



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

GLEICIÉLI STEINKE

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE
SOJA BRUTO**

LARANJEIRAS DO SUL

2018

GLEICIÉLI STEINKE

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE
SOJA BRUTO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos sob a orientação do Prof Dr. João Paulo Bender.

LARANJEIRAS DO SUL

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rodovia SC 484, Km 02

CEP: 89815-899

Bairro Fronteira Sul

Chapecó - SC

Brasil

PROGRAD/DBIB – Divisão de Bibliotecas

Steinke, Gleiciéli

Síntese enzimática de ésteres metílicos a partir de óleo de soja bruto /
Gleiciéli Steinke. – 2018.

85 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. João Paulo Bender

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTAL, Laranjeiras
do Sul, PR, 2018.

1. Biodiesel. 2. Fosfolipase. 3. Lipase. I. Bender, João Paulo, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GLEICIELI STEINKE

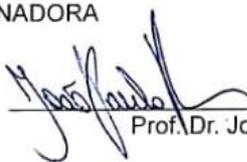
SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA BRUTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - **Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – PPGCTAL da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, defendido em 17/08/2018.

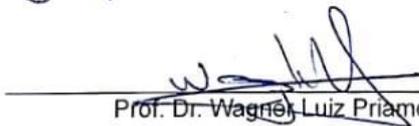
Presidente da Banca: Prof. Dr. João Paulo Bender

Aprovado em: 17/08/2018

BANCA EXAMINADORA



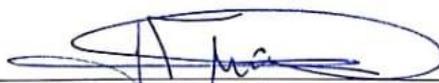
Prof. Dr. João Paulo Bender/UFFS



Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo/IFRS



Prof. Dr. Jacir Dal Magro/UNOCHAPECÓ



Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira/UFSC

Laranjeiras do Sul/PR, agosto de 2018

Dedico este mestrado à minha avó (*in memoriam*), por ter me apoiado incondicionalmente em todas minhas decisões. Ela é minha saudade diária, minha inspiração e exemplo de amor, ternura, simplicidade e honestidade. Minha avó foi o melhor presente que Deus me deu.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por ter me dado o dom da vida e ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

Agradeço ao meu orientador, Dr. João Paulo Bender, meu co-orientador Dr. José Vladimir de Oliveira e ao professor Dr. Guilherme Mibielli, por toda a paciência, empenho, compreensão e orientação. Muito obrigada por terem me corrigido sempre de forma muito humana, sem nunca me desmotivar.

Desejo igualmente agradecer a minha família, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem no meu melhor, especialmente ao meu companheiro Pedro Bressan Neto, pela compreensão, carinho, paciência e incentivo. Obrigada amor por ter feito meu objetivo se tornar nosso!

Sou grata as minhas voluntárias Isabella, Leiliani e Auriane pelas horas e horas me auxiliando no laboratório, pelas palavras de incentivo, pelos risos, pelo respeito e amizade que construímos. Tenho certeza que vocês foram as melhores companheiras de laboratório que eu poderia ter.

Agradeço também aos meus amigos, em especial ao Marcos, Daiana, Lindaiane e Maiara, por sempre desejarem o melhor para mim, pelas risadas, palavras de incentivo e carinho, principalmente pela amizade simples e verdadeira. Amo vocês!

Também agradeço ao meu colega Marcelo Mistura, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e paciência com minhas infinitas dúvidas.

Não poderia deixar de agradecer as minhas colegas de mestrado, Franceline, Cintia, Viviane, Jaque, Jussara e Juceli, por tornarem esse processo o menos dolorido possível, sou grata pelos cafés, risos e lamentações compartilhadas. Foi um prazer conhece-las e hoje poder chama-las de amigas!

É preciso amar as pessoas como se não houvesse amanhã. Porque se você parar para pensar, na verdade não há.

Legião Urbana

RESUMO

O biodiesel caracteriza-se como uma opção vantajosa para substituição do diesel mineral. Entretanto, o método empregado industrialmente, a transesterificação alcalina, acaba por gerar grande volume de efluentes e limita-se ao uso de matérias-primas com alto valor agregado, tornando-o menos competitivo ao diesel mineral. Uma alternativa para o método convencional de produção do biodiesel é a hidroesterificação enzimática, pois além de permitir a utilização de matérias-primas de baixo custo, o uso de enzimas como catalisadores apresenta alta eficiência catalítica em condições brandas de reação, biodegradabilidade, reutilização da enzima e redução do volume de resíduos. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo principal a produção de ésteres metílicos por meio do processo de hidroesterificação do óleo de soja bruto, utilizando os seguintes catalisadores enzimáticos NS 40116, Lecitase Ultra e Quara LowP, adquiridas junto à Novozymes. Para a realização deste estudo, inicialmente realizou-se ensaios de hidrólises com 100g de óleo de soja bruto, 4% (em base mássica de óleo) de água, a 45°C, 200 rpm com 10 horas de reação empregando-se diferentes concentrações e combinações de catalisadores. Obteve-se o melhor resultado, índice de acidez de 30,80%, empregando-se de forma combinada 5000ppm de NS40116 e 50ppm de LowP. Numa segunda etapa, testes de hidroesterificação foram realizados também em diferentes combinações e concentrações de catalisadores, nas seguintes condições de processo: 100 g de óleo de soja bruto, 2% (em base mássica de óleo) de água, 1,5 equivalente de metanol - adicionado gradualmente ao longo da reação em 12 adições, a 45°C e 200rpm. A melhor condição experimental foi encontrada empregando-se, de forma combinada, 5000ppm de NS 40116 e 50ppm de Quara LowP em 72 horas de reação, obtendo-se um percentual de glicerina combinada de 0,045% e uma redução de 88,28% do teor de fósforo. Além disso, comparou-se este resultado com o obtido por um ensaio em duas etapas, realizando-se primeiramente uma degomagem catalisada pela enzima Quara LowP, seguida de hidroesterificação catalisada pela NS 40116, obtendo-se uma redução de 89,57% de fósforo. Contudo, sob o ponto de vista industrial, este processo torna-se inviável, pois além de envolver mais etapas empregou-se temperaturas maiores. Os resultados obtidos evidenciaram que a hidroesterificação enzimática em uma única etapa é uma metodologia promissora para a produção de biodiesel utilizando matéria-prima alternativa (óleo de soja bruto).

Palavras-chave: Lipase. Fosfolipase. NS40116. Quara LowP. Lecitase Ultra.

ABSTRACT

Biodiesel is characterized as an advantageous option for replacement of mineral diesel. However, the industrially used method, alkaline transesterification, generates a large volume of effluents and is limited to the use of raw materials with high added value, making it less competitive with mineral diesel. An alternative to the conventional method of biodiesel production is the enzymatic hydroesterification. In addition to allowing the use of low cost raw materials, the use of enzymes as catalysts has high catalytic efficiency under mild reaction conditions, biodegradability, reuse of the enzyme and reducing the volume of waste. Considering the above, the main objective of the present work was the production of methyl esters by the hydroesterification process of crude soybean oil, using the following enzymatic catalysts NS 40116, Lecitase Ultra and Quara LowP, purchased from Novozymes. In order to carry out this study, hydrolysis tests were initially carried out with 100 g of crude soybean oil, 4% (water-based oil), at 45°C, 200 rpm with 10 hours of reaction using different concentrations and combinations of catalysts. The best result, acidity index of 30.80% was obtained, using 5000ppm of NS40116 and 50ppm of LowP in a combined form. In a second step, hydrothermalification tests were also performed in different combinations and catalyst concentrations, under the following process conditions: 100 g of crude soybean oil, 2% (in water oil base), 1.5 equivalent of methanol - added gradually over the reaction in 12 additions, at 45 °C and 200rpm. The best experimental condition was found using 5000ppm of NS 40116 and 50ppm of Quara LowP in a combined 72 hours of reaction, yielding a combined percentage of glycerol of 0.045% and a reduction of 88.28% of the content of phosphorus. In addition, this result was compared with that obtained by a two-step assay, first performing a degumming catalyzed by the enzyme Quara LowP, followed by hydroesterification catalysed by NS 40116, obtaining a reduction of 89.57% of phosphorus. However, from the industrial point of view, this process becomes impracticable, since in addition to involving more stages we used higher temperatures. The results obtained evidenced that the enzymatic hydroesterification in a single step is a promising methodology for the production of biodiesel using alternative raw material (crude soybean oil).

Keywords: Lipase. Phospholipase. NS40116. Quara LowP. Lecitase Ultra.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preços de Insumos no Produtor: Metanol x Etanol anidro.....	26
Figura 2. Matérias-primas empregadas para a produção de biodiesel no Brasil no 1º Trimestre de 2018	27
Figura 3. Representação da transesterificação de um TAG com metanol	30
Figura 4. Representação da hidrólise de um TAG.....	30
Figura 5. Representação da esterificação de um TAG com metanol	31
Figura 6. Locais de ação das fosfolipases PLA (1 e 2), PLB, PLC e PLD em um fosfolípido. Onde X= H, colina, etanolamina, inositol, serina, etc.	36
Figura 7. Representação da degomagem enzimática.	37
Figura 8. Representação geral da metodologia.....	38
Figura 9. Shaker empregado nos ensaios enzimático.....	40
Figura 10. Procedimento empregado nos ensaios de hidrólise.....	41
Figura 11. Procedimento empregado nos ensaios de hidroesterificação.	42
Figura 12. Procedimento experimental empregado nos ensaios de hidrólise seguido por esterificação.	44
Figura 13. Procedimento experimental empregado na melhor condição experimental	45
Figura 14. Mecanismo de ação NS 40116.	58
Figura 15. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima NS40116 (reação em shaker a 200 rpm e 45°C).....	59
Figura 16. Mecanismo de atuação da Lecitase Ultra.....	61
Figura 17. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima Lecitase Ultra (reação em shaker a 200 rpm e 50°C).....	61
Figura 18. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima Quara® LowP (reação em shaker a 200 rpm e 70°C).	63
Figura 19. Mecanismo de ação da enzima Quara LowP	63
Figura 20. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima Lecitase Ultra (50 ppm), em shaker a 200 rpm e 50°C.....	64
Figura 21. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e Lecitase Ultra (1000 ppm), shaker a 200 rpm e 45°C.	65

Figura 22. Cinética de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e LowP (250 ppm).....	66
Figura 23. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000ppm) e Lecitase Ultra (50ppm) -reação em shaker a 200 rpm e 45°C.	67
Figura 24. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm), em shaker a 200 rpm e 45°C.	68
Figura 25. Produto obtido por hidroesterificação catalisada por NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de produção de ésteres metílicos/ etílicos por hidroesterificação enzimática	33
Tabela 2. Variáveis investigadas nos ensaios de hidrólise.	41
Tabela 3. Variáveis investigadas nos ensaios preliminares de hidroesterificação. ...	43
Tabela 4. Resultados da Caracterização do Óleo de Soja Bruto	55
Tabela 5. Comparação entre os ensaios de hidrólise.	69
Tabela 6. Cinética reacional de hidroesterificação do óleo de soja bruto.	71
Tabela 7. Resultados da hidroesterificação catalisada pela enzima NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm) com adição de 100ppm de NaOH em uma única etapa	73
Tabela 8. Resultados hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em duas etapas	74
Tabela 9. Resultados hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm) com adição de 100ppm de NaOH em uma etapa.....	75
Tabela 10. Resultados Caracterização do Produto Obtido. *ANP 45 de 25/08/14....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP. - Agência Nacional do Petróleo

MME- Ministério Minas e Energia

LISTA DE SIGLAS

AGL- Ácidos graxos livres.

CG- Cromatografia em fase gasosa.

DAG- Diacilgliceróis.

m/m – Massa/massa dos substratos.

m/v – Massa/volume.

MAG- Monoacilgliceróis.

ppm – Parte por milhão.

rpm – Rotação por minuto.

TAG – Triacilgliceróis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. JUSTIFICATIVA	22
4. REFERENCIAL TEÓRICO	24
4.1 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DOS ÉSTERES	24
4.2 BIODIESEL	24
4.3 MATÉRIAS-PRIMAS	26
4.4 MÉTODOS EMPREGADOS NA SÍNTESE DE BIODIESEL	29
4.5 ENZIMAS	31
4.6 CATÁLISE ENZIMÁTICA	32
4.7 LIPASES E FOSFOLIPASES	34
4.8 DEGOMAGEM ENZIMÁTICA	36
5. MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 MATERIAL	38
5.1.1 Enzimas	38
5.1.2 Reagentes	39
5.1.3 Substratos	39
5.1.4 Padrões químicos	40
5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
5.2.1 Ensaios de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto	40
5.2.2 Ensaios de hidroesterificação enzimática do óleo de soja bruto	42
5.2.3 Ensaios de hidroesterificação em uma única etapa	43
5.2.4 Ensaios de hidrólise seguido de esterificação (reações em duas etapas).	43

5.2.5 Repetição do ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 e Quara LowP com adição de 100 ppm de NaOH em uma etapa.....	44
5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	45
5.3.1 Caracterização físico-química da matéria-prima.....	45
5.3.1.1 Determinação do índice de acidez	45
5.3.1.2 Determinação do índice de peróxido	46
5.3.1.3 Determinação do índice de saponificação	46
5.3.1.4 Determinação do teor de umidade	47
5.3.1.5 Determinação do teor de cinzas	48
5.3.1.6 Determinação do índice de iodo	48
5.3.1.7 Determinação do teor de fósforo	49
5.3.2 Caracterização dos produtos das reações experimentais	50
5.3.2.1 Determinação da glicerina combinada (GC).....	50
5.3.2.2 Determinação da massa específica.....	51
5.3.2.3 Determinação da viscosidade cinética.....	51
5.3.2.4 Determinação do teor de Ca, Mg, Na e S.....	51
5.3.2.5 Determinação do teor de água	51
5.3.2.6 Determinação da estabilidade oxidativa	52
5.3.2.7 Determinação do teor de ésteres	52
5.3.2.7.1 Preparo das amostras	52
5.3.2.7.2 Cálculo do teor de ésteres.....	52
5.3.2.8 Determinação do teor de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG)	53
5.3.2.8.1 Preparo das Amostras.....	53
5.3.2.8.2 Determinação dos teores de MAG, DAG E TAG	53
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	55

6.1.1 Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS40116 (5000 ppm)	58
6.1.2 Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto catalisada pela enzima Lecitase Ultra (1000 ppm)	60
6.1.3 Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto catalisada pela enzima Quara LowP (250 ppm)	62
6.1.4 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pela enzima Lecitase Ultra (50 ppm)	64
6.1.5 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e Lecitase Ultra (1000 ppm)	65
6.1.6 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e LowP (250 ppm)	66
6.1.7 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e Lecitase Ultra (50 ppm)	67
6.1.8 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm)	68
6.1.9 Comparação entre os ensaios de hidrólise	69
6.1.10 Cinética de hidroesterificação do óleo de soja bruto.....	69
6.1.11 Ensaios de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em uma única etapa.....	72
6.1.12 Ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em duas etapas.....	73
6.1.13 Repetição do ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em uma etapa.....	75
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8. REFERÊNCIAS.....	80

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Síntese enzimática de ésteres metílicos a partir de óleo de soja bruto

O quê?

É possível obter altas conversões de ésteres metílicos a partir de óleo de soja bruto empregando o processo de hidroesterificação enzimática?

Por quê?

- Reduzir os custos da produção de ésteres metílicos a partir da matéria-prima óleo de soja;
- O óleo de soja degomado e neutralizado continua sendo a matéria-prima predominante para a produção de biodiesel;

Quem já fez?

Em uma busca realizada no periódico Capes a partir dos termos hidroesterificação, produção enzimática, ésteres metílicos, encontrou-se 5 artigos que relatavam a produção de ésteres metílicos empregando óleo de soja bruto como substrato, a partir de hidroesterificação catalisada por enzimas.

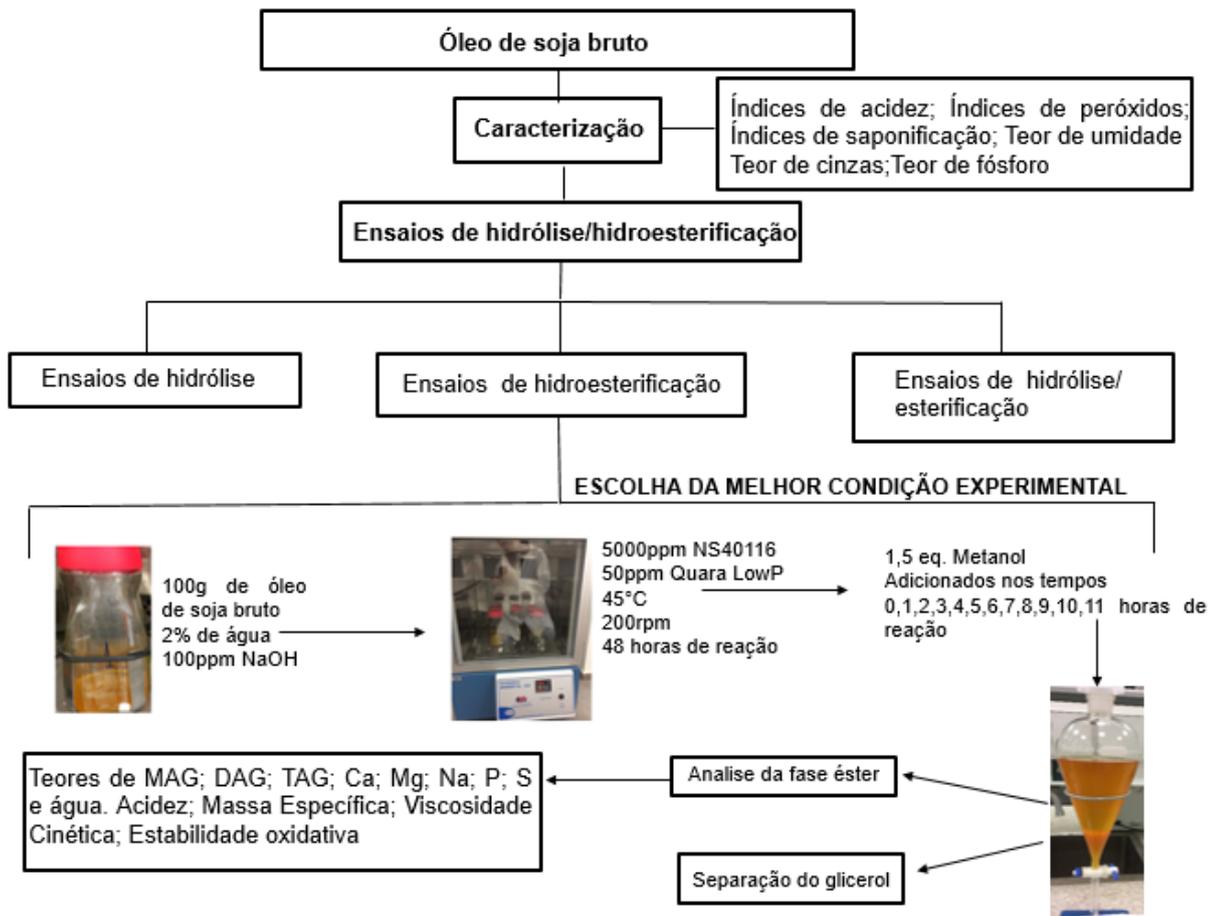
Hipótese

É possível realizar em uma única etapa o processo de hidroesterificação do óleo de soja bruto combinando uma lipase com uma fosfolipase?

Como fazer?

Estudar o processo de hidroesterificação do óleo de soja bruto empregando as enzimas fosfolipase e lipase de forma individual e combinada.

