao longo do processo de transformação das matérias-primas, foram necessárias algumas análises como determinação do teor de ácidos graxos livres e ésteres metílicos e, em alguns casos, verificação da presença de mono-, di- e triacilgliceróis e do teor de glicerol livre.

3.2.3.1 Teor de ácidos graxos livres

A determinação do teor de AGL das matérias graxas foi realizada segundo metodologia AOCS Cd 3d – 63. Primeiramente, pesou-se de 4 a 15 g de amostra, em um béquer se 250 mL. A seguir, o óleo foi dissolvido em uma solução neutralizada de 150 mL de etanol/éter etílico (1:1 v/v). Adicionaram-se 2 mL do indicador (solução de fenolftaleína 1% em etanol 95%) e titulou-se com solução padronizada de KOH 0,1 mol L⁻¹. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como teor de ácidos graxos livres (AGL) em ácido oleico, calculado pela Equação (3.1):

$$\text{Teor de AGL (\% ácido oleico)} = \frac{\left(\frac{56,1 V M}{m}\right)}{2}$$

(Equação 3.1)

Onde:

V = volume de base gasto na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de KOH, padronizada (molL⁻¹);

m = massa da amostra (g).

3.2.3.2 Teor de glicerol livre

O método de periodato para determinação da concentração de glicerol foi descrito 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 à amostra e a mesma é acidificada com ácido sulfúrico $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 4. A solução é então neutralizada com $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ até coloração azul.

Paralelamente, um branco reacional foi preparado contendo 50 mL de água destilada, sem a presença de glicerol e o mesmo procedimento adotado para a amostra a ser analisada foi aplicado ao branco. Em seguida, 100 mL de solução de periodato de sódio (60 g L^{-1}) 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 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 $\text{NaOH } 0,125 \text{ mol L}^{-1}$ usando pH-metro para determinar pH 6,5 para o branco e pH 8,1 para a amostra. O teor de glicerol livre contido na amostra é determinado pela seguinte equação (3.2):

$$\text{Glicerol livre (\%)} = \frac{9,209 M(V_1 - V_2)}{m}$$

(Equação 3.2)

Onde:

M = Molaridade da solução de $\text{NaOH } (\text{mol L}^{-1})$;

V_1 = volume da solução de NaOH gasto na amostra (mL);

V_2 = volume da solução de NaOH gasto no branco (mL);

m = massa de amostra utilizada (g).

3.2.3.3 Determinação do teor de ésteres metílicos de ácido graxo

A determinação do teor de ésteres foi feita por meio de cromatógrafo de fase gasosa (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm (Restek, nº de série: 1208976) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. Sendo a programação de temperatura da coluna: 120°C por 1 min, seguido pelo aumento de 15 °C/min até 180 °C por 2 min e 5 °C/min até 250 °C permanecendo por 2 min. A temperatura do detector e injetor era de 250 °C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 µL.

Preparação das amostras

As amostras foram preparadas, transferindo-se 250 mg das mesmas para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume até o menisco do mesmo com heptano. Após, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e adicionava-se 50 µL do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000 mg L⁻¹ e completava-se o volume com heptano.

Calculo do teor de ésteres

Após a injeção e análises dos cromatogramas gerados foi determinada a porcentagem a conversão em ésteres pela Equação 3.3:

$$\text{Teor de ésteres (\%)} = \frac{(\Sigma A) - A_{pi}}{A_{pi}} \frac{C_{pi} V_{pi}}{m} 100$$

(Equação 3.3)

Onde:

ΣA = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1;

A_{pi} = área correspondente ao pico do padrão interno, heptadecanoato de metila;

C_{pi} = concentração da solução de padrão interno heptadecanoato de metila (mg/mL);

V_{pi} = volume da solução de padrão interno adicionado à amostra;

m = massa, da amostra (mg).

3.2.3.4 Determinação do teor de mono-, di- e triacilgliceróis

A determinação do teor de MAG, DAG, TAG nas amostras coletadas foi realizada a fim de conhecer o comportamento da reação ao final do tempo (MAG e DAG). As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar MTX®-5 (5% difenil, 95% dimetil polixiloxano) de 30m x 0,25mm x 0,1µm (RESTEK, nº de série: 1193990). As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50°C por 1min, seguido pelo aumento de 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C e 10°C/min até 380°C, permanecendo por 8min. A temperatura do detector foi de 380°C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80kPa e o volume injetado foi de 1µL.

Preparação das Amostras

Na preparação das amostras reacionais para a análise cromatográfica foram pesadas 100 mg de cada amostra em balão volumétrico de 10 mL, após foram adicionados 100 µL do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada e esta foi deixada em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o volume foi aferido (10 mL) com heptano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e levadas para análise em cromatógrafo gasoso.

Determinação dos teores de mono-, di- e triacilgliceróis

Para a quantificação dos produtos MAG, DAG e TAG, utilizaram-se padrões externos monooleína, dioleína e trioleína. Para a construção das curvas de calibração preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo, e, a partir destas prepararam-se 8 soluções de calibração em diferentes concentrações para os glicérides, conforme a Tabela 2.1. As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram realizadas segundo a Norma nº 14.105 (2001) do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos conforme metodologia adaptada por Krüger (2010). Nas soluções de calibração foi adicionado derivatizante MSTFA, o qual transforma os glicérides em seus respectivos derivados voláteis, para que possam ser quantificados por cromatografia gasosa. Após, a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 min para que o derivatizante agisse. Em seguida, aferiu-se o volume (10 mL) com

heptano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e o volume de 1 μ L injetado em cromatógrafo gasoso.

Tabela 3.1- Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos.

| Padrão externo | Soluções de calibração | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Monooleína (mg/L) | 1500 | 1000 | 500 | 300 | 100 | 50 | 40 | 20 |
| Dioléína (mg/L) | 1500 | 1000 | 700 | 400 | 150 | 100 | 80 | 50 |
| Trioléína (mg/L) | 2000 | 1500 | 1000 | 800 | 500 | 300 | 100 | 50 |

3.2.3.5 Avaliação das velocidades iniciais de reação de esterificação

Em cada do estudo cinético com os diferentes substratos avaliados, foi verificada velocidade inicial de reação. O cálculo da velocidade inicial de reação (r) foi realizado dividindo-se a variação de conversão a ésteres metílicos e etílicos num determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear da curva cinética, conforme Equação 4.4.

$$r = \frac{dC}{dt_{t=0}} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

r = velocidade inicial de reação (min^{-1});

C = conversão de ésteres etílicos/metílicos no tempo t (% , m/m teor de ésteres);

C_0 = conversão de ésteres etílicos/metílicos no tempo 0 (% , m/m teor de ésteres);

t = tempo (min);

t_0 = tempo do início da reação (min).

3.3 Resultado e Discussão

Esta seção apresenta os resultados alcançados na unidade piloto industrial desenvolvida utilizando óleo ácido residual e gordura ácida residual, e as lipases *Eversa® transform* e o desempenho de uma nova lipase, a *Eversa® Transform 2.0*, a ser investigada e aplicada na produção de ésteres de ácidos graxos.

3.3.1 Produção de ésteres metílicos com óleo ácido residual

Assim como no capítulo anterior, foi estudada a produção de ésteres metílicos, porém agora em escala piloto, para acompanhar o comportamento da reação mediante o escalonamento, avaliando a possibilidade de produção industrial. Como o intuito deste capítulo é simular condições industriais, foram escolhidos para o escalonamento matérias-primas de baixo custo e álcool metílico, que tem menor custo que o álcool etílico e é mais empregado em grande escala.

3.3.1.1 Caracterização do óleo ácido residual

Como anteriormente discutido no *Capítulo 2*, a matéria-prima óleo ácido residual, assim como muitos resíduos, era muito heterogênea, com isso foram realizadas análises a cada lote recebido. Neste capítulo foram estudados apenas 2 lotes, distintos dos estudados no capítulo anterior, os quais serão identificados como lote 4 e 5. Na tabela 3.2 podemos observar os resultados das análises químicas nos dois lotes de matéria-prima estudados.

Tabela 3.2– Análises realizadas nos lotes de óleo ácido residual utilizados como matéria-prima na etapa de produção piloto de ésteres metílicos de ácido graxo.

| | Lote 4 | Lote 5 |
|---------------------------|--------|--------|
| Teor de AGL (%) | 71,64 | 87,42 |
| Ésteres (%) | 0 | 0 |
| Matéria não conhecida (%) | 28,36 | 12,18 |

Como pode ser observado na Tabela 3.2, as matérias-primas apresentam alto teor de AGL, superior aos lotes empregados anteriormente, e ausência de ésteres. Como já discutido no *Capítulo 2*, sabe-se que esta matéria-prima pode conter material não passível de conversão a ésteres (sabões), com isso, a fração de resíduo não identificada nas análises foi considerada como “matéria não conhecida”. Baseado no alto teor de acidez das matérias-primas, optou-se por acompanhar o processo de produção de ésteres metílicos através do consumo dos AGL na reação, ou seja, no menor teor de AGL considerou-se o melhor tempo de reação.

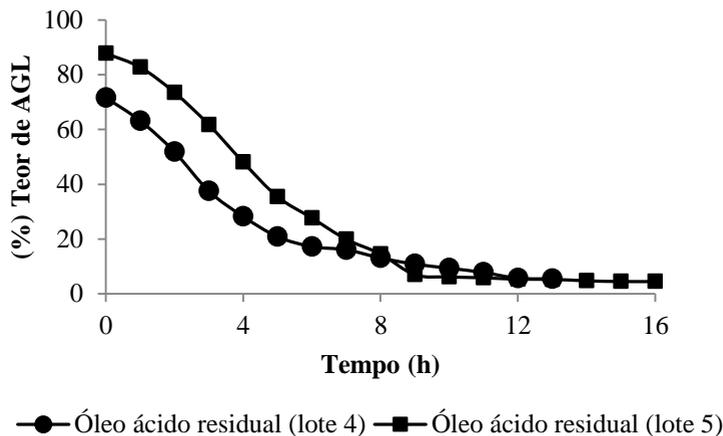
3.3.1.2 Produção de ésteres metílicos em escala piloto utilizando óleo ácido residual

A fim de avaliar o comportamento das reações mediante a escala piloto, foram realizadas cinéticas de até 16 horas, com ambos os lotes de matéria-prima (lote 4 e 5). As condições do processo foram baseadas nas melhores condições encontradas no estudo em laboratório, como exposto no *Capítulo 2* (item 2.3.4.2). Assim, utilizou-se óleo ácido residual (550 kg), água (2%, m/m, em relação ao substrato), lipase *Eversa® Transform* (0,7%, m/m, em relação ao substrato) e o álcool metílico (razão molar metanol/óleo 4,5:1), com temperatura ajustada (35°C).

Devido ao salto na escala de produção, é natural que possam ocorrer algumas variações na produção dos ésteres, como, por exemplo, a diminuição da velocidade de reação o que faz com que a transformação dos substratos ocorra de forma mais lenta, necessitando alguns ajustes ao processo; baseado nisso, optou-se por aumentar a razão molar metanol/óleo na reação de 3,5:1 para 4,5:1, tentando deslocar, assim, o equilíbrio da reação pelo excesso de metanol e também espaçar a sua alimentação no meio reacional, de 6 para 8 frações. Em relação à quantidade de biocatalisador, lipase *Eversa® Transform*, foi aumentado de 0,5% para 0,7% (m/m, em relação ao substrato).

Na Figura 3.2 é possível verificar o consumo de AGL através da diminuição do teor de AGL, ao longo da cinética de produção de ésteres metílicos utilizando dois diferentes lotes de óleo ácido residual e lipase *Eversa® Transform* em escala piloto.

Figura 3.2- Avaliação cinética de produção de ésteres metílicos utilizando óleo ácido residual e álcool metílico na razão molar óleo/álcool 4,5:1, 0,7% de *Eversa® Transform* e 2% de água, em escala piloto.



Como pode ser observado na Figura 3.2, foram estudados dois lotes de matérias-primas com distintos valores de AGL inicial, lote 4 (71,6% AGL) e lote 5 (87,8% AGL), possibilitando a análise do comportamento da reação com distintos teores de acidez da matéria-prima. Como esperado, observamos o rápido consumo dos AGL, onde em 13 horas de reação, foram obtidos os valores de AGL 5,5 %, para o lote 4, e de 5,3%, para o lote 5, a reação foi mantida até 16 horas. Porém, após 15 horas de reação, o teor de AGL de ambos os lotes estagnou em 4,5%. Esses valores baixos de AGL ao final do tempo reacional, bem como o perfil de sua cinética de consumo, evidenciam alta conversão do processo a ésteres metílicos, já que, com a adição de metanol e a lipase, o processo produz ésteres como produto. O processo de esterificação ocorre pela presença de um doador acil e um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador formando uma molécula de éster e uma molécula de água (CANET et al., 2016).

O tempo de reação foi maior do que o encontrado nos estudos com o mesmo substrato realizado em laboratório, porém, como já citado, o processo, quando é escalonado, pode necessitar de alguns ajustes, pelos desafios devido ao aumento de volume do processo. Também, o maior tempo de reação necessário nesse caso pode ocorrer em decorrência da maior formação de água que ocorre em reações de esterificação. A presença de água pode acarretar a diluição do meio

reacional, tornando o processo mais lento, além de favorecer a hidrólise dos ésteres formados. Torna-se necessário, assim, operações adicionais para remoção da água, subproduto da reação ou adição de excesso de álcool ao processo, alterando, assim, o equilíbrio da reação para maior formação de ésteres (SHIBASAKI-KITAKAWA et al., 2015).

Nielsen et al. (2016), que estudaram o reuso da lipase *Eversa Transform* na transesterificação de óleo de soja refinado com metanol, afirmam que, como os avanços recentes na produção desta enzima reduziram o seu custo, a sua reutilização torna-se desnecessária, pois uma única dosagem é economicamente viável, também que um único ciclo da lipase elimina o risco de acumular componentes secundários da esterificação do óleo que acaretam a redução da eficiência de separação dos produtos finais e resulta em um processo mais simples e reprodutível.

Nie et al. (2015) estudaram em laboratório a produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha catalisada pela lipase imobilizada produzida por *Candida* sp. 99-125 com adição de ciclodextrina, utilizando 0,4% da enzima, ciclodextrina/lipase 2:1 (m/ m), 2% de água (m/m em relação ao substrato) e velocidade de agitação de 180 rpm. O metanol foi adicionado de forma fracionada em 30 vezes em 1/30 M equivalente de hora em hora, obtendo o rendimento de 88% de ésteres, conseguindo reproduzir o processo em escala industrial, com o mesmo rendimento.

3.3.2 Produção de ésteres metílicos utilizando com gordura residual

Para o enriquecimento do estudo da produção de ésteres em escala piloto, investigou-se o aproveitamento de outra matéria-prima de baixo custo e aplicação de nova enzima livre ao processo. Com isso, foi avaliada neste item a produção de ésteres metílicos mediante a utilização de gordura residual como matéria-prima e das lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* como biocatalisadores.

3.3.2.1 Caracterização da gordura residual ácida

Assim como o óleo ácido residual, primeiramente foram feitas análises da matéria-prima recebida, as quais podem ser observadas na Tabela 3.3. No caso da gordura residual ácida foi recebido apenas um lote, o qual foi utilizado em todas as etapas do trabalho. Como pode ser observado na Tabela 3.3, a matéria-prima apresenta baixo teor de AGL,

ausência de ésteres e alto teor de triacilgliceróis, constituindo uma ótima composição para aproveitamento na produção de biodiesel.

Tabela 3.3– Análises realizadas no lote de gordura residual ácida utilizada como matéria-prima na etapa de produção piloto quanto ao teor de AGL, ésteres de ácidos graxos e triacilgliceróis.

| | Gordura Ácida Residual |
|---------------------|------------------------|
| Teor de AGL (%) | 3,2 |
| Ésteres (%) | 0 |
| Triacilglicerol (%) | 96,8 |

3.3.2.2 Produção de ésteres metílicos de ácidos graxos em escala piloto utilizando gordura ácida residual

Foi realizado estudo cinético em até 24 horas de reação, com ambas as lipases estudadas, a fim de verificar o comportamento das reações mediante a escala piloto. As condições do processo, assim como as empregadas no estudo anterior utilizando óleo ácido residual, foram: gordura residual ácida (550 kg), água (2%, m/m, em relação ao substrato). A lipase *Eversa® Transform/Eversa® Transform 2.0* (0,7%, m/m, em relação ao substrato) e o álcool metílico (razão molar metanol:gordura 4,5:1), alimentado em 8 frações iguais nas primeiras 8 horas de reação, com temperatura ajustada a 35°C para a *Eversa® Transform* e 40°C para *Eversa® Transform 2.0*, conforme recomendação do fabricante (NOVOZYMES, 2016). Nas figuras 3.3 podemos observar os resultados encontrados quanto ao teor de ésteres metílicos, AGL, MAG, DAG e TAG, para os estudos utilizando gordura ácida e as lipases *Eversa® Transform*.

Na Figura 3.3, observamos o consumo do triacilgliceróis (TAG) da gordura ácida, juntamente com a formação majoritária de ésteres metílicos. O comportamento da reação o qual foi semelhante ao obtido no estudo da produção de ésteres metílicos com óleo de soja (utilizando 0,5% de *Eversa® Transform*, item 2.3.1.3, capítulo 2.), esse resultado era previsto, pois o óleo de soja, assim como a gordura ácida, é composto basicamente por TAGs. A velocidade inicial de reação foi semelhante à encontrada com o estudo utilizando óleo de soja, sendo que a velocidade inicial da gordura ácida foi de 0,192 min⁻¹, enquanto no óleo de soja 0,196 min⁻¹. A reação teve seus melhores resultados em 24 horas de reação, 1,06 % de MAG, 1,74% de DAG, 0,46% de TAG,

1,82% de AGL e 94,93% de ésteres metílicos, porém em 16 horas a reação já apresentava excelentes valores de ésteres de 91,1%. Na Figura 3.4 é possível observar os resultados quanto à produção de ésteres metílicos utilizando 0,7% de *Eversa® Transform 2.0* e gordura residual em escala piloto.

Figura 3.3- Avaliação cinética de produção de ésteres metílicos de ácido graxo utilizando gordura ácida residual e álcool metílico na razão molar óleo/álcool de 1:4,5, 0,7% de *Eversa® Transform* e 2% de água, em escala piloto.

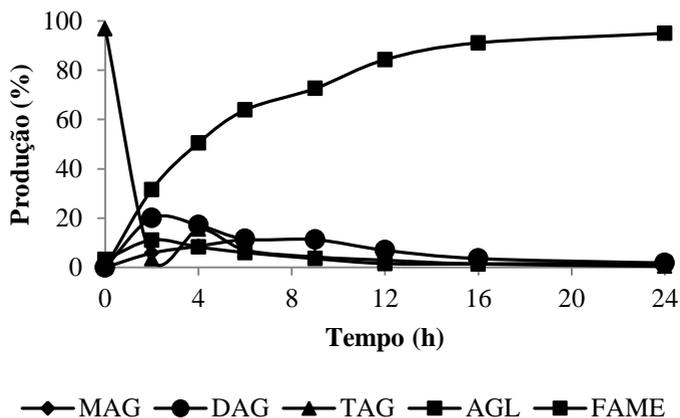
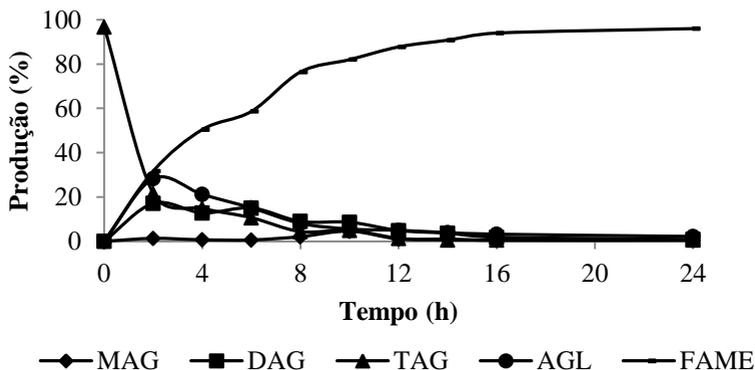


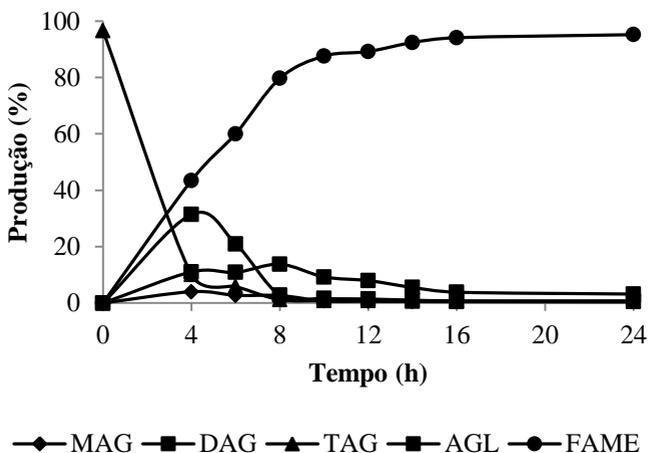
Figura 3.4- Avaliação cinética da síntese de ésteres metílicos de ácido graxo utilizando gordura ácida residual e álcool metílico na razão molar óleo/metanol de 1:4,5, 0,7% de *Eversa® Transform 2.0* e 2% de água, em escala piloto.



Na Figura 3.4, os melhores resultados foram obtidos também em 24 horas de reação, com 0,41 % de MAG, 0,85% de DAG, 0,6% de TAG, 2,2% de AGL e 96% de ésteres metílicos. Porém, em 16 horas, a reação já apresentava valores excelentes de produtos com 0,41% de MAG, 1,81% de DAG, 0,6% de TAG, 3,2% de AGL e 94,5% de ésteres metílicos, resultados superiores que os encontrados na Figura 3.3, utilizando a lipase *Eversa® Transform*. A velocidade inicial de reação obtida foi de $0,195 \text{ min}^{-1}$, sendo semelhante à encontrada na Figura 3.3 ($0,192 \text{ min}^{-1}$).