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO TRABALHO



1 INTRODUÇÃO

A importância comercial e econômica da síntese de ésteres metílicos está relacionada à ampla aplicação desses compostos nos diversos tipos de indústrias, podendo-se citar a farmacêutica, alimentícia e cosmética. Além disso, esses ésteres são empregados na obtenção do biodiesel, que se caracteriza como uma alternativa vantajosa para a substituição dos combustíveis de origem fóssil, pois, além de ser obtido a partir de uma biomassa renovável, sua queima emite menor quantidade de gases poluentes e tóxicos (CHEN et al., 2009; MISHRA et al., 2009; FAN; WANG; CHEN, 2011; SOARES, 2014). Os principais componentes do biodiesel são ésteres obtidos a partir de álcoois de cadeia curta e misturas de ácidos graxos de cadeias longas, comumente derivadas de óleos vegetais (Al-Zuhair, 2007; GALLINA, 2011). Porém, outras fontes de ácidos graxos vêm sendo estudadas, por exemplo: as gorduras de origem animal, gorduras provenientes de esgotos, óleos residuais de frituras e borras ácidas provenientes do processo de refino de oleaginosas, com o objetivo de reduzir o custo da produção desse combustível (SOARES, 2014).

Atualmente para a produção industrial deste biocombustível, a transesterificação alcalina é o método mais utilizado, devido à alta eficiência, rapidez e baixo custo. Nesse processo ocorre a reação entre óleos vegetais degomados e/ou gordura animal, com um álcool (geralmente metanol), na presença de um catalisador (hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio), tendo como produtos ésteres metílicos e como co-produto o glicerol (GALLINA, 2011; SOARES, 2014). Porém, nessa reação é necessário o uso de fontes de triacilgliceróis (TAGs) com baixo teor de ácidos graxos livres (AGLs) (< 1%) e umidade (<0,5%). Pois, na transesterificação alcalina, os AGLs consomem o catalisador, resultando em sabão (dificultando a recuperação do biodiesel) e a água pode hidrolisar os TAGs, formando uma emulsão e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento da reação. Fato este que limita a utilização de matérias-primas de baixo custo, que contêm quantidades significativas de AGLs e água (BANKOVIĆ-ILIĆ; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012; DEMIRBAS et al., 2016 ;SOARES, 2014).

Uma alternativa para o método convencional de produção do biodiesel é a hidroesterificação, onde, na etapa de hidrólise os TAGs são convertidos em AGLs, independentemente da acidez e da umidade da matéria-prima. Com este processo pode-se aumentar o rendimento da reação, já que o glicerol é removido na hidrólise. Além disso,

tanto a etapa de hidrólise, quanto à de esterificação, podem ser catalisadas pelas vias química, enzimática e/ou pela combinação das duas vias (SOARES, 2014).

Em relação à catálise enzimática, destaca-se que o uso de enzimas como catalisadores na síntese de biodiesel apresenta diversas vantagens, podendo-se citar a alta eficiência catalítica em condições brandas de reação, biodegradabilidade, reutilização do catalisador e redução do volume de efluentes decorrentes do processo de purificação dos ésteres metílicos (CESARINI et al., 2014).

Apesar das diversas vantagens ambientais relacionadas ao uso e produção do biodiesel, comercialmente ainda se considera mais viável o diesel mineral. Uma vez que o custo médio, para as distribuidoras, desse combustível é de R\$ 2,68 por litro, enquanto o biodiesel custa em torno de R\$ 3,17 por litro (ANP, 2017). O elevado custo do biodiesel está relacionado, principalmente, à matéria prima empregada na sua produção. No 59º Leilão (L59), que visa garantir o abastecimento de biodiesel no mercado nacional durante o período de 01 de março a 30 de abril de 2018, o óleo de soja degomado e neutralizado correspondeu a 65,98% da matéria prima utilizada e, em função dos processos envolvidos na sua obtenção, possui um alto valor agregado (preço médio em 2017 de R\$ 2,20 o litro), o que representa atualmente cerca de 70% dos custos de produção. (ENCARNAÇÃO, 2008; CESARINI et al., 2014; ANP, 2018).

Industrialmente, para a obtenção do óleo de soja degomado, as degomagens com água e ácida são as mais utilizadas. No processo de degomagem à água, é adicionado 1-3% de água ao óleo de soja aquecido (60-70 °C) sob agitação, por um período de aproximadamente 30 minutos. Em seguida, as gomas são separadas por centrifugação (MANDARINO; HIRAKURI; ROESSING, 2015). Porém, esse processo resulta em perdas de rendimento na produção de biodiesel (NOVOZYMES, 2015; MANDARINO; HIRAKURI; ROESSING, 2015; ROSA et al., 2016). Já a degomagem ácida caracteriza-se pela adição de ácido fosfórico 85%, sendo adicionado 01-0,4% do ácido ao óleo bruto, em temperatura de 60-65 °C, a separação da goma é realizada via centrifugação ou ainda através de filtração. Porém, há geração de efluente aquoso, cujo tratamento onera o processo.

Diante do exposto, a sustentabilidade da cadeia de produção de biodiesel, passa, primordialmente, pelo desenvolvimento de processos economicamente e ambientalmente viáveis, pautados na utilização de matérias-primas de baixo custo e não comestíveis, como o óleo de fritura, resíduos graxos industriais, óleo de soja bruto, etc. Dentre as matérias-primas de baixo custo, destaca-se o potencial do óleo de soja bruto, óleo extraído a partir

de flocos de soja, utilizando o hexano como solvente. Enquanto que, o óleo de soja degomado, utilizado atualmente na produção de biodiesel, é obtido a partir do óleo de soja bruto, do qual a maior parte das gomas naturais (fosfolipídios) é removida pelo processo de degomagem. Atualmente, óleo de soja degomado apresenta-se como matéria-prima para uma série de segmentos como: Matéria prima para a produção de Biodiesel, Ingrediente para Alimentação Animal e Matéria prima para Indústrias de Refino de óleo vegetal. Já óleo de soja bruto, para ter mercado, precisa de uma etapa adicional de degomagem.

Neste contexto, evidencia-se a potencialidade da produção de biodiesel por hidroesterificação, processo caracterizado por uma etapa de hidrólise que antecede a esterificação. Na hidrólise, gera-se glicerina e ácidos graxos, além disso a hidrólise aumenta a acidez da matéria-prima. Esse processo possibilita o emprego de matérias-primas de menor custo, ou seja, com elevado índice de acidez e umidade. Além disso, a hidroesterificação pode ser catalisada por via química, por via enzimática, ou ainda pela combinação das duas vias (SOARES, 2014). Entretanto, a catalise enzimática exhibe algumas vantagens, como por exemplo, biodegradabilidade do catalisador, uso de condições brandas de temperatura e pH refletindo em menor degradação do produto, solubilidade em meios aquosos, etc. (FILHO; VIEIRA, 2002; POPIOLSKI, 2011).

Diante dessas considerações, propõe-se nesse trabalho a produção de ésteres metílicos por meio do processo de hidroesterificação do óleo de soja bruto, utilizando como catalisadores uma lipase, com a capacidade de hidrolisar óleos vegetais, e uma fosfolipase, com elevada atividade enzimática sobre fosfolipídios. Possibilitando através desse processo uma maior liberação de óleo neutro e ácidos graxos livres, redução da formação de gomas e sabão e conseqüentemente não sendo necessário o uso de produtos químicos para degomagem (NOVOZYMES,2017), conseqüentemente tornando o processo de obtenção desses ésteres metílicos menos oneroso.

2. OBJETIVOS

Esta seção apresenta o objetivo geral e os objetivos específicos propostos neste trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma alternativa ao método convencional de produção de ésteres metílicos a partir do óleo de soja degomado e neutralizado ao substituí-lo pelo processo de hidroesterificação do óleo de soja bruto, empregando como catalisador as enzimas comerciais fosfolipases e lipases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atender o objetivo geral, procuram-se cumprir as seguintes etapas:

- Caracterizar a matéria-prima quanto aos índices de acidez, peróxidos, saponificação, teores de fósforo, umidade e cinzas;
- Realizar ensaios de hidrólise do óleo bruto com a enzima fosfolipase para liberação dos grupos fosfatos, avaliando a influência das variáveis concentração de enzima, temperatura;
- Investigar as variáveis concentração de enzima na reação de hidroesterificação do óleo de soja bruto empregando uma lipase comercial;
- Avaliar o processo de hidroesterificação do óleo de soja bruto combinando as enzimas fosfolipase e lipase em uma única etapa;

3. JUSTIFICATIVA

A humanidade faz uso de combustíveis desde a antiguidade, por exemplo, a queima da madeira, contudo com a Revolução Industrial, houve um grande aumento na busca por novos combustíveis. Assim, aumentou-se drasticamente a exploração de recursos naturais como o carvão mineral, o petróleo e a madeira (RODRIGUES, 2007; CHRISTOPHER, KUMAR, ZAMBARE, 2014).

Embora tenha contribuído para o desenvolvimento do setor industrial, de transporte, agrícola e de alimentos, a exploração dos recursos naturais, desvinculada da preservação ambiental, trouxe prejuízos ao meio ambiente. Essas consequências ao ambiente foram causadas tanto pelos processos de extração dos combustíveis fósseis quanto pela poluição devido aos produtos da queima destes combustíveis. Além do intenso desenvolvimento tecnológico observa-se, nas últimas décadas, um grande aumento na população mundial, dessa maneira, para suprir as necessidades energéticas ampliou-se o consumo de energia. Porém, a maior parte da energia produzida e utilizada é de origem fóssil, podendo-se destacar o carvão mineral, petróleo, gás natural e urânio (RODRIGUES, 2007; GALLINA, 2011; RAMOS *et al.*, 2017).

Nesse contexto, tornou-se crescente a busca pela produção de energias através de fontes renováveis, com o objetivo de substituir gradativamente as fontes de energias não renováveis, particularmente o diesel de petróleo. Atualmente o setor de biocombustíveis é de grande interesse para a sociedade mundial. Pois além de serem obtidos a partir da biomassa renovável, sua combustão emite menor quantidade de gases tóxicos e poluentes. No Brasil, evidenciam-se estudos voltados ao etanol, biodiesel, biogás e bio-H₂. Dentro das propostas de combustível renovável, destaca-se o biodiesel (monoésteres alquílicos) como uma vantajosa proposta em substituição ao diesel convencional (RODRIGUES, 2007; RAMOS *et al.*, 2003; CHRISTOPHER, KUMAR, ZAMBARE, 2014).

Apesar do biodiesel ser de origem renovável e sua queima emitir menores quantidades de gases tóxicos, economicamente esse biocombustível não é competitivo ao diesel mineral (ANP, 2018). Isso ocorre devido ao elevado custo do processo de produção do biodiesel empregado industrialmente, pois, embora a transesterificação alcalina de óleos possibilite altos rendimentos de ésteres metílicos e/ou etílicos, esse método empregada matérias-primas de custo elevado (baixos teores de AGL e umidade), além disso, é necessário o tratamento dos efluentes gerados na purificação dos ésteres, o que também contribui para a elevação do custo do processo (PARENTE, 2003; RAMOS *et al.*, 2017).

Atualmente, muito em função da variação do preço da soja e do metanol no mercado nacional, estima-se que a matéria-prima pode representar de 50 a 85% do custo total do biodiesel, nesse sentido o uso do óleo de soja bruto como matéria-prima contribui para a redução do custo do biodiesel (CHEN *et al.*, 2009; SOARES, 2014). Porém, o óleo de soja bruto caracteriza-se por apresentar elevados teores umidade e fósforo, o que pode acarretar em dificuldades no armazenamento, devido à formação de precipitado e acumulação de água. Além disso, a presença de quantidades elevadas de fósforo facilita a formação de emulsão, dificultando a separação e causando perdas de rendimento (CESARINI *et al.*, 2014; DEMIRBAS *et al.*, 2016). Uma alternativa para os problemas impostos pelo método tradicional de síntese de biodiesel é a hidroesterificação enzimática, pois nesse processo pode-se utilizar matérias-primas de baixo custo, sem interferências em relação a acidez e umidade.

A síntese de biodiesel por hidroesterificação apresenta diversas vantagens em relação ao processo tradicional, uma vez que o biodiesel gerado apresenta elevada pureza, resulta em um aumento do rendimento da reação, não há necessidade de lavagem, conseqüentemente menor geração de efluentes. Além disso, quando empregado enzimas como catalisadores tem-se condições brandas de reação, biodegradabilidade do catalisador e não ocorre a produção de produtos secundários, devido à alta especificidade das enzimas (ENCARNAÇÃO, 2008; NOVOZYMES, 2015). Assim, enfatiza-se a importância de estudos que possibilitem compreender o processo de hidroesterificação enzimática de óleos brutos, buscando produzir ésteres metílicos de alta qualidade, obter elevados rendimentos e redução dos custos de produção do biodiesel, a fim de que esse biocombustível se torne mais competitivo ao diesel derivado do petróleo.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção apresenta-se a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre: Aplicação industrial dos ésteres; Biodiesel; Matérias-primas; Métodos empregados na síntese de biodiesel; Enzimas; Lipases e fosfolipases; Catálise enzimática e Degomagem enzimática.

4.1 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DOS ÉSTERES

A produção de ésteres pode ocorrer através de diferentes metodologias, podendo-se citar a reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação); através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados ou ainda através de reações de interesterificação, reações de trocas de grupos acilas entre ésteres e ácidos carboxílicos (acidólise), entre ésteres e álcoois (alcólise) ou gliceróis (glicerólise) e entre ésteres (transesterificação) (ADACHI; KOBAYASHI, 2005; GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOĞLU, 2002; POPIOLSKI, 2011).

Os produtos obtidos por meio dessas metodologias apresentam uma vasta aplicação industrial. Os ésteres obtidos a partir de ácidos e álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são importantes componentes de aromas e flavorizantes utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Por outro lado, os ésteres de esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) com álcoois de cadeia longa são empregados como lubrificantes e plastificantes em máquinas de alta precisão. Já os ésteres resultantes das reações entre ácidos de cadeia longa com álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são empregados nas indústrias como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e em medicamentos (GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOĞLU, 2002; POPIOLSKI, 2011).

Além disso, esses ésteres são aplicados na obtenção do biodiesel, uma alternativa promissora para a substituição dos combustíveis fósseis, nesse caso o diesel de petróleo.

4.2 BIODIESEL

De acordo com a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, define-se biodiesel como um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração

de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (ANP, 2005).

O uso de óleos vegetais como matéria-prima para produção de combustíveis a serem utilizados em motores de compressão se iniciou em 1900, quando Rudolph Diesel apresentou, na Exposição Mundial de Paris, um protótipo de motor acionado com óleo de amendoim (obtido por transesterificação). Entretanto, a grande oferta de petróleo, seu menor preço e a elevada viscosidade dos óleos vegetais determinaram a preferência pelos derivados do petróleo como combustíveis (LUCENA, 2004; RODRIGUES, 2007; POPIOLSKI, 2011).

Porém, durante a Segunda Guerra Mundial, houve inativação do abastecimento de combustíveis fósseis, estimulando pesquisas na busca por fontes alternativas de energia. Entretanto, no final da Guerra, o restabelecimento do fornecimento de petróleo e importação dessa fonte de energia do Oriente médio com baixos valores, desestimulou novamente o uso de outros combustíveis (LUCENA, 2004; POPIOLSKI, 2011).

Já em 1973 devido à crise do petróleo várias universidades brasileiras voltaram-se a estudar a produção de combustíveis a partir de matérias-primas vegetais para substituir o diesel. No ano de 1979 pesquisas realizadas na Universidade Federal do Ceará (UFC) resultaram em um novo combustível obtido através de óleos vegetais e com propriedades semelhantes às do óleo diesel derivado do petróleo, o biodiesel obtido pelo processo de transesterificação (PARENTE, 2003; POPIOLSKI, 2011).

No intuito de incentivar a produção de biodiesel em 2004, no Brasil, criou-se o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, com o objetivo de implementar a produção de biodiesel de forma sustentável, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional (POPIOLSKI, 2011). De acordo com a lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, estabeleceu-se um percentual mínimo obrigatório de 2%, em volume de biodiesel no diesel. Porém, com o passar dos anos esse percentual foi sendo aumentado, em 2014, através da Lei nº 13.033 estabeleceu-se um cronograma, acordo com qual até março de 2017 o óleo diesel comercializado no país deve conter 8% de biodiesel (ANP, 2017). Atualmente todo o diesel comercializado no território nacional possui 10% de biodiesel, sendo este percentual antecipado de 2019 para 1º de março de 2018, por decisão do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) em novembro de 2017. (AGÊNCIA BRASIL, 2018).

O Brasil exibe um grande potencial para produção de biodiesel, pois possui abundância em terras cultiváveis e etanol, além de uma vasta diversidade vegetal. Em 2016, a produção de biodiesel foi de 3.801,339 m³ e a produção de 2017 foi de 4.300 m³. Para a produção de 2018, estima-se um total de 4.500 m³, podendo este valor ser ampliado em função do aumento da atividade econômica do país. Destaca-se que atualmente o país é o segundo maior consumidor de biodiesel no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos da América (ANP, 2018).

4.3 MATÉRIAS-PRIMAS

O biodiesel é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa. Esse combustível, renovável e biodegradável, é comumente produzido a partir de uma reação de transesterificação, entre óleos ou gorduras com um álcool primário de cadeia curta na presença de um catalisador (SOARES, 2014; GALLINA, 2011).

Dentre aos álcoois empregados na síntese de biodiesel, o metanol é o mais utilizado, por apresentar maior reatividade e menor custo, como pode ser observado na Figura 1. Porém apresenta maior toxicidade e maior risco de explosão quando comparado ao etanol. Além disso, o metanol é obtido principalmente a partir de gases derivados do petróleo. Já o etanol é obtido principalmente através do grão do milho e a cana-de-açúcar (fontes renováveis) (SOARES, 2014).

Figura 1. Preços de Insumos no Produtor: Metanol x Etanol anidro

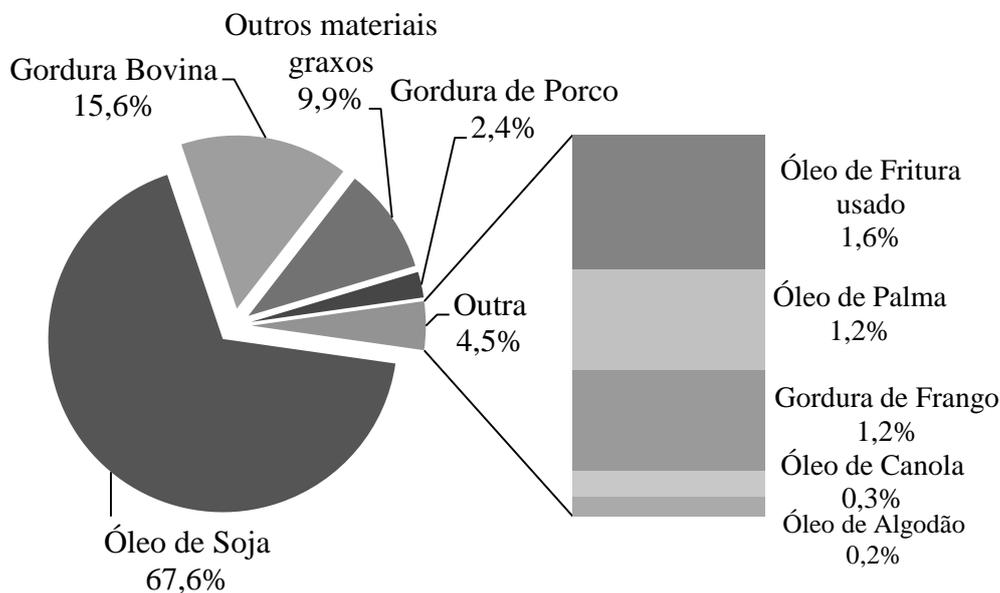


Fonte: MME, 2017

Em relação às fontes de ácidos graxos empregadas na síntese do biodiesel, estas podem ser óleos vegetais, gorduras animais, óleos de reuso e resíduos graxos. No Brasil,

dentre as matérias-primas, de origem vegetal, destaca-se a transesterificação de óleos como o de soja, girassol, algodão, amendoim, canola e palma (CESARINI *et al.*, 2014; DEMIRBAS *et al.*, 2016; ANP, 2017). No entanto, para a produção industrial, o óleo de soja degomado e neutralizado é o mais empregado, representando mais de 65% da matéria-prima utilizada na produção biodiesel no país, fato que pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Matérias-primas empregadas para a produção de biodiesel no Brasil no 1º Trimestre de 2018



Fonte: ANP, 2018

Sabe-se que o óleo de soja corresponde a aproximadamente 90% do óleo vegetal produzido no país. A soja representa a maior parcela do óleo vegetal produzido no Brasil, devido a diversas razões dentre as quais pode-se citar a cadeia produtiva bem estruturada, tecnologias de produção modernas; rápido retorno do investimento (ciclo de 4 a 5 meses) e é um dos óleos mais baratos. Além disso, a soja pode ser armazenada por longos períodos, aguardando a melhor oportunidade para venda (DALL'AGNOL, 2007).