Por meio dos excelentes resultados apresentados pela *Eversa Transform 2.0* na produção de ésteres metílicos e para que seu potencial fosse mais bem explorado, uma vez que essa lipase não teve seu comportamento estudado nesse trabalho, optamos por realizar uma cinética diminuindo a concentração de lipase para 0,3% (m/m, em relação ao substrato), mantendo as demais condições e concentrações dos substratos como nas reações anteriores. Na figura 3.5, podemos observar os resultados quanto à produção de ésteres metílicos utilizando 0,3% de *Eversa® Transform 2.0* e gordura residual ácida em escala piloto.

Figura 3.5 - Avaliação cinética da síntese de ésteres metílicos de ácido graxo utilizando gordura ácida residual e álcool metílico na razão molar óleo/metanol 1:4,5, 0,3% de *Eversa® Transform 2.0* e 2% de água, em escala piloto.



Na Figura 3.5, verificamos que mesmo pequenas concentrações (0,3%) da lipase *Eversa® Transform 2.0* são suficientes para produzir altos conteúdos de produto. Em 16 horas, obtivemos 0,46 % de monoacilgliceróis, 3,52% de diacilgliceróis, 0,87% de triacilgliceróis, 0,8% de AGL e 94,1% de ésteres metílicos, praticamente os mesmos valores alcançados com 0,7% de enzima (Figura 3.4). A velocidade inicial de reação caiu para $0,168 \text{ min}^{-1}$, em comparação ao ensaio anterior ($0,195 \text{ min}^{-1}$), porém, esse resultado se deve à diminuição da concentração da lipase, o que afeta a velocidade inicial da reação.

Park et al. (2008) investigaram a produção de ésteres metílicos de ácido graxos a partir de resíduos do refino de óleos, em uma planta piloto de 50 L utilizando óleo diesel e querosene como solventes orgânicos, a lipase de *Candida cylindracea* (1%) como catalisador, alcançando o teor de FAME de 97%, em 12 h de reação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e com agitação de 30 rpm. Segundo Price et al. (2016), a partir da análise de dados de uma planta piloto de transesterificação do óleo de cozinha usado utilizando a lipase NS40116, observo-se que a produção com uma dosagem da lipase 0,1%, m/m de óleo, viabilizaria comercialmente a produção de biodiesel enzimático em escala industrial. Ou seja, o emprego de lipases em escala industrial ganha cada vez espaço e relevância como uma alternativa viável economicamente.

3.4 Considerações Finais

A aplicação do óleo ácido residual em escala piloto para a produção de ésteres metílicos utilizando a lipase *Eversa® Transform*, apresentou seus melhores resultados, para ambos os lotes de matéria-prima, em 13 horas de reação com os valores de AGL de 5,5% para o lote 4 e de 5,3% para o lote 5. Nas condições reacionais: óleo ácido residual (550 kg), água (2%, m/m, em relação ao substrato), lipase *Eversa® Transform* (0,7%, m/m, em relação ao substrato) e o álcool metílico (razão molar metanol/óleo de 4,5:1), com temperatura ajustada ($35 \text{ }^\circ\text{C}$).

Em relação à gordura ácida residual quando se utilizou o biocatalizador, *Eversa® Transform*, nas mesmas condições reacionais dos testes com óleo ácido residual: água (2%, m/m, em relação ao substrato), lipase *Eversa® Transform* (0,7%, m/m, em relação ao substrato) e o álcool metílico (razão molar metanol/gordura 4,5:1), em $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Os melhores resultados foram obtidos em 24 horas de reação com 94,93% de ésteres metílicos. Já com a gordura ácida residual, porém

catalisada pela lipase *Eversa® Transform 2.0*, as melhores condições foram obtidas com: água (2%, m/m, em relação ao substrato), lipase *Eversa® Transform 2.0* (0,3%, m/m, em relação ao substrato) e o álcool metílico (razão molar metanol/óleo 4,5:1) em 40°C, resultando em 94,1% ésteres metílicos em 16 horas de reação.

Os resultados apresentados neste capítulo utilizando as matérias-primas de reuso, ácido graxo residual e gordura ácida residual para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos com as diferentes lipases, *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*, demonstraram a versatilidade dessas lipases mediante o escalonamento do processo, demonstrando que é possível a reprodução dos resultados encontrados em laboratório em escala industrial sem grandes modificações no processo.

Capítulo IV

IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES *EVERSA*[®] *TRANSFORM* E *EVERSA*[®] *TRANSFORM 2.0* EM SUPORTES HIDROFÓBICOS

A partir dos resultados encontrados nos dois últimos capítulos referentes ao delineamento do processo para a produção enzimática de ésteres de ácido graxo utilizando lipases em sua forma livre, este capítulo traz uma nova abordagem: o estudo da imobilização das lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* em diferentes matrizes hidrofóbicas, revestidas ou não com polímeros iônicos polietilenoimina (PEI) e ácido poliacrílico (PAA), avaliando seu comportamento em meio com e livre de solventes orgânicos, buscando maximizar a produção dos compostos de interesse, ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos.

Cabe salientar que esta etapa do trabalho foi desenvolvida durante o doutorado sanduíche, realizado no *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación - CIAL*, Madri/ES, entre os meses de setembro de 2015 a junho de 2016, sob supervisão e orientação da Dr.^a Gloria Lorente Fernandez.

4.1 Introdução

As lipases, triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3, catalisam principalmente a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis e glicerol, mas a sua natureza versátil lhes permite catalisar a hidrólise de uma variedade de outros ésteres, bem como a formação destes (TANASKOVIĆ et al., 2017). O uso das lipases na conversão enzimática de óleos para biodiesel é de grande valia, devido a sua alta eficiência, seletividade e pela produção de um produto altamente puro (AKOH et al., 2007, KAREEM et al., 2016). No entanto, a aplicação industrial de lipases livres é geralmente dificultada pela sua fácil desnaturação, baixa estabilidade operacional e dificuldades no reuso (GAO et al., 2017; LI et al., 2013; GARCIA et al., 2011; HARTMANN e JUNG, 2010; ZAKS e KLIBANOV, 1984). A imobilização enzimática pode ser a chave para superar estas deficiências, por meio dela é possível o aumento da estabilidade da lipase, a fácil separação entre biocatalisador e mistura reacional formada, além da possibilidade de aplicação desses biocatalisadores numa ampla variedade de reatores (IDRIS e BUKHARI, 2012).

No caso das lipases, o método de imobilização mais popular é baseado na adsorção física em suportes hidrofóbicos sob condições suaves (baixa força iônica e pH neutro) (VESCOVI et al., 2016, FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; LIMA et al., 2013, FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é uma técnica que tem muitas vantagens: é muito simples e em apenas um passo promove a purificação, imobilização, estabilização e hiperativação da maioria das lipases (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2016; ADLERCREUTZ 2013; LEE et al., 2009; BLANCO et al. 2004; BASTIDA 1998). Estas enzimas são imobilizadas por interação reversível das áreas hidrofóbicas da lipase, região do seu centro ativo, com a superfície do suporte hidrofóbico (BASSI et al., 2006). No mecanismo de ativação interfacial, a lipase, na presença de uma superfície hidrofóbica, se adsorve sobre ela, fixando uma nova estrutura chamada “aberta”, onde o centro ativo está totalmente exposto. Sendo assim, as lipases são capazes de hidrolisar gotas de óleos (MANOEL et al., 2015; SCHMID e VERGER 1998, CAMBILLAU et al., 1996, VERGER 1997).

No entanto, este método tem uma limitação importante: as moléculas de lipase podem ser libertadas do suporte por incubação a altas temperaturas ou na presença de meios orgânicos (FERNANDEZ-

LOPEZ et al., 2016; HIRATA et al., 2016, FERNADEZ-LORENTE et al., 2011). Para ultrapassar esta desvantagem, uma alternativa é a utilização de polímeros iônicos no revestimento das enzimas imobilizadas. A poli etilenimina (PEI) é o polímero iônico mais estudado como ferramenta na melhora da estabilidade enzimática (FERNANDEZ-LOPES et al., 2016; RODRIGUES et al. 2014; PESSELA et al., 2003; TORRES et al., 2002; MATEO et al., 2000) inclusive em lipases imobilizadas (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016; VESCOVI et al., 2016; MORENO-PEREZ 2013). Outro polímero iônico para esse fim é o ácido poliacrílico (PAA), que também atua na melhora da estabilidade das enzimas imobilizadas (RICCARDI et al., 2016; RICCARDI et al., 2014; MUDHIVARTHI et al., 2012), porém, sua aplicação em lipases imobilizadas é algo novo.

Tanto a PEI quanto o PAA são polímeros altamente hidrofílicos, que atuam a fim de aprisionar as enzimas imobilizadas ao suporte, sem que haja a necessidade de alguma modificação superficial do suporte (RICCARDI et al., 2014). Consequentemente, ocorre o aumento da estabilidade enzimática por meio da prevenção de distorções na estrutura das enzimas, impedindo a exposição dos grupos hidrofóbicos da enzima, também reduzindo a entropia conformacional da cadeia polipeptídica (RICCARDI et al., 2016; MORENO-PEREZ et al., 2016).

A partir do exposto, neste capítulo do trabalho, propôs-se a imobilização de duas lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0* em diferentes suportes hidrofóbicos (*Sepabeads-C18*, *Lewatit 1600*, *Purolite-C18*, *Purolite Divinyl*) para estudo da produção de ésteres metílicos e etílicos de ácido graxo a partir de óleo de girassol alto oleico. Primeiramente, realizaram-se os estudos em meio reacional com solvente orgânico, referentes à estabilidade em solvente orgânico (hexano) das enzimas imobilizadas revestidas ou não com PEI, efeito da razão molar dos substratos (álcool/óleo de girassol) na produção de ésteres etílicos e metílicos com suporte *Sepabeads-C18*; à estabilidade aos substratos com derivados produzidos com o suporte *Sepabeads-C18* modificados com os polímeros iônicos: polietilenoimina (PEI) combinado com ácido poliacrílico (PAA) e, por fim, foram avaliados os ciclos de uso das lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18* na produção de ésteres etílicos de ácidos graxos. Após, avaliou-se as lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18* em meio livre de solvente orgânico, quanto ao efeito da razão molar dos

substratos (álcool/óleo de girassol) na produção de ésteres etílicos e metílicos e também os ciclos de uso das lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18* na produção de ésteres etílicos de ácidos graxos.

4.2 Material e Métodos

Nesta seção, serão descritos os materiais e métodos utilizados na caracterização e imobilização das lipases livres *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*, também a produção de ésteres de ácido graxo em meio com e livre de solventes orgânicos, quantificação dos produtos de interesse e estudo dos ciclos de uso dos derivados que se destacaram frente à estabilidade aos substratos e às cinéticas para produção de ésteres etílicos e ésteres metílicos obtidos nas reações de transesterificação.

4.2.1 Material

Enzimas

- *Eversa Transform* - Lipase solúvel produzida e gentilmente cedida pela Novozymes® (Dinamarca).
- *Eversa Transform 2.0* - Lipase solúvel produzida e gentilmente cedida pela Novozymes® (Dinamarca) produzida pelo micro-organismo *Aspergillus oryzae* modificado geneticamente (Novozymes, 2016).

Reagentes

- Fosfato de sódio monobásico monoidratado (98%, Sigma Aldrich);
- Reagente de Bradford 1-1, 400 µg/mL de proteína (Sigma Aldrich);
- Polietilenimina 25000 MW (Branched);
- Ácido Poli-acrílico, 50%, 5000 MW (Acros Organics);
- Visking Dialysis Tubing, 12-1400 Da (Medicell membranes);
- Butirato de p-nitrofenil (98%, Sigma Aldrich);
- Acetonitrila, grau HPLC (99,9%, Sigma Aldrich);

- Hexano, grau HPLC (99,9%, Merk);
- 2-propanol (99,5%, Sigma Aldrich).

Substratos

- Óleo de girassol alto oléico 80% (Sur-Coosur S);
- Álcool etílico PA (99,9%, Merk);
- Álcool metílico (99,9%, Merk).

Suportes para imobilização

- *Purolite-C18* ECR8804F *Octadecyl acrylate* (LifeTech, Purolite);
- *Purolite* ECR1061 DVB *Divinyl* (LifeTech, Purolite);
- *Sepabeads-C18* doados por Resindion S.R.L;
- *Lewatit* VP OC 1600 (Bayer, Leverkusen, Alemanha).

Padrões químicos

- Monoacilgliceróis: 1-oleoyl-rac-glycerol (97%, Sigma Aldrich);
- Diacilgliceróis: 1,2-dioleoyl-rac-glycerol (97%, Sigma Aldrich);
- Ésteres etílico/metílicos: ethyl oleate (98%, Sigma Aldrich);
- Triacilgliceróis: Óleo de girassol alto oléico 80%, (Sur-Coosur S).

4.2.2 Procedimentos Experimentais

Estão descritos aqui os passos realizados para as etapas de caracterização das lipases livres *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*, imobilização em diferentes suportes hidrofóbicos, estudo da estabilidade dos derivados por meio da modificação desses com o uso de polímeros iônicos (PEI e PAA), avaliação do efeito da razão molar de etanol/metanol/óleo em reações de transesterificação de óleo de girassol e no estudo do reciclo das lipases imobilizadas para a produção de ésteres de ácido graxo na presença e livre de solventes orgânicos.

4.2.2.1 Caracterização das lipases livres *Eversa*® *Transform* e *Eversa*® *Transform* 2.0

Teor de Proteína

A quantificação do teor de proteína nas lipases livres foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando a curva padrão, construída a partir de diferentes concentrações de albumina de soro bovino: $y=0,4037x+0,03$ (mg/mL). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro 595 nm, após 10 min da adição de 0,02 mL de amostra e 2 mL do reagente de Bradford.

Eletroforese em gel SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo o método de Laemmli (1970) em uma unidade de eletroforese SE 250-Mighty Small II (Hoefer Co.) utilizando gel de poliacrilamida 12% (m/m) para a separação e gel de concentração de 5% (m/m) de poliacrilamida. As lipases, *Eversa*® *Transform* e *Eversa*® *Transform* 2.0, foram desnaturadas por aquecimento na presença de SDS e β -mercaptoetanol. O gel foi corado com solução corante azul de Coomassie 0,25% (m/m) e decorados com uma solução 50% de água destilada, 43% de metanol e 7% de ácido acético. O padrão de alta e baixa massa molar utilizado foi Bio-Rad (10-250 kDa).

4.2.2.2 Imobilização em diferentes suportes hidrofóbicos

4.2.2.2.1 Imobilização das lipases *Eversa*® *Transform* e *Eversa*® *Trasnform* 2.0

A adsorção da lipase aos suportes hidrofóbico estudados (Sepabeads, *Lewatit*, Purolite Octadecyl e Purolite Divinyl) ocorreu por meio da diluição da lipase em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 à 25 °C (BASTIDA et al., 1998). Onde a atividade do sobrenadante foi verificada antes e ao longo da imobilização pelo método pNPB, até máxima imobilização (determinada quando a atividade enzimática do sobrenadante permaneceu constante). Ao final da imobilização, a suspensão foi filtrada, o suporte recuperado e submetido à secagem com acetona. A carga enzimática utilizada nos ensaio foi de 20 mg de proteína por g suporte. O rendimento de imobilização no derivado foi calculado pela diferença entre a atividade inicial do sobrenadante, carga

enzimática oferecida ao suporte para a imobilização, e a atividade enzimática do sobrenadante no final do tempo de imobilização sobre a atividade inicial do sobrenadante.

Atividade lipolítica utilizando p-nitrofenil butirato (pNPB)

A atividade enzimática para o acompanhamento da imobilização foi determinada por meio da medição de absorvância a 348 nm ($\epsilon = 5.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) produzida pela medida de *p*-nitrofenol (pNP) na hidrólise de 0,5 mM de pNPB em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7 e 25 °C (LORENTE, et al., 2007). A reação foi iniciada com 0,02 mL de suspensão de lipase juntamente com 0,02 mL de pNPB e 2,5 ml de tampão 25 mM. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de pNPB por minuto.

Secagem das lipases imobilizadas e dos reagentes

Os solventes orgânicos foram secos por incubação durante a noite, na presença do excesso de peneiras moleculares secas (500 g/L solvente). Para a secagem das lipases imobilizadas utilizou-se 5 g de cada lipase, que foram filtrados e lavados com 50 mL de soluções com diferentes concentrações de acetona, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% a 25 °C. Deste modo, a água que preenchia os poros dos derivados foi dissolvida e diluída no solvente orgânico, assim expulsa do suporte.

4.2.2.2 Modificação das lipases imobilizadas com polietileno imina

Buscando melhorar a estabilidade e seletividade das lipases imobilizadas frente aos substratos e condições reacionais trabalhadas, as enzimas imobilizadas foram recobertas com polietilenoimina (PEI). Os derivados imobilizados foram incubados em uma solução de 2,5% de polietilenoimina (25.000 MM) em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 (Guisan et al., 2001). Após 4 horas, o suporte foi filtrado, lavado com tampão fosfato 25 mM e seco.

4.2.2.3 Modificação das lipases imobilizadas em Sepabeads-C18 com polietilenoimina combinada com ácido poliacrílico

Para a melhora da estabilidade e seletividade nas enzimas imobilizadas, foi estudado o recobrimento dos suportes com polietilenoimina (PEI) e ácido poliacrílico (PAA). Para isso, a solução

de 2,5% de polietilenimina (25.000 Da MW) em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 recebeu 0,001% (m/v) de PA e, após, foi submetido à diálise em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, por 24 h. Após, os derivados imobilizados foram incubados na solução de PEI com PA 0,001% (1 g de suporte/20 ml solução PEI com PA) agitados em agitador de tubos por 3 horas, filtrados e secos (MORENO-PEREZ et al., 2016).

4.2.2.3 Síntese de ésteres em meio com solvente

4.2.2.3.1 Síntese de ésteres etílicos e metílicos em solvente orgânico

As enzimas *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas nos distintos suportes foram testadas na produção dos ésteres etílicos e metílicos. Para isto 0,3 g de enzima imobilizada foi adicionado em uma solução contendo os substratos óleo de girassol alto oleico (óleo de girassol com 80% de oleico), álcool, 4,1 mL de hexano e 0,2 g de peneira molecular (3 Å) (de modo a manter baixos os valores de atividade da água), incubados a 40 °C, 150 rpm em agitador orbital (MORENO-PEREZ et al., 2013). Onde as reações realizadas com álcool metílico foram estudadas as razões molares metanol:óleo de 12,5:1, 6:1 e 4:1, e com álcool etílico as razões molares etanol:óleo de 8,5:1 e 4:1 foram avaliadas. A massa molar 839 g/mol utilizada para os cálculos das razões molares entre os substratos foi calculada de acordo com a composição de ácidos graxos do óleo de girassol alto oleico: 85% de ácido oleico, 10% de ácido palmítico e 5% de ácido linoleico. O acompanhamento da reação de transesterificação foi feito por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), onde o meio reacional foi regularmente analisado por meio da diluição de 0,1 mL da amostra reacional em 0,9 mL de 2-propanol/hexano na proporção 5:4 (v/v). A determinação da atividade lipolítica das lipases imobilizadas foi obtida pela Equação 4.1, onde uma unidade de atividade (U/g) foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido oleico em 1 min.

$$\text{Atividade lipase (U/g)} = \left(\frac{1880 E}{100} \right) / Smt$$

(Equação 4.1)

Onde:

1880* = Máxima produção de ésteres etílicos da reação (µmol);

E = Teor de ésteres na reação (%);
S= Concentração de enzima imobilizada no suporte (g proteína/g suporte);
m= Massa utilizada na reação (g);
t= Tempo de reação (min).

*Valor calculado considerando a reação completa de 0,549 g de óleo de girassol alto oleico com 0,09 g de álcool etílico utilizando a massa molar media dos ésteres produzidos de 307,81 g/mol.

4.2.2.3.2 Estabilidade das lipase *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*

Estabilidade a hexano

A lipase imobilizada seca (0,3 g) e 4,1 mL de hexano foram incubados à temperatura de 40 °C por até 6 dias. Aos dias 0, 2 e 6 adicionou-se ao catalisador incubado nas condições de inativação, os substratos na razão molar etanol/óleo de 12,5:1 e 0,2 g de peneira molecular (3 Å) e iniciou-se a reação de transesterificação.

Estabilidade a óleo de girassol

0,3 g de lipase imobilizada seca e 4,1 mL de hexano, juntamente com óleo de girassol foram incubados à temperatura de 40 °C por 7 dias. Aos dias 0 e 7 adicionaram-se ao catalisador incubado nas condições de inativação, o substrato álcool etílico na razão molar de etanol/óleo de 4:1 e 0,2 g de peneira molecular (3 Å) e iniciou-se a reação de transesterificação.

Estabilidade a etanol

0,3 g de lipase imobilizada seca, 4,1 mL de hexano e o etanol foram incubados à temperatura de 40 °C por 7 dias. Aos dias 0 e 7 adicionaram-se ao catalisador incubado nas condições de inativação, o substrato óleo de girassol na razão molar etanol/óleo de 4:1 e 0,2 g de peneira molecular (3 Å) e iniciou-se a reação de transesterificação.

Estabilidade a metanol

0,3 g de lipase imobilizada seca, 4,1 mL hexano e o metanol foram incubados à temperatura de 40 °C por 7 dias. Aos dias 0 e 7 adicionaram-se ao catalisador incubado nas condições de inativação, o

substrato óleo de girassol na razão molar metanol/óleo de 4:1 e 0,2 g de peneira molecular (3 Å) e iniciou-se a reação de transesterificação para verificação da capacidade de transesterificação.

4.2.2.3.2 Ciclos de uso dos derivados em meio com solvente orgânico

Os ciclos de uso foram realizados utilizando as lipases imobilizadas *Eversa® Transform 2.0*, nas condições: 0,3 g de lipase imobilizada, razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,2 g de peneira molecular (3 Å), incubados a 40 °C, 150 rpm em agitador orbital. Ao final do tempo de reação, as lipases foram lavadas com hexano, e uma nova reação teve início, assim por sucessivos ciclos até que a produção de ésteres diminuísse consideravelmente.

4.2.2.4 Síntese de ésteres em meio livre de solvente orgânico

4.2.2.4.1 Síntese de ésteres etílicos e metílicos em meio livre de solvente orgânico

As enzimas *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas no suporte *Sepabeads-C18* foram testadas na produção dos ésteres etílicos e metílicos. Para isto, 0,5 g de lipase imobilizada seca foram adicionadas em uma solução contendo os substratos óleo de girassol (óleo de girassol alto oleico, 80% ácido oleico) e álcool com 0,2 g de peneira molecular (3 Å), incubados a 40 °C, 150 rpm em agitador orbital (MORENO-PEREZ et al., 2013). Onde nas reações realizadas com álcool metílico foram estudadas as razões molares metanol/óleo de 11:1, 5:1 e 3,5:1 e com álcool etílico as razões molares etanol/óleo de 4:1 e 3,25:1. A massa molar 839 g/mol utilizada para os cálculos das razões molares entre os substratos foi calculada de acordo com a composição de ácidos graxos do óleo de girassol alto oleico: 85% de ácido oleico, 10% de ácido palmítico e 5% de ácido linoleico. O acompanhamento da reação de transesterificação foi feito por HPLC, onde o meio reacional foi regularmente analisado por meio da diluição de 0,1 mL da amostra reacional em 1,9 mL de 2-propanol/hexano na proporção de 5:4 (v/v) (item 4.2.3.1).

4.2.2.4.2 Ciclos de uso dos derivados em meio livre de solvente orgânico

Os ciclos de uso foram realizados utilizando as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18*, nas condições: 0,5 g de lipase imobilizada razão molar etanol/óleo de 3,25:1, 0,2 g de peneira molecular (3 Å), incubados a 40 °C e 150 rpm em agitador orbital por 3 horas. Ao final do tempo de reação, o meio reacional foi recolhido e analisado em HPLC, as lipases imobilizadas foram lavadas com 20 ml de hexano, filtradas e uma nova reação iniciou-se, assim por sucessivos ciclos até que a produção de ésteres diminuísse consideravelmente.

4.2.3 Métodos Analíticos

4.2.3.1 Determinação do teor de ésteres, mono-, di- e triacilgliceróis

A quantificação dos produtos de reação: ésteres, MAG, DAG e TAG, foi realizada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) utilizando RPHPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com detector UV Spectra Physic SP 8450) e coluna C18 (Ultrabase-C8, 150 x 4.6 mm, 5µm). A detecção em UV foi realizada em 215 nm. Foram injetados 10 µL de amostra diluídas em 2-propanol/hexano na proporção de 5:4 (v/v) numa vazão de 1 ml/min da fase móvel. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40 °C. O reservatório A continha água mili-q, o reservatório B acetonitrila e o reservatório C 2-propanol/hexano 5:4 (v/v). Foi utilizado um gradiente ternário de 25 min, com dois passos de gradiente linear: 30% de A + 70% B em 0 min, 100% de B em 10 min, 50% de B + 50% de C em 20 min, seguido por eluição isocrática com 50% B + 50% C durante os últimos 5 min. As porcentagens de cada composto foram calculadas com base nas áreas dos picos dos padrões analisados 1-oleoyl-rac-glycerol (MAG) (tempo de retenção (RT) de 7,4 min), 1,2-dioleoyl-rac-glycerol (DAG) (RT de 15,8 min), ethyl oleate (ésteres) (RT de 12,2 min) e óleo de girassol (TAG) (RT de 21,6 min) (HOLČAPEK, et al., 1999).

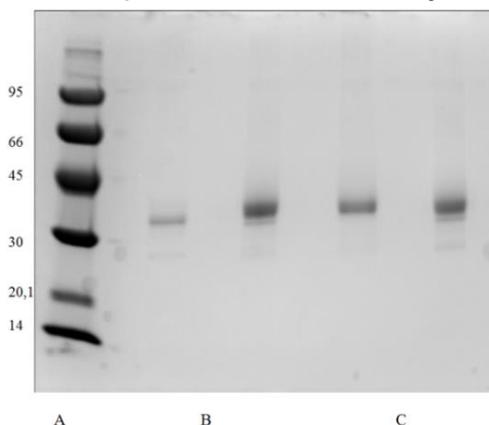
4.3 Resultados e Discussão

Nesta seção, serão apresentados os resultados e a discussão referente às etapas caracterização das lipases livres estudadas, imobilização dessas em diferentes suportes e desempenho dos derivados produzidos frente à estabilidade em substratos e solvente orgânico e a ciclos de uso em reações de transesterificação em meio com e livre de solvente orgânico, com o objetivo de investigar as melhores rotas de produção dos substratos de interesse, ésteres etílicos e metílicos.

4.3.1 Caracterização das lipases livres *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*

As lipases livres *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* foram submetidas a SDS-eletroforese, Figura 4.1, onde para ambas as soluções enzimáticas foram feitas duas diluições a primeira de 1:150 (v/v) e a segunda de 1:100 (v/v).

Figura 4.1- SDS-PAGE. A: Marcador de pesos molecular. B: Extrato enzimático *Eversa® Transform* em diferentes diluições. C: Extrato enzimático *Eversa® Transform 2.0* em diferentes diluições.



Na Figura 4.1, observamos que ambas as lipases apresentam apenas uma banda de proteína, demonstrando que a solução enzimática não é composta por uma mistura de proteínas e também que as enzimas têm massa molecular próximas a 30 KDa, dado que suas bandas correspondentes foram observadas próximas à do padrão de anidrase

carbônica (30 KDa). A semelhança das lipases perante eletrofose pode indicar que as duas lipases sejam produzidas pelo mesmo micro-organismo, porém, mesmo que isso se confirme em trabalhos futuros, não significa que a composição da solução aquosa de ambas seja igual, nem de que estão na mesma concentração nas respectivas soluções (mg proteína/mL) e nem que o micro-organismo de ambas tenham as mesmas modificações genéticas.

Também, as lipases foram analisadas quanto ao teor de proteína pelo método de Bradford e os resultados indicaram que a enzima *Eversa® Transform* continha em sua formulação de 29,9 mg/mL de proteína total enquanto à enzima *Eversa® Transform 2.0* de 41mg/ml de proteína total, esses valores são importantes e fundamentais para os cálculos de imobilização, evitando a saturação do suporte, quando a carga de proteína oferecida ao suporte é muito alta, e evitando também a baixa atividade enzimática do derivado quando a carga de proteína oferecida ao suporte é insuficiente.

4.3.2 Síntese de ésteres em reações de transesterificação com solvente orgânico

4.3.2.1 Produção de ésteres etílicos em meio com solvente orgânico utilizando as lipases imobilizadas em distintos suportes hidrofóbicos

Estudou-se a transesterificação enzimática do óleo de girassol com etanol em meios anidros, com intuito de produzir ésteres de etil oleato utilizando as lipases comerciais *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*. Para isto, as lipases foram imobilizadas por adsorção hidrofóbica interfacial em 4 suportes hidrofóbicos com distintas características morfológicas, *Sepabeads-C18*, *Lewatit 1600*, *Purolite octadecyl (Purolite-C18)* e *Purolite divinyl (Purolite DV)*.

Os derivados produzidos foram testados nas condições de reação: 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano, razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, 0,2 g peneira molecular incubados a 40 °C sob agitação orbital de 150 rpm em 24 horas de reação. Os resultados quanto à produção de ésteres etílicos (FAEE), monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) utilizando a enzima *Eversa® Transform* podem ser vistos na Figura 4.2 e a produção utilizando a *Eversa® Transform 2.0*, na Figura 4.3.

Figura 4.2- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase *Eversa*® *Transform* imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação.

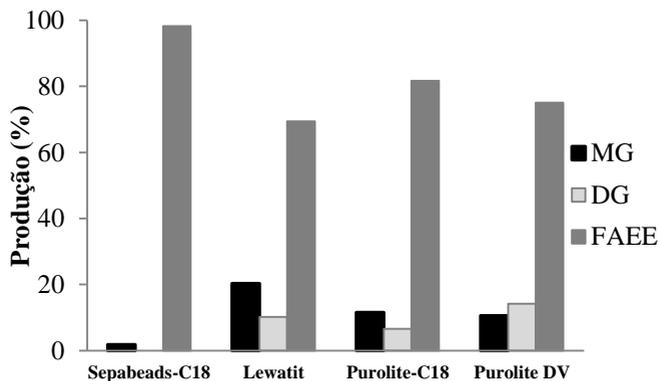
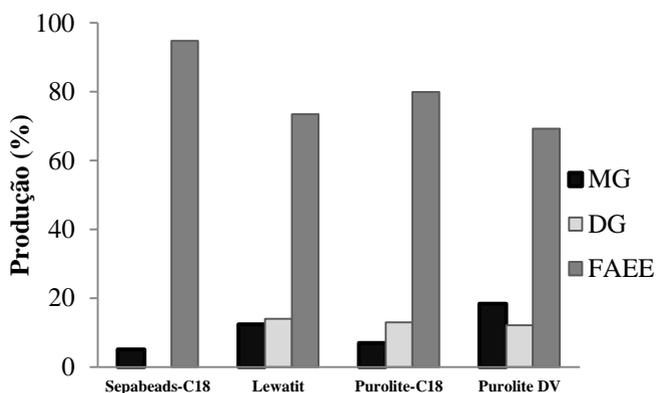


Figura 4.3- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase *Eversa*® *Transform* 2.0 imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação.



O valor de TAG não está presente nas Figuras 4.2 e 4.3 porque esse insignificante em todas as amostras analisadas. A concentração de proteínas oferecidas aos distintos suportes foi de 20 mg proteína/g suporte e a média de lipase imobilizada ao suporte teve rendimentos superiores a 95%, em comparação com a atividade enzimática inicial oferecida. Segundo as Figuras 4.2 e 4.3 as maiores produções de ésteres etílicos e menores conteúdo de MAG e DAG foram observadas nas lipases imobilizadas na matrix *Sepabeads-C18*. Os demais imobilizados também apresentaram conteúdo relevante de ésteres etílicos, com isso foram calculadas as atividades (U/g) das lipases imobilizadas nas reações de transesterificação, observadas na Tabela 4.1 para a *Eversa® Transform* e na Tabela 4.2 para a *Eversa® Transform 2.0*.

Tabela 4.1- Atividade lipolítica referente a síntese de ésteres etílicos a partir da lipase *Eversa® Transform* imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação.

| Suporte | Atividade (U/g prot.) | Teor FAEE (%) |
|----------------------|-----------------------|---------------|
| <i>Sepabeads-C18</i> | 801,46 | 99,5 |
| <i>Lewatit</i> | 589,96 | 69,4 |
| <i>Purolite-C18</i> | 694,24 | 81,6 |
| <i>Purolite DV</i> | 638,39 | 75,1 |

Tabela 4.2- Atividade lipolítica referente a síntese de ésteres etílicos a partir da lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em diferentes suportes utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano e razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, 0, em 24 horas de reação.

| Suporte | Atividade (U/g prot.) | Teor FAEE (%) |
|----------------------|-----------------------|---------------|
| <i>Sepabeads-C18</i> | 806,49 | 99,7 |
| <i>Lewatit</i> | 625,19 | 73,5 |
| <i>Purolite-C18</i> | 679,46 | 79,9 |
| <i>Purolite DV</i> | 589,63 | 69,3 |

As Tabelas 4.1 e 4.2 confirmam que as lipases imobilizadas que obtiveram melhor desempenho nas reações de transesterificação de óleo de girassol foram, para ambos os casos, as imobilizadas com o suporte *Sepabeads-C18*. Este apresentou, para a lipase *Eversa® Transform*, 99,5% FAEE e atividade de 801,46 U/g e, para a lipase *Eversa® Transform 2.0*, o conteúdo de 99,7% de FAEE e 806,49 U/g de atividade enzimática, os maiores em comparação com os outros derivados. A partir desses resultados, fica evidente que a morfologia do suporte onde se imobiliza a lipase é determinante para a reação, não tanto para a atividade da lipase na reação que em todos os casos está entre 580-800 U/g de prot. (Tabela 4.1 e 4.2), mas sim para a seletividade da enzima. Se observarmos as Figuras 4.2 e 4.3, cada matriz apresentou uma seletividade distinta, dando lugar à formação de MAG e DAG junto com os ésteres etílicos, enquanto que para ambas as enzimas imobilizadas na matrix *Sepabeads-C18* a produção foi basicamente de ésteres etílicos.

4.3.2.2 Síntese de ésteres etílicos e estabilidade a solvente orgânico utilizando diferentes suportes hidrofóbicos recobertos com PEI

O uso de polímeros iônicos como PEI é uma forma de enriquecer superfícies enzimáticas com grupos de aminas primárias que se ligam por adsorção iônica aos grupos carboxil ionizados das enzimas (resíduos Asp + Glu) (MORENO-PEREZ et al., 2016). Com a adsorção iônica desses grupos em múltiplos pontos, os derivados tornam-se muito estáveis (GUISAN et al., 2001). Assim, a PEI pode atuar no aumento de resistência mecânica, na melhora da atividade enzimática e na melhora da estabilidade térmica das enzimas imobilizadas, onde suporte revestido com estes polímero permite a adsorção de proteínas ao suporte de forma mais eficaz (BAHULEKAR; AYYANGAR; PONRATHNAM, 1991; TORRES et al., 2016).

Os suportes estudados na imobilização das lipases de interesse foram recobertos com uma solução de PEI a 2,5% buscando a melhora na produção e na estabilidade frente à reação de transesterificação de óleo de girassol em solvente orgânico. Nas Figuras 4.4 e 4.5, podemos observar a produção de ésteres etílicos utilizando suportes recobertos com PEI a 2,5% para as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*, respectivamente. As condições de reação estudadas foram: 0,3 g de lipase imobilizada revestida com PEI a 2,5%, 4,1 mL de hexano, razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1 e 0,2 g peneira

molecular incubados a 40 °C, sob agitação orbital de 150 rpm em 24 horas de reação.

Figura 4.4- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase *Eversa® Transform* imobilizada em diferentes suportes com PEI, utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 mL de hexano, razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação.

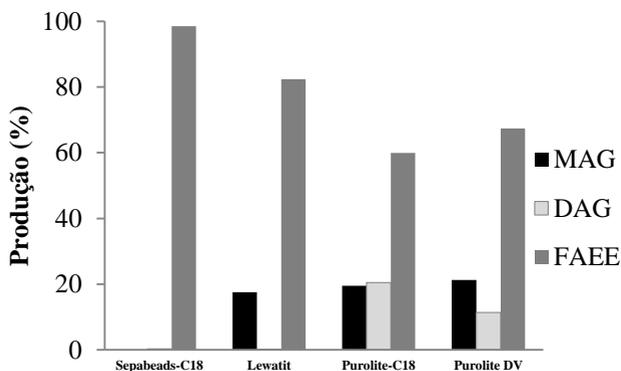
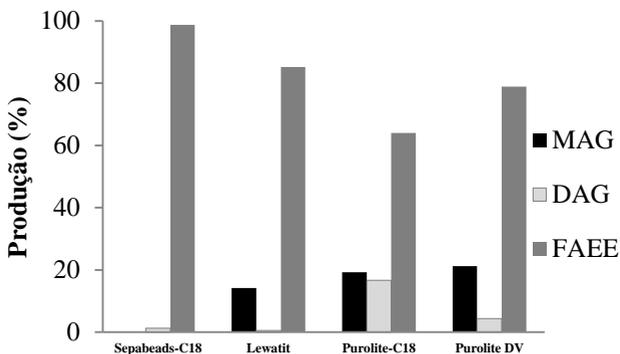


Figura 4.5- Síntese de ésteres etílicos a partir da lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em diferentes suportes com PEI, utilizando 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 mL de hexano, razão molar etanol/óleo de girassol de 8,5:1, em 24 horas de reação.



Na Figura 4.4, observamos que a reação não apresentou avanços na produção de ésteres nos imobilizados revestidos por PEI, estes apresentaram em média conteúdos de ésteres menores do que no estudo anterior, com os mesmos suportes e a lipase *Eversa® Transform*, sem a utilização de PEI. O mesmo pode ser descrito para a Figura 4.5, que apresenta os resultados com a lipase *Eversa® Transform 2.0*. Neste, os resultados quanto à produção de ésteres etílicos se mantiveram ou caíram, em relação à síntese dos imobilizados sem PEI. Com isso, optou-se por estudar a estabilidade em solvente orgânico (hexano), das distintas matrizes revestidas com e sem revestimento de PEI, para verificar se o revestimento teria impacto na estabilidade da lipase imobilizada. Com isso, após incubação nas condições de inativação (0,3 g lipase imobilizada, 4,1 mL hexano em 40 °C), foi realizada a reação de produção de ésteres etílicos nas mesmas condições que as realizadas anteriormente. Nas Figuras 4.6 e 4.7 apresentamos a estabilidade a hexano utilizando a lipase *Eversa® Transform* revestida ou não com PEI a 2,5%.

Figura 4.6- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase *Eversa® Transform* imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C.

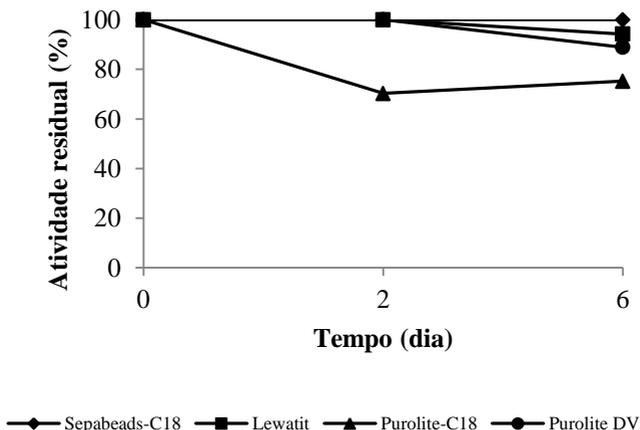
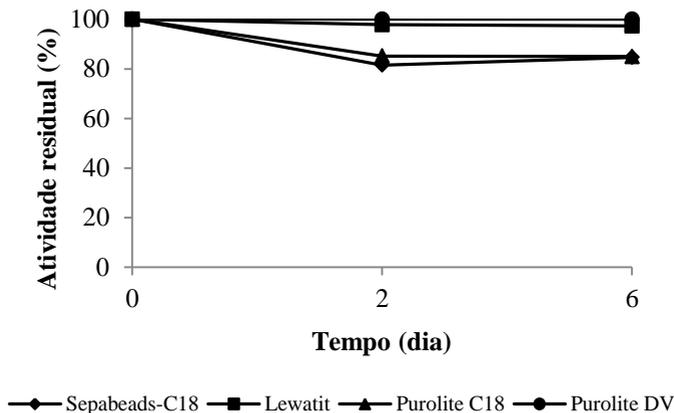


Figura 4.7- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase *Eversa® Transform* imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos recobertos com PEI a 2,5%, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C.



A atividade residual da *Eversa® Transform* imobilizada sem PEI (Figura 4.6) em *Sepabeads-C18*, *Lewatit* e *Purolite DV*, se manteve próxima a 100%; enquanto a atividade com *Purolite-C18* caiu cerca 30% em relação a atividade inicial. Entretanto, na Figura 4.7, quando os derivados enzimáticos foram revestidos com PEI as atividades residuais dos imobilizados com *Lewatit* e *Purolite DV* se mantiveram próximas a 100%, enquanto a dos suportes *Sepabeads-C18* e *Purolite-C18* apresentaram queda de 20% em relação à atividade inicial. Nas figuras 4.8 e 4.9, constam os resultados quando avaliada a estabilidade a solvente orgânico (hexano) utilizando a lipase *Eversa® Transform 2.0*.

Figura 4.8- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase *Eversa*® *Transform 2.0* imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C.

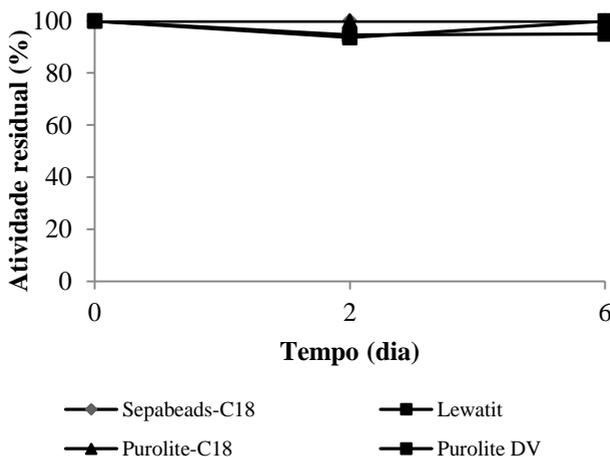
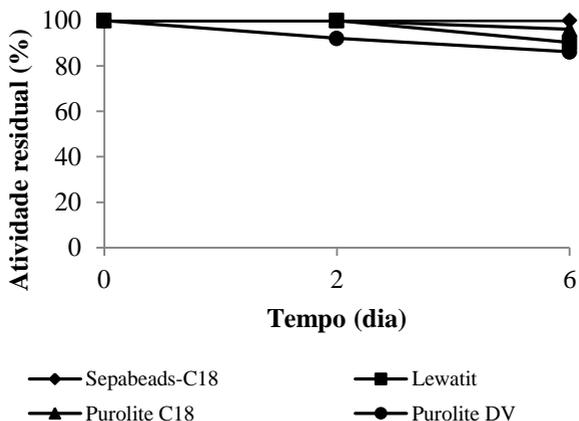


Figura 4.9- Estabilidade a solvente orgânico (hexano) da lipase *Eversa*® *Transform* imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos recobertos com PEI, nas condições de inativação 0,3 g lipase imobilizada e 4,1 mL hexano a 40 °C.