Adicionalmente a esses fatores, a soja é um produto de fácil comercialização, uma vez que são poucos os produtores mundiais (EUA, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai) e exportadores (EUA, Brasil, Argentina e Paraguai), porém todos os países são compradores (DALL'AGNOL, 2007). Os aspectos expostos acima somados à boa estabilidade do óleo e ao seu baixo teor de AGL justificam o fato do óleo de soja ser o mais

utilizado na síntese de biodiesel, porém, isso resulta em um aumento do custo de produção do biodiesel.

Destaca-se que a síntese do biodiesel através da transesterificação alcalina, método mais empregado industrialmente, possui a necessidade de o material de partida apresentar teores mínimos de AGLs (abaixo de 1%) e de água (abaixo de 0,5%). Uma vez que a presença de AGLs leva à formação indesejável de sabões e a presença de água pode levar à hidrólise dos TAGs, o que se caracteriza como a principal dificuldade de se utilizar materiais graxos residuais (BANKOVIĆ-ILIĆ; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012; SOARES, 2014).

Sabe-se que a matéria-prima pode representar 50 a 85% do custo total do biodiesel, nesse sentido a escolha do material de partida é um fator que deve ser avaliado em relação ao custo, rendimento, qualidade e aproveitamento dos subprodutos (CHEN *et al.*, 2009; SOARES, 2014). Devido a isso, compreende-se que o uso de matérias-primas residuais ou não refinadas contribui para a redução do custo do biodiesel e dos impactos ambientais, tornando-o mais competitivo comercialmente.

Nesse contexto, o uso de óleo de soja bruto caracteriza-se como um substrato vantajoso para a síntese enzimática de biodiesel, entretanto o óleo de soja bruto apresenta uma quantidade relativamente elevada de fósforo, geralmente tem um teor de 400 a 1.200 ppm e um percentual de 1-3% de fosfatídeos, o que pode acarretar em dificuldades no armazenamento, devido à formação de precipitado e acúmulo de água (CESARINI *et al.*, 2014; DEMIRBAS *et al.*, 2016).

Devido a isso, os fosfolipídios são geralmente removidos por degomagem de natureza física ou química, que acabam onerando o processo de produção do biodiesel. Porém, estudos anteriores mostraram que a degomagem enzimática exhibe diversas vantagens, pois, evita o tratamento ácido usado para a remoção de gomas, consequente evita a neutralização e a alta temperatura utilizada nos sistemas. Além disso, proporciona uma boa redução do teor de fósforo, tornando o processo mais ecológico e com maior rendimento (CESARINI *et al.*, 2014).

Cesarini, Diaz e Nielsen (2013) avaliaram o desempenho de uma lipase líquida *Callera Trans L* (EP 258068, Novozymes) para a produção de ésteres metílicos. As misturas reacionais empregadas consistiram em 20 g de óleo de soja em bruto, 1% (m/m, em base de óleo) de solução *Callera Trans L* e diferentes quantidades de água: 3%, 5%, 10%, 15%

(m/m, em base de óleo). A melhor conversão em ésteres metílicos foi de 96%, obtida quando empregadas concentrações baixas de água (3-5%).

Cesarini e colaboradores (2014) utilizaram uma combinação de fosfolipases (*Lecitase Ultra*, *LLPL-2* e *PLC*) e uma lipase líquida (*Callera Trans L*), com o objetivo de realizar a degomagem e a transesterificação do óleo de soja bruto em uma única etapa, os autores alcançaram uma transformação completa em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs > 95 %) e uma boa redução de fósforo ($P < 5$ ppm). No procedimento experimental as enzimas (lipases e fosfolipases) foram adicionados ao mesmo tempo em 20 g de óleo, foram adicionados 3,5 % de água destilada, 10 ppm de NaOH e 1,5 eqs de óleo de metanol, bombeado em um gradiente linear durante 10 h, a 35 °C com agitação de 250 rpm em shaker. Dessa maneira, pode-se afirmar que ao contrário da produção química, o processo de produção enzimática de biodiesel não é prejudicado pelas altas concentrações de AGLs, permitindo o uso de matérias-primas de baixo custo, no caso o óleo de soja bruto.

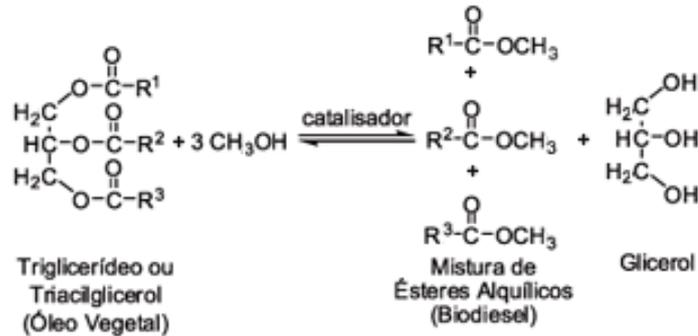
4.4 MÉTODOS EMPREGADOS NA SÍNTESE DE BIODIESEL

A síntese de ésteres alquílicos pode ocorrer através de diferentes metodologias, como as reações de esterificação, acidólise, alcólise, glicerólise e transesterificação (ADACHI; KOBAYASHI, 2005; GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOĞLU, 2002; POPIOLSKI, 2011).

Industrialmente o método mais empregado para a síntese de biodiesel é a transesterificação com catalisador básico homogêneo. Por meio deste processo os rendimentos obtidos são superiores a 95% em até 1 h de reação, com uma razão molar de TAG:metanol de 1:6 (excesso de metanol) (RAMOS *et al.*, 2011; SOARES, 2014).

A transesterificação consiste na reação entre triglicerídeos e álcool (comumente metanol e etanol) em presença de catalisador, Figura 3. Essa reação acontece em três etapas, tendo como intermediários diacilgliceróis e monoacilgliceróis, subproduto o glicerol e como produtos ésteres metílicos ou etílicos (ENCARNAÇÃO, 2008; SOARES, 2014).

Figura 3. Representação da transesterificação de um TAG com metanol

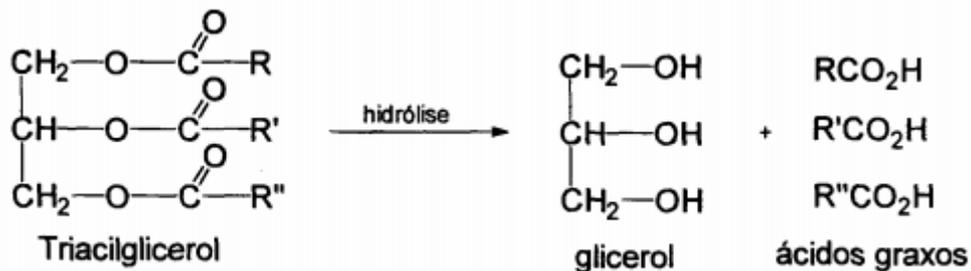


FONTE: REINALDI et al.,2007

A síntese industrial do biodiesel via transesterificação envolve diversas etapas sendo elas, a preparação da matéria-prima, reação, separação de fases, recuperação e desidratação do álcool, purificação dos produtos e sub-produtos. Porém, na produção de biodiesel através da transesterificação gera-se resíduos de difícil tratamento. Além disso, a transesterificação limita-se ao uso de matérias primas com baixo teor de ácidos graxos livres e umidade, dificultando o emprego de substratos de baixo valor agregado (PARENTE, 2003).

Uma alternativa para os problemas impostos pela transesterificação é o processo de hidroesterificação, no qual pode-se utilizar qualquer matéria prima, independentemente de sua acidez e teor de umidade. Esse método caracteriza-se por uma etapa de hidrólise que antecede a esterificação. Na etapa de hidrólise, gera-se glicerina (com elevada pureza) e ácidos graxos, além disso a hidrólise aumenta a acidez da matéria-prima (Figura 4).

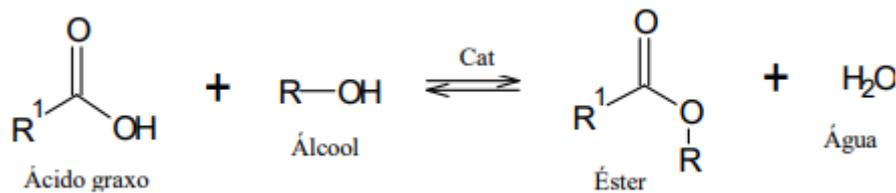
Figura 4. Representação da hidrólise de um TAG



FONTE: FERNANDES, 2002.

Terminada essa etapa, a glicerina é removida e ocorre a esterificação dos ácidos graxos com um álcool (Figura 5). Dessa maneira, a síntese de biodiesel por hidroesterificação apresenta diversas vantagens em relação ao processo tradicional, uma vez que resulta em um aumento do rendimento da reação, não há necessidade de lavagem, conseqüentemente menor geração de efluentes e consumo de reagentes.

Figura 5. Representação da esterificação de um TAG com metanol



FONTE: LEÃO, 2009.

Além disso, a água é o subproduto dessa reação e pode ser reutilizada no processo de hidrólise (ENCARNAÇÃO, 2008). Com relação ao uso de catalisadores, tanto a etapa de hidrólise quanto a de esterificação podem ser catalisadas por via química, por via enzimática, ou ainda pela combinação das duas vias (SOARES, 2014).

4.5 ENZIMAS

As enzimas vêm adquirindo importância na síntese orgânica devido a sua alta seletividade e atividade catalítica. Além disso, apresentam diversas vantagens ambientais, como por exemplo, a biodegradabilidade do catalisador, uso de condições brandas de temperatura e pH refletindo em menor degradação do produto, solubilidade em meios aquosos, etc. (FILHO; VIEIRA, 2002; POPIOLSKI, 2011).

Atualmente, a expansão do mercado de enzimas está relacionada a diversos fatores, dentre os quais pode-se citar, a melhor compreensão da bioquímica de produção, dos métodos de recuperação e a variedade de transformações que as enzimas podem catalisar (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Entende-se por enzimas, proteínas que exibem atividade catalítica sobre as reações biológicas, em condições fisiológicas de atividade iônica, pH, temperatura entre outros. A atividade biológica das enzimas é devida a existência de um centro ativo, comumente

constituído de resíduos de aminoácidos da cadeia proteica e um grupo não-proteico (íons metálicos ou moléculas orgânicas) (LEHNINGER, 1986).

Embora as enzimas possam ser derivadas de animais, plantas e de microrganismos, a maior parte das enzimas empregadas industrialmente é de origem microbiana. Isso ocorre devido ao rápido crescimento dos microrganismos em meios de baixo custo, à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética e ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais (TREICHEL *et al.*, 2010). As enzimas hidrolíticas, (proteases, celulasas, amilases e lipases), são as mais empregadas na química orgânica, por apresentarem ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, não necessitam cofatores e exibem ampla especificidade para substratos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; SOARES, 2014).

4.6 CATÁLISE ENZIMÁTICA

Enzimas são moléculas constituídas por dobraduras de aminoácidos (estrutura tridimensional), na natureza, são responsáveis por catalisar as reações bioquímicas. A maioria das enzimas são solúveis em água e geralmente funcional em um ambiente hidratado (NOVOZYMES, 2015). Os biocatalisadores caracterizam-se por apresentarem regioseletividade e a enantioseletividade, o que resulta em um número reduzido de subprodutos, além disso, as enzimas necessitam de condições brandas de temperatura e pressão, exibindo assim diversas vantagens em relação aos catalisadores ácidos e básicos (FACIOLI; GONÇALVES, 1998; CASTRO *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2011; SOARES, 2014).

Em relação à síntese de biodiesel, o uso de enzimas como catalisadores permite produzir biodiesel de alta qualidade a partir de óleos residuais e não-alimentícios. Pois, a atividade da enzima independe da concentração de AGLs no óleo e permanece eficiente num ambiente contendo umidade. Além disso, o catalisador enzimático é altamente específico, assim, a transesterificação enzimática não produz produtos secundários indesejados, tais como compostos de oxidação (NOVOZYMES, 2015).

Embora a produção de biodiesel por hidroesterificação catalisada por enzimas ainda não tenha sido desenvolvida comercialmente, há um crescente interesse em compreender as condições ótimas para o desenvolvimento deste processo, na busca por

tornar a produção de biodiesel por hidroesterificação economicamente competitiva com o método convencional. Fato que pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Estudos de produção de ésteres metílicos/ etílicos por hidroesterificação enzimática

Referência	(ADACHI <i>et al.</i> , 2013)	(AGUIEIRAS <i>et al.</i> , 2014)	(ZENEVIC Z <i>et al.</i> , 2014)	(LENZI, 2017)
Catalisador/Hidrólise	Lipase proveniente de <i>Candida rugosa</i>	Enzima vegetal ¹	Lipozyme TL IM	NS-40116
Conversão e tempo	*,24 h	99,6%, 6h	*, *	*,24h
Catalisador/ Esterificação	Lipase proveniente de <i>Aspergillus oryzae</i>	Sólido fermentado seco ²	<i>Novozym 435 e Lipozyme TL IM.</i>	NS-40116
Conversão e tempo	90-93%,*	91%, 8h	91%, *	72,8%, 24h

* Não informado pelos autores. ¹Obtida a partir de sementes de mamona. ² Com atividade de lipase de *Rhizomucor miehei*.

Através dos estudos realizados anteriormente, observa-se que as enzimas podem catalisar tanto a etapa de hidrólise quanto de esterificação, sem problemas de inativação pelo metanol, nesta última etapa. Em trabalhos realizados por Watanabe *et al.* (2007) e Adachi *et al.* (2013) adicionaram-se na reação de esterificação catalisada por lipases provenientes de *C. antarctica* e *Aspergillus oryzae* respectivamente, metanol, nas razões molares 5:1 e 1,5:1, em uma única etapa e obtiveram elevados rendimentos, 96% e 90-93% de conversão em 24 h e 10 h. Desta maneira, percebe-se o potencial do uso de lipases para a produção de ésteres metílicos e etílicos via hidroesterificação. Uma vez que, na etapa de hidrólise, as lipases possibilitam uma boa conversão de AGLs, além disso, na esterificação resulta em satisfatórias conversões em ésteres metílicos e etílicos (SOARES, 2014).

Dessa maneira, as enzimas caracterizam-se como eficientes catalisadores, uma vez que catalisam várias reações de forma seletiva e específica, em condições brandas de temperatura, resultando em elevados rendimentos, devido a não ocorrência de reações paralelas (DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

4.7 LIPASES E FOSFOLIPASES

Lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de TAGs de cadeia longa (trioleína), tendo como produto os ácidos graxos correspondentes e como subproduto o glicerol. As lipases destacam-se também por catalisar outras reações, como as de esterificação, transesterificação, interesterificação, entre outras (DIAZ *et al.*, 2006; JAEGER; EGGERT, 2002; SOARES, 2014). Além disso, essas enzimas não requerem cofatores, são de baixo custo, regioespecíficas, atuam em uma larga faixa de pH (POPIOLSKI, 2011).

Sarda e Desnuelle, em 1958, caracterizaram lipases a partir da propriedade de ativação na presença de ésteres emulsionados. Esse fenômeno foi explicado devido ao fato de que a maioria das lipases apresenta seu sítio ativo protegido por uma cadeia peptídica hidrofóbica denominada *lid* (espécie de “tampa”), que se move quando encontra uma molécula hidrofóbica na interface, ocasionando mudanças na sua estrutura, assim expondo o sítio ativo. Essa ativação na presença de interface lipídeo/água é conhecida como ativação interfacial. Porém, sabe-se hoje que a presença da *lid* não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Dessa maneira, a ativação interfacial e presença da *lid* não são critérios adequados para classificar uma enzima como sendo uma lipase (ALOULOU *et al.*, 2006).

Atualmente as lipases são definidas como carboxilesterases que hidrolisam TAGs constituídos de ácidos graxos de cadeia longa. Enquanto que as enzimas que hidrolisam TAGs compostos de ácidos graxos de cadeia curta são reconhecidas como as esterases-carboxil éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3. Embora a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, o inverso não acontece (NELSON, FOGLIA e MARMER, 1996; CASTRO-OCHOA *et al.*, 2005).

A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40 °C, massa molecular entre 20 e 60 kDa, apresentam alta atividade na faixa de pH 5 a 9,

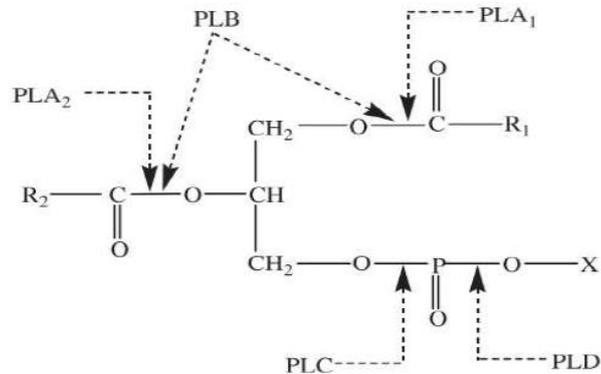
com um máximo situado entre 6 e 8 e não requerem cofator (CARVALHO *et al.*, 2003; GHANEM, e ABOUL-ENEIN, 2005).

As lipases também apresentam sempre algum tipo de especificidade como a quimioespecificidade, regioespecificidade e estereoespecificidade. A quimioespecificidade está relacionada com as diferentes taxas de atividade enzimática exibidas por uma mesma lipase em relação a diferentes substratos. Dessa forma, as lipases podem apresentar especificidade por tri, di e monoacilgliceróis e outros ésteres de ácido graxo formados pela mesma molécula de ácido carboxílico, além disso, podem diferenciar moléculas de ácido graxo de diferentes tamanhos de cadeia, de diferentes níveis, posição de insaturação entre outros. A regioespecificidade se refere às diferentes atividades enzimáticas apresentadas pela mesma lipase sobre as distintas posições do ácido graxo no triacilglicerol. Já a estereoespecificidade relaciona-se com as diferentes taxas de atividade enzimática apresentada por uma mesma lipase sobre distintos isômeros de uma molécula (VILLENEUVE, 2003).

Dentre as lipases, uma enzima que vem despertando interesse é a NS40116, uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* que caracteriza-se por sua elevada estabilidade, o que possibilita seu emprego na forma livre. Esta enzima possui uma vasta aplicação industrial, sendo utilizada na produção de ésteres metílicos, na fabricação de pesticidas e medicamentos (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Outro grupo de enzimas de importantes aplicações industriais são as fosfolipases, caracterizadas por hidrolisar a ligação éster de fosfolipídeos. A classificação das fosfolipases baseia-se no local de hidrólise, sendo divididas em fosfolipases A, B, C e D. As fosfolipases A (PLA₁ ou PLA₂) são enzimas capazes de remover os ácidos graxos dos fosfolipídeos, a classificação como sendo 1 ou 2 está relacionada à posição do ácido graxo removido, já as fosfolipases B (PLB) são responsáveis por remover os ácidos graxos remanescentes. A fosfolipase C (PLC) possui a capacidade de remover o grupo "fosforo-éster" e gerar um DAG para cada molécula de fosfolipídeo que reagiu. A fosfolipase D (PLD) é conhecida por catalisar a hidrólise da ligação fosfodiéster de glicerofosfolípidos (DE MARIA *et al.*, 2007; AMARAL *et al.*, 2014). Na Figura 6 pode-se visualizar os locais de ação das enzimas A-D.