Nas estabilidades estudadas com *Eversa*® *Transform 2.0*, a atividade residual dos suportes não revestidos com PEI (Figura 4.8), em todos os suportes analisados, as atividades residuais se mantiveram

próximas a 100%, e quando estudadas os suportes revertidos com PEI (Figura 4.9), os derivados *Sepabeads-C18* e *Purolite-C18* mantiveram sua atividade residual próxima a 100%, já os suportes *Lewatit* e *Purolite DV* apresentaram uma queda de cerca de 10% da atividade inicial. Levando em consideração que utilizando as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas e revestidas com PEI não apresentaram aumento na produção de ésteres etílicos com relação aos anteriormente alcançados (item 4.3.2.1), e a partir da análise da estabilidade a solvente orgânico onde os derivados sem PEI demonstraram em sua maioria alta estabilidade (exceto *Eversa® Transform* imobilizada em *Purolite-C18*), optou-se por não utilizar o revestimento com 2,5% de PEI nas enzimas imobilizadas produzidas para ambas as lipases.

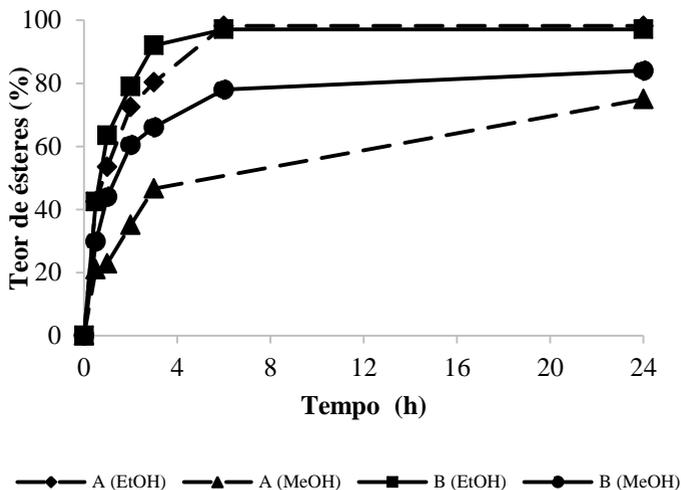
No estudo de Cicolatti et al. (2016), o suporte revestido com 20% de PEI (25000) apresentou maior estabilidade e melhora na atividade enzimática da lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em poliuretano, para a etanolise de óleo de peixe. Segundo Lathoude et al. (2008), que estudaram a influência de diferentes massas molares de PEI (60.000, 750.000 e $\sim 1,000,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) na imobilização de β -galactosidase, moléculas maiores de PEI proporcionam um ambiente mais estável e uma ligação mais forte para o complexo enzima-suporte. Com isso, o possível uso de maiores concentrações de PEI 25000 nos derivados imobilizados, ou ainda, a avaliação de PEI com maiores massas molares poderia ter resultado em enzimas imobilizadas com melhor desempenho na reações de transesterificação.

Baseado no excelente desempenho do suporte *Sepabeads-C18* na imobilização das enzimas *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* e na alta produção de ésteres etílicos (>99%) na reação de transesterificação de óleo de girassol em reações com solvente orgânico, as lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18* sem revestimento de PEI foram consideradas as melhores para o aprofundamento da investigação da síntese de ésteres em meio com e livre de solventes orgânico utilizando as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas. Fica evidente, a partir dos resultados aqui expostos, que a eficiência do catalisador imobilizado numa reação assim como os produtos resultantes dessa, não depende apenas do catalisador empregado, mas também da matriz utilizada para a imobilização.

4.3.2.3 Produção de ésteres metílicos e etílicos com lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18*

Estudou-se a cinética de formação de ésteres na reação de transesterificação de óleo de girassol com dois alcoóis de cadeia curta, álcool etílico e álcool metílico, para avaliar o efeito de cada um nestas reações. As condições de reação estudadas foram: 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 mL de hexano, razão molar álcool/óleo de girassol de 8,5:1 com o álcool etílico e 12,5:1 com o álcool metílico, 0,2 g peneira molecular incubados a 40 °C sob agitação orbital de 150 rpm. Os resultados quanto ao efeito do doador acil nas reações de síntese de ésteres etílicos e metílicos são apresentados na Figura 4.10, para *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*.

Figura 4.10- Efeito de diferentes substratos – álcool etílico e álcool metílico - nas reações de síntese de ésteres etílicos e metílicos das lipases *Eversa® Transform* (A) e *Eversa® Transform 2.0* (B) imobilizadas nas condições, 0,3 g de lipase imobilizada em *Sepabeads-C18*, 4,1 mL de hexano, razão molar álcool/óleo de girassol de 8,5:1 com o álcool etílico e 12,5:1 com o álcool metílico, 40 °C e 150 rpm.



Analisando a Figura 4.10, tanto para a *Eversa® Transform* quanto para a *Eversa® Transform 2.0*, a reação somente se deu por completa (>98% FAEE) quando se utilizou o álcool etílico como substrato. Quando a reação utiliza álcool metílico em 24 h, é alcançado em torno de 75% de FAME, ou seja, o metanol acaba por afetar as lipases e isso causa a queda na produção de ésteres. A velocidade inicial de formação de ésteres calculada também demonstra a queda na produção de ésteres metílicos, pois, no caso da lipase *Eversa® Transform* com etanol, a velocidade inicial foi de $0,697 \text{ min}^{-1}$ enquanto que com as mesmas condições utilizando metanol, essa foi de $0,328 \text{ min}^{-1}$ e para *Eversa® Transform 2.0* a velocidade encontrada foi de $0,774 \text{ min}^{-1}$ com etanol e de $0,57 \text{ min}^{-1}$ com metanol, ou seja, o metanol afeta a velocidade de formação de ésteres de ambas as lipases, principalmente a lipase *Eversa® Transform*, visto que maiores velocidades iniciais encontradas são com a *Eversa® Transform 2.0*.

4.3.2.1.1 Efeito de diferentes razões molares de álcool/óleo de girassol na produção de ésteres etílicos e metílicos com derivado de *Sepabeads-C18*

Com o intuito de investigar a influência do álcool etílico e do álcool metílico nas reações de transesterificação de óleo de girassol e do comportamento desses na formação de ésteres, foram realizadas cinéticas com diferentes razões molares álcool/óleo. Todos os ensaios contaram com: 0,3 g de lipase imobilizada, 4,1 ml de hexano, 0,2 g peneira molecular, incubados a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm. Nos ensaios utilizando álcool etílico, as razões molares etanol/óleo estudadas foram de 8,5:1 e 4:1 e nas utilizando álcool metílico, foram metanol/óleo 6:1 e 4:1. O efeito da razão molar utilizando álcool etílico utilizando *Eversa® Transform* encontra-se na Figura 4.11, e os utilizando *Eversa® Transform 2.0* na Figura 4.12.

Figura 4.11- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 8,5:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de *Eversa® Transform* immobilizada em *Sepabeads-C18*, 40 °C e agitação de 150 rpm.

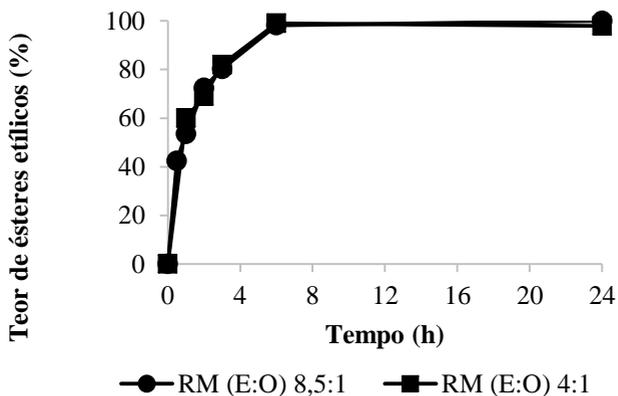
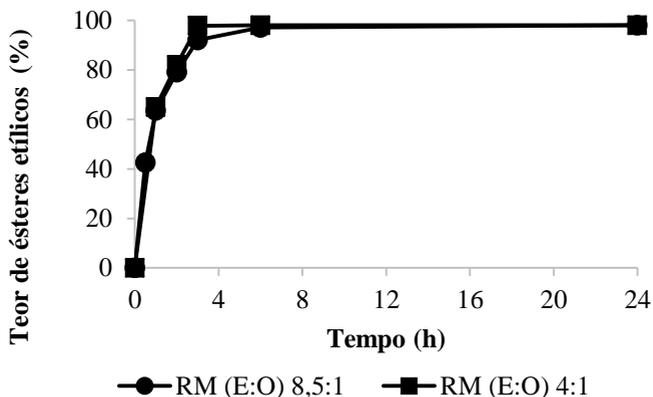


Figura 4.12- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 8,5:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de *Eversa® Transform 2.0* immobilizada em *Sepabeads-C18*, 40 °C e agitação de 150 rpm.

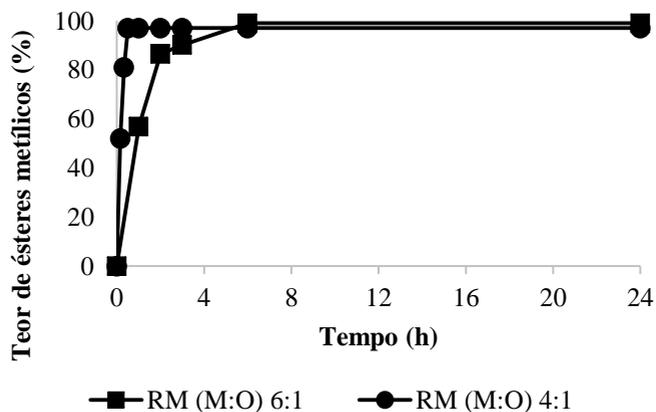


Alta formação de ésteres etílicos (97%) foi encontrada em 6 horas (Figura 4.11), onde não houve perceptível diferença na formação de ésteres etílicos nas duas razões molares testadas com o uso da lipase

imobilizada *Eversa® Transform*. Na Figura 4.12, referente a lipase imobilizada *Eversa® Transform 2.0*, altos conteúdos de ésteres foram encontrados com 3 horas de reação (98%) na razão molar 4:1, na razão molar de 8,5:1 também houve a alta produção de ésteres etílicos, porém em 6 horas.

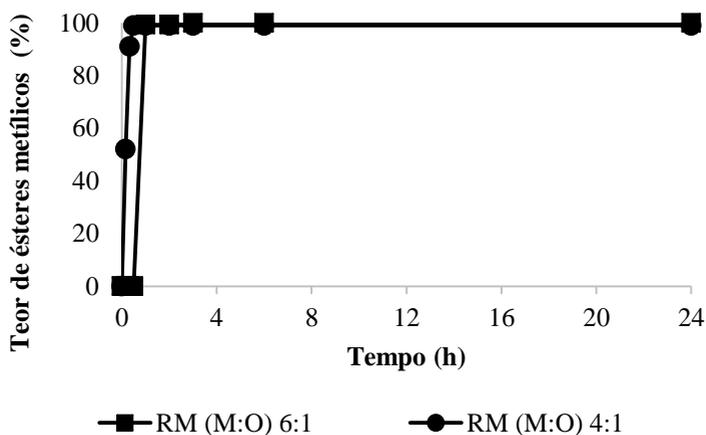
Para a lipase *Eversa® Transform*, as velocidades iniciais da formação de ésteres etílicos foram: com a razão molar 8,5:1 de $0,697 \text{ min}^{-1}$ e de $0,68 \text{ min}^{-1}$ com 4:1, ou seja, o uso da maior ou menor razão molar não provocou notável influência na velocidade de formação de ésteres etílicos e nem no conteúdo final destes. Contudo, para a *Eversa® Transform 2.0* a velocidade inicial foi de $0,774 \text{ min}^{-1}$ com a razão molar etanol/óleo de 8,5:1 e de $0,78 \text{ min}^{-1}$ para 4:1, demonstrando que a menor concentração de etanol é benéfica para o andamento da reação, influenciando na velocidade de formação dos ésteres etílicos. O efeito da razão molar na síntese de ésteres metílicos utilizando a lipase imobilizada *Eversa® Transform* encontra-se na Figura 4.13, e os utilizando a lipase imobilizada *Eversa® Transform 2.0*, na Figura 4.14.

Figura 4.13- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 6:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de *Eversa® Transform* imobilizada em *Sepabeads-C18*, a 40° com agitação de 150 rpm.



Na Figura 4.13, temos a produção de ésteres metílicos com a *Eversa® Transform*, onde com a razão molar metanol/óleo de 6:1 teve o conteúdo máximo de ésteres em 6 horas (97,6%), já com a razão molar de 4:1, o maior conteúdo de ésteres metílicos se deu em 0,5 horas de reação (97,1%).

Figura 4.14- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 6:1 e 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, a 40 °C com agitação de 150 rpm.



Na Figura 4.14, utilizando a lipase *Eversa® Transform 2.0* como biocatalisador, com a razão molar metanol/óleo de 6:1 altos conteúdos de ésteres (97,9%) foram encontrados em 1 hora de reação, e na razão molar de 4:1, os mesmos valores foram encontrados em 0,5 h (98%).

Demonstrando que a quantidade de metanol na reação tem grande efeito na formação de ésteres metílicos principalmente sobre a lipase imobilizada *Eversa® Transform*, que teve as velocidades iniciais da cinética de $0,766 \text{ min}^{-1}$ (RM 6:1) e $4,28 \text{ min}^{-1}$ (RM 4:1), enquanto para lipase imobilizada *Eversa® Transform 2.0* de $2,6 \text{ min}^{-1}$ (RM 6:1) e de $4,96 \text{ min}^{-1}$ (RM 4:1). Ao compararmos o desempenho das lipases *Eversa® Transform* com a *Eversa® Transform 2.0*, observamos que a *Eversa® Transform 2.0* tem velocidade de formação de ésteres maiores,

tanto com o substrato álcool etílico quanto álcool metílico, indicado que essa tem maior poder catalítico em relação à *Eversa® Transform*.

Em comparação ao tempo de reação na produção de ésteres com álcool etílico e metílico, a mais rápida foi quando se utilizaram álcool metílico, o que pode ter ocorrido pelo fato do metanol ser uma molécula de massa molar menor (32,04 g/mol) em comparação ao etanol (46,06 g/mol), o que poderia facilitar seu transporte por meio dos poros da matrix de imobilização *Sepabeads-C18*, acelerando assim a reação. Com isso, foram definidas como as melhores condições de reação na produção de ésteres metílicos, a razão molar metanol/óleo de girassol de 4:1 para ambas as lipases, no tempo de 1 hora.

E para as reações com etanol, levando em conta a economia de processo como critério de seleção das melhores condições, no caso da lipase *Eversa® Transform*, e o menor tempo de reação para o caso da lipase *Eversa® Transform 2.0*, o emprego da razão molar 4:1 etanol/óleo de girassol é a melhor opção nas reações de produção de ésteres etílico em meio com solvente orgânico utilizando a *Eversa® Transform* em 6 horas de reação ou *Eversa® Transform 2.0* em 3 horas de reação.

Moreno-Perez et al. (2013) realizaram a transesterificação de triacilgliceróis com ácido ascórbico e alcançaram conversão de 70% de ascorbil oleato em 3 h a 45 °C, meio anidro utilizando o solvente orgânico álcool terc-amílico, com 0,1g de lipase de *Candida antarctica* B adsorvido em suportes hidrofóbicos modificados com PEI. Lima et al. (2013), imobilizaram uma lipase solúvel de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes suportes hidrofóbicos, sendo a matrix *Seapabeads-C18*, com rendimento de 95% de imobilização, a que apresentou melhor produção em oleato de benzila (85%), utilizando azeite de oliva e álcool benzílico em sistema com o solvente orgânico álcool terc-amílico.

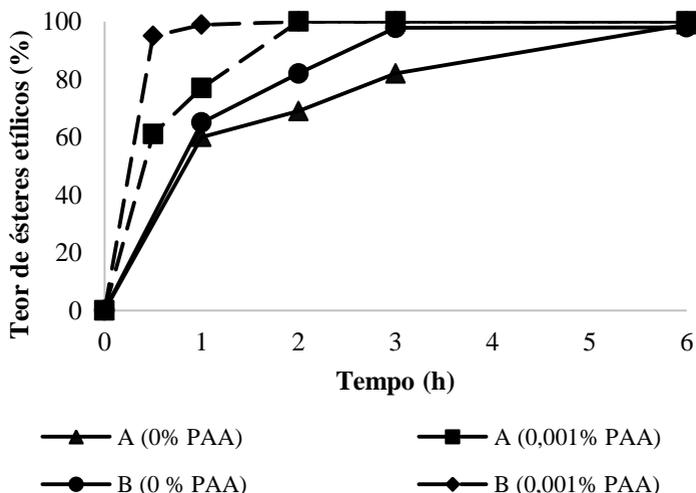
4.3.2.2 Produção de ésteres utilizando as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas *Sepabeads-C18* revestidos com 0,001% de PAA

Buscando uma ferramenta para melhorar os catalisadores imobilizados estudados, através do aumento de sua atividade catalítica e de sua estabilidade operacional, investigou-se uma estratégia de modificação físico-química pós-imobilização dos catalisadores, com uso

combinado dos polímeros iônicos, polietilenoimina (PEI) e ácido poliacrílico (PAA).

Em testes preliminares, utilizaram-se concentrações distintas de PAA desde 0,001% até 0,01 %, obtendo os melhores resultados com 0,001% de PAA. Com isso, foi investigado o uso de 0,001% de PAA para o recobrimento das lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18*, em reações de produção de ésteres etílicos e metílicos, para verificação de seu desempenho em reações de transesterificação. As condições reacionais foram: 0,3 g de enzima imobilizada com 0% de PAA ou 0,001% de PAA, 4,1 ml de hexano, 0,2 g de peneira molecular, razão molar álcool/óleo de 4:1, incubado a 40 °C e agitação de 150 rpm. Na Figura 4.15, estão os resultados da síntese de ésteres etílicos com ambas as lipases, com e sem PAA.

Figura 4.15- Produção de ésteres etílicos utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de *Eversa® Transform* (A) ou *Eversa® Transform 2.0* (B) imobilizadas em *Sepabeads-C18* com 0 ou 0,001% PAA, a 40 °C e agitação de 150 rpm.

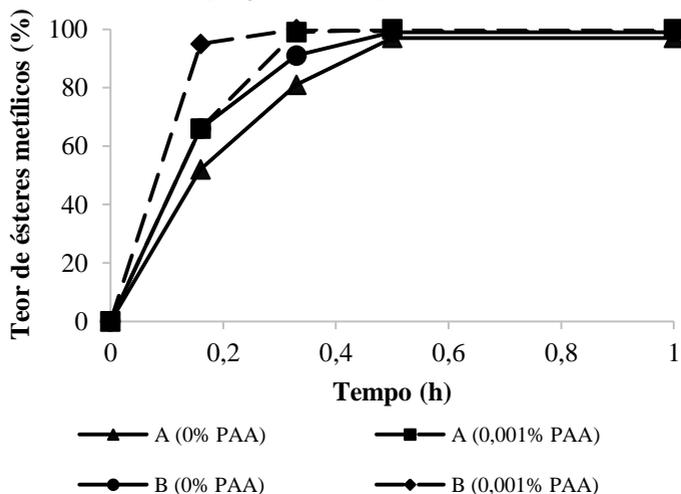


Avaliando a produção de ésteres etílicos com os imobilizados modificados com PAA, estes apresentaram altos teores de ésteres etílicos (98,1%) em 2 horas de reação para a lipase imobilizada *Eversa® Transform* e em 1 hora de reação (95%) para a lipase imobilizada *Eversa® Transform 2.0*, ou seja, a transesterificação do óleo de girassol

foi mais rápida, em razão de que nas enzimas imobilizadas sem revestimento esses teores somente foram encontrados no tempo reacional de 6 horas (*Eversa® Transform*) e 3 horas (*Eversa® Transform 2.0*). A velocidade inicial subiu de $0,68 \text{ min}^{-1}$ para $1,43 \text{ min}^{-1}$ nas reações com *Eversa® Transform*, ou seja, a velocidade inicial foi duas vezes mais rápida nas enzimas imobilizadas com PAA.

No entanto, com a *Eversa® Transform 2.0*, não foi possível calcular a velocidade inicial, pois a formação de ésteres foi muito rápida em um curto espaço de tempo, todavia, como a produção de ésteres etílicos nos imobilizados com PAA ocorreu em apenas 1/3 do tempo da produção com os derivados sem PAA, podemos afirmar que o PAA triplicou a velocidade inicial de formação de ésteres etílicos. Comparando o desempenho das lipases nas sínteses de ésteres etílicos, mais uma vez a *Eversa® Transform 2.0* se sobressaiu, pois teve maior produção de ésteres em um menor tempo de reação, em comparação à síntese utilizando a lipase *Eversa® Transform*. Na Figura 4.16, constam os resultados para a produção de ésteres metílicos com os derivados de *Sepabeads-C18* com 0% e 0,001% de PAA.

Figura 4.16- Produção de ésteres metílicos utilizando a razão molar metanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de *Eversa® Transform* (A) ou *Eversa® Transform 2.0* (B) imobilizada em *Sepabeads-C18* com 0 ou 0,001% PAA, a 40°C e agitação de 150 rpm.



Na Figura 4.16, apresenta-se a produção de ésteres metílicos, onde observamos que os imobilizados revestidos com 0,001% de PAA também tiveram altas conversões de ésteres metílicos em menor tempo, 0,33 h para a *Eversa® Transform* (99%) e 0,16 h para *Eversa® Transform 2.0* (95,3%). Foi comprovado que o PAA no revestimento dos derivados acelera a transesterificação de ésteres metílicos assim como nos etílicos. Os polímeros iônicos PEI e PAA são altamente hidrofílicos, e, na modificação físico-química das enzimas, esses promovem a formação de um fino revestimento hiperhidrófilo na superfície enzimática (MORENO-PEREZ et al., 2016). A partir desse entorno hidrófilo, formado pode ocorrer maior atração da lipase por alcoóis, com maior acesso ao substrato favorecendo a formação dos produtos de interesse, aumentando a velocidade de reação.

Uma vez comprovado que a modificação dos catalizadores com PAA nos permite aumentar a atividade catalítica das lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18* na síntese de ésteres etílicos e metílicos, e pensando na implantação deste tipo de processo em escala industrial, estudamos a estabilidade operacional destes catalizadores modificados. Para isto, analisamos como os imobilizados revestidos atuam frente à estabilidade aos substratos da reação de transesterificação: óleo de girassol, etanol e metanol. Para o estudo da estabilidade foi pesado 0,3 g de lipase imobilizada revestida com 0,001% de PAA ou não revestida com PAA (0% PAA) e incubados a 40 °C com 4,1 mL de hexano mais o substrato de inativação, óleo de girassol/ álcool etílico/álcool metílico, após o tempo de incubação com o inativante, os demais substratos foram adicionados e a reação de transesterificação iniciada. Os resultados quanto à estabilidade das lipases com óleo de girassol encontram-se na Figura 4.17, com álcool etílico na Figura 4.18 e ao álcool metílico na Figura 4.19.

Figura 4.17- Estabilidade a óleo de girassol com as lipases *Eversa® Transform* (A) e *Eversa® Transform 2.0* (B) imobilizadas em *Sepabeads-C18* com 0 ou 0,001% de PAA, utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano e 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm.

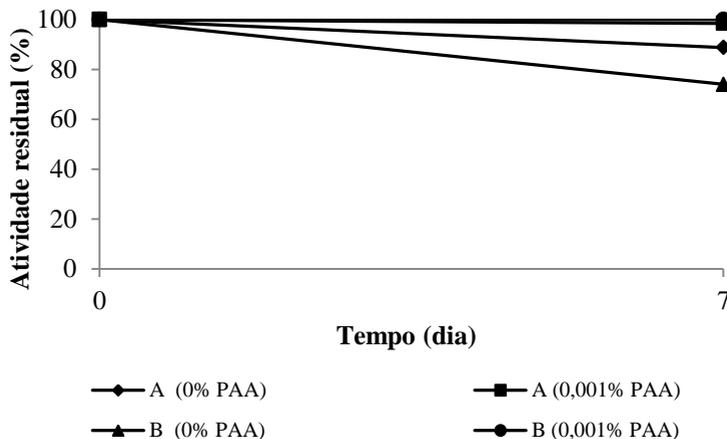


Figura 4.18- Estabilidade a álcool etílico com as lipases *Eversa® Transform* (A) e *Eversa® Transform 2.0* (B) imobilizadas em *Sepabeads-C18* com 0 ou 0,001% de PAA, utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm.

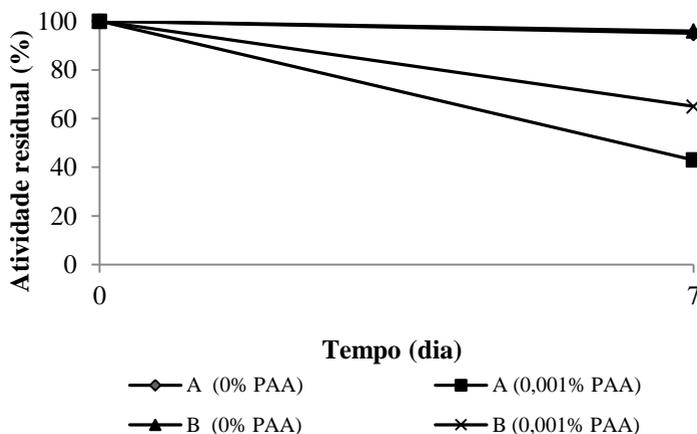
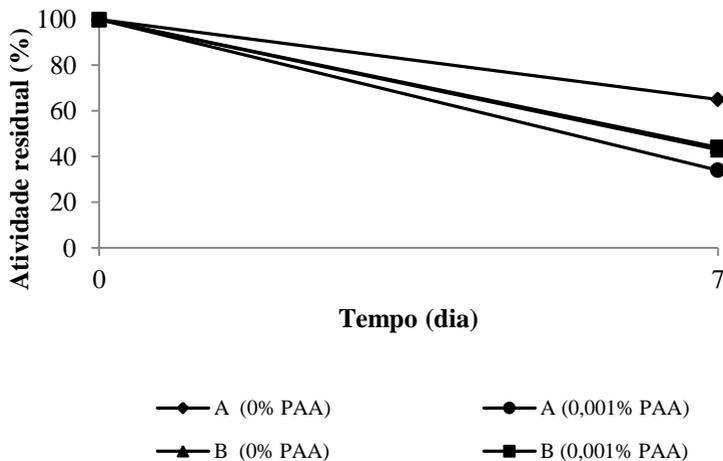


Figura 4.19- Estabilidade a álcool metílico com as lipases *Eversa*® *Transform* (A) e *Eversa*® *Transform 2.0* (B) imobilizadas em *Sepabeads-C18* com 0 ou 0,001% de PAA, utilizando a razão molar metanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm.



Na Figura 4.17, quanto à estabilidade a óleo de girassol, as lipases imobilizadas revestidas com PAA foram as que obtiveram os melhores resultados, com 100% da atividade residual, as demais não modificadas apresentaram queda da atividade residual, a lipase *Eversa*® *Transform* com queda de cerca de 10% e a *Eversa*® *Transform 2.0* com queda de cerca de 20%. Na Figura 4.18, referente à estabilidade com etanol, os resultados com as lipases revestidas com PAA apresentaram perda na atividade residual, sendo de 40% para a *Eversa*® *Transform* e de 60% de perda para a *Eversa*® *Transform 2.0*, já as lipases sem revestimento (0% PAA) obtiveram 100% da atividade residual.

Madalozzo et al. (2014) investigaram a estabilidade da lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Accurel MP 1000, em solvente orgânico e temperatura de 40 °C, após 24 horas de incubação com hexano, a lipase apresentou a atividade residual de 69%, em relação a sua atividade inicial, porém, em incubação com etanol em apenas 90 min a 40 °C a enzima já apresentava somente 10% da atividade residual.

Na estabilidade ao álcool metílico, por sua vez (Figura 4.19) nenhuma lipase teve 100% da atividade residual, sendo ela modificada ou não. As enzimas *Eversa*® *Transform* com 0,001% de PAA obtiveram

queda de cerca de 65% da atividade residual, enquanto a mesma sem o revestimento teve queda de 35%, ou seja, menor; para *Eversa® Transform 2.0* revestida com 0,001% de PAA e também na lipase sem o revestimento (0%) de PAA, houve queda de cerca de 55% em relação à atividade inicial da lipase.

Os resultados quanto à estabilidade aos substratos demonstraram a fragilidade das lipases ao metanol, o que já havia sido discutido no capítulo 2 quando se investigou a produção de ésteres com a lipase *Eversa® Transform* livre utilizando etanol e metanol como substratos. Também, o revestimento com PAA não se mostrou eficiente frente à estabilidade aos substratos etanol e metanol, resultando em grandes quedas na atividade residual das lipases.

Segundo Riccardi et al. (2016), polímeros altamente hidrofílicos, tais como o PAA, aumentam a estabilidade da enzima, impedindo as distorções da mesma, possivelmente por impedir a exposição dos grupos hidrofóbicos no interior da enzima, bem como reduzindo a entropia conformacional do polipeptídeo. Como o uso revestimento com PAA neste estudo não resultou na melhora na estabilidade das lipases imobilizadas, acredita-se que assim como o caráter hidrofílico dado às lipases por meio do uso de recobrimento com PAA acelera as reações de produção de ésteres, dado que este facilita a entrada dos substratos etanol e metanol, o PAA também acaba por aumentar a exposição destas lipases a estes solventes, visto que elas são muito sensíveis, assim o PAA permite que a ação do etanol/metanol seja mais severa, afetando assim as lipases e sua estabilidade.

O recobrimento com PAA é uma boa alternativa pra melhorar a reação de transesterificação, pois esse atuou aumentando a velocidade de formação dos ésteres e diminuindo o tempo reacional de produção, porém não apresentou as mesmas vantagens para a estabilidade das lipases imobilizadas neste sistema, por isso esta técnica deveria ser melhor explorada, pois com a aplicação de outros polímeros ou diferentes concentrações desses, poderíamos encontrar o polímero ideal onde é possível obter alta atividade lipolítica aliada à maior estabilidade das enzimas, evitando assim sua inativação. Com isso, optou-se por seguir para a próxima etapa deste estudo avaliando os ciclos de uso das lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18* na transesterificação de óleo de girassol com solvente orgânico, com as lipases não revestidas com PAA (0% PAA).

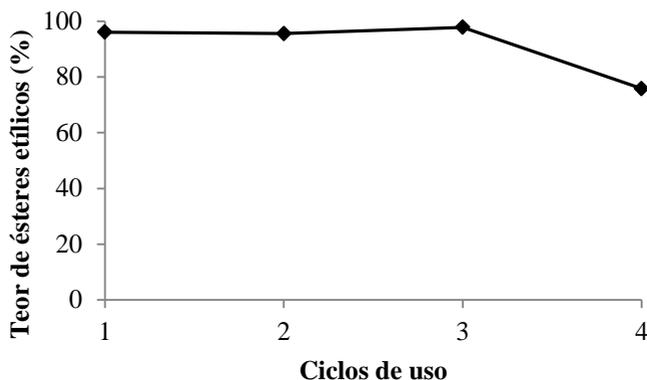
4.3.2.2.2 Avaliação dos ciclos de uso utilizando a lipase imobilizada em *Sepabeads-C18 Eversa® Transform 2.0* na produção de ésteres etílicos

Baseado no desempenho das lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18* para a produção de ésteres etílicos e metílicos e na estabilidade dessas aos seus substratos, observou-se que ambas as lipases apresentaram melhor estabilidade ao etanol de que ao metanol, e que nas reações para a produção de ésteres etílicos a lipase *Eversa® Transform 2.0* teve destaque por sua maior atividade e menor tempo de reação, em comparação com os resultados com a lipase *Eversa® Transform*. A lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18* foi selecionada para o estudo dos ciclos de uso em reações de transesterificação de óleo de girassol, utilizando como substrato o álcool etílico em meio com solvente orgânico.

As condições reacionais adotadas para o reuso foram: 0,3 g de lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, razão molar etanol/óleo de girassol de 4:1 e 0,2 g de peneira molecular em 3 horas de reação. Os resultados dos ciclos de uso da lipase *Eversa® Transform 2.0* estão apresentados na Figura 4.20.

Na Figura 4.20, é possível verificar que a lipase *Eversa® Transform 2.0* manteve alto teor de ésteres (>97%) por 3 ciclos de uso, caindo para 75% no quarto ciclo de uso, esses valores são considerados bons, porém, a investigação de novas estratégias para a melhorar a estabilidade operacional desta lipase imobilizada poderia resultar em mais ciclos de uso, prolongando sua aplicação em reações de síntese de ésteres etílicos de ácido graxo. Também, o estudo da imobilização desta lipase em outros suportes hidrofóbicos que apresentem maior diâmetro de poro poderia evitar problemas como entupimento do suporte, que é muito comum principalmente em reações que contém glicerol, e acarreta a redução dos ciclos de uso de lipases imobilizadas.

Figura 4.20- Ciclos de uso da lipase *Eversa*® *Transform* 2.0 imobilizada em *Sepabeads-C18*, utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1, 4,1 mL de hexano, 0,3 g de lipases imobilizadas, a 40 °C e agitação de 150 rpm.



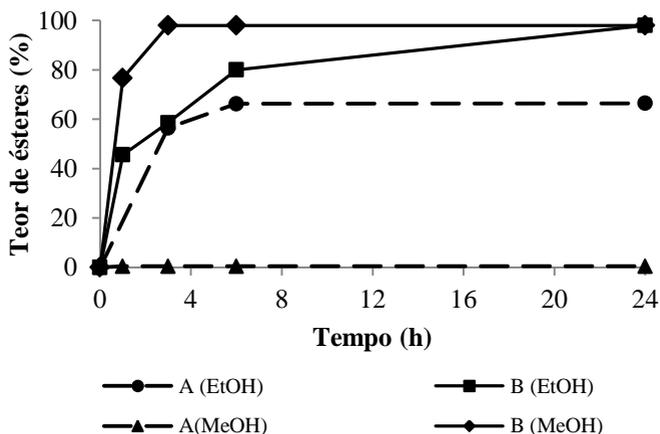
4.3.3 Síntese de ésteres a partir das lipases *Eversa*® *Transform* e *Eversa*® *Transform* 2.0 em meio livre solvente orgânico

Buscando a complementação dos estudos do comportamento das lipases *Eversa*® *Transform* e *Eversa*® *Transform* 2.0 nas reações de transesterificação de óleo de girassol em meio anidro, realizaram-se as sínteses de ésteres etílicos e metílicos em meio livre de solvente orgânico. Para isto, foram utilizadas as enzimas imobilizadas em *Sepabeads-C18*, as quais obtiveram destaque na primeira etapa deste capítulo referente à produção de ésteres em meio com solvente orgânico. As sínteses foram realizadas primeiramente com os substratos óleo de girassol, álcool etílico e álcool metílico, com o objetivo de conhecer o efeito dos distintos alcoóis na formação de ésteres, bem como o comportamento das lipases *Eversa*® *Transform* e *Eversa*® *Transform* 2.0 mediante as reações livres de solventes orgânicos. As condições reacionais foram: 0,5 g de lipase imobilizada, 0,2 g peneira molecular, álcool/óleo de girassol nas razões molares de 4:1 para o etanol e 5,4:1 para o metanol. Os resultados destes primeiros ensaios podem ser observados na Figura 4.21.

Na Figura 4.21, observamos o comportamento das lipases nos meios de reação, onde a enzima *Eversa*® *Transform* apresentou menores rendimentos tanto em ésteres metílicos (0,5%) quanto em

ésteres etílicos (66,5%) em comparação com a enzima *Eversa® Transform 2.0*, que por sua vez produziu altos conteúdos de ésteres etílicos e metílicos (>98%) demonstrando sua melhor adaptação às condições reacionais. Como já observado, em reações com solvente orgânico e no estudo da estabilidade em metanol, a *Eversa® Transform* é muito afetada pela presença de metanol, ocasionando menor formação de produto de interesse na presença deste. Neste caso em particular, não houve formação significativa de ésteres metílicos utilizando a lipase imobilizada *Eversa® Transform*, provavelmente ocorreu à desnaturação da enzima pelo excesso de metanol oferecido neste ensaio.

Figura 4.21- Efeito dos diferentes alcoóis para a produção de ésteres utilizando 0,5 g de lipase *Eversa Transform* (A) ou *Eversa Transform 2.0* (B), álcool/óleo de girassol nas razões molares de 4:1 para etanol e de 5,4:1 para metanol, a 40 °C e agitação de 150 rpm.



Os valores baixos de formação encontrados na produção de ésteres etílicos e metílicos da lipase *Eversa® Transform* (Figura 4.21) frente aos altos valores encontrados com a outra lipase, nas mesmas condições, um fato a ser observado baseado nas demais reações estudadas neste capítulo, é que a velocidade inicial da lipase *Eversa® Transform 2.0* em geral é maior, podendo gerar maior conteúdo de produto por sua rápida velocidade de formação de ésteres e não necessariamente por sua maior tolerância ao etanol ou ao metanol, uma vez que no estudo quanto à estabilidade ao etanol, os resultados foram

semelhantes para ambas as lipases e, no estudo da estabilidade ao metanol, o desempenho da lipase *Eversa® Transform 2.0* é pior em comparação ao da lipase *Eversa® Transform*.

Com relação ao comportamento da *Eversa® Transform 2.0*, quando comparada a síntese de ésteres etílicos com a de ésteres metílicos altos teores de ésteres metílicos são encontrados em 3 horas (97,5%), enquanto resultados semelhantes somente ocorrem em 24 horas com ésteres etílicos, ou seja, a reação com metanol como substrato é mais rápida, o que também foi observado nas reações de transesterificação em solvente orgânico, anteriormente estudadas. A partir destes resultados, investigou-se o efeito de diferentes razões molares dos substratos, óleo com etanol/metanol nas reações de transesterificação livres de solvente orgânico.

4.3.3.2 Efeito de diferentes razões molares dos substratos álcool:óleo de girassol na produção de ésteres etílicos e metílicos

Com o intuito de investigar a influência do álcool etílico e do álcool metílico nas reações de transesterificação de óleo de girassol e seu efeito mediante a diferentes concentrações no meio, foram realizadas cinéticas com diferentes razões molares álcool/óleo. Nesta etapa, todos os ensaios contaram com: 0,5 g de lipase imobilizada e 0,2 g peneira molecular, incubados a 40 °C e agitação de 150 rpm. Nos ensaios utilizando álcool etílico, as razões molares estudadas etanol/óleo foram de 4:1 e 3,25:1 e, nas utilizando álcool metílico, foram metanol/óleo de 11,5:1, 5,4:1 e 3,25:1. O efeito da razão molar utilizando álcool etílico e a lipase *Eversa® Transform* encontram-se na Figura 4.22, e os utilizando *Eversa® Transform 2.0* como catalisador, na Figura 4.23.

Figura 4.22- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 4:1 e 3,25:1 e 0,5 g de *Eversa® Transform* imobilizada em *Sepabeads-C18*, a 40 °C e agitação de 150 rpm.

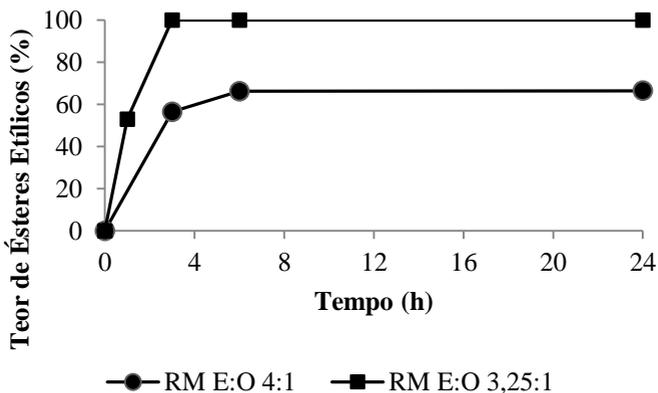
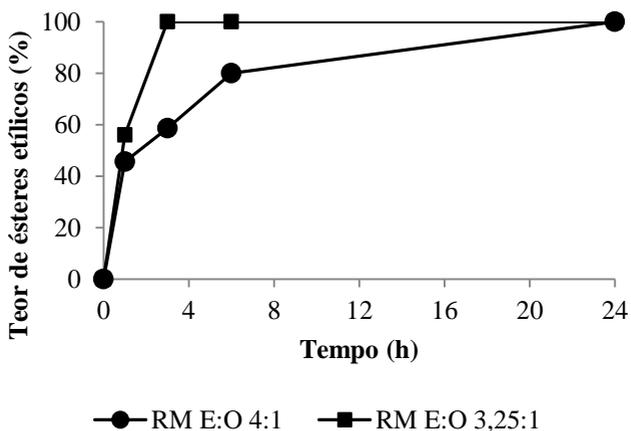


Figura 4.23- Efeito da razão molar etanol/óleo de girassol na síntese de ésteres etílicos utilizando as razões molares etanol/óleo de 4:1 e 3,25:1 e 0,5 g de *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, em 40 °C e agitação de 150 rpm.



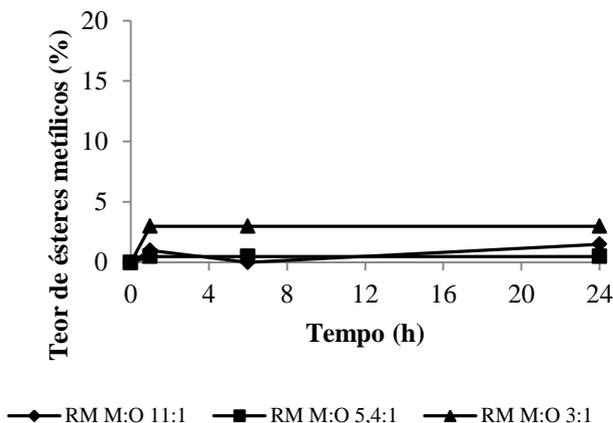
Na Figura 4.22, em relação à produção de ésteres etílicos, observamos que ao diminuir a razão molar etanol/óleo de 4:1 para 3,25:1, a lipase em apenas 3 horas de reação alcançou alto teor de ésteres (98%). Na Figura 4.23, a diminuição da razão molar etanol/óleo

de 4:1 para 3,25:1 igualmente trouxe benefícios, uma vez que a *Eversa® Transform 2.0* alcançou altos conteúdos de ésteres (>98%) em menor tempo de reação, 3 horas (RM 3,25:1), necessitando de 24 horas para alcançar o mesmo conteúdo utilizando a razão molar etanol/óleo de 4:1.

Para o estudo do efeito do metanol nas reações de transesterificação com ambas as lipases, como a lipase *Eversa® Transform* não havia apresentado bom desempenho frente a este álcool no ensaio anterior, em que utilizou-se a razão molar 5,4:1 metanol/óleo, estabelecemos o uso de razões molares acima desse valor (RM 11:1) e abaixo dele (R:M 3:1), proporcionando à lipase uma faixa maior de atuação para a avaliação de seu desempenho.

Nas Figuras 4.24 e 4.25, podem ser observados os resultados utilizando como substrato álcool metílico e óleo de girassol, com as enzimas *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*, respectivamente.

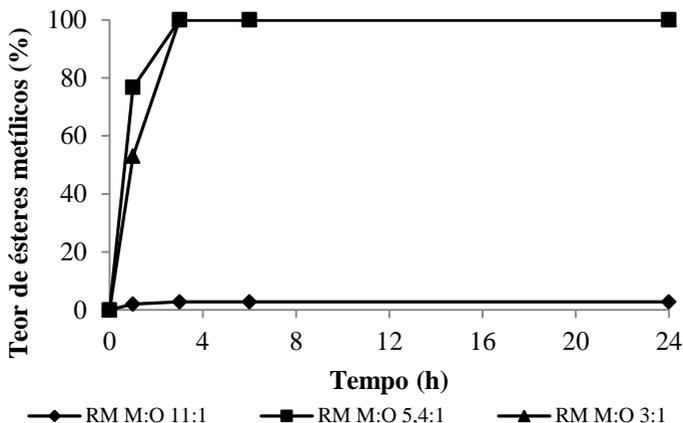
Figura 4.24- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 11:1, 5,4:1 e 3:1, 0,5 g de *Eversa® Transform* imobilizada em *Sepabeads-C18*, a 40 °C e agitação de 150 rpm.