Figura 6. Locais de ação das fosfolipases PLA (1 e 2), PLB, PLC e PLD em um fosfolípido. Onde X= H, colina, etanolamina, inositol, serina, etc.



Fonte: JIANG, F. *et al.*, 2011

Entre as fosfolipases aplicadas industrialmente, destaca-se a potencialidade da enzima Lecitase Ultra, que por ser obtida artificialmente através da fusão da *Thermomyces lanuginosus* e genes fosfolipases de *Fusarium oxysporum* apresenta propriedades tanto de lipase quanto de fosfolipase A1, atuando em moléculas de triglicerídeos e fosfolípidios. (GONÇALVES *et al.*, 2016). Outra fosfolipase interessante para a produção de biodiesel é a Quara LowP, pois, apresenta elevada atividade enzimática sobre fosfolípidios. Possibilitando dessa maneira, ganhos no rendimento e redução da formação de gomas e sabões (NOVOZYMES, 2018).

De maneira geral, as lipases e fosfolipases apresentam várias características que as tornam interessantes para as indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos, farmacêuticas e de síntese orgânica. Dentre as quais pode-se citar, o fato de atuarem sobre substratos pouco solúveis em água e em interfaces de lipídeo/água. Além disso, as lipases exibem habilidade para realizar biotransformações altamente específicas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SHU *et al.*, 2010; POPIOLSKI, 2011).

4.8 DEGOMAGEM ENZIMÁTICA

A degomagem é realizada com o objetivo de retirar os fosfatídeos (um dos constituintes das gomas) dos óleos brutos, uma vez que os fosfolípidios diminuem o rendimento da produção do biodiesel bem como, prejudicam a qualidade do produto. O princípio do processo de degomagem baseia-se em alterar a hidrofobicidade das gomas,

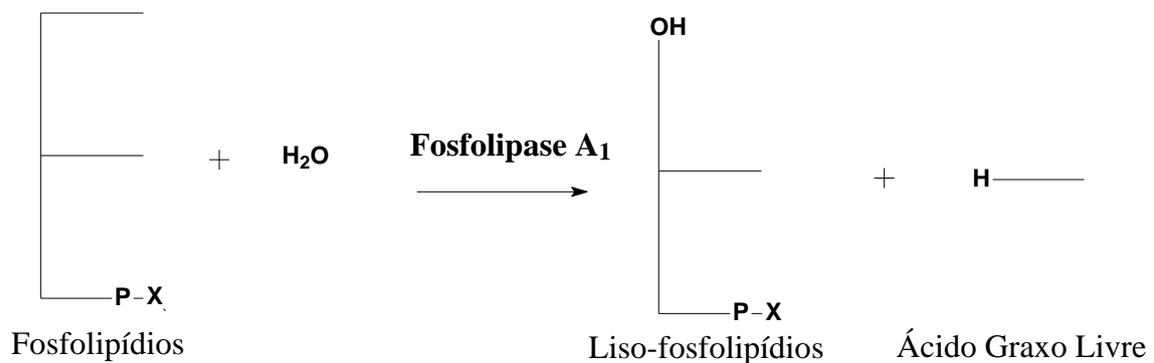
tornando-as hidratáveis dessa maneira, facilitando sua separação (MANDARINO; HIRAKURI; ROESSING, 2015; ROSA *et al.*, 2016).

Industrialmente os métodos mais empregados são a degomagem com água e ácida, devido ao baixo custo. Na degomagem à água, é adicionado 1-3% de água ao óleo de soja aquecido (60-70°C) sob agitação, por um período de aproximadamente 30 minutos. Em seguida, as gomas são separadas por centrifugação (MANDARINO; HIRAKURI; ROESSING, 2015). Porém, esse processo de degomagem produz uma fração de goma com um teor significativo de óleo, assim, estas gomas são retiradas transportando uma quantidade do óleo com elas, resultando em perdas de rendimento na produção de biodiesel (NOVOZYMES, 2015; MANDARINO; HIRAKURI; ROESSING, 2015; ROSA *et al.*, 2016).

A degomagem ácida emprega ácido fosfórico 85%, sendo adicionado 01-0,4% do ácido ao óleo bruto, em temperatura de 60-65 °C, a separação da goma é realizada via centrifugação ou ainda através de filtração. Porém, há produção de resíduos, cujo tratamento onera o processo.

Uma vantajosa substituição aos processos de degomagem tradicionalmente empregados é a degomagem enzimática. Normalmente utiliza-se uma fosfolipase com o objetivo de alterar a hidrofobicidade das gomas. Por exemplo, as fosfolipases A₁ hidrolisaram os fosfolipídios na posição A₁, como pode ser observado na Figura 7, produzindo fosfolipídios hidratáveis que poderão ser removidos por lavagem com água.

Figura 7. Representação da degomagem enzimática.



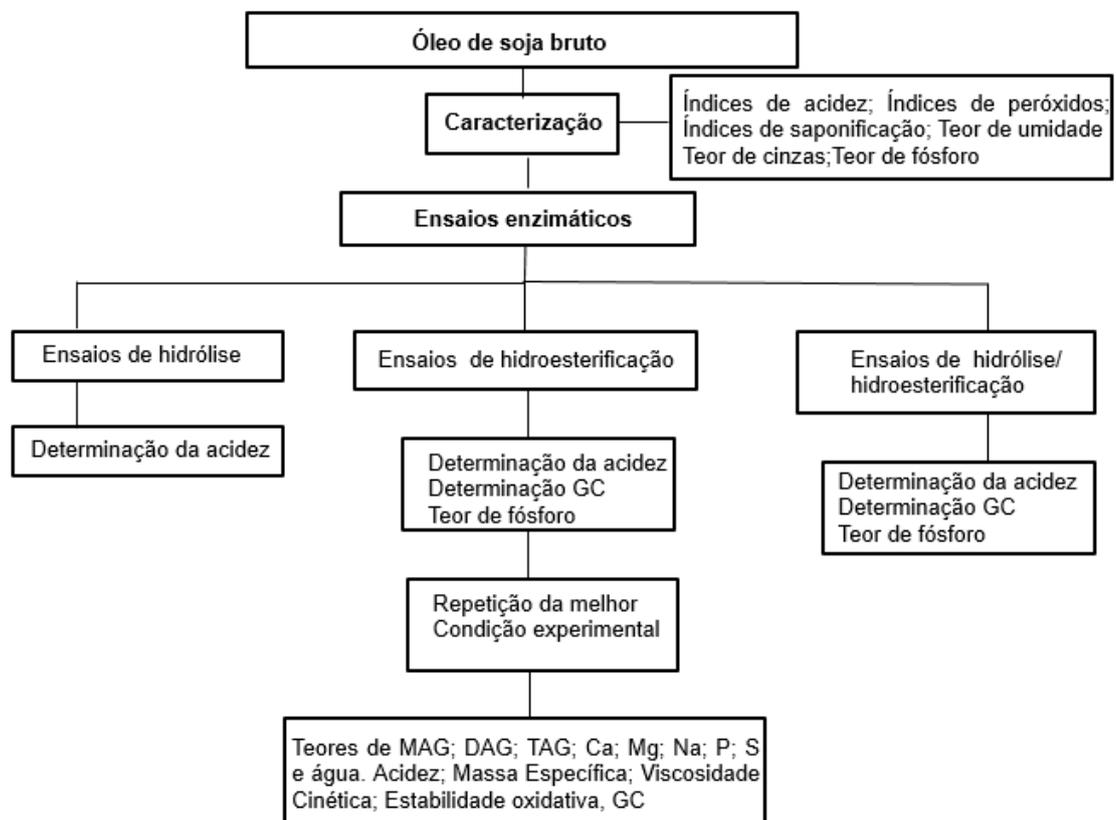
Fonte: COWAN, 2013

Como a goma adquire um caráter mais hidrofílico, as perdas de óleo são reduzidas (COWAN, 2013).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção aborda o desenvolvimento das etapas deste trabalho referente à caracterização da matéria-prima (índices de acidez, peróxidos, saponificação e os teores de umidade, cinzas e fósforo) e ao estudo da produção enzimática de ésteres metílicos, utilizando como catalisadores uma fosfolipase e uma lipase, ambas enzimas comerciais. As análises foram realizadas na Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Chapecó/SC*. Na Figura 8 pode-se visualizar uma representação simplificada da metodologia que será empregada.

Figura 8. Representação geral da metodologia.



Fonte: Elaborado pela autora

5.1 MATERIAL

5.1.1 Enzimas

Fosfolipases Quara LowP, Lecitase Ultra e lipase NS 40116, ambas solúveis, produzidas e gentilmente cedidas pela Novozymes® (Dinamarca).

5.1.2 Reagentes

- Heptano (Vetec, 99,5%);
- Derivatizante MSTFA (N-methy-N-trimethylsilyltrifluoroacetamida);
- Solução de éter-álcool (2:1);
- Fenolftaleína;
- Hidróxido de sódio (NaOH);
- Solução de Ácido Acético-Clorofórmio 3:2;
- Iodeto de potássio (KI);
- Tiosulfato de Sódio (Na₂S₂O₃) 0,1 M;
- Solução de Amido 1%;
- Solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH);
- Ácido clorídrico (HCl) 0,5 M;
- Acetona;
- Solução de etanol/éter etílico (1:1 v/v);
- Heptano;
- Éter de petróleo;
- Ácido nítrico (HNO₃) concentrado;
- Fosfato ácido de potássio (KH₂PO₄);
- Molibdato de amônio [(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O]
- Vanadato de amônio (NH₄VO₃).

5.1.3 Substratos

- Óleo de soja bruto, gentilmente cedido pela empresa Olfar S/A – Alimento e Energia;
- Álcool metílico (Vetec, 99,9%);
- Água destilada.

5.1.4 Padrões químicos

- 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);

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 Ensaios de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto

As reações de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto foram realizadas por meio de agitação orbital, utilizando Shaker (SOLAB, Incubadora Shaker SL-223) com controle de agitação e temperatura, Figura 9.

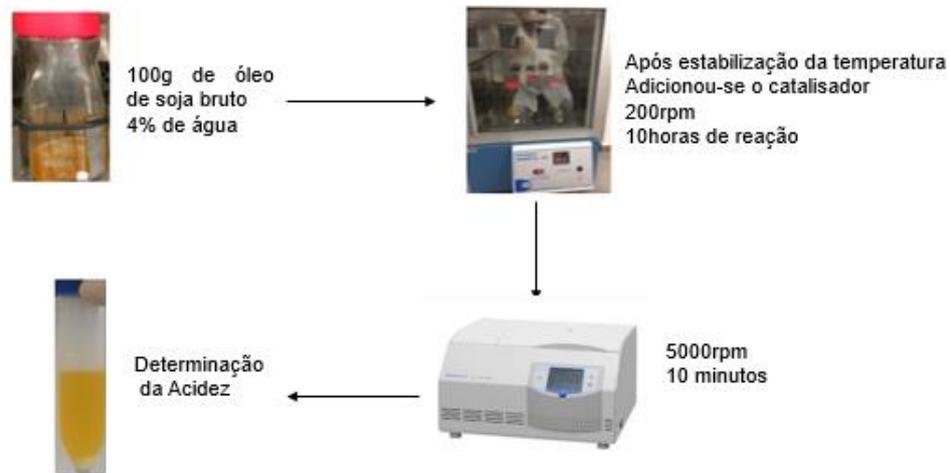
Figura 9. Shaker empregado nos ensaios enzimático.



Fonte: <http://www.prismalab.com.br>

Para os ensaios de hidrólise empregou-se as seguintes condições, pesou-se 100 g de óleo de soja bruto em Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 4% de água, a 200 rpm (Figura 10).

Figura 10. Procedimento empregado nos ensaios de hidrólise



Fonte: Elaborado pela autora.

No decorrer da reação, a cada uma hora, retirou-se uma alíquota dos frascos, centrifugou-se por 10 minutos a 5000 rpm e mediu-se a acidez. O tempo total de reação foi de 10 horas. Na Tabela 02 pode-se visualizar as variáveis investigadas nestes ensaios.

Tabela 2. Variáveis investigadas nos ensaios de hidrólise.

Ensaio	Variáveis investigadas	
	Catalisador	Temperatura
1	5000ppm NS 40116	45°C
2	1000ppm Lecitase Ultra	50°C
3	250ppm Quara LowP	70°C
4	50ppm Lecitase Ultra	50°C
5	5000ppm NS40116 + 1000ppm Lecitase Ultra	45°C
6	5000ppm NS40116 + 250ppm Quara LowP	45°C
7	5000ppm NS40116 + 50ppm Lecitase Ultra	45°C
8	5000ppm NS40116 + 50ppm Quara LowP	45°C

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao término das reações de hidrólise, os resultados de acidez medidos ao término dos ensaios (10 horas) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e

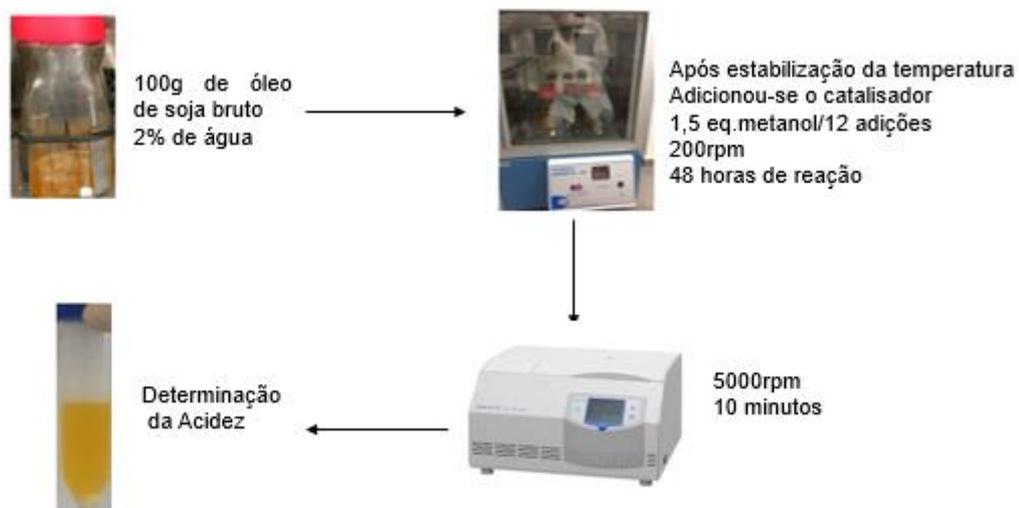
as médias comparadas pelo teste de tukey (5% de probabilidade) com auxílio do *software* PAST, possibilitando delimitar as próximas etapas do trabalho. Destaca-se que para a determinação dos parâmetros temperatura e concentração de enzima seguiu-se indicações da Novozymes.

5.2.2 Ensaios de hidroesterificação enzimática do óleo de soja bruto

As reações de hidroesterificação enzimática do óleo de soja bruto foram realizadas por meio de agitação orbital, utilizando Shaker (SOLAB, Incubadora Shaker SL-223) com controle de agitação e temperatura.

Para os ensaios de hidroesterificação empregou-se as seguintes condições experimentais, pesou-se 100 g de óleo de soja bruto, adicionou-se 2% de água, a 45°C e 200 rpm. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se a(s) enzima(s) e iniciou-se a adição de 1,5 equivalente de metanol dividido em 12 adições. A representação esquemática do procedimento pode ser visualizada na Figura 11.

Figura 11. Procedimento empregado nos ensaios de hidroesterificação.



Fonte: Elaborado pela autora.

No decorrer das 7 primeiras horas de reação, a cada uma hora, retirou-se uma alíquota dos frascos centrifugou-se e mediu-se a acidez da fase topo. Decorrido as 48 horas de reação realizou-se uma neutralização. Os parâmetros investigados nos ensaios de hidroesterificação podem ser visualizados na Tabela 03.

Tabela 3. Variáveis investigadas nos ensaios preliminares de hidroesterificação.

Ensaio	Catalisador
1	5000ppm NS40116
2	5000ppm NS40116 + 50ppm Lecitase Ultra
3	5000ppm NS40116 + 50ppm Quara LowP

Fonte: Elaborado pela autora.

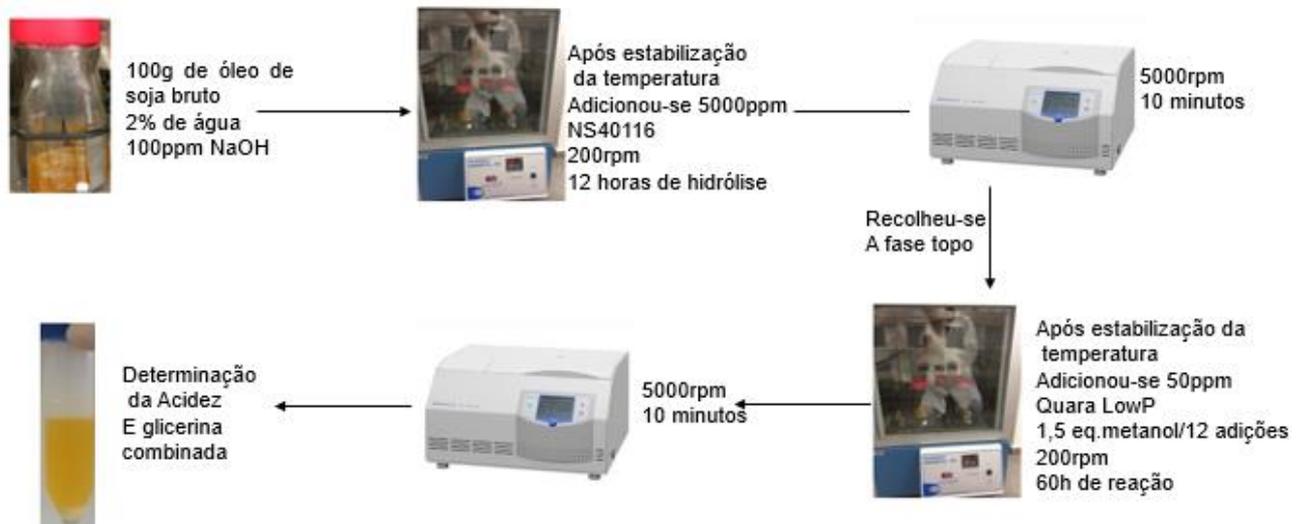
5.2.3 Ensaios de hidroesterificação em uma única etapa

Foi pesado 100 g de óleo de soja bruto, adicionou-se 2% de água, 100 ppm de hidróxido de sódio (NaOH) (ppm, em relação ao substrato) a 45 °C e 200 rpm. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se 5000 ppm da enzima NS40116 combinado com 50 ppm da fosfolipase Quara LowP e iniciou-se a adição de 1,5 equivalente de metanol em 12 adições. No decorrer da hidroesterificação a cada 12 horas, retirou-se uma alíquota dos frascos centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos e mediu-se a acidez da fase topo e glicerina combinada. Ao término da reação, após as 72h, realizou-se uma neutralização.

5.2.4 Ensaios de hidrólise seguido de esterificação (reações em duas etapas).

Foi pesado 100 g de óleo de soja bruto, adicionou-se 2% de água, 100ppm de NaOH (ppm, em relação ao substrato) a 45 °C e 200 rpm. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se 5000 ppm da enzima NS40116, deixando a reação de hidrólise ocorrer por 12 horas. Em seguida, centrifugou-se e recolheu-se a fase topo levando ao shaker novamente, após estabilização da temperatura adicionou-se 50ppm da fosfolipase Quara LowP e iniciou-se a adição de 1,5 equivalente de metanol em 12 adições. No decorrer da reação a cada 12 horas, retirou-se uma alíquota dos frascos centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos e mediu-se a acidez da fase topo e glicerina combinada. Após decorrido 72 horas de reação, realizou-se uma neutralização o, na Figura 12 pode-se visualizar uma representação do procedimento adotado.

Figura 12. Procedimento experimental empregado nos ensaios de hidrólise seguido por esterificação.