Na Figura 4.24, quanto ao desempenho da lipase *Eversa® Transform*, verificamos que tanto em maior razão molar quanto em menor, a lipase *Eversa® Transform* não apresenta valores relevantes de produção ésteres metílicos (<1% EM), ou seja, em reações de

transesterificação livre de solvente e na presença de metanol, a lipase *Eversa® Transform* não foi capaz de desenvolver seu poder catalítico, provavelmente pela desnaturação desta no sistema adotado.

Figura 4.25- Efeito da razão molar metanol/óleo de girassol na síntese de ésteres metílicos utilizando as razões molares metanol/óleo de 11:1, 5,4:1 e 3:1, 0,5 g de *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, a 40 °C e agitação de 150 rpm.



Já na Figura 4.25, referente à lipase *Eversa® Transform 2.0* na maior razão molar (11,5:1), a enzima não apresentou bom desempenho, não produzindo valores relevantes de ésteres metílicos (<2%). No entanto, com as razões molares metanol/óleo 5,4:1 e 3:1 e no tempo reacional de 3 horas, atingiu altos conteúdos de ésteres (>98%), bons resultados em curto tempo reacional.

A partir dos resultados desta etapa do trabalho, foram definidas como as melhores condições de reação, para a transesterificação de óleo de girassol em meio livre de solvente para a produção de ésteres etílicos, na razão molar etanol/óleo de girassol de 3,25:1 em 3 horas de reação para ambas as lipases imobilizadas em *Sepabeads-C18*. E, para as reações para produção de ésteres metílicos, a melhor condição foi utilizando a lipase imobilizada em *Sepabeads-C18 Eversa® Transform 2.0* com a razão molar metanol/óleo de girassol de 3:1 no tempo reacional de 3 horas, todos incubados a 40 °C e 150 rpm de agitação.

Chiaradia et al. (2016) obtiveram 85% de etil oleato utilizando a razão molar etanol/óleo de 3:1, 7% de lipase de *Candida Antarctica B*

imobilizadas em nanopartículas magnéticas de poli(uréia-uretano) à 50 °C e agitação de 150 rpm durante 4 h. Ferrero et al. (2016) avaliaram a produção de ésteres etílicos a partir de óleo de fritura usado e etanol, utilizando a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suportes mesoporosos SBA-15 modificados, em sistema batelada, utilizando as condições, 4% de água, razão molar óleo/etanol de 1:4, 0,4 g de enzima imobilizada, a 37 °C e agitação de 180 rpm, onde, após 24 horas de reação, obtiveram um rendimento de 90% de FAEE. Ognjanovc et al. (2009) investigaram a utilização da lipase imobilizada comercial Novozyme 435 para síntese biodiesel a partir de óleo de girassol, onde as condições ótimas para a transesterificação foram: 45 °C, 3% de enzima, razão molar metanol/óleo de 3:1 onde obtiveram conversão de 99% de FAME após 50 h de reação.

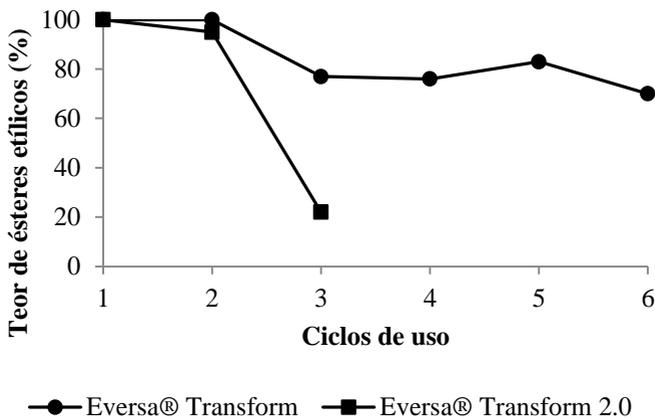
Como discutido em estudo anterior, estabilidade aos substratos em meio com solvente orgânico, as lipases imobilizadas *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* são mais estáveis ao etanol quando comparado ao metanol. Aliadas ao bom desempenho de ambas as lipases imobilizadas nas reações de produção de ésteres etílicos, estas foram selecionadas para o estudo dos ciclos de uso em reações de transesterificação utilizando óleo de girassol e álcool etílico, em sistema livre de solvente orgânico.

4.3.3.3 Avaliação dos ciclos de uso utilizando a lipase imobilizada *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* na produção de ésteres etílicos em meio livre de solvente orgânico

Para a avaliação dos ciclos de uso em reações de transesterificação livre de solvente orgânico, foram empregadas, com base nos resultados obtidos no estudo anterior, as seguintes condições reacionais: 0,5 g de lipase imobilizada *Eversa® Transform/Eversa® Transform 2.0*, 0,2 g de peneira molecular, razão molar etanol/óleo de girassol de 3,25:1, 40 °C e 150 rpm de agitação em 3 horas de reação. Os resultados para ambas as lipases no reuso para a produção de ésteres etílicos em meio livre de solvente podem ser observados na Figura 4.26.

Figura 4.26- **Avaliação dos ciclos de uso das lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0* na síntese de ésteres etílicos utilizando 0,5 g de lipase**

imobilizada, razão molar etanol/óleo de girassol de 3,25:1, 40 °C, 150 rpm de agitação em 3 horas de reação.



Podemos observar, pelo exposto na Figura 4.26, que a lipase imobilizada *Eversa® Transform* manteve o teor de ésteres alto (>98%) por 2 ciclos, após, este se manteve em torno de 75% por mais 3 ciclos (ciclos 3, 4 e 5), apresentando queda no ciclo 6 de utilização para 70% de ésteres etílicos. Já a lipase *Eversa® Transform 2.0* conseguiu manter alto teor de ésteres no primeiro (98%) e segundo (95%) ciclos, porém, no terceiro apresentou menos de 20% de ésteres etílicos, valor muito abaixo do esperado nos primeiros ciclos. Assim, o estudo de seus ciclos de uso foi interrompido.

A partir desses resultados, fica evidente que apesar da alta velocidade catalítica apresentada pela lipase *Eversa® Transform 2.0* (*Eversa® Transform 2.0*) ao longo do estudo em reações em meio livre de solvente orgânico, a lipase *Eversa® Transform* (*Eversa® Transform*) é a que apresenta melhor desempenho nas reações de transesterificação de óleo de girassol com álcool etílico, pois, além de apresentar alta produção de ésteres etílicos (>98%) e excelente tempo de reação para produção dos compostos de interesse (3 horas), essa também apresenta a possibilidade de reuso da lipases por até 5 ciclos com valores relevantes de ésteres etílicos.

Assim como sugerido no reuso em meio com solvente orgânico, a investigação de novas estratégias em busca da melhora da estabilidade operacional das lipases imobilizadas poderia resultar em mais ciclos de uso, prolongando sua aplicação em reações de síntese de ésteres etílicos de ácido graxo. Assim como o estudo da imobilização destas lipases em

outros suportes hidrofóbicos que tenham maior diâmetro de poro, podendo evitar problemas como entupimento do suporte, que é muito comum principalmente em reações que contém glicerol, e acarreta a redução dos ciclos de uso de uma lipase imobilizada.

4.5 Considerações Finais

Em vista dos resultados obtidos neste capítulo, onde buscou-se a imobilização das lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0* em diferentes suportes hidrofóbicos (*Sepabeads-C18*, *Lewatit 1600*, *Purolite-C18*, *Purolite Divinyl*) para estudo da produção de ésteres metílicos e etílicos de ácido graxo a partir de óleo de girassol alto oleico, em sistema com e livre de solvente orgânico. O suporte hidrofóbico *Sepabeads-C18*, empregado na imobilização das lipases solúveis *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*, se destacou frente aos demais suportes hidrofóbicos estudados, por produzir lipases imobilizadas com alta estabilidade operacional e alta atividade catalítica em reações de síntese de ésteres etílicos a partir de óleo de girassol em meio com solvente orgânico.

Em busca da maximização da produção de ésteres etílicos e metílicos nas reações de transesterificação de óleo de girassol em meio com solvente orgânico, as melhores condições experimentais (>98% de ésteres) para ambos os substratos e lipases foram: 0,3 g de lipase imobilizada em *Sepabeads-C18* (não modificado com PEI e PAA), razão molar álcool/óleo de girassol de 4:1, 4,1 ml de hexano e 0,2 g peneira molecular, incubados a 40 °C e agitação de 150 rpm, com o tempo reacional de 6 horas para a produção de ésteres etílicos com *Eversa® Transform*, de 3 horas para a produção de ésteres etílicos com a *Eversa® Transform 2.0*, e de 1 hora para a síntese de ésteres metílicos com ambas as lipases imobilizadas.

Devido à lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18* apresentar alta estabilidade ao etanol, alto poder catalítico e alta produção de ésteres etílicos em menor tempo de reação, foi eleita para o estudo da possibilidade de reuso em reações de transesterificação de óleo de girassol em meio com solvente orgânico. No qual foi possível sua utilização em 4 ciclos de uso, mantendo sua produção de ésteres etílicos alta, contribuindo para a viabilidade da aplicação da lipase em bioprocessos.

No estudo da síntese de ésteres em meio livre de solvente orgânico, as melhores condições reacionais para a produção de ésteres etílicos (>98%) foram: 0,5 g de lipase *Eversa® Transform* ou *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, 0,2 g de peneira molecular e razão molar etanol/óleo de girassol de 3,25:1, a 40 °C e 150 rpm de agitação em 3 horas de reação. Já para a produção de ésteres metílicos, a melhor condição (>98% EM) foi: 0,5 g de lipase imobilizada *Eversa® Transform 2.0*, 0,2 g de peneira molecular, razão molar etanol/óleo de girassol de 3:1, a 40 °C e 150 rpm de agitação em 3 horas de reação.

O estudo dos ciclos de uso das lipases em meio livre de solvente orgânico também foi realizando com álcool etílico, visto que as lipases foram mais estáveis à presença desse, onde constatou-se que apesar da alta velocidade catalítica apresentada pela lipase *Eversa® Transform 2.0* ao longo do estudo em reações em meio livre de solvente orgânico, a lipase *Eversa® Transform* é a que apresenta melhor desempenho nas reações de transesterificação de óleo de girassol com álcool etílico em meio livre de solvente orgânico, pois, além de apresentar alta produção de ésteres etílicos (>98%) e excelente tempo de reação para produção dos compostos de interesse (3 horas), essa também apresenta a possibilidade de reuso da lipases por até 5 ciclos com valores relevantes de ésteres etílicos.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível a obtenção de altos teores de ésteres de ácidos graxos, utilizando como biocatalisador as lipases *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0* em suas formas livres e imobilizadas, a partir de diferentes matérias-primas, em modo batelada alimentada em escala laboratorial e em escala piloto industrial. Primeiramente, foi realizado o estudo utilizando a lipase solúvel *Eversa*[®] *Transform* para a produção de ésteres metílicos utilizando os diferentes substratos óleo de soja, óleo de soja com altos teores de ácido oleico (obtidos por meio da adição de 25%, 50% e 75% de ácido oleico), óleo de macaúba, óleo de fritura e óleo ácido residual, no qual o óleo ácido residual teve destaque, por ser uma matéria-prima de baixo custo, ampla disponibilidade, excelente desempenho em reações de síntese, tanto de ésteres metílicos como de ésteres etílicos, curto tempo reacional, além de apresentar possibilidade de reuso da lipase estudada por até 4 ciclos na produção de ésteres etílicos a partir dessa matéria-prima.

Com as condições reacionais definidas em laboratório, as matérias-primas de reuso, óleo ácido residual e gordura ácida residual, juntamente com o álcool metílico, foram aplicados para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos em escala piloto de 1 t utilizando a lipase *Eversa*[®] *Transform* e *Eversa*[®] *Transform 2.0*, onde observamos a alta versatilidade das lipases mediante o escalonamento do processo, demonstrando que é possível a reprodução dos resultados encontrados em laboratório para a escala industrial.

Na imobilização das lipases solúveis *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0*, o suporte hidrofóbico *Sepabeads-C18* apresentou alta estabilidade operacional e alta atividade catalítica dos derivados produzidos, assim apresentou potencial para a aplicação em reações de síntese de ésteres etílicos a partir de óleo de girassol em meio com e livre de solvente orgânico.

Nas reações de transesterificação de óleo de girassol em meio com solvente orgânico, foi possível a maximização dos resultados para produção tanto de ésteres etílicos quanto de ésteres metílicos com ambas as lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18*. No qual a aplicação da lipase *Eversa Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18* foi relevante devido à alta estabilidade ao etanol, alto poder catalítico e alta produção de ésteres etílicos

(>98%), em menor tempo de reação, e à possibilidade de utilização da lipase por até 4 ciclos de uso, mantendo sua alta produção de ésteres etílicos, contribuindo para a viabilidade da aplicação da lipase em bioprocessos.

Em relação à síntese de ésteres em meio livre de solvente orgânico catalisadas pelas lipases *Eversa transform* e *Eversa Transform 2.0* imobilizada em *Sepabeads-C18*, concluímos que, apesar da alta velocidade catalítica apresentada pela *Eversa® Transform 2.0* nestas reações, a lipase *Eversa® Transform* apresentou melhor desempenho nas reações de transesterificação de óleo de girassol com álcool etílico, pois, além de apresentar alta produção de ésteres etílicos (>98%) e excelente tempo de reação para produção dos compostos de interesse, essa também apresentou a possibilidade de reuso da lipase por até 5 ciclos, com valores relevantes de ésteres etílicos.

A partir dos resultados obtidos ao longo deste trabalho, referente aos altos teores de ésteres produzidos a partir das diferentes matérias-primas estudadas nos diferentes sistemas reacionais, as condições brandas exigidas em ambos os processos, a ampla gama de aplicação das enzimas aqui estudadas, a possibilidade de reuso enzimático com as lipases em suas formas livres ou imobilizadas, a baixa concentração necessária de lipases para uso nas distintas reações, o tempo curto de reação, aos excelentes resultados encontrados no escalonamento do processo (planta piloto), ao sistema simples requerido para a síntese de ésteres, aliados ao baixo custo da enzima (em torno de 20 USD/kg), demonstram que os catalisadores lipase *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* são potenciais no uso em reações de produção de ésteres de ácidos graxos utilizando diferentes matérias-primas em diferentes meios reacionais.

SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS

Tendo em vista os resultados alcançados neste trabalho, as seguintes sugestões foram delineadas:

- Caracterizar as lipases solúveis *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*;
- Estudar a estabilidade térmica, à solventes orgânicos e ao pH, com as lipases solúveis *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0*;
- Estudar a aplicação da *Eversa® Transform 2.0* em síntese de ésteres etílicos e metílicos em sistema livre de solventes a partir de óleos de reuso;
- Avaliar o reuso das lipases livres *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* em escala piloto;
- Desenvolver o estudo combinado das lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* em sua forma livre para a produção de ésteres de ácido graxo na etapa de polimento da reação utilizando as mesmas em sua forma imobilizada;
- Avaliar os ciclos de uso da lipase *Eversa® Transform* imobilizada em *Sepabeads-C18* em reações para a produção de ésteres etílicos a partir de óleo de girassol, em meio com solvente orgânico;
- Empregar novas estratégias em busca da melhoria da estabilidade operacional dos derivados das lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizados em *Sepabeads-C18*;
- Aplicar as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18* em reator contínuo para a produção de ésteres etílicos e metílicos de ácido graxo;
- Caracterizar as lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18*;
- Estudar a estabilidade térmica das lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18*;
- Avaliar o efeito da concentração enzimática das lipases *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* imobilizadas em *Sepabeads-C18* em reações de produção de ésteres etílicos e metílicos em meio com e livre de solventes orgânicos;
- Estudar a imobilização das lipases solúveis *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* outros suportes alternativos, de menor

custo e com maior diâmetro de poro, visando à economia do processo e minimizando problemas no reuso das enzimas imobilizadas em reações de transesterificação.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA

Artigo Publicado em Periódico:

REMONATTO, D.; SANTIN, C.M.T.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; NINOW, J.; OLIVEIRA, J.V. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 254-262, 2016.

Orientação de trabalho de conclusão de curso:

Marielle Colombi. INFLUÊNCIA DO ULTRASSOM NA HIDRÓLISE DE ÓLEO DE SOJA UTILIZANDO A LIPASE EVERSA. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Daniela Remonato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M.K; ROSE, C.; KAMINI. N.R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92 2014, p. 1591–1601, 2014.

ABOMOHRRA, A.E.F.; JIN, W.; TU, R.; HAN, S.F.; EID, M.; ELADEL, H. Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: current status and perspectives. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.64, p. 596–606, 2016.

ACHTEN, W.M.; VERCHOT, J. L.; FRANKEN, Y.J.; MATHIJS, E.; SINGH, V.P.; AERTS, R. *et al.* Jatropha bio-diesel production and use. **Biomass Bioenergy**, v.32, p. 1063–1084, 2008.

ADAMS, C.; PETERS, J.F.; RAND, M.C.; SCHROER, B.J.; ZIEMKE, M.C. Investigation of soybean oil as a diesel fuel extender: Endurance tests. **JAACS**, v. 60 , p. 1574–1579,1983.

ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406–6436, 2013.

AGUIEIRAS, E.C.G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; CASTRO, A.M.; LANGONE, M.A.P.; 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.

AHMAD, A.L.; YASIN, M.N.H.; DEREK, C.J.C.; LIM J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. **Renewable and Sustainable Energy**. Reviews, v. 15, p. 584–96, 2011.

AIASAKOU, M.; LOULUDI, A.; PAPAYANNAKOS, N. Kinetics of the non-catalytic transesterification of soybean oil. **Fuel**, v, 77, p. 1297–302, 1999.

AKGUN, N.; IYSCAN E. Effects of process variables for biodiesel production by transesterification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 486- 492, 2007.

AKOH, C.C.; CHANG, S.W.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 8995–9005, 2007.

ALAMBERT, M. R. **Estimação Estocástica De Parâmetros Produtivos Da Soja: Uso do modelo PPDSO em um estudo de caso em Piracicaba/SP**. 2010. Fundação Getulio Vargas. Escola de Economia de São Paulo. São Paulo.

AL-ZUHAIR S.; LING, F.W.; JUN, L.S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951–60, 2007.

AMORIM, M.M.A.; JUNQUEIRA, R.G.; JOKL, L. Consumo de óleo e gordura nas preparações do almoço self-service. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara; v.21, p.217–223, 2010.

ANDRADE, E.F.; MAFRA, L.I.; MAFRA, M.R.; CORAZZA, M.L. (Liquid + liquid) equilibrium for the system {ethyl stearate(1) + ethanol(2) + glycerol(3)}. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 47, p. 213-218, 2012.

ANDRADE, L.H.; REBELO, L.P.; NETTO, C.G.C.M.; TOMA, H.E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 55-62, 2010.

ANON, 1982. Filtered waste cooking oil power diesel. **Journal Am Oil Chemistry Society**, 59, 780-781.

ANP-AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS- Boletim mensal do Biodiesel, dezembro 2016. http://www.anp.gov.br/wwwanp/images//publicacoes/boletins-anp/Boletim_Mensal_do_Biodiesel/BoletimBiodiesel_DEZ2016.pdf (acessado em janeiro 2017).

ARAÚJO, C.D.M.; ANDRADE, C.; SILVA, E.S.; A.D.DUPAS. Biodiesel production from used cooking oil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, 445–452, 2013.

ASHRAFUL A.M.; RAHMAN, S.M.A.; SHAHIR S.A.; RASHEDUL, H.K.; MASJUKI, H.H.; KALAM, M.A. The effect of additives on properties, performance and emission of biodiesel fuelled compression ignition engine-Review. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 348–364, 2014.

ATABANI, A.E.; SILITONGA, A.S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T.M.I.; MASJUKI, H.H.; MEKHILEFD, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy**, v. 16, p. 2070–2093, 2012.

ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K.; AZIZ, A.A., High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1999–2008, 2010.

ATADASHI, I.M.; AROUA, MK.; AZIZ, A.R.A.; SULAIMAN, N.M.N. The effects of catalysts in biodiesel production: a review. **Journal Industrial Engineering Chemistry**, v. 19, p. 14-26, 2013.

BACKES, A. M. **Desenvolvimento de produto cárneo fermentado adicionado de óleo de canola**. 2011. (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UFSM, Santa Maria.

BADGUJAR, C.K.; DHAKE, P.K.; BHANAGE, M.B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. **Process Biochemistry**, v.48, p.1335-1347, 2013.

BAHULEKAR, R.; AYYANGAR, N.R.; PONRATHNAM, S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 858–868, 1991.

BAJAJ, A.; JOHAN, P.; JHA, PN.; MEHROTRA, R., Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.9-14, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, p. 1815–1835, 2010.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production—A review of current work. **Energy Convers Manag**, v. 52, p. 1479–92, 2011.

BANDEIRA, F.S. **Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges**. Universidade Federal de Viçosa, Tese, Viçosa, p. 92, 2008.

BANKOVIĆ-ILIĆ, I.B.; STAMENKOVIĆ, O.S.; VELJKOVIĆ, V.B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renew Sustain Energy**, v. 16, p. 3621–3647, 2012.

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

BASSO, R.C.; DA SILVA, C.A.S.; SOUSA, C.O.; MEIRELLES, A.J.A.; BATISTA, E.A.C. LLE experimental data, thermodynamic modeling and sensitivity analysis in the ethyl biodiesel from macauba pulp oil settling step. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 468–475, 2013.

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

BATISTELLA, L. **Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2011.

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.

BENASSI, V.M.; SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; GUIBAN, J.M.; MATEO, C.; LIMA, M.S.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93-97, 2013.

BENETI, S. C.; LANZA, M., MAZUTTI M.A.; KUNITA, M.H.; FILHO, L.C., OLIVEIRA, J.V. Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for ternary and quaternary mixtures of fatty acid methyl and ethyl esters (FAME/FAEE) from soybean oil. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 68, p. 60-70, 2014.

BERCHMANS, H.J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, v.99 ,pp. 1716–172, 2008.

BERGMANN, J.C.; TUPINAMBÁ, D.D.; COSTA, O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renew Sustainable Energy**, v. 21, p. 411–420, 2013.

BIODIESELBR, disponível em:
<<http://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja.htm> > (acessado em março de 2015).

BORA, P.S.; ROCHA, R.V.M. Macauba palm: fatty and amino acids composition of fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 158–162, 2004.

BORA, P.; KONWAR, L. J.; BORO, J.; PHUKAN, M. M.; DEKA, D.; KONWAR, B. K. Hybrid biofuels from non-edible oils: A comparative standpoint with corresponding biodiesel. **Applied Energy**, v. 135, p. 450–460, 2014.

BOTELHO, C. A. V. **Viabilidade técnica e aspectos ambientais do biodiesel etílico de óleos residuais de fritura**. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Energia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BLANCO, R.M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: characterization of the support and the

catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 83–93, 2004.

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

BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 283–301, 2012.

CAIRES, E.F.; FERRARI, R.A.; MORGANO, M.A. Produtividade e qualidade da soja em função da calagem na superfície em semeadura direta. **Bragantia**, v. 62, p. 283–290, 2003.

CAMBILLAU, C.; LONGHI, S.; NICOLAS, A.; MARTINEZ, C. Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 449–455, 1996.

CANET, A.; BONET-RAGEL, K.; BENAIGES, M.D.; VALERO, F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p 94-99, 2016.

CARVALHO A. K.F.; ROSA, P. C.M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRADE, G. S.S.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485–493, 2013.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 484–487, 2013.

CESARINI, S.; HALLER, R. F.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p 1-12, 2014a.

CESARINI, S.; PASTOR, J.F.I.; DIAZ, P. Improvement of *P. aeruginosa* 42A2 lipase preparations for FAMES production, both in immobilized and soluble form. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99 p. 1–7, 2014b.

CERBIO - CENTRO BRASILEIRO DE REFERÊNCIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS. **O biodiesel, Publicação da Divisão de Biocombustíveis – DBIO**, Ano II, Ed. 12, Maio, 2006.

CHATTOPADHYAY S, SEN R. Fuel properties, engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a green process. **Applied Energy** 2013;105:319–26.

CHEN, H.; JU, H.; WU, T.; LIU, Y.; LEE, C.; CHANG, C. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a Packed Bed reactor: optimization and enzyme reuse study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D.H. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24: p. 2097–102, 2008a.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D.H.; DING, F.X. Lipase-mediated methanolysis of soybean oils for biodiesel production. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 83:p. 71–6, 2008b.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D.H. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 40, p. 423–9, 2008c.

CHHETRI, A.B.; TANGO, M.S.; BUDGE, S.M.; WATTS, K.C.; ISLAM, M.R. Non-edible plant oils as new sources for biodiesel production. **Int Journal Molecular Science**, v. 9 , p. 169–180, 2008.

CHIARADIA, V.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D.; ARAÚJO, P.H.H.; SAYER, C. Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 31–35, 2016.

CHOUHDURY, H.A.; MALANI, R.S.; MOHOLKAR, V.S. Acid catalyzed biodiesel synthesis from *Jatropha* oil: mechanistic aspects of ultrasonic intensification, **Chemistry Engineering Journal**, v. 231, p. 262–272, 2013.

CHRISTOPHER, L.P., KUMAR, H., ZAMBARE, V.P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CIPOLATTI, E.P.; VALÉRIO, A.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B.C. Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* by crosslinking in PEGylated polyurethane particles by polymerization: Application on fish oil ethanolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 54–60, 2016.

CIPOLATTI, E.P.; MORENO-PÉREZ, S; SOUZA, L.T.A.; VALÉRIO, A; GUISÁN, J.M.; ARAÚJO, P.H.H.; SAYER, C.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B.C. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 163–169, 2015.

CIPOLATTI, E.P.; SILVA, M.J.A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M.M.C.; OLIVEIRA J.V.; NINOW, J.L.; D. Review- Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.

COIMBRA, M.C.; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, p. 679–684, 2012.

CONAB. Boletim de grão julho 2012. Disponível em: <www.conab.gov.br/>. Acesso em 22 de março de 2015.

COSTA, J.A. **Cultura da Soja**. Porto Alegre. Evangraf. p. 233, 1996.

CURI, R. ET AL. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, p. 583, 2002.

CVENGRO, S.J.; CVENGROSO V.A.Z. Used frying oil sand fat sand the irutilizationin the production of methyl-ester soffhigh fatty acids. **Biomass Bioenergy**, v. 27, p. 173–181, 2004.

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

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 900 p., 2010.

DAUD, N.M.; ABDULLAH, S.R.S.; HASAN, H.A.; YAAKOB, Z. Production of biodiesel and its wastewater treatment technologies: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 94, p. 487–508, 2015.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A.M.; LAWSON, D.M.; DEREWENDA, Z.S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, p. 1532–1541, 1992.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A.J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6437- 6474, 2013.

DIYA'UDDEEN, B.H.; ABDUL AZIZ, A.; DAUD, W.; CHAKRABARTI, M. Performance evaluation of biodiesel from used domestic waste oils: a review **Process Safety and Environmental Protection**, v.90, p. 164–179, 2012.

DORADO, M.P.; BALLESTEROS, E.; LÓPEZ, F.J.; MITTELBAACH, M. Optimization of alkali catalyzed transesterification of brassica carinata oil for biodiesel production, **Energy Fuel**, v. 18, p. 77–83, 2004.

DOSSAT, V.; COMBES D, MARTY A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 30, p. 90–4. 2002

DOĞAÇ, Y. İ.; DEVECI, İ.; MERCIMEK, B.; TEKE, M. A comparative study for lipase immobilization onto alginate based

composite electrospun nanofibers with effective and enhanced stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 302–311, 2017.

ECHIM, C.; VERHÉ, R.; GREYT, W. D.; STEVENS, C. Production of biodiesel from side stream refining products. **Energy Environ Science**, v. 2; p. 1131–41, 2009.

ENCINAR J.M.; GONZALEZ J. F.; RODRÍGUEZ-REINARES A. Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yield and characteristics of the biodiesel. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. 44:5491–9, 2005.

ESCOBAR, J.C.; LORA, E.S.; VENTURINI, O.J.; YÁÑEZ, E.E.; CASTILLO, E.F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable Sustainable Energy Rev**, v. 13, p. 1275–87, 2009.

FARAG, H.; EL-MAGHRABY, A.; TAHA, N.A. Optimization of factors affecting esterification of mixed oil with high percentage of free fatty acid. **Fuel Process. Technology**, v. 92, p. 507–510, 2011.

FELIZARDO, P.; NEIVA CORREIA, M.J.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKEMEIER, R.; BORDADO, J.M. Production of biodiesel from waste frying oils. **Waste Manage**, v. 26, p. 487–494, 2006.

FENG, Y.; HE, B.; CAO, Y.; LI, J.; LIU, M.; YAN, F.; LIANG, X. Biodiesel production using cation-exchange resin as heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, 101, p. 1518–152, 2010.

FERNANDEZ, I. A. P.; LIU, D.; ZHAO, J. LCA studies comparing alkaline and immobilized enzyme catalyst processes for biodiesel production under Brazilian conditions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 119, p. 117–127, 2017.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185–197, 1998.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; G. PEDRERO, S.G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; VIRGEN-ORTÍZ J.J.; GORINES, B.C.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose *via* coating with ionic polymers: Avoiding enzyme release from the support. **Process Biochemistry**, In Press, 2016.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; FILICE, M.; LOPEZ-VELA, D.; PIZARRO, C.; WILSON, L.; BETANCOR, L.; AVILA, Y.; GUISAN, J.M. Cross-linking of lipases adsorbed on hydrophobic supports: highly selective hydrolysis of fish oil catalyzed by RML. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 801–807, 2011.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J.M.; GUISAN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1061–1067, 2008.

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

FERRERO, G.O.; ROJAS, H.J.; ARGARAÑA, C.E; EIMER, G.A. Towards sustainable biofuel production: Design of a new biocatalyst to biodiesel synthesis from waste oil and commercial ethanol. **Journal of Cleaner Production**, v. 139, p. 495–503, 2016.

FIRDAUS, M.Y.; BRASK, J.; NIELSEN, P.M.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 55–64, 2016.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1298–1315, 2009.

FORTES, I.C.P.; BAUGH, P.J. Pyrolysis-GC/MS studies of vegetable oils from Macauba fruit. **Journal Analytical Applied Pyrolysis**, v. 72, p. 103–111, 2004.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal Biosci Bioeng**, v. 92, p. 405–416, 2001.

GAO, J.; KONG, W.; ZHOU, L.; HE, Y.; MA, L.; WANG, Y.; YIN, L.; JIANG, Y. Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 309, p. 70–79, 2017.

GARCIA, J.; ZHANG, Y.; TAYLOR, H.; CESPEDES, O.; WEBB, M.E.; ZHOU, D. Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient, reusable biocatalysts and biosensors. **Nanoscale**, v. 3, p. 3721–3730, 2011.

GAZMURI, A.M.; BOUCHON, P. Analysis of wheat gluten and starch matrices during deep-fat frying. **Food Chemistry**, v.115, p. 999-1005, 2009.

GERALDES, C.É.; GRISOLI, R.; FREIRE, F.; PECORA V.; COELHO ST. Sustentabilidade ambiental do biodiesel no Brasil. *Política Energética*, v. 65, p. 680-691, 2014.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Process Technology**, v. 86, p. 1097–1107, 2005.

GOERING, C.E. Final report for project on Effect of nonpetroleum fuels on durability of direct-injection diesel engines under contract 59-2171-1-6-057-0, USDA, **ARS, Peoria, IL**, 1984.

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

GONG, J.; LUQUE, R. Catalysis for production of renewable energy. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 7466–7468, 2014.

GRYGLEWICZ, S. Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts. **Bioresource Technology** v. 70, p. 249–253, 1999.

GU, L.; HUANG, W.; TANG, S.; TIAN, S.; ZHANG, X. A novel deep eutectic solvent for biodiesel preparation using a homogeneous base catalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 647–652, 2015.

GUI, M.M.; LEE, K.; BHATIA S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, p. 1646–1653, 2008.

GUISAN, J.M.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; HALLING, P.J.; KENNEDY, D.; MIYATA, E.; RE, D. Preparation of new lipases derivatives with high activity–stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 817–824, 2001.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUXA, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

GUO, F.; FANG, Z.; TIAN, X.F.; LONG, Y.D.; JIANG, L.Q. One-step production of biodiesel from *Jatropha* oil with high-acid value in ionic liquids, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6469–6472, 2011.

HAAS MJ, SCOTT KM. Combined nonenzymatic–enzymatic method for the synthesis of simple alkyl fatty acid esters from soapstock. **Journal Am Oil Chemistry Society**, v. 73, p. 1393–401, 1996.

HAAS, M.J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Process Technology**, v. 86, p. 1087–1096, 2005.

HAMA S, KONDO A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, 2013.

HALIM, S.F.A.; KAMARUDDIN, A. H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. **Process Biochemistry**, 43, p. 1436–1439, 2008.

HAMZE, H.; AKIAA, M.; YAZDANIA, F. Optimization of biodiesel production from the waste cooking oil using response surface methodology. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 94, p. 1–10, 2015.

HARA, M.; YOSHIDA, T.; TAKAGAKI, A. A carbon material as a strong protonic acid. **Angew Chemistry Int Ed**, v. 43, p. 2955–8, 2004.

HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 844–857, 2010.

HAYYAN, A.; HASHIMA, M. A.; HAYYAN, M. Agro-industrial acidic oil as a renewable feedstock for biodiesel production using (1R)-(-)-camphor-10-sulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 116, p.223–227, 2014.

HAYYAN, A.; HASHIM, M.A.; MJALLI, F.S.; HAYYAN, M.; AL-NASHEF, I.M. A novel phosphonium-based deep eutectic catalyst for biodiesel production from industrial low grade crude palm oil. **Chemistry Engineering Science**, v. 92, p. 81–88, 2013.

HAYYAN, A.; ALAM, M. Z.; MIRGHANI, M.E.S.; KABBASHI, N.A.; HAKIMI, N.M. SIRAN, Y.M.; TAHIRUDDIN, S. Reduction of high content of free fatty acid in sludge palm oil via acid catalyst for biodiesel production. **Fuel Process Technology**, 92, p. 920–924, 2011.

HE, Y.; LI, J.; KODALI, S.; BALLE, T.; CHEN, B.; GUO, Z. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445–456, 2017.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL. R. Field Guide to the Palms of the Americas. **Princeton University Press**, Princeton, New Jersey, p. 352, 1995.

HIANE, P.A.; RAMOS FILHO, M.M.; RAMOS, M.I.L.; MACEDO, M.L.R. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. **Brazil Journal Food Technology**, v. 8, p. 256–259, 2005.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Custos e Benefícios de biodiesel e etanol Biocombustíveis Ambientais, Econômicos e Energéticos. **PNAS**, 103, p. 206–211, 2006.

HIRATA, D.B.; ALBUQUERQUE, T.L.; RUEDA, N.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M.; GARCIA-VERDUGO, E.; PORCAR, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Advantages of heterofunctional octyl supports: production of 1,2-dibutyryl by specific and selective hydrolysis of tributyrin catalyzed by immobilized lipases. **Chemistry Select**, v. 1, p. 3259–3270, 2016.

HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKES, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by highperformance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 858, p. 13–31, 1999.

HSIAO, M.C.; LIN, C.C.; CHANG, Y.H.; CHEN, L.C. Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil, **Fuel** v. 89, p. 3618–3622, 2010.

HUANG, J.; XIA, J.; JIANG, W.; LI, Y.; LI, J. Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase, **Bioresource Technology**, v. 180, p. 47–53, 2015.

HWANG, H.T.; QI, F.; YUAN, C.; ZHAO, X.; RAMKRISHNA, D.; LIU, D. Processo catalisado por lipase para a produção de biodiesel: engenharia de proteínas e produção de lipase. **Biotechnology Bioengineering**, v. 111, p. 639–653, 2014.

IBGE, 2013. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Aquisição Alimentar Domiciliar Per Capita. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf> (acessado em Maio 2013).

IBGE, 2013. Censo Demográfico 2010. Disponível em:<http://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Demografico_2010/Familias_e_Domicilios/Table1_2.pdf>(acessado em Maio 2013).

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 550–563, 2012.

IHA, O. K.; ALVES, F. C.S.C.; SUAREZ, P.A.Z.; DE OLIVEIRA, M. B.F.; MENEGHETTI, S. M.P.; SANTOS, B. P.T.; SOLETTI, J. I. Physicochemical properties of *Syagrus coronata* and *Acrocomia aculeata* oils for biofuel production . **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 318–322, 2014.

ISLAM, A.; YAP, Y.H.T.; CHU, C.M.; CHAN, E.S.; RAVINDRA, P. Studies on design of heterogeneous catalysts for biodiesel production, **Process Safety and Environmental Protection**, v. 91, p. 131-144, 2013.

JACOBSON, K.; GOPINATH R.; MEHER, L.C.; DALAI, AK. Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Catalysis B:Environmental**. 85:86–91, 2008.

JEGANNATHAN, K.R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E.S.; RAVINDRA, P. Lipase-a produção de biodiesel utilizando imobilizado revisão crítica. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, pp. 253-264, 2008.

JIANG, Y., LIU, X., CHEN, Y., ZHOU, L., HE, Y., MA, L., GAO, J. Pickering emulsion stabilized by lipase-containing periodic mesoporous organo silica particles: A robust biocatalyst system for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 278-283, 2014.

JO, Y.J., LEE, O.K., LEE, E.Y. Dimethyl carbonate-mediated lipid extraction and lipase-catalyzed in situ transesterification for simultaneous preparation of fatty acid methyl esters and glycerol carbonate from *Chlorella* sp. KR-1 biomass. **Bioresource Technology**, v. 158, 105-110, 2014.

KAREEM, S.O.; FALOKUN, E.I.; BALOGUN, S.A. AKINLOYE, O.A.; OMEIKE, S.O. Enzymatic biodiesel production from palm oil and palm kernel oil using free lipase. **Egyptian Journal of Petroleum**, 2016.

KHAN T.M. Y.; ATABANI, A.E.; BADRUDDIN, I. A.; BADARUDIN, A.; KHAYOON, M.S.; TRIWAHYONO, S. Recent scenario and technologies to utilize non-edible oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 840–851, 2014.

KHAN, A.A.; ALZOHAIRY, M.A. Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 565–575, 2010.

KOÇAR, G.; N. CIVAS. An overview of biofuels from energy crops: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 28, p. 900–916, 2013.

KNOTHE G.; JURGEN, K. The biodiesel handbook. AOCS Press; 2004.

KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K. Waste Cooking Oil - An Economical Source for Biodiesel: A Review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 9, p. 2901–2913, 2006.

KUO, T.C.; SHAW, J.F.; LEE, G.C. Conversion of crude *Jatropha curcas* seed oil into biodiesel using liquid recombinant *Candida rugosa* lipase isozymes. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 54-59, 2015.

KUO, C.-H., PENG, L.-T., KAN, S.-C., LIU, Y.-C., SHIEH, C.-J. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 145, 229-232, 2013.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

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

LAPIS, A.A.M.; OLIVEIRA, L.F.; NETO, B.A.D.; DUPONT, J. Ionic liquid supported acid/base-catalyzed production of biodiesel, **Chemistry Sustanble Chemistry**, v. 1, p.759–762, 2009.

LATHOUDER K.M.; VAN-BENTHEM, D.T.J.; WALLIN, S.A.; MATEO, C.; FERNANDEZ LAFUENTE, R.; GUI SAN, J.M.; KAPTEIJN, F.; MOULIJN, J.A. Polyethyleneimine (PEI) functionalized ceramic monoliths as enzyme carriers: Preparation and performance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, p. 20-27, 2008.

LEE, J.S.; SAKA, S. Biodiesel production by heterogeneous catalysts and supercritical technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7191-7200, 2010.

LEE, D.G.; PONVEL, K.M.; KIM, M.; HWANG, S.; AHN, I.S.; LEE, C.H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 62–66, 2009.

LEUNG, D.Y.C. WU, X. LEUNG, M.K.H. A Review on Biodiesel Production Using Catalyzed Transesterification . **Applied Energia**, v. 87, p. 1083-1095, 2010.

LI, X.; ZHU, H.; FENG, J.; ZHANG, J.; DENG, X.; ZHOU, B.; ZHANG, H.; XUE, D.; LI, F.; MELLORS, N.J.; LI, Y.; PENG, Y. One-pot polyol synthesis of graphene decorated with size- and density-tunable Fe_3O_4 nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. **Carbon**, v. 60, p. 488–497, 2013.

LI, Y.; DU, W.; LIU, D. Free lipase-catalyzed biodiesel production from phospholipids-containing oils. **Biomass and Bioenergy**, v. 71, p. 162–169, 2014.

LIM, S.; TEONG, L.K. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: an overview, **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Reviews, v. 14 p. 938–954, 2010.

LIMA, L.N.; ARAGON, C.C.; MATEO, C.; PALOMO, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; TARDIOLI, P.W.; GUI SÁN, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by

multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 118–123, 2013.

LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, p. 1020–1031, 2011.

LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. University of Missouri, Columbia 2004.

LIU Y, LI C, MENG X, YAN Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderiacenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Process Technology**, v. 106, p. 303–309, 2013.

LIU, W.; WANG, L.; JIANG, R. Specific enzyme immobilization approaches and their application with nanomaterials. **Topics in Catalysis**, v. 55, p. 1146–1156, 2012.

LOPES, D.C.; NETO, A.J.S.; MENDES, A.A.; PEREIRA, D.T.V. Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil. **Energy Economics**, v. 40, p. 819–824, 2013.

LORENZI, H. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. (1st ed.) Nova Odessa , p. 367 , 2010.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D.E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D.A.; GOODWIN J.G. JR. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353–536, 2005.

LUO, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production transesterification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 349–355, 2006.

LUQUE, R.; HERRERO, D.L.; CAMPELO, J.M.; CLARK, J.H.; HIDALGO, J.M.; LUNA, D. Biofuels: a technological perspective. **Energy Environmental Science**, v. 1, p. 542–564, 2008.

LUQUE,R.; LOVETT, JC; DATTA, B.; CLANCY, J.; CAMPELO, J.M.; ROMERO, A.A. Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview, **Energia Environmental Science**, v. 3, p. 1706-172, 2010.

LV, D.; DU, W.; ZHANG, G.; LIU, D. Mechanism study on NS81006-mediated methanolysis of triglyceride in oil/water biphasic system for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 446–450, 2010.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. **Bioresource technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MAAG, H. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, p. 259–267, 1984.

MADALOZZO, A. D.; MUNIZ, L.S.; BARON, A.M.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 13–19, 2014.

MAN, Z.; ELSHEIKH, Y.A.; BUSTAM, M.A; YUSUP, S.; MUTALIB, M.I.A; MUHAMMAD, N. A Brønsted ammonium ionic liquid-KOH two-stage catalyst for biodiesel synthesis from crude palm oil. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 144–149, 2013.

MANOEL, E.A.; SANTOS, J.C.S.; FREIRE, D.M.G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.

MARCHETTI, J.M.; ERRAZU, A.F. Technoeconomic study of supercritical biodiesel production plant. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2160–2164, 2008.

MARCHETTI J.M. A summary of the available technologies for biodiesel production based on a comparison of different feedstock's properties. **Process Safety Environmental Protection**, v. 90, p. 157–163, 2012.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas Fundação Cargill. 86 p., 1987.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN J.M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 98–105, 2000.

MEDINA, A. R.; MORENO, G.P.A; CERDÁN, L. E; GRIMA E.M. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398–408, 2009.

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

MENG, X.; CHEN, G.; WANG ,Y. Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test. **Fuel Processing Technology**v. 89, p. 851–857, 2008.

MENGYU, G.A.N.; DENG, P.A.N.; LI, M.A.; EN, Y.U.E.; JIANBING, H.O.N.G. The kinetics of the esterification of free fatty acids in waste cooking oil using $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3/\text{C}$ catalyst, **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 83–87, 2009.