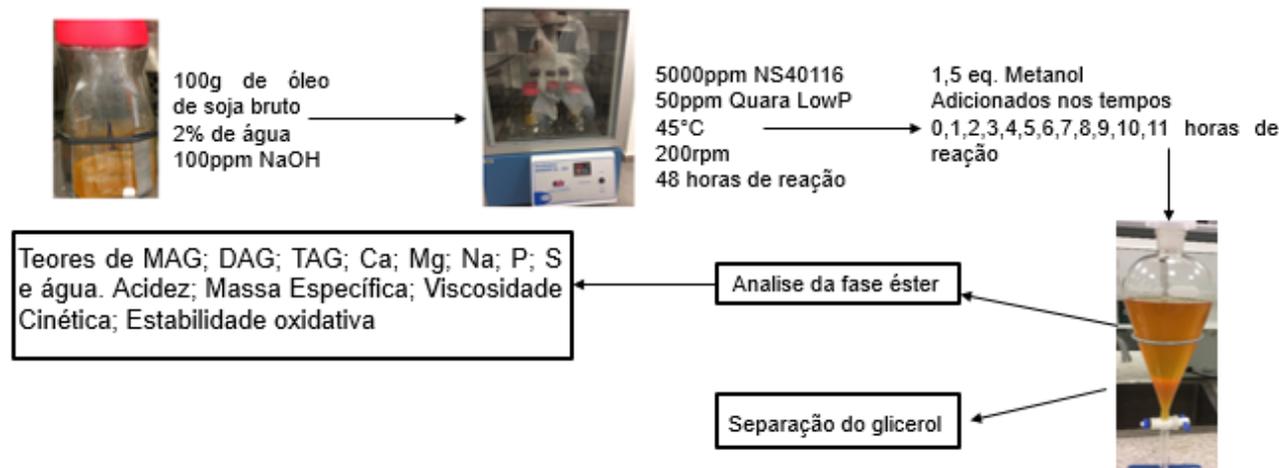
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.5 Repetição do ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 e Quara LowP com adição de 100 ppm de NaOH em uma etapa.

Este ensaio foi realizado com um óleo de soja bruto, que apresentou as seguintes características: 2358 ppm de umidade, 0,01% de impurezas, 0,85% de acidez e 668,7 ppm de fósforo.

Foi pesado 100 g de óleo de soja bruto em Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 2% de água, 100 ppm de hidróxido de sódio (NaOH) a 45°C e 200 rpm. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se 5000 ppm da enzima NS40116 combinado com 50 ppm da fosfolipase Quara LowP e iniciou-se a adição de 1,5 equivalente de metanol em 12 adições. No decorrer da hidroesterificação a cada 12 horas, retirou-se uma alíquota dos frascos centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos e mediu-se a acidez da fase topo e glicerina combinada, ambas as análises realizadas em triplicatas. O tempo total de reação foi de 72 horas. No final da reação realizou-se uma neutralização. O procedimento pode ser visualizado na Figura 13.

Figura 13. Procedimento experimental empregado na melhor condição experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Realizou-se a caracterização do óleo de soja bruto em relação aos índices de acidez, peróxidos, saponificação, teores de umidade, cinzas e fósforo.

5.3.1 Caracterização físico-química da matéria-prima

5.3.1.1 Determinação do índice de acidez

Baseando-se na metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), para a determinação do índice de acidez, foi pesado, em balança analítica (SHIMADZU AUY 220) 3 g da amostra em frasco erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 50 mL de álcool etílico 95% neutro e duas gotas de fenolftaleína. Em seguida, realizou-se titulação com solução de NaOH 0,1 M até o aparecimento da coloração rósea, persistindo por 30 segundos. O cálculo empregado para determinação da acidez é representado na Equação (1).

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times [\text{NaOH}] \times 282}{m_a \times 10} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V_{NaOH} = volume de base gasto na titulação (mL);

[NaOH] = concentração da solução de NaOH (mol L⁻¹);

m_a = massa da amostra (g)

5.3.1.2 Determinação do índice de peróxido

O índice de peróxidos é determinado pela titulação indireta da amostra de óleo pelo método da iodometria. Após a pesagem (SHIMADZU AUY 220) de 5 g de amostra em erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 30 mL da mistura clorofórmio-ácido acético 3:2 para dissolução e 0,5 mL de solução saturada de Iodeto de Potássio (KI), deixando o composto reagir, ao abrigo da luz, por 1 minuto. Adicionou-se 30 mL de água e 0,5 mL de indicador amido 1%. Titulou-se com Tiosulfato de Sódio 0,01 N até o completo desaparecimento da coloração azul, anotando-se o volume gasto. Preparou-se uma prova em branco nas mesmas condições e realizou-se a titulação, efetuando as análises em triplicata. Para o cálculo, foi utilizado a Equação 2 (AOCS Cd 8-53, 1990):

$$\text{Índice de peróxido} \left(\frac{mEq}{Kg} \right) = \frac{(V_a - V_b) \times C \times f_c \times 1000}{m_a} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

V_a= volume de tiosulfato de sódio na titulação da amostra (mL);

V_b= volume de tiosulfato de sódio na titulação do branco (mL);

C = concentração da solução de tiosulfato de sódio (mol L⁻¹);

f_c= fator de correção da solução de tiosulfato de sódio;

m_a = massa da amostra (g)

5.3.1.3 Determinação do índice de saponificação

Seguindo o procedimento proposto pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), a amostra foi filtrada em papel de filtro para remover as impurezas e traços de umidade. Pesou-se 5 g da amostra, em balança analítica (SHIMADZU AUY 220) e adicionou-se 50 mL da solução alcoólica de hidróxido de potássio KOH (4% m/v). Preparou-se um branco simultaneamente com a amostra. O erlenmeyer foi conectado ao extrator até a completa saponificação da amostra (aproximadamente 1h). Após o resfriamento do frasco, lavou-se a parte interna do extrator com água destilada. Depois de desconectar

o erlenmeyer do extrator, adicionou-se 1 mL de fenolftaleína e titulou-se com a solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea. O cálculo empregado para determinar o índice de peróxido está representado na Equação (3).

$$\text{Índice de saponificação} = \frac{(28,06 \times f_c \times (V_b - V_a))}{m_a} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

V_a = volume gasto na titulação da amostra (mL);

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

f_c = fator de correção da solução de HCl 0,5M;

m_a = massa da amostra (g).

5.3.1.4 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade e voláteis foi feita por secagem. O objetivo da análise foi a medição da quantidade de água e componentes voláteis presentes na amostra. Primeiramente, cadinhos de 50 mL foram secos em estufa por 30 minutos, a temperatura de 130°C. Em seguida, foram resfriados até temperatura ambiente e o peso foi determinado em balança analítica. Amostras de 5 g foram pesadas nos cadinhos previamente secos e tarados. As amostras foram levadas para a estufa a 130°C, permanecendo 24 horas, atingindo-se peso constante. Após a retirada, resfriou-se em dessecador até temperatura ambiente e pesou-se a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. O parâmetro foi determinado através da Equação 4 (AOCS 2c-25, 1996):

$$\text{Teor de umidade} = \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M_1 - M_0} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

M_0 = massa do cadinho (g);

M_1 = massa do cadinho + amostra antes da secagem (g)

M_2 = massa do cadinho + amostra após a secagem (g)

5.3.1.5 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi avaliado por incineração, utilizando os resíduos da determinação anterior, objetivando quantificar o material inorgânico nas amostras. Os resíduos foram carbonizados em bico de Bunsen, em chama baixa. Posteriormente, foram levados a mufla à 550°C, permanecendo 8 horas, até ter atingido massa constante. Depois de transcorrido o tempo, as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. Os ensaios foram realizados em triplicata. O valor do teor de cinzas é obtido pela Equação 5 (AOCS Ca 11-55, 1996):

$$\text{Teor de cinzas} = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_1 - m_0} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

m_0 = massa do cadinho (g)

m_1 = massa do cadinho + amostra antes da mufla (g)

m_2 = massa do cadinho + amostra depois da mufla (g)

5.3.1.6 Determinação do índice de iodo

O índice de iodo foi determinado pelo método de Wijs. Em um Erlenmeyer de 500 mL, pesou-se 0,25 g de óleo de soja bruto e dissolveu-se em 40 mL de clorofórmio. Adicionou-se 25 mL da solução de Wijs e abrigou-se o frasco da luz por 45 minutos. Posteriormente, adicionou-se 20 mL de Iodeto de Potássio (KI) 15%, 100 mL de água e 2 mL de solução de amido indicadora 1%. A solução foi titulada com tiosulfato de sódio 0,1 mol/L até o desaparecimento da coloração azul, anotando-se o volume gasto. Uma prova em branco foi preparada e titulada nas mesmas condições. Os resultados foram obtidos através da Equação 6 (AOCS Cd 1-25, 1995):

$$\text{Teor de cinzas} = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 12,69}{m} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

Va = volume de Tiosulfato de Sódio gasto na titulação da amostra (mL)

Vb = volume de Tiosulfato de Sódio gasto na titulação do branco (mL)

M = molaridade da solução de Tiosulfato de Sódio (mol/L)

m = massa da amostra (g)

5.3.1.7 Determinação do teor de fósforo

Para determinação de fósforo realizou-se uma adaptação do método AOCS Ca12-55 (1998). Em um cadinho pesou-se de 3g de amostra e adicionou-se 1g de óxido de zinco. Os cadinhos foram levados a mufla por 6 horas a 300°C, em seguida aumentou-se a temperatura para 550°C e calcinou-se por mais 4 horas.

Após calcinação o resíduo foi dissolvido usando 10mL de ácido clorídrico 1:1, cobriu-se o cadinho com vidro relógio e levou-se a ebulição. Em seguida, transferiu-se para um balão de 100mL usando papel filtro nº41 o cadinho e funil foram lavados com 40mL de água destilada quente. Após resfriamento adicionou-se 5mL de hidróxido de potássio (KOH) 50%. Seguiu-se com a adição de 5mL de ácido clorídrico 1:1. Completou-se o volume para 100mL com água destilada.

Pipetou-se alíquotas de 10mL, para balão de 50mL, adicionou-se 8mL de sulfato de hidrazina 0,015% e 2mL de molibdato de sódio, nessa ordem. Tampou-se e inverteu-se o balão por duas vezes. Após retirada das tampas, os balões foram levados a banho maria a 75°C por 10 minutos. Em seguida, realizou-se um banho de água fria, a aproximadamente 25 ± 5°C. Completou-se o volume e a amostra foi homogeneizada. Realizou-se leitura da absorbância da amostra e do branco foi realizada em 650nm. O cálculo da concentração de fósforo foi realizado de acordo com a equação 7.

$$y = ax + b \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde:

y = concentração de fósforo (mg/L)

a = coeficiente angular

x = medida da absorbância

b = coeficiente linear

5.3.2 Caracterização dos produtos das reações experimentais

Além da determinação da acidez e fósforo, as reações de hidroesterificação foram acompanhadas a partir da determinação da glicerina combinada (GC). Além disso, os ésteres metílicos, produzidos a partir do ensaio considerado como a melhor condição reacional, foram caracterizados em relação à massa específica, viscosidade cinética, teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo, enxofre, teores de monoglicerídeos (MAG), diglicerídeos (DAG), triglicerídeos (TAG), teor de água e estabilidade oxidativa.

5.3.2.1 Determinação da glicerina combinada (GC)

A amostra contendo glicerina combinada foi saponificada, liberando a glicerina da sua forma éster. Em seguida a glicerina é separada da parte graxa, por extração com água acidulada. Para determinação da GC foi pesado aproximadamente 3 g da amostra em funil de separação (250 mL), o funil foi levado para a capela e então se adicionou 60 mL de água destilada e 1,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1:3. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso até que se definiram duas fases, drenou-se a fase de maior volume (fase inferior) e descartou-se. A fase de menor volume (fase superior) foi coletada em um balão de fundo chato, adicionou-se 20 mL de água destilada, 5 mL de álcool etílico e 3 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 50%, homogeneizou-se a solução e aquece-se a mesma a 100 °C com condensador em refluxo até que a amostra saponificou. Após a amostra esfriar um pouco, a mesma foi transferida para um funil de separação (250 mL), adicionou-se 10 mL de tolueno e 2 gotas de azul de bromofenol e adicionou-se ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1:3 em incrementos de 1 mL intercalados por agitação até que a coloração amarela apareceu, deixou-se a mistura em repouso até que se definiram duas fases. Coletou-se a fase inferior em um erlenmeyer e foi adicionado 25 mL da solução de Metaperiodato de sódio (11 g/L). Homogeneizou-se bem a solução, após tampar a boca do erlenmeyer com plástico filme, a solução foi levada a geladeira, na ausência da luz durante 10 minutos. Decorrido esse tempo adicionou-se aproximadamente 4 g de bicarbonato de sódio a solução. Em seguida, foi adicionado aproximadamente, 1,5 g de iodeto de potássio (KI). Titulou-se imediatamente com a solução de arsenito de sódio ($AsNaO_2$) 0,05 mol/L até a mudança de coloração de vermelho tijolo para incolor. Anotou-se o

volume de AsNaO_2 gasto na titulação, foi determinado em paralelo uma titulação do branco. Realizou-se o cálculo da glicerina combinada com base na Equação 8.

$$\% GC = \frac{(Vb - Vars.)T \times 0,1}{Ma} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

GC = Glicerina Combinada a ser determinada em %;

VB = Volume da Solução de Arsenito de Sódio gasto na titulação do branco em mL;

Vars. = Volume da Solução de Arsenito de Sódio gasto na titulação da amostra em mL;

T = Título da Solução de Arsenito de Sódio [%];

ma = Massa da amostra pesada para determinação do Glicerol em gramas;

5.3.2.2 Determinação da massa específica

A determinação da massa específica seguiu a NBR 7148 (2013).

5.3.2.3 Determinação da viscosidade cinética

Para determinar a viscosidade cinética empregou-se a norma NBR 10441 (2014).

5.3.2.4 Determinação do teor de Ca, Mg, Na e S

Para a determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo, potássio e enxofre, empregou-se espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) de acordo com as normas NBR 15553 (2015) e NBR 15867 (2010).

5.3.2.5 Determinação do teor de água

Quantificou-se a quantidade de água usando a titulação de Karl Fischer seguindo a ASTM D6304.

5.3.2.6 Determinação da estabilidade oxidativa

Determinou-se da estabilidade oxidativa dos ésteres metílicos produzidos empregou-se o teste EN 14112 (2003).

5.3.2.7 Determinação do teor de ésteres

Para a determinação do teor de ésteres metílicos utilizou-se um CG (Shimadzu QP 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Será empregada uma 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. Empregou-se a seguinte 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.

5.3.2.7.1 *Preparo das amostras*

Transferiu-se 250 mg do substrato das mesmas para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume do mesmo com heptano. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e foi adicionado 50 µL do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000 mg L⁻¹ o volume foi completado com heptano.

5.3.2.7.2 *Cálculo do teor de ésteres*

Após a injeção e análises dos cromatogramas gerados será determinado a porcentagem de conversão em ésteres pela Equação 9:

$$\text{Teor de ésteres (\%)} = \frac{(\Sigma A) - A_{pi}}{A_{pi}} \frac{C_{pi} V_{pi}}{m} 100 \quad (\text{Equação 9})$$

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).

5.3.2.8 Determinação do teor de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG)

As análises das amostras foram realizadas em CG, Shimadzu QP2010, com injetor automático *on-column* e detector FID. Será utilizado 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 seguirão a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50 °C por 1 min, 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 8 min. A temperatura do detector foi de 380 °C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1µL.

5.3.2.8.1 Preparo das Amostras

Pesou-se 100 mg de amostra em balão volumétrico de 10 mL, em seguida foi adicionado 100 µL do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada, a solução foi ser deixada em temperatura ambiente por 15 min. Após, completou-se o volume com heptano. As soluções foram transferidas para vials de 1,5 mL e levadas para análise em CG.

5.3.2.8.2 Determinação dos teores de MAG, DAG E TAG

Para a quantificação dos produtos MAG, DAG e TAG foi utilizado 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 foi preparado 8 soluções de calibração em diferentes concentrações

As condições de análise das soluções de calibração e das amostras seguiram de acordo com a metodologia proposta por Krüger (2010). Nas soluções de calibração foi adicionado derivatizante MSTFA. Após agitou-se a solução e deixou-se em temperatura ambiente por 15 min para ação do derivatizante. Em seguida, completou-se o volume com heptano. As soluções foram transferidas para vials de 1,5 mL e o volume de 1 μ L será injetado no CG.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A caracterização do óleo de soja bruto é apresentada na Tabela 4. Em relação ao parâmetro umidade, sabe-se que os ácidos graxos livres e a água são os responsáveis pela reação de saponificação, uma vez que umidade acima de 0,5% provoca a hidrólise dos TAGs convertendo-os em AGL, ocasionando aumento do teor de acidez, formação de sabão e diminuição no rendimento das reações (BARROS,2008). O teor de umidade e voláteis encontrado no óleo utilizado neste estudo foi de 0,01%, como demonstrado na Tabela 4, sendo um resultado aceitável para a produção de biodiesel tanto pela via convencional (catálise química) quanto pela rota enzimática, entretanto, destaca-se que a produção de biodiesel por via enzimática, caracteriza-se por um processo que tolera matérias-primas com elevados teores de umidade.

Tabela 4. Resultados da Caracterização do Óleo de Soja Bruto

Propriedade	Resultado	Valores de Referência (MAPA,1993)
Teor de umidade e Voláteis (%)*	0,02 ± 0,01	<0,5
Teor de cinzas (%)*	0,03 ± 0,01	-
Índice de Peróxidos (mEq/Kg)*	8,80 ± 0,01	-
Índice de acidez (mg NaOH/g)*	1,40	
Índice de iodo (gl/100g)	135,03	120-143
Ácidos graxos totais (%)	85,15	-
Ácidos graxos oxidados (%)	0,19	-
Fósforo (ppm)*	464,99 ± 38,80	<1000

*médias de triplicatas ±desvio padrão amostral.

Fonte: Elaborado pela autora.

Outra característica analisada foi à determinação do teor de cinzas, essa análise é importante, uma vez que o emprego de matéria-prima com elevado teor de substâncias inorgânicas poderá dificultar o processo de produção de biodiesel, sendo necessários gastos adicionais em etapas de pré-tratamento da matéria prima e, até

mesmo, de purificação do produto final, devido ao fato de que o biodiesel com elevado teor de resíduos inorgânicos, como metais residuais, pode causar entupimento dos filtros e desgaste de partes do motor. A amostra de óleo de soja bruto obteve um baixo teor de cinzas, isso se deve a origem da matéria prima utilizada para o estudo, haja vista que óleos e gorduras apresentam, em geral, baixos teores de resíduos inorgânicos.

Com a determinação do índice de peróxidos pode-se verificar a presença de substâncias oxidantes no óleo, durante a oxidação, além das reações de decomposição pode ocorrer à formação de novos radicais livres, o que não é desejável para a produção de ésteres metílicos, pois, diminui a estabilidade à oxidação, (MORETO & FETT, 1998). O óleo de soja bruto, apresentou um índice de peróxidos de 8,80 mEq/kg. Experimentos realizados por Weine Azeredo (2014) mostram resultados onde o óleo de soja refinado apresentou 1,95 mEq/kg enquanto que para o óleo de fritura o valor encontrado foi 37,08 mEq/kg.

A amostra analisada apresentou um índice de acidez de 1,40 mg NaOH/g. Destaca-se que um alto índice de acidez evidencia um elevado grau de deterioração, dificultando a produção do biodiesel pela via convencional (transesterificação alcalina), uma vez que a presença em excesso de ácidos graxos pode levar a saponificação. Quando comparado ao índice de acidez da atual matéria-prima empregada industrialmente, óleo de soja degomado e neutralizado, o óleo de soja bruto apresenta um elevado índice de acidez. Entretanto, para a produção de ésteres metílicos por hidroesterificação enzimática, a elevada acidez não se caracteriza como um parâmetro que inviabiliza o emprego desta matéria-prima. Gonçalves et al, (2009), analisaram índices de diferentes gorduras residuais, onde a média das amostras foi de $2,7 \pm 0,1$ mg KOH/g, segundo os autores a média é considerada alta, uma vez que óleo deve conter no máximo a acidez de 1 mg KOH/g para que o biodiesel produzido atenda a acidez normalizada pela ANP (0,5 mg KOH/g), já que após o processo de transesterificação pode ocorrer uma diminuição de 90% do índice de acidez (ARAÚJO, 2007; GONÇALVES et al, 2009).

Quanto ao índice de iodo, a amostra apresentou 135,03 g I/100g, valor este próximo ao exigido pelo INMETRO (134,38 g I/100g). Este parâmetro é útil na determinação do grau de insaturação dos óleos, uma vez que iodo reage com as duplas ligações entre os carbonos (MORETO & FETT, 1998; REDA, 2004) e, um elevado índice de iodo, indica uma maior propensão do óleo a sofrer degradação

térmica e oxidativa (CECCHI, 2003; FERRARI *et al*, 2005). Além disso, cabe destacar que o índice de iodo difere de acordo com a origem do óleo, variando de 120% a 141% para óleo de soja refinado. O alto valor encontrado para este índice era esperado, uma vez que o óleo de soja é rico em ácidos graxos poli-insaturados como, por exemplo, o ácido linoleico.

Em relação ao índice de ácidos graxos totais a amostra apresentou 85,15%, indicando que o material em estudo apresenta grande potencial para a produção de biodiesel, ou seja, aproximadamente 85% da matéria-prima pode ser convertida em ácidos graxos, que por sua vez, podem ser convertidos a ésteres metílicos ou etílicos.

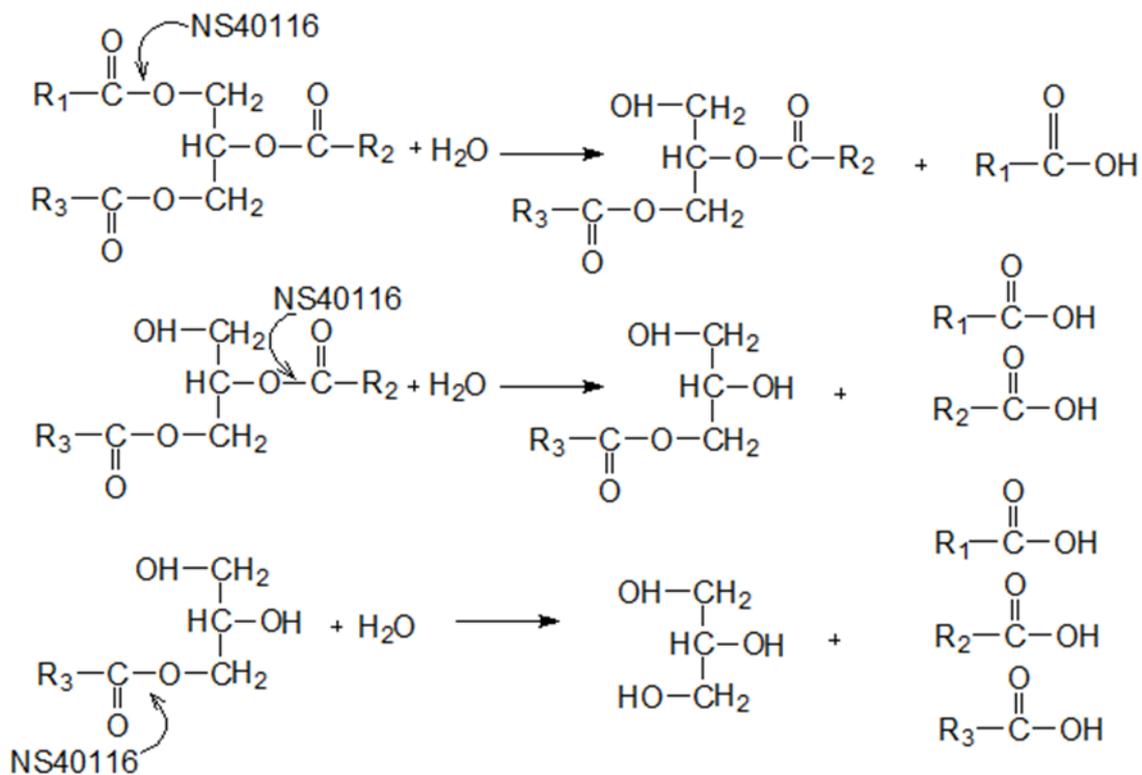
A amostra apresentou, ainda, 0,19% de ácidos graxos oxidados. Este resultado confirma o baixo grau de deterioração do óleo de soja bruto (pouco rançoso), o que, também, era esperado - haja vista que este óleo é obtido após a etapa de extração com solvente orgânico, não passando por processos avançados de degomagem e, tão pouco, foi exposto a altas temperaturas.

Quanto ao teor de fósforo, apresentado na Tabela 4, a amostra apresentou 464,99 ppm de fósforo. Resultado dentro do esperado, visto que o óleo de soja bruto apresenta de 250 a 1200 ppm de fósforo (CESARINI, DIAZ e NIELSEN, 2013), dependendo do processo de obtenção do óleo, assim como das características da matéria-prima (soja) utilizada. Destaca-se que, atualmente, para a produção de biodiesel, não se utiliza matérias-primas com elevados teores de fósforo, devido à formação de gomas que favorecem a formação de emulsão, dificultando o processo de separação e purificação do biodiesel obtido e, conseqüentemente, provocando uma redução no rendimento da reação. É em função desta peculiaridade que na transesterificação alcalina, método convencional para a produção de biodiesel, o óleo de soja bruto passa por uma etapa adicional de degomagem para a eliminação de impurezas como ceras e fosfolipídios. Contudo, esta etapa produz efluentes de difícil tratamento, onerando a fabricação deste biocombustível. Desta maneira, o óleo de soja bruto, devido ao seu elevado teor de fósforo, para ser empregado na produção de biodiesel via transesterificação alcalina, terá que necessariamente passar por uma etapa de degomagem. Entretanto, uma alternativa para o emprego do óleo de soja bruto para a produção de biodiesel seria a hidroesterificação enzimática, descartando-se etapas anteriores de pré-tratamento da matéria-prima.

6.1.1 Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS40116 (5000 ppm)

A lipase empregada nesse ensaio, NS-40116, caracteriza-se como uma formulação líquida obtida por meio do cultivo e modificação do fungo *Thermomyces lanuginosus*. Esta enzima apresenta especificidade para matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres (FFA), fato que a torna um potencial biocatalisador para reações que empregam matérias graxas de baixo custo (PRICE et al., 2016; SANTOS, 2016; SILVA et al., 2016). De acordo com Facin (2017) a NS-40116 possui a capacidade de hidrolisar óleos vegetais, sendo os ácidos graxos livres e glicerol os produtos de uma reação completa dos triglicerídeos, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14. Mecanismo de ação NS 40116.

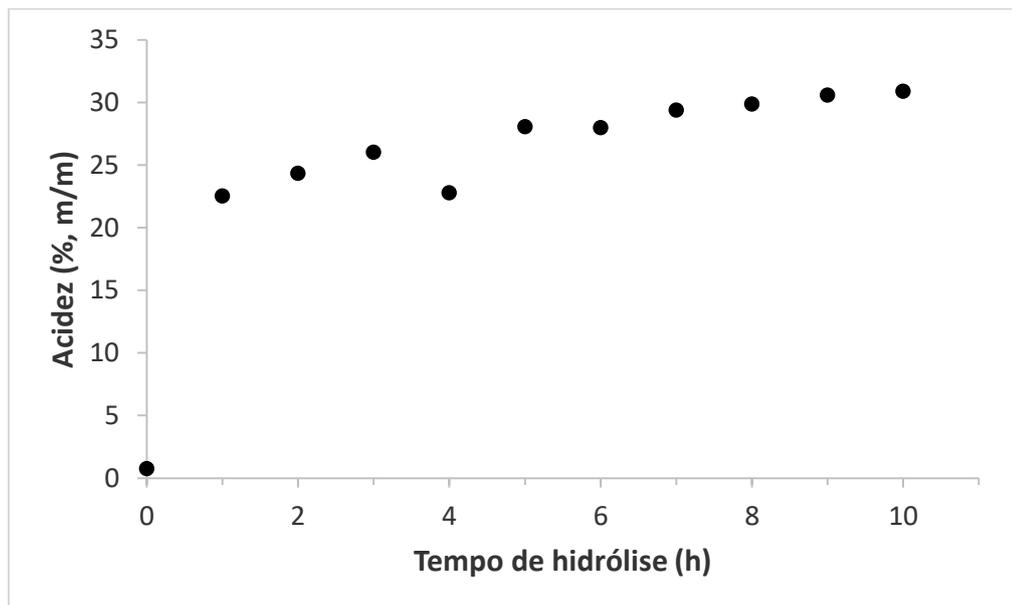


Fonte: Adaptado de CASTRO et al., 2004.

Inicialmente, como teste preliminar, realizou-se um ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto, onde se procurou avaliar o comportamento do percentual de acidez do meio reacional em intervalos de uma hora, por um período de

10 horas de reação. Neste ensaio foram adicionados, como apresentado no item 5.2.1, 100g de substrato, 5000 ppm da enzima NS40116 (m/m, em relação ao substrato) e 4% de água (m/m, em relação ao substrato), sendo a reação realizada a 200 rpm e 45°C. Na Figura 15 são apresentados os resultados cinéticos de 10 horas de reação.

Figura 15. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima NS40116 (reação em shaker a 200 rpm e 45°C).



Fonte: Elaborado pela autora.

Por meio da Figura 15, pode-se observar que houve um aumento do percentual de acidez ao longo do tempo reacional, passando de 0,75% na condição inicial, tempo zero, e atingindo 30,9% após 10 horas de hidrólise, evidenciado, conforme apresentado na Figura 14, a capacidade da enzima NS 40116 em hidrolisar os triacilgliceróis, produzindo ácidos graxos livres. O resultado obtido é considerado satisfatório, uma vez que em uma reação de hidrólise a estequiometria da reação é de 1 mol de triglicerídeo para 3 mol de água, se tomarmos a massa molar do triglicerídeo como 870 g.mol^{-1} e da água como 18 g.mol^{-1} , pode-se calcular que seria necessário 6,2% de água para realizar a hidrólise total de um óleo vegetal. No entanto, o óleo de soja bruto utilizado apresentou 85,5% de ácidos graxos totais e a quantidade de água empregada foi de 4%. Dessa maneira o máximo teórico de conversão que seria possível é de 55%, no entanto deve-se considerar que o mecanismo de reação na prática é mais complexo, tem-se questões como o impedimento estereoquímico

que torna difícil para a lipase hidrolisar o triglicerídeo na posição 2. Pois, mesmo após a hidrólise nas extremidades do TAG ocorrer, ainda tem-se o grupamento OH, dificultando a ação da enzima na posição 2.

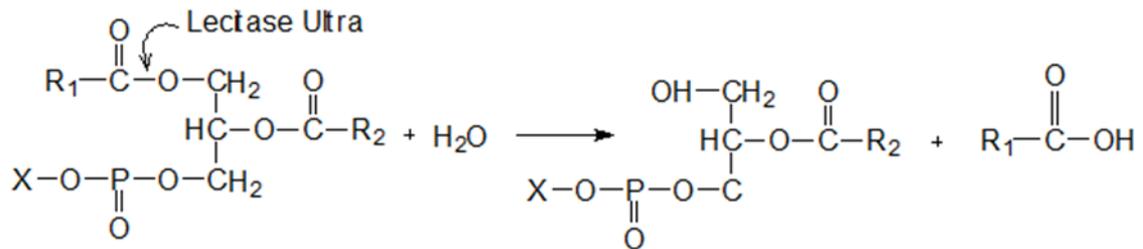
Observa-se, também, que a reação apresenta uma elevada taxa de hidrólise na primeira hora, atingindo 22,5% de acidez. Além disso, nota-se que após a sétima hora de reação (29,4%) o aumento da acidez do meio reacional é pouco pronunciado (1,5%), indicando que a reação entra em estagnação/equilíbrio reacional entre sete e 10 horas após o início do processo de hidrólise. Ressalta-se que um ensaio realizado nas mesmas condições, entretanto empregando óleo de soja refinado (0,4% de acidez), apresentou durante a primeira hora de reação uma acidez de 12,4% e atingindo no final do tempo reacional 26,2%. Resultado este, que evidencia a eficiência da enzima NS40116 para catalisar hidrólise de óleo de soja bruto.

Facin (2017) comparou a hidrólise empregando NS-40116 na forma livre e imobilizada). O procedimento consistiu na adição em reator de 100 mL de óleo de soja refinado juntamente com 2 mL de água destilada e 0,5 mL de enzima livre bruta ou um grama de suporte polimérico de PU com enzima imobilizada. O sistema vedado foi mantido a 45 °C e 300 rpm com uso de agitador magnético. O autor observou que todos os sistemas foram capazes de atingir 12 a 13% de acidez, no entanto, foi observado que o tempo para atingir essa acidez foi de 120 min para os sistemas contendo o catalisador imobilizado, enquanto que para a enzima livre foi de 60 minutos. Este resultado corrobora a afirmação da elevada eficiência da enzima NS-40116 na hidrólise de óleo de soja bruto, uma vez que esses resultados menores de acidez deve-se ao fato de que os autores empregaram uma baixa quantidade de água (2%).

6.1.2 Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto catalisada pela enzima Lecitase Ultra (1000 ppm)

A enzima comercial Lecitase Ultra caracteriza-se por ser uma mistura obtida por meio da fusão da lipase de *Thermomyces lanuginosa* com a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, exibindo atividade para fosfolipídios na posição 1 e nos TAG nas posições 1,3 (SLIZYTE et al., 2005; WANG et al., 2010; NOVOZYMES, 2012; MOLINARI, 2015). Na Figura 16 pode-se observar a ação da Lecitase Ultra em uma molécula de fosfolipídio.

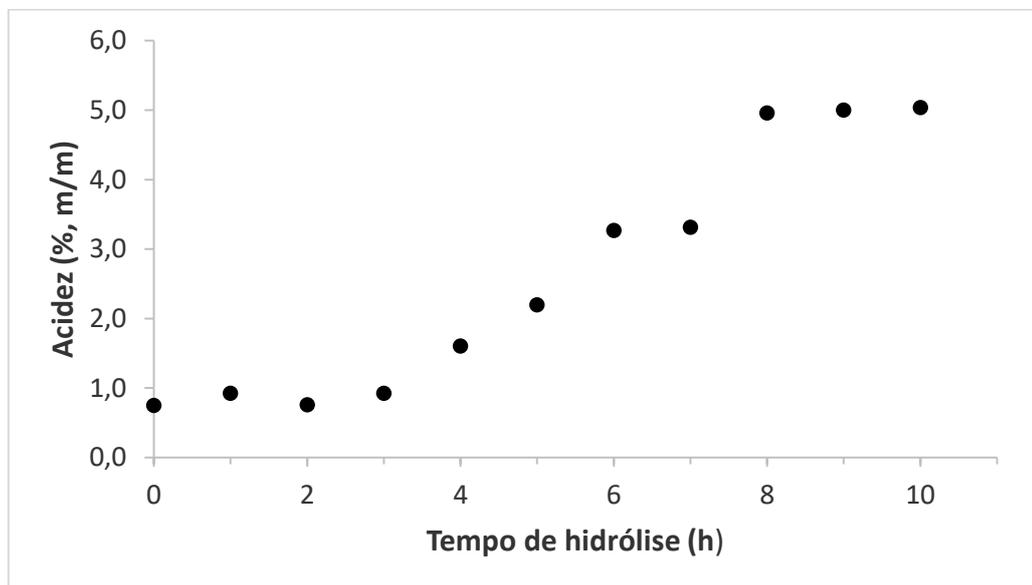
Figura 16. Mecanismo de atuação da Lecitase Ultra



Fonte: Adaptado de JIANG, F. *et al.*, 2011.

Neste teste adicionou-se, como apresentado no item 5.2.2, 100 g de substrato, 1000 ppm da enzima Lecitase Ultra (m/m, em relação ao substrato) e 4% de água (m/m, em relação ao substrato), sendo a reação realizada a 200 rpm e 50 °C. Na Figura 17, são apresentados os resultados cinéticos de 10 horas de reação.

Figura 17. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima Lecitase Ultra (reação em shaker a 200 rpm e 50°C).



Fonte: Elaborado pela autora.

Analisando a Figura 17, observa-se que a acidez máxima obtida neste ensaio, empregando somente a enzima Lecitase ultra, foi de aproximadamente 5% a partir de oito horas de reação. A variação da acidez entre os tempos de oito e dez horas foi de 0,4%, evidenciando que a reação entra em equilíbrio neste período. O aumento

significativo no percentual de acidez ao longo do processo de hidrólise evidencia que a Lecitase Ultra, provavelmente, não está atuando apenas na hidrólise dos fosfolípidos, mas sim, como reportado pela Novozymes (2012), esta enzima possui também atividade sobre os TAGs. Contudo, em comparação com a cinética obtida com a enzima NS40116, Figura 15, fica evidente que a Lecitase Ultra apresenta pouca atividade frente aos TAGs, quando comparamos o teor de acidez máximo obtido com a NS40116 (30,9%) com o obtido com a Lecitase Ultra (5,3%).

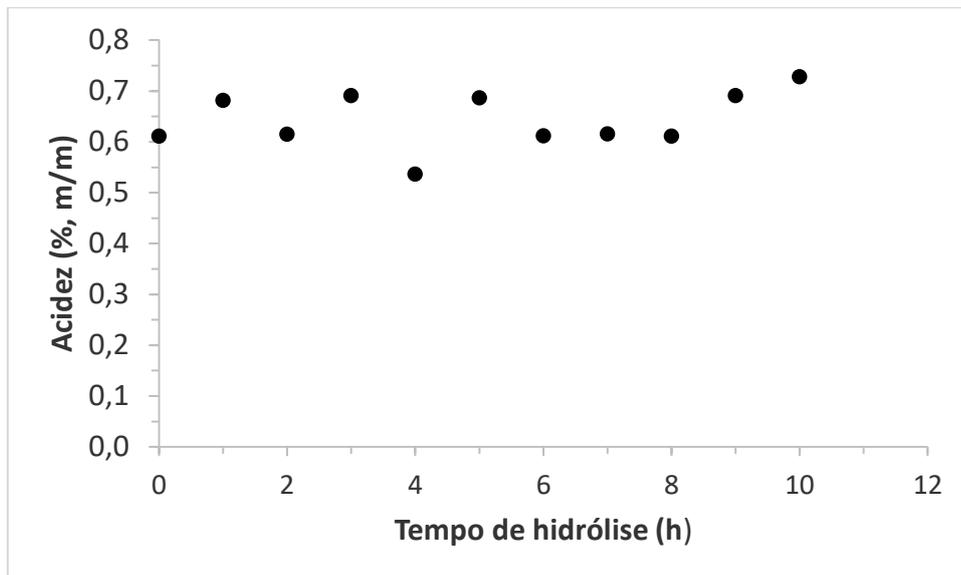
Um estudo reportado por Raizer *et al* (2015) demonstra que a hidrólise de TAGs, de óleo de girassol em AGLs, em 4 horas de reação, com 40 °C e com 2% de Lecitase Ultra em relação à massa de substrato (óleo mais água), apresentou um percentual de acidez de 16,3%, destaca-se que este estudo empregou uma quantidade elevada do catalisador. Fato que deixa evidente, que além de atuar nos fosfolípidos, a enzima Lecitase Ultra é capaz de hidrolisar os TAGs.

6.1.3 Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja bruto catalisada pela enzima Quara LowP (250 ppm)

De acordo com o fabricante, a enzima Quara® LowP é eficaz na obtenção de óleos com níveis reduzidos de fósforo, uma vez que trata-se de uma enzima “premium” para a degomagem de óleos vegetais, apresentando elevada atividade enzimática sobre fosfolípidos, reduzindo o uso de produtos químicos na degomagem e diminuindo a formação de gomas e sabão (NOVOZYMES,2017).

Neste contexto, com o intuito de avaliar a efetividade da enzima Quara® LowP frente à hidrólise dos fosfolípidos, realizou-se uma cinética de hidrólise do óleo de soja bruto nas seguintes condições: 100 g de óleo de soja bruto, 250 ppm (m/m, em relação ao substrato) de Quara® LowP, 4% (m/m, em relação ao substrato) de água, em shaker a 70°C e 200 rpm. Os resultados cinéticos obtidos neste ensaio são apresentados na Figura 18.

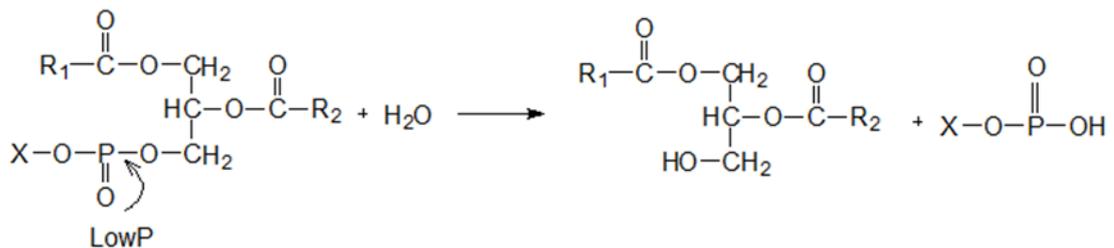
Figura 18. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima Quara® LowP (reação em shaker a 200 rpm e 70°C).



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos, pode-se compreender que a enzima LowP é mais específica que a Lecitase Ultra, na remoção do fósforo da molécula do fosfolípido, atacando somente o fósforo, sem gerar a quebra dos ácidos graxos das posições 1 e 2 presentes na molécula do fosfolípido, como mostrado na Figura 19.

Figura 19. Mecanismo de ação da enzima Quara LowP



Fonte: Adaptado de JIANG, F. *et al.*, 2011.

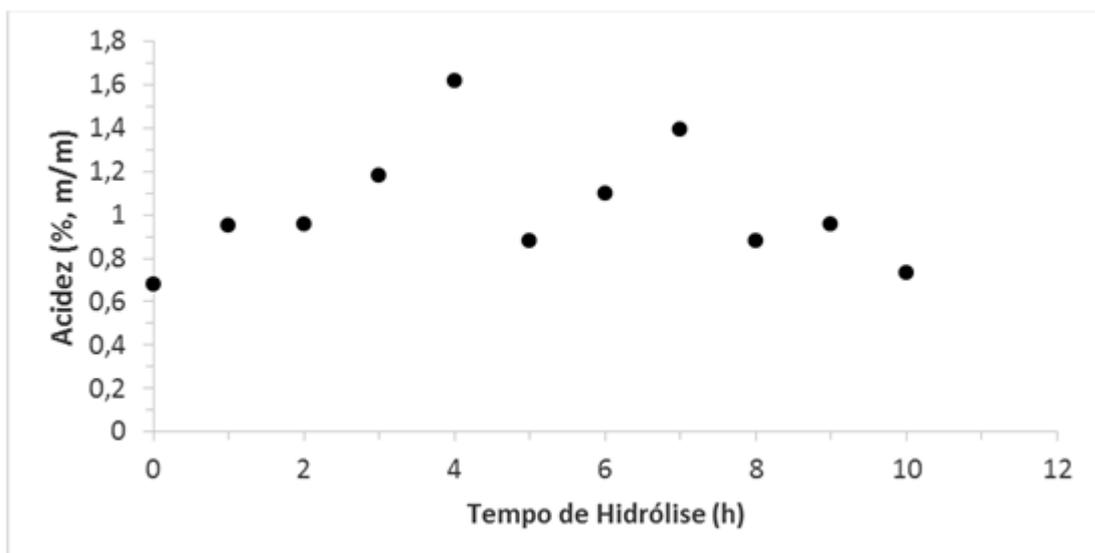
Porém, para a produção de ésteres metílicos somente a ação desta enzima não seria interessante uma vez que na etapa de hidrólise tem-se o objetivo de produzir ácidos graxos livres, assim seria necessária a combinação desta fosfolipase de alta especificidade com uma lipase. Entretanto, destaca-se a potencialidade desta enzima

para os processos de degomagem, uma vez que após as 10 horas de reação o teor de fósforo foi reduzido de 464,9 ppm para 55,8 ppm, 87,9% a menos.

6.1.4 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pela enzima Lecitase Ultra (50 ppm)

Com o objetivo de verificar o efeito, em relação ao percentual de acidez, de uma diminuição da concentração de Lecitase Ultra, empregou-se as seguintes condições: 100 g de óleo de soja bruto, 50 ppm de Lecitase Ultra, 4% água em shaker a 50°C e 200 rpm. Após 10 horas de hidrólise não se observou alteração no percentual de acidez, como demonstrado na figura 20. A partir dos resultados descritos no item 6.2.2 quando se empregou as mesmas condições, no entanto com uma concentração maior de Lecitase Ultra (1000ppm) pode-se observar uma acidez de 5%. Dessa maneira, percebe-se que a utilização de uma quantidade reduzida de Lecitase Ultra é desejável, não interferindo na ação da enzima NS 40116.

Figura 20. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pela enzima Lecitase Ultra (50 ppm), em shaker a 200 rpm e 50°C.

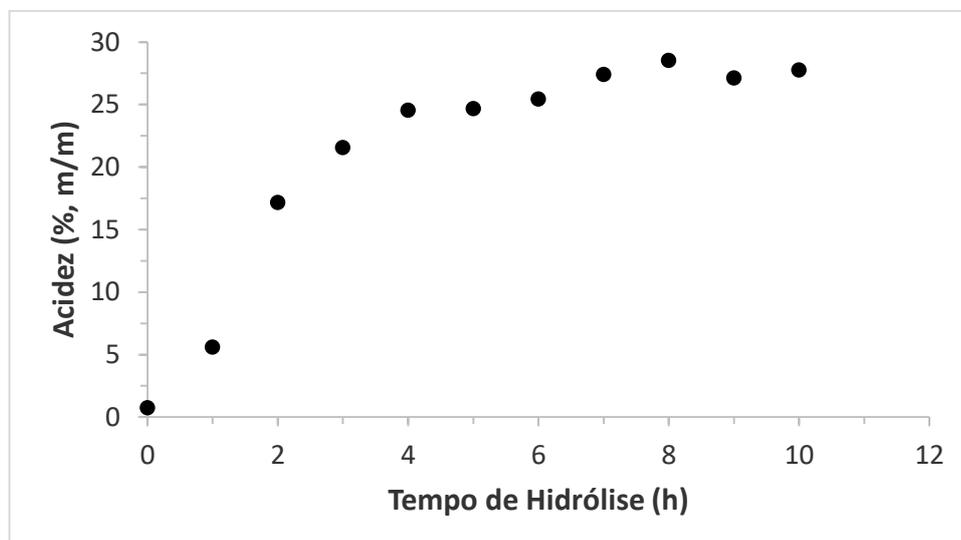


Fonte: Elaborado pela autora.

6.1.5 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e Lecitase Ultra (1000 ppm)

Com o intuito de compreender o efeito sob a reação de hidrólise empregando-se a enzima NS 40116 combinada com uma fosfolipase A1, Lecitase Ultra, empregou-se a seguinte condição: 100 g de óleo de soja bruto, 5000 ppm de NS 40116, 1000 ppm de Lecitase Ultra, 4% água em shaker a 45°C e 200 rpm, no final das 10h de reação obteve-se um percentual de acidez de 28%. Observou-se que embora houve um aumento na acidez, esta foi menor do que no ensaio de hidrólise que empregou somente a lipase NS 40116 (Figura 15), que atingiu com dez horas de reação 30,9% de acidez. Esse resultado justifica-se pelo fato de que estas enzimas podem estar competindo pelo mesmo sítio ativo, uma vez que a enzima Lecitase Ultra não atua somente sobre os fosfolipídios. Observa-se também que a reação não apresentou uma elevada taxa de hidrólise na primeira hora (5,25%), em comparação com o ensaio empregando-se somente a NS-40116, o qual atingiu 22,5% de acidez. Além disso, nota-se que após a sétima hora de reação (27,4%) o aumento da acidez do meio reacional é pouco pronunciado (2,2%). Este fato indica que a reação entra em estagnação/equilíbrio reacional entre sete e dez horas, como pode ser visualizado na Figura 21, após o início do processo de hidrólise, mesmo padrão observado no ensaio com NS-40116.

Figura 21. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e Lecitase Ultra (1000 ppm), shaker a 200 rpm e 45°C.



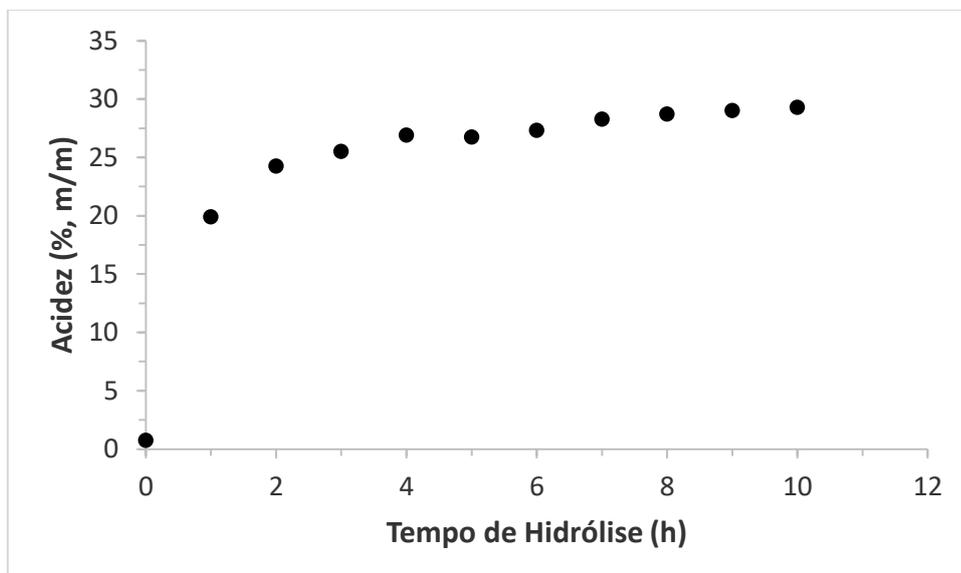
Fonte: Elaborado pela autora.

6.1.6 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e LowP (250 ppm)

Buscando-se conhecer o efeito da NS 40116 combinada com a Quara LowP sob a reação de hidrólise do óleo de soja bruto, realizou-se um ensaio nas seguintes condições, 100 g de óleo de soja bruto, 5000 ppm de NS 40116 e 250 ppm LowP, 4% água em shaker a 45°C e 200 rpm.

Percebe-se que porcentual de acidez atingido em 10h foi próximo ao obtido quando empregou-se somente NS (30%). Destaca-se ainda que quando comparamos o resultado obtido (29,3%), Figura 22, com a porcentagem de acidez atingida ao término das 10 horas, na reação catalisada pela enzima NS 40116 combinada com Lecitase Ultra (28%), fica evidente que, ao contrário da Lecitase, a enzima Quara LowP não compete pelo mesmo sitio ativo da lipase, assim não interferindo na hidrólise catalisada pela NS 40116.

Figura 22. Cinética de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e LowP (250 ppm)



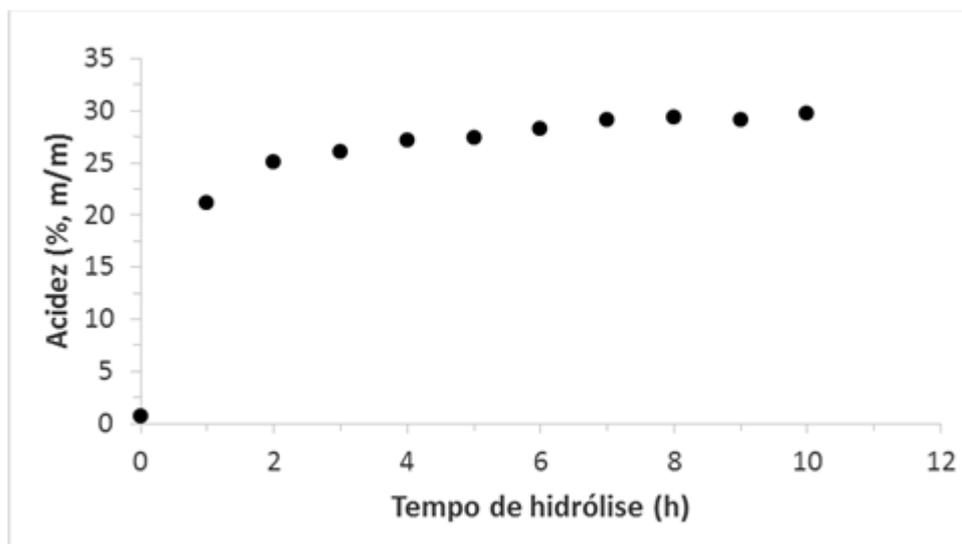
Fonte: Elaborado pela autora.

6.1.7 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000 ppm) e Lecitase Ultra (50 ppm)

Com o objetivo de diminuir o efeito da Lecitase Ultra sob a ação da NS 40116, como apresentado no item 5.2.5, empregou-se 100 g de substrato, 5000 ppm da enzima NS40116 (m/m, em relação ao substrato), 50 ppm da enzima Lecitase Ultra e 4% de água (m/m, em relação ao substrato), sendo a reação realizada a 200 rpm e 45°C.

Como demonstrado na Figura 23, ao final do tempo reacional, atingiu-se uma acidez de 29,4%. Este resultado, nos indica que a concentração da enzima Lecitase Ultra, pode ser reduzida de 1000 ppm para 50 ppm, sem causar prejuízos a reação de hidrólise em combinação com a enzima NS 40116. Fato que traz benefícios para a produção de biodiesel, uma vez que utilizou-se 95% a menos da fosfolipase, resultando em uma redução de custo do processo. Além disso, observou-se neste ensaio o mesmo padrão comportamental da cinética da reação catalisada com a NS40116, com uma elevada taxa de hidrólise na primeira hora, atingindo 20,2% de acidez e início da estagnação reacional entre sete e dez horas de hidrólise.

Figura 23. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000ppm) e Lecitase Ultra (50ppm) -reação em shaker a 200 rpm e 45°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

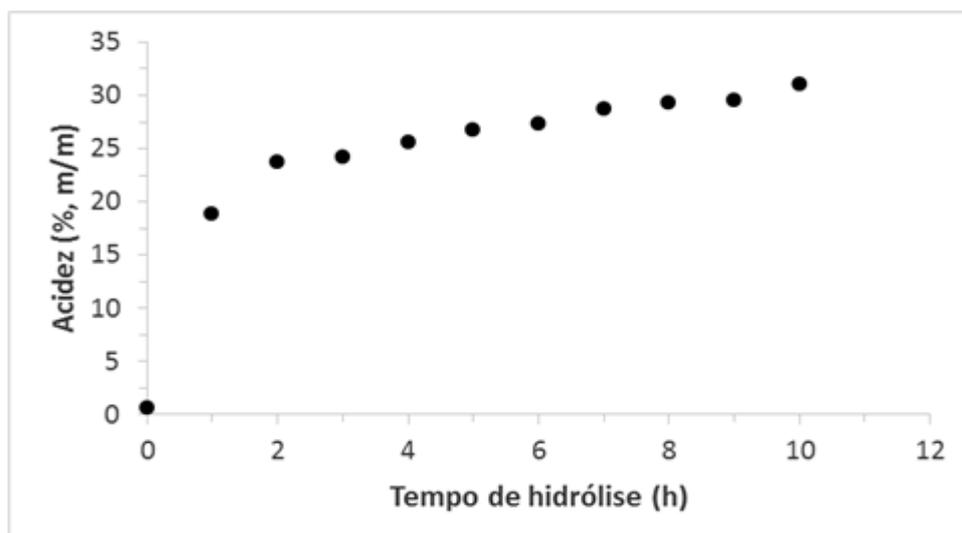
Percebe-se ainda, que a redução da concentração da Lecitase Ultra, resultou em melhores resultados, quando comparado ao ensaio com a Lecitase Ultra (1000 ppm) que obteve uma acidez de 27,9% após dez horas de reação, devido a uma menor competição pelo sitio ativo.

6.1.8 Ensaio de hidrólise enzimática de óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm)

Visando a possibilidade da redução da concentração da enzima Quara LowP, realizou-se a hidrólise nas seguintes condições, 100 g de óleo de soja bruto, 5000 ppm de NS 40116 e 50 ppm Quara LowP, 4% água em shaker a 45°C e 200 rpm. Após 10 horas de hidrólise atingiu-se uma acidez de 30,9%, como demonstrado na figura 24.

Comparando os resultados obtidos no item 6.2.4 (Figura 21), quando realizado o ensaio nessas mesmas condições, porém, com 250ppm de Quara LowP obteve-se um porcentual de acidez de 29,3%. Dessa maneira é mais vantajoso sob o ponto de vista ambiental e econômico empregar na reação uma concentração reduzida desta fosfolipase (50 ppm). Este ensaio apresentou uma elevada taxa de hidrólise na primeira hora, atingindo 18,1% de acidez e início da estagnação reacional entre oito e dez horas de hidrólise.

Figura 24. Cinética reacional de hidrólise do óleo de soja bruto catalisado pelas enzimas NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm), em shaker a 200 rpm e 45°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.1.9 Comparação entre os ensaios de hidrólise

Ao término dos ensaios de hidrólise realizou-se uma comparação entre os ensaios que apresentaram, após as 10 horas de reação um maior percentual de acidez, como pode-se observar na Tabela 05.

Tabela 5. Comparação entre os ensaios de hidrólise.

Ensaio	%Acidez após 10h*
1	30,9 ^a
2	28,0 ^b
3	29,3 ^c
4	29,4 ^c
5	30,9 ^a

Ensaio 1- NS 40116 5000 ppm + óleo de soja bruto; **Ensaio 2-** NS 40116 5000 ppm + Lecitase Ultra 1000 ppm + óleo de soja bruto; **Ensaio 3-** NS 40116 5000 ppm + Quara LowP 250ppm + óleo de soja bruto; **Ensaio 4-** NS 40116 5000 ppm + Lecitase Ultra 50 ppm + óleo de soja bruto; **Ensaio 5-** NS 40116 5000 ppm + Quara LowP 50ppm.

*médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

Observando a Tabela 5, pode-se evidenciar que os ensaios empregando concentrações menores de fosfolipases apresentaram maiores valores de acidez, quando comparado aos ensaios nas mesmas condições, porém, com concentrações maiores. Dessa maneira, decidiu-se empregar para as posteriores reações de hidroesterificação os seguintes catalisadores: enzimas NS 40116 5000 ppm (Ensaio 1), NS 40116 5000 ppm combinada com Lecitase Ultra 50 ppm (Ensaio 4) e NS 40116 5000 ppm combinada com Quara LowP 50 ppm (Ensaio 5).

6.1.10 Cinética de hidroesterificação do óleo de soja bruto

Com o objetivo de compreender a cinética da reação de hidroesterificação do óleo de soja bruto utilizando-se como catalisador a enzima NS 40116, Lecitase ultra e Quara LowP, empregou-se as seguintes condições experimentais: 100 g de óleo de soja bruto em Erlenmeyer de 250 mL, 2% de água 5000ppm de NS 40116, 1,5 equivalentes de metanol em 12 adições, a 45°C e 200rpm. No entanto, investigou-se

a variação dos catalisadores, sendo que no Ensaio 1 empregou-se a NS 40116 5000ppm, no Ensaio 2 combinou-se as enzimas NS 40116 5000ppm com a Lecitase Ultra 50ppm, já o Ensaio 3 foi catalisado pelas enzimas NS 40116 5000ppm e Quara LowP 50ppm de forma combinada.

Observou-se, no Ensaio 1 (catalisado apenas pela enzima NS 40116) que durante as três primeiras horas de reação teve-se um aumento na acidez, seguida de sua diminuição até o término do tempo reacional (Tabela 6). Destaca-se que este comportamento já era esperado, uma vez que se tem um processo de hidroesterificação, onde ocorre a liberação dos AGL, ocasionando um aumento no percentual de acidez e consumo desses AGL produzindo ésteres metílicos, resultando em uma redução do percentual de acidez. Em relação ao teor de fósforo, este passou de 464,9 ppm para 297,5 ppm, resultando em uma redução de apenas 36% do fósforo, além disso, percebeu-se a formação de emulsão.

Em relação ao Ensaio 2 (catalisado por 5000 ppm de NS 40116 e 50 ppm de Lecitase Ultra) percebeu-se que neste ensaio demorou mais para ocorrer uma diminuição do percentual de acidez (Tabela 6), ou seja o consumo dos AGL do que no ensaio de hidroesterificação empregando apenas a lipase NS40116, demonstrando que a capacidade da NS 40116 de catalisar a hidroesterificação foi afetada pela presença da Lecitase Ultra, como observado no ensaio de hidrólise, devido a competitividade pelo mesmo sítio ativo, uma vez que a Lecitase Ultra não atua somente sob o fosfolípido. Em relação ao teor de fósforo, ocorreu uma redução de 52,5%, pois o mesmo passou de 464,9 ppm para 220,6 ppm.

Na Tabela 6, pode-se visualizar o valor médio da acidez durante as primeiras sete horas de reação, ao término das 48 horas e após a neutralização, dos três ensaios de hidroesterificação realizados.

Com o intuito de compreender o efeito da NS 40116 combinada com Quara LowP sob a hidroesterificação do óleo de soja bruto, empregou-se as condições descritas em 5.3.3, 100 g de óleo de soja bruto, 2% de água 5000 ppm de NS 40116, 50 ppm de Quara LowP, 1,5 equivalentes de metanol em 12 adições, a 45°C e 200rpm (Ensaio 3). Pode-se perceber que neste ensaio ocorreu no início na reação um maior aumento do percentual de acidez, devido à hidrólise. Além disso, iniciou-se a redução da acidez após cinco horas de reação, entretanto, ao término das 48 horas observou-se o menor percentual de acidez, indicando maior consumo de AGL e

consequentemente maior produção de ésteres metílicos, como pode ser visualizado na Tabela 6.

Destaca-se ainda que visualmente o produto obtido por meio deste processo, em relação à cor e viscosidade, caracteriza-se como biodiesel, como demonstrado na Figura 25.

Tabela 6. Cinética reacional de hidroesterificação do óleo de soja bruto.

Tempo (h)	Acidez 1 (% m/m) *	Acidez 2 (% m/m) *	Acidez (% m/m) *
0	5,04 ± 0,06	5,9 ± 0,01	2,81 ± 0,016
1	12,15 ± 0,01	11,41 ± 0,01	13,00 ± 0,01
2	12,51±0,03	13,01±0,29	13,45±0,02
3	12,22±0,08	11,65±0,06	12,66±0,01
4	9,94±0,06	11,38±0,04	12,29±0,29
5	9,28±0,02	11,17±0,02	11,21±0,01
6	8,30±0,29	10,03±0,01	10,03±0,01
7	6,34±0,02	6,54±0,01	7,32±0,24
48	2,02±0,01	2,48±0,02	1,81±0,05
Neutralização	0,36±0,01	2,98±0,005	0,23±0,004

*médias de triplicatas ± desvio padrão amostral.

Acidez 1: NS 40116 (5000ppm) + óleo de soja bruto; **Acidez 2:** NS 40116 (5000ppm) + Lecitase Ultra (50ppm) +óleo de soja bruto; **Acidez 3:** NS 40116 (5000ppm) +Quara LowP (50ppm) +óleo de soja bruto

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25. Produto obtido por hidroesterificação catalisada por NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm).



Em relação ao teor de fósforo, neste ensaio ocorreu uma redução de 61,3%, passando de 464,9 ppm para 180ppm de fósforo.

6.1.11 Ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em uma única etapa.

Pode-se conhecer o efeito da presença de NaOH na ação das enzimas NS 40116 e Quara LowP através das seguintes condições: 100 g de óleo de soja bruto, 2% de água, 100 ppm de NaOH, 5000 ppm de NS 40116, 50 ppm de Quara LowP, 1,5 equivalentes de metanol em 12 adições, a 45 °C e 200 rpm e 72 horas de reação.

Para o melhor acompanhamento da reação, além das análises do teor de AGL no meio reacional, foram realizadas análises do percentual de glicerina combinada (GC) na fase éster. A determinação da glicerina combinada inclui mono-, di- e triglicerídeos, que são provenientes da reação incompleta dos glicerídeos, logo é um importante parâmetro utilizado na avaliação da eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; PRICE et al., 2016). A GC tem sido empregada nas indústrias de biodiesel no intuito de verificar a eficiência da reação, sendo aceitáveis valores inferiores a 0,23%. Os valores de acidez juntamente com valores menores que 0,23% de glicerina combinada (GC), evidenciam que a reação de hidroesterificação ocorreu de forma satisfatória. Na Tabela 7 pode-se

visualizar o valor da acidez e GC, determinados a cada 12 horas de reação, ao término das 72 horas e após a neutralização.

Pode-se observar que o valor de GC evidencia que após 48 horas de reação o produto já estava especificado para biodiesel (valor de GC inferior a 0,23%). Além disso, destaca-se que houve uma redução maior da concentração do fósforo, uma vez que após este ensaio a fase topo antes da neutralização apresentou 68,89 ppm de Fósforo e após a neutralização a concentração na fase éster foi de 54,5 ppm, obtendo-se assim, uma redução de 88,3% do teor de fósforo.

Tabela 7. Resultados da hidroesterificação catalisada pela enzima NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm) com adição de 100ppm de NaOH em uma única etapa

Tempo (h)	Acidez (% m/m)	Glicerina Combinada (% m/m)
12	2,28	0,5
24	1,72	0,07
36	1,64	0,17
48	1,64	0,11
60	1,87	0,01
72	1,89	0,03
Neutralização	0,11	0,03

Fonte: Elaborado pela autora.

6.1.12 Ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em duas etapas.

Neste ensaio empregou-se as condições descritas no item 5.4.3, 100 g de óleo de soja bruto, 2% de água, 100 ppm de NaOH, 5000 ppm de NS 40116, 50 ppm de Quara LowP, 1,5 equivalentes de metanol em 12 adições, a 45°C e 200rpm e 72 horas de reação, em duas etapas. Ressalta-se que as duas etapas foram separadas, com centrifugação para eliminação do fósforo, visando facilitar a ação da NS 40116. Na tabela 8, pode-se visualizar o valor da acidez e GC, determinados a cada 12 horas de reação, ao término das 72 horas e após a neutralização.

Tabela 8. Resultados hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000 ppm) e Quara LowP (50 ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em duas etapas

Tempo (h)	Acidez (% m/m)	Glicerina Combinada (% m/m)
12	2,13	0,18
24	2,04	0,09
36	1,90	0,07
48	2,46	0,03
60	1,13	0,03
72	1,96	0,01
Neutralização	0,03	0,01

Fonte: Elaborado pela autora.

Observando os valores de porcentual de acidez e GC pode-se entender que a reação de hidroesterificação enzimática em duas etapas se desenvolveu melhor do que quando realizada em uma única etapa, nas mesmas condições. Sendo que em relação à GC este ensaio apresentou um valor baixo no final das 72 h de reação. Em relação à concentração de fósforo, ao final da hidrólise a mesma foi de 60,24 ppm, sendo após a esterificação foi reduzido para 30,12 ppm, dessa maneira, obteve-se uma redução de 93,5% da concentração de fósforo inicial, demonstrando a potencialidade deste processo para a produção de biodiesel a partir de matérias graxas de baixo custo, com elevada acidez e concentração de fósforo, sem ser necessário pré-tratamento da matéria-prima.

No entanto, embora apresentando resultados mais satisfatórios, a hidroesterificação enzimática do óleo de soja bruto em duas etapas, sob um ponto de vista industrial, é inviável em função de ser muito laborioso. Pois, no caso foi necessário realizar a degomagem enzimática com a Quara LowP, em seguida centrifugou-se e recolheu-se a fase topo, para dar continuidade a reação de hidroesterificação com a enzima NS 40116.

6.1.13 Repetição do ensaio de hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm) com adição de 100 ppm de NaOH em uma etapa.

Buscando compreender se o processo possui reprodutibilidade, neste ensaio empregou-se as condições descritas no item 5.5.0, 100 g de óleo de soja bruto, 2% de água, 100 ppm de NaOH, 5000 ppm de NS 40116, 50 ppm de Quara LowP, 1,5 equivalentes de metanol em 12 adições, a 45°C e 200 rpm e 72 horas de reação, em uma etapa.

Na Tabela 9, pode-se visualizar o valor médio das triplicatas da acidez e GC, determinados a cada 12 horas de reação, ao término das 72 horas e após a neutralização.

Tabela 9. Resultados hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisada pela enzima NS 40116 (5000ppm) e Quara LowP (50ppm) com adição de 100ppm de NaOH em uma etapa.

Tempo (h)	Acidez (% m/m)*	Glicerina Combinada* (% m/m)
12	5,44± 0,5	0,46±0,4
24	4,03±0,03	0,22±0,03
36	1,86±0,09	0,11±0,009
48	2,35±0,08	0,09±0,01
60	2,01±0,22	0,08±0,02
72	1,83±0,02	0,03±0,02
Neutralização	0,08±0,001	0,03±0,01

*média das triplicatas ± desvio padrão

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os valores de porcentual de acidez e GC pode-se entender que a reação de hidroesterificação enzimática, embora apresentado valores semelhantes aos demais ensaios, ocorreu de forma diferenciada, indicando a influência da concentração de fósforo na reação de hidroesterificação enzimática. Uma vez que o óleo empregado neste ensaio apresentou 668,7ppm de fósforo. A determinação da

concentração de fósforo ao término da reação na fase éster foi de 40,3 ppm de fósforo. Assim, a partir desta reação reduziu-se 93,97% da concentração de fósforo.

Os baixos valores de glicerina combinada (<0,2) indicando um bom desenvolvimento da reação, somados a significativa redução do teor de fósforo (93,97%) e simplicidade do processo, evidenciam a potencialidade da aplicação da hidroesterificação do óleo de soja bruto catalisado por NS 40116 e Quara LowP para a produção industrial de biodiesel. Pois além de possibilitar o uso de uma matéria-prima de menor custo, em comparação com o óleo de soja degomado e neutralizado, dispensa o processo de degomagem, á quente ou ácida, para retirada dos fosfolipídios, responsáveis pela formação de gomas e perdas no rendimento da reação. Dessa maneira, o processo se torna menos oneroso, não sendo necessário o tratamento dos resíduos ácidos provenientes da degomagem.

6.1.14 Caracterização dos ésteres metílicos

Ao final das 72h de reação, obteve-se um teor de AGL de 0,1%, AGT 0,298%, monoglicerídeos 0,488%, diglicerídeos 1,045% e triglicerídeos 0,206% além de uma conversão de 86,23%, tendo visto que o óleo de soja bruto apresenta um teor de ácidos graxos totais de aproximadamente 85%, a partir do processo realizado 100% dos ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos. 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%, foram empregadas as seguintes condições: 20 g de óleo de soja em bruto, 1% p / p de solução de lipase Callera Trans L e quantidades diferentes de água: 3%, 5%, 10%, 15% (p / p), 16% (p / p) de metanol, que foi adicionado em quatro etapas a 35 °C e 200 rpm. A partir desse processo obtiveram a produção de 96% de ésteres metílicos após 24 h de reação.

Outro estudo, realizado por Remonato (2017) empregando óleo de soja refinado, nas seguintes condições reacionais: lipase Eversa Transform 1% (m/m), razão molar óleo de metanol/ soja de 4,5:1 e 2,5% de água com incubação em shaker a 35°C e 250 rpm, obteve uma conversão de 95,3% em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) com 16 h de reação. Nas mesmas condições, mas com 0,5% de enzima, a autora observou a conversão de 95,1% em ésteres, porém, no tempo reacional de 40h. Também se observou os valores de AGL (2,1%), seguidos por MAG (0,2%), DAG (1,4%) e TAG (1,3%).

Quando utilizado óleo de soja refinado com acréscimo de 75% de ácido oleico, razão molar metanol/óleo de 4,5:1, 2,5% (m/m) de água destilada e 1% (m/m) de enzima *Eversa® Transform*, incubado em shaker a 35 °C/250 rpm, Remonato (2017) obteve um teor de ésteres de 85,97% em 16 horas, evidenciando a dificuldade em produzir ésteres metílicos a partir de matérias primas com elevado teor de AGL.

Considera-se o resultado obtido (86,23%) satisfatório, uma vez que a presença de AGLs leva à formação indesejável de sabões e a presença de água pode levar à hidrólise dos TAGs, além disso, o uso de matérias-primas ricas em AGL podem acarretar maior formação de água devido à esterificação desses, fato que se caracteriza como a principal dificuldade de se utilizar materiais graxos residuais (BANKOVIĆ-ILIĆ; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012; SOARES, 2014; REMONATO,2017).

Uma alternativa para melhorar o desenvolvimento da reação segundo Shibasaki-Kitakawa et al. (2015) o ideal seria a remoção de água durante a reação e a adição de álcool em excesso, visando deslocar o equilíbrio da reação em direção a formação de produto.

Além disso, o óleo de soja bruto apresenta uma quantidade relativamente elevada de fósforo, geralmente tem um teor de 400 a 1.200 ppm e um percentual de 1-3% de fosfatídeos, o que pode acarretar em dificuldades no armazenamento, devido à formação de precipitado e acumulação de água (CESARINI *et al.*, 2014; DEMIRBAS *et al.*, 2016). Devido a isso, é recomendado que antes do processo de produção do biodiesel, o óleo ou gordura passe por um pré-tratamento denominado degomagem, para remoção de grande parte dos fosfolipídios (LÔBO, FERREIRA, & CRUZ, 2009). Destaca-se através do processo de hidroesterificação em uma única etapa realizado obteve-se uma redução significativa do teor de fósforo que passou de 464,99 ppm para 24,93 ppm de fósforo, como pode ser observado na tabela 10.

Tabela 10. Resultados Caracterização do Produto Obtido. *ANP 45 de 25/08/14

Parâmetro	Valor obtido	Valor de referência*
Massa específica (Kg/m ³)	882,1	850 a 900
Viscosidade cinética (mm ² /s)	4,4463	3,00 a 6,00
Estabilidade a oxidação (h)	4,76	6,0
Índice de acidez	0,2	0,50
Teor de enxofre (mg/kg)	5,187	10,00
Teor de fósforo (mg/kg)	24,93	10,00
Índice de iodo	131,92	
Teor de água (mg/Kg)	909,5	200,00
Cálcio + magnésio (mg/Kg)	32,41	5,00
Sódio + Potássio (mg/Kg)	1,518	5,00

Além do teor de fósforo, realizou-se a caracterização dos ésteres metílicos produzidos em relação a outras dez propriedades, cujos valores são demonstrados na mesma tabela. Destaca-se que a massa específica, viscosidade cinética, índice de acidez, teor de enxofre, e concentração de sódio e potássio apresentaram valores dentro da especificação do biodiesel (ANP, 2014), fato que evidencia a potencialidade da aplicação de hidroesterificação enzimática do óleo de soja bruto para a produção de biodiesel.

Porém, os parâmetros estabilidade a oxidação, teor de água, teor de fósforo, índice de iodo e concentração de cálcio e magnésio apresentaram valores diferentes dos determinados pela ANP n°45 (2014), observa-se assim que é necessária uma otimização das etapas envolvidas no processo, visando à produção de ésteres metílicos que atendam às especificações estabelecidas para o biodiesel.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do processo empregado pode-se obter um resultado satisfatório de conversão em ésteres metílicos, 86,23 % (completa conversão dos ácidos graxos) com uma redução de 93,97% do fósforo, empregando-se 100g de óleo de soja, 2% de água, 1,5 eq de metanol (12 adições), 5000ppm NS 40116 combinada com 50ppm de Quara LowP, a 45°C e 250rpm. Esse resultado evidencia que as enzimas Quara LowP e NS40116 são biocatalisadores potenciais para produção industrial de biodiesel. Além disso, destaca-se que algumas propriedades dos ésteres metílicos produzidos, podendo-se citar a massa específica, viscosidade cinética, índice de acidez, teor de enxofre, e concentração de sódio e potássio apresentaram valores dentro da especificação do biodiesel. Evidenciando a potencialidade da aplicação do processo de hidroesterificação enzimática do óleo de soja bruto para a produção de biodiesel.

Assim, o objetivo deste trabalho de se verificar a possibilidade de produzir ésteres metílicos a partir do óleo de soja bruto, catalisado por uma lipase combinada com uma fosfolipase em uma única etapa foi alcançado com êxito. Entretanto, os parâmetros estabilidade a oxidação, teor de água, teor de fósforo, índice de iodo e concentração de cálcio e magnésio apresentaram valores diferentes dos determinados pela legislação que especifica o biodiesel, dessa maneira, algumas recomendações para trabalhos futuros podem ser feitas:

Considera-se necessária uma otimização das etapas envolvidas no processo, a partir de um delineamento experimental, visando à produção de ésteres metílicos que atendam às especificações estabelecidas para o biodiesel.

Além disso, entende-se por fundamental a realização de um estudo de viabilidade técnica e econômica, para apresentar este processo como uma substituição rentável em relação ao método empregado atualmente para a produção industrial do biodiesel.

8. REFERÊNCIAS

ADACHI, D. et al. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410–416, 2013.

ADACHI, S.; KOBAYASHI, T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n.2, p. 87–94, 2005.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135,n.1, p. 315–321, 2014.

ALOULO, A. et al. Exploring the specific features of interfacial enzymology base on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761,n.9, p. 995–1013, 2006.

Al-Zuhair S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bio-prod Bior-Biopr** 2007;1:57–66.

AMARAL, E. et al. Degomagem enzimática de óleo de mamona produzido no Vale do Rio Pardo. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, p. 100–114, 2014.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **AOCS Cd 3d-63**: Acid Value.

ANP. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005., Brasília, p. 52, 14 janeiro 2005. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/>>. Acesso em: 15 março 2017.

ANP. ANP: Agência Nacional de Petróleo, 2010. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/rodada-legislacao>. Acesso em: 20 fevereiro 2017.

ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/>>. Acesso em: 26 março 2017.

ASSOCIAÇÃO ESPANHOLA DE CERTIFICAÇÃO E NORMALIZAÇÃO. EN 14103. Fat and oil oil derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents, Madri, 2003.

BANKOVIĆ-ILIĆ, I. B.; STAMENKOVIĆ, O. S.; VELJKOVIĆ, V. B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n.6, p. 3621–3647, 2012.

CARVALHO, P. D. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n.1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L. D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n.6, p. 648–654, 2005.

CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. I. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

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. et al. Combining phospholipases and liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n.29, p. 1-12, 2014.

CHEN, Y. et al. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bead reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 668–673, 2009.

COWAN, D. De-oiling of vegetable gums. **Novozymes**, p. 1-4, dezembro 2013.

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

DALL'AGNOL, A. BODIESELBR. **BODIESELBR**, 2007. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/%20convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja.htm>>. Acesso em: 28 mar, 2017.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27,n.4, p. 623-630, 2004.

DE MARIA, L. et al. Phospholipases and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, p. 290-300, 2007.

DE OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 742-756, 2009.

DEMIRBAS, A. et al. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 34, n. 2, p. 290–318, 2016.

DIAZ, J. C. M. et al. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n.5, p. 1042–1050, 2006.

ENCARNAÇÃO, Ana Paula Gama. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação,uma avaliação econômica**. 2008. p. 144. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2008.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense Camb*). **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 16-19, 1998.

FAN, X.; WANG, X.; CHEN, F. Biodiesel Production from Crude Cottonseed Oil: An Optimization Process Using Response Surface Methodology. **The Open Fuels & Energy Science Journal**, v. 4, p. 1-8, 2011.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. D. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 455-464, 2002.

GALLINA