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

MILAZZO, M.F.; SPINA, F.; CAVALLARO, S.; BART, J.C.J. Sustainable soy biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Review, v. 27, p. 806–852, 2013.

MISRA, R. D. Straight vegetable oils usage in a compression ignition engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 3005–3013, 2010.

MO, X.H.; LOTERO, E.; LU, C.Q.; LIU, Y.J.; GOODWIN, J.G. A novel sulfonated carbon composite solid acid catalyst for biodiesel synthesis. **Catalysis Letters**, v. 123, p.1–6, 2008.

MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated Transformation of Vegetable Oils into Biodiesel using Propan-2-ol as Acyl Acceptor. **Biotechnology Letters**. v. 28, p. 637–640, 2006.

MORENO-PEREZ, S.; ORREGO, A.H.; ROMERO-FERNÁNDEZ, M.; TROBO-MASEDA, L.; MARTINS-DEOLIVEIRA, S.; MUNILLA, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M. Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects. *Methods in ENZYMOLOGY*. **Rational Design of Enzyme-Nanomaterials**. Cap. 3, v. 571, Ed. Medical, 294 p., 2016.

MORENO-PEREZ, S.; FILICE, M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Synthesis of ascorbyl oleate by Sonia transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 174, p. 48–55, 2013.

MPOC. World's oils and fats production share in 2007. **Malaysian Palm Oil Council (MPOC)**; 2008.

MUDHIVARTHI, V. K.; COLE, K. S.; NOVAK, M. J.; KIPPHUT, W.; DESHAPRIYA, K.; ZHOU, Y.; KASI R. M.; KUMAR, C. V. Ultra-stable hemoglobin–poly (acrylic acid) conjugates. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 20423–20433, 2012.

MURTY, V.R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P.K.A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 57–66, 2002.

NAG, A. **Biofuels refining and performance McGraw Hill**, 2008.

NAKAJIMA, K.; HARA, M. Environmentally benign production of chemicals and energy using a carbon-based strong solid acid. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 90, p.3725–34, 2007.

NIE, K.; WANG, M.; ZHANG, X.; HU, W.; LIU, L.; WANG, F.; DENG, L.; TAN, T. Additives improve the enzymatic synthesis of biodiesel from waste oil in a solvent free system. **Fuel**, v. 146, p. 13–19, 2015.

NIELSEN, P.M.; RANCKE-MADSEN, A.; HOLM, H.C.; BURTON, R. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 905-910, 2016.

NIELSEN, P.M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 692–700, 2008.

NIELSEN, P. M. Enzyme-catalyzed biodiesel made from low-quality oils. **Biodiesel Magazine**. Disponível em <<<http://www.biodieselmagazine.com/articles/127509/> enzyme-catalyzed-biodiesel-made-from-low-quality-oils>>, 2014.

NOVOZYMES, 2017. The novozymes enzymatic biodiesel handbook. Disponível em: ><http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures>< (acessado em Janeiro de 2017).

NOVOZYMES, 2015. The novozymes enzymatic biodiesel handbook. Disponível em: ><http://www.novozymes.com/en/solutions/bioenergy/enzymaticbiodiesel/Pages/enzymatic-biodiesel-handbook.aspx><<(acessado em Julho de 2015).

NURFITRI I, MANIAM GP, HINDRYAWATI N, YUSOFF MM, GANESAN S. Potential offeedstock and catalysts from waste in biodiesel preparation: a review. **Energy Convers Manage**, v. 74, p. 395–402, 2013.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Conversão enzimática de óleo de girassol em biodiesel em sistema isento de solventes: Otimização do processo e estabilidade do sistema imobilizado. **Tecnologia Bioresource**, v. 100, p. 5.146-5.154, 2009.

PAULSON N, GINDER R. **The growth and direction of the biodiesel industry in the United States**. Working Paper-Center for Agricultural and Rural Development, Iowa State University; 2007. p. 1–29.

PARENTE, Expedito de Sá. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Tecbio, Fortaleza, CE, 2003.

PARK, E.Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3130–3135, 2008.

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Lipase Biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v.4, p.971-982, 2011.

PEDERSEN, A. T.; NORDBLAD, M.; NIELSEN, P. M.; JOHN M. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

PEIRCE, S.; TACIAS-PASCACIO, G.V., RUSSO, E.M.; MARZOCHELLA, A.; VIRGEN-ORTÍZ, J.J.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Stabilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) immobilized on octyl agarose by treatment with polyethyleneimine (PEI). **Molecules**, v. 21, p. 751, 2016.

PEREIRA, M.G.; FACCHINI, F.D.A.; FILÓ, L.E.C.; POLIZELI, A.M.; VICI, A.C.; JORGE, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B.C.; GUISAN, J.M.; POLIZELI M.L. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 561, 2015.

PESSELA, B.C.C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A. ; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 369–374, 2003.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Editora Manole, 456 p., 2014.

PETERSON, C.L AULD, D.L KORUS, R.A. Winter rape oil fuel for diesel engines: Recovery and utilization. **Journal Am Oil Chemistry Society**, v. 60, pp. 1579–1587, 1983.

PHAN AN, PHAN T.M. Biodiesel production from waste cooking oils. **Fuel**. 87:3490–6, 2008.

PINZI, S.; LEIVA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; REDEL-MACÍAS, M.D.; DORADO, M.P. Latest trends in feedstocks for biodiesel production. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v. 8, p. 126–143, 2014.

PREDOJEVIC, Z. J. The production of biodiesel from waste frying oils: a comparison of different purification steps. **Fuel** 87:3522–8, 2008.

PRICE, J.; NORDBLAD, M.; MARTEL, H.H.; CHRABAS, B.; WANG, H.; NIELSEN, P.M.; WOODLEY, J.M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, p. 1719–1728, 2016.

PRYDE, E.H. Vegetable oil as diesel fuel: Overview. **Journal Am Oil Chemistry Society**, v. 60, p. 1557–1558, 1983.

PRYOR, R.W.; HANNA, M.A.; SCHINSTOCK, J.L.; BASHFORD L.L. Soybean oil fuel in a small diesel engine. **Transactions of the American society of Agricultural Engineers**, v. 26, p. 333–342, 1983.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMIGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 31, p. 27-37, 2003.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975–3981, 2008.

REEFAT, A.A.; ATTIA, N.K.; SIBAK, H.A.; SHELTAWY S.T.; DIWANI GI. Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil. International . **Journal of Environmental Science and Technology**, v 5, p.75–82, 2008.

REMONATTO, D.; SANTIN, C.M.T.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa[®] Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 254-262, 2016.

REMONATTO, D.; SANTIN, C.M.T.; VALÉRIO, A.; LERIN, L.; BATISTELLA, L.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Lipase-Catalyzed Glycerolysis of Soybean and Canola Oils in a Free Organic Solvent System Assisted by Ultrasound. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 850–862, 2015.

REN, H.J.; DU, W.; LV, L.L.; LIU, D.H. Study on free lipase-catalyzed ethanolysis for biodiesel preparation in an oil/water biphasic system. **Journal Am Oil Chemistry Society**, v. 88, p. 1551–1555, 2011.

REN, H.J.; LI, Y.; DU, W.; LIU, D.H. Free lipase-catalyzed esterification of oleic acid for fatty acid ethyl ester preparation with response surface optimization. **Journal Am Oil Chemistry Society**, v. 90 p. 73–79, 2013.

REN21, 2015. Renováveis 2015 - Status Global Repor. Rede de Política Energética Renovável para o Século XXI - REN. Secretariado, Paris.

REYERO, I.; ARZAMENDI, G.; ZABALA, S.; GANDÍA, L. M. Kinetics of the NaOH-catalyzed transesterification of sunflower oil with ethanol to produce biodiesel. **Fuel Processing Technology**, v. 129, p. 147–155, 2015.

RIBEIRO, L.M.O.; SANTOS, B.C.S.; ALMEIDA, R.M.R.G. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 498-503, 2012.

RICCARDI, C. M.; MISTRI, D.; HART, O.; ANUGANTI, M.; LIN, Y.; KASI, R. M.; KUMAR, C. V. Covalent interlocking of glucose oxidase and peroxidase in the voids of paper: enzyme–polymer “spider webs”. **Chemical Communications**, v. 52, p. 2593–2596, 2016.

RICCARDI, C.M.; COLE, K.S.; BENSON, K.R.; WARD, J.R.; BASSETT, K.M.; ZHANG, Y.; ZORE, O.V.; STROMER, B.; KASI, R.M.; KUMAR, C.V. Toward "stable-on-the-table" enzymes: improving key properties of catalase by covalent conjugation with poly(acrylic acid). **Bioconjugate Chemistry**, v. 8, p. 20-25, 2014.

RODRIGUES, R.C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Amination

of enzymes to improve biocatalyst performance: coupling genetic modification and physicochemical tools. **RSC Advances**, v. 4, p. 38350–38374, 2014.

SANTIN, C.M.T.; SCHERER, R.P.; NYARI, N.L.D.; DALLA ROSA, C.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida antarctica B* immobilized in polyurethane foam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 90–94, 2014.

SANTOS, E.M.; PIOVESAN, N.D.; DE BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Low linolenic soybeans for biodiesel: characteristics, performance and advantages. **Fuel**, v. 16, 2012.

SANTOS, A.L.F.; MARTINS, D.U.; IHA, O.K.; RIBEIRO, R.A.M.; QUIRINO, R.L.; SUAREZ, P.A.Z. Agro-industrial residues as low-price feedstock for diesel-like fuel production by thermal cracking. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6157–6162, 2010.

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25 p. 97–108, 2013.

SCHMID, R.D.; VERGER, R. Lipases interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 1609–1633, 1998.

SCHLAUTMAN, N.J.; SCHINSTOCK J.L.; HANNA M.A. Unrefined expelled soybean oil performance in a diesel engine. **Transactions of the American society of Agricultural Engineers**, v. 29, p. 70–73, 1986.

SCHUCHARDTA. U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. **Transesterification of vegetable oils: a review**. Journal of Braziliam Chemical Society, v.9, n.1, p. 199 – 210, 1998.

SINGH, B.; GULDHE, A.; RAWAT, I.; BUX, F. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216–24, 2014.

SHAH, K.A.; PARIKH, J.K.; MAHERIA, K.C. Biodiesel synthesis from acid oil over large pore sulfonic acid-modified mesostructured SBA-15: **Process optimization and reaction kinetics**, p. 29–37, 2014.

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 97–108, 2013.

SHAH, K. A.; PARIKH, J. K.; MAHERIA, C. Biodiesel synthesis from acid oil over large pore sulfonic acid-modified mesostructured SBA-15: Process optimization and reaction kinetics. **Catalysis Today**, v. 237, p. 29–37, 2014.

SHARMA, Y.C., SINGH, B. Development of biodiesel: current scenario. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1646–1651, 2009.

SHARMA, Y.C.; AGRAWAL, S. B.; SINGH, A.E.; FRÓMETA, N. Synthesis of economically viable biodiesel from waste frying oils (WFO). **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 90, p. 483–488, 2012.

SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, p. 227–242, 1993.

SHELDON, R.A.; ARENDS, I.W.C.E.; HANEFELD, U. **Green Chemistry and Catalysis**. (first ed.) Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

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

SHIBASAKI-KITAKAWA, N.; HIROMORI, K.; IHARA, T.; KASHIMA, O.; YONEMOTO, T. Production of high quality biodiesel from waste acid oil obtained during edible oil refining using ion-exchange resin catalysts. **Fuel**, v. 139, p. 11–17, 2015.

SHU, Q.; ZHANG, Q.; XU, G.H.; NAWAZ, Z.; WANG, D.Z.; WANG, J.F. Synthesis of biodiesel from cottonseed oil and methanol using a

carbon-based solid acid catalyst. **Fuel Process Technology**, v. 90, p. 1002–1008, 2009.

SHU, Q.; NAWAZ, Z.; GAO, J.X.; WANG, D.Z.; WANG, J.F. Synthesis of biodiesel from waste oil feedstocks using a carbon-based solid acid catalyst: reaction and separation. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5374–5384, 2010.

SHU, Q.; GAO, JX.; LIAO, Y.H.; WANG, JF. Reaction kinetics of biodiesel synthesis from waste oil using a carbon-based solid acid catalyst. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.163–168, 2011.

SHU, Q.; YUAN, H.; LIU, B.; ZHU, L.; ZHANG, C.; WANG, J. Synthesis of biodiesel from model acidic oil catalyzed by a novel solid acid catalyst SO₄²⁻/Ce⁴⁺. **Fuel**, v. 143, p. 547–554, 2015.

SITEPU, I.R.; GARAY, L.A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D.E.; GERMAN, J.B.; BOUNDY-MILLS, K.L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336–1360, 2014.

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

SOCCOL, C.R.; NETO, C.J.D.; SOCCOL, V.T.; SYDNEY, E.B.; COSTA, E.S.F.; MEDEIROS, A.B.P.; VANDENBERGHE, L.P.S. Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. **Bioresource Technology**, v. 223, 259-268, 2017.

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

STAMENKOVIĆ, O.S.; VELIČKOVIĆ, A.V.; VELJKOVIĆ, V.B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141–3155, 2011.

STRAYER, R.C; BLAKE, J.A; W.K, CRAIG. Canola and high erucic rapeseed oil as substitutes for diesel fuel: Preliminary tests. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, p. 1587–1592, 1983.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILLIPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipases-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p.1846-1859, 2013.

SU, E.; WEI, D. Improvement in biodiesel production from soapstock oil by one-stage lipase catalyzed methanolysis. **Energy Conversion and Management**, v. 88,p. 60–65, 2014.

SULAIMAN, A.Z.; FAN, W.L.; LIM, S.J. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951–60, 2007.

SUWANNO, S.; RAKKAN, T.; YUNU, T.; PAICHID, N.; KIMTUN, P.; PRASERTSAN, P.; SANGKHARAK, K. " The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. **Fuel**, v. 195, p. 82-87, 2017.

TAKASE, M.; ZHAO, T.; ZHANG, M.; CHEN, Y.; LIU, H.; YANG, L.; WU., X. An expatiate review of neem, jatropha, rubber and karanja as multipurpose non-edible biodiesel resources and comparison of their fuel, engine and emission properties. **Renewable and Sustainable Energy**, Reviews, v.43, p. 495–520, 2015.

TALEBIAN-KIAKALAEIH, A.; AMIN, N.A.S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683–710, 2013.

TALUKDER, M.M.R., WU, J.C.; CHUA L.P. Conversion of waste cooking oil to biodieselveia enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Energy Fuels**, v. 24, p. 2016–2019, 2010a.

TALUKDER, M.M.R.; WU, J.C.; FEN N. M.; MELISSA Y.L.S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 207–12, 2010b.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; Wang, F., Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TANASKOVIĆ, S. J.; JOKIĆ, B.; GRBAVČIĆ, S.; DRVENICA, I.; PRLAINOVIĆ, N.; LUKOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 103-111, 2017.

TANG, S.K.; WANG, L.P.; ZHANG, Y.; LI, S.F.; TIAN, S.J.; WANG, B.Y. Study on preparation of Ca/Al/Fe₃O₄ magnetic composite solid catalyst and its application in biodiesel transesterification, **Fuel Processing Technology**, v. 95 p. 84–89, 2012.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe. Agropecuário.**, v. 26, p. 18–27, 2005.

TENENBAUM, D.J.. Food vs. fuel: diversion of crops could cause more hunger. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 254, 2008.

THOMPSON, P.B. The agricultural ethics of biofuels: the food vs. fuel debate. **Agriculture**, v. 2, p. 339–358, 2012.

TODA, M.; TAKAGAKI, A.; OKAMURA, M. Green chemistry–biodiesel made with sugar catalyst. **Nature**, v. 438, p. 178, 2005.

TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, B.C.C.; PALOMO, J.M.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 167–171, 2016.

TORRES, R.; MATEO, C.; FUENTES, M.; PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: optimization of the biocatalyst's stability. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 1221–1226, 2002.

TRENTIN, C.M.; LIMA, A.P.; ALKIMIM, I.P.; SILVA, C.; CASTILHOS, F.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V. Continuous

catalyst-free production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in microtube reactor using supercritical carbon dioxide as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 283–291, 2011a.

TRENTIN, C.M.; LIMA, A.P.; ALKIMIM, I.P.; SILVA, C.; CASTILHOS, F.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V. Continuous production of soybean biodiesel with compressed ethanol in a microtube reactor using carbon dioxide as co-solvent. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 952–958, 2011b.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnology**, v. 15, p. 32–38, 1997.

VERZIU, M. B.; COJOCARU, J.C.; HU, R.; RICHARDS, C.; CIUCULESCU, P.; FILIP, V.I. Parvulescu, Sunflower and rapeseed oil transesterification to biodiesel over different nanocrystalline MgO catalysts, **Green Chemistry**, v.10 p. 373–381, 2008.

VESCOVI, V.; KOPP, W.; GUISÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; MENDES, A.A.; TARDIOLI, P.W. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 2055–2066, 2016

VIRGEN-ORTÍZ, J.J.; TACIAS-PASCACIO, V.G.; HIRATA, D.B.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 30–35, 2017.

WANG, Y.; OU, S.; LIU, P.; XUE, F.; TANG, S. Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 252, p. 107–112, 2006.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 29–32, 2006.

WARABI, Y.; KUSDIANA, D.; SAKA, S. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols, **Bioresource Technology**, v. 91, p. 283–287, 2004.

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

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 151–155, 2002.

WORLD AGROFORESTRY CENTRE. When oil grows on trees. **World Agroforestry**, Centre Press; 2007. Released on April 26, 2009.

WORLDWATCH INSTITUTE. Biofuels make a comeback despite tough economy. Disponível em: <<http://www.worldwatch.org/biofuels-make-comeback-despite-tough-economy>>. (acessado em Agosto, 2011).

USDA, Foreign Agricultural Service (FAS). GAIN BR0707 Brazil – 2011 annual oilseeds report, Global Agricultural Information Network (GAIN) on-line, abril 2011.

XIE, W.; FAN, M. Biodiesel production by transesterification using tetra alkyl ammonium hydroxides immobilized onto SBA-15 as a solid catalyst. **Chemical Engineering Journal** ., v. 239, p 60–67, 2014.

XU, Y.Y.; DU, W.; LIU, D.H. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 32, p.241–5, 2005.

YAAKOB Z, MOHAMMAD M, ALHERBAWI M, ALAM Z, SOPIAN K. Over view of the production of biodiesel from waste cooking oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p.184–93, 2013.

YAN, J.; ZHENG, X.; LI, S. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and

application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 43–48, 2014.

YAN, J.; LI, A.; XU, Y.; NGO, T.P.N.; PHUA, S.; LI, Z. Efficient production of biodiesel from waste grease: one-pot esterification and transesterification with tandem lipases. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 332–337, 2012.

YAN, S.; SALLEY, S.O.; SIMON NG, K.Y. Simultaneous transesterification and esterification of unrefined or waste oils over ZnO–La₂O₃ catalysts. **Applied Catalysis A**, v. 353, p. 203–212, 2009.

YANG, W.; YAOJIA, E.; XU, L.; ZHANG, H.; YAN, Y. Uma nova lipase termo-solvente estável extracelular de *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identificação, caracterização e aplicação para a produção de biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 76–89, 2016.

YANG, J.S.; GYU, J.J.; BYUNG, K.H.; YANG, J.W. Enzymatic methanolysis of castor oil for the synthesis of methyl ricinoleate in a solvent-free medium. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.15, p.1183–1188, 2005.

YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN R. Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production, **Biotechnology Biofuels**, v. 5, p. 1–10, 2002.

YOOSUK, B.; UDOMSAP, P.; PUTTASAWAT, B.; KRASAE, P. Improving transesterification activity of CaO with hydration technique, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3784–3786, 2010.

YUN, H.; WANG, M.; FENG, W.; TAN, T. Process simulation and energy optimization of the enzyme-catalyzed biodiesel production. **Energy**, v. 54, p. 84–96, 2013.

YUSOFF, M.F.M.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: a review on processing and production requirements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 525–531, 2014.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. **Science**, v. 224, p. 1249–1255, 1984.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES M. Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: 1. Process Design and Technology Assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 1-16, 2003.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHENG, J.; XU, L.; LIU, Y.; ZHANG, X.; YAN, Y. Lipase-coated K_2SO_4 micro-crystals: preparation, characterization, and application in biodiesel production using various oil feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 224–231, 2012.

APÊNDICE A- Laudo de qualidade do produto óleo ácido residual

Abaixo na Figura 1A o laudo emitido pela empresa Olfar Alimentos e Energia (Erechim/RS) sobre a qualidade e composição da matéria graxa residual doada para a realização desta pesquisa. Nesse laudo intitulado pela empresa como “ácido graxo de glicerina” e demonado nesta trabalho denominado “óleo ácido residual”.

Figura 1A- Laudo de qualidade do produto óleo ácido residual cedido pela Olfar Alimentos e Energia.

PRODUÇÃO – BIODIESEL E DERIVADOS
Laudo de Qualidade de produto



- PRODUTO: ÁCIDO GRAXO DE GLICERINA
- CLIENTE: AGROLATINA
- PLACA: IIZ 5147
- FABRICAÇÃO: 06/05/2014
- LOTE: 06052014
- TANQUE: 11

| Análises Recomendadas | Resultados | Padrões |
|-------------------------------|------------|----------------------------|
| Massa Específica | 0,909 | Anotar - g/cm ³ |
| Acidez | 54,83 | min. 30,00 % |
| Sabões | 19,4 | máx. 20% |
| Voláteis | 1,55 | máx. 5% |
| Teor de Glicerina (titulação) | 1,47 | máx. 1% |
| | | |

✓ Parecer Técnico:

O parâmetro analisado de teor de glicerina esta fora dos padrões de qualidade.

Erechim, 06 de Maio de 2014.

Maiquel Bonato

Maiquel Bonato
Gerente de Qualidade de Produto
CRQ V 05202114

Os resultados apresentados neste documento têm significação restrita
e se aplicam somente à amostra analisada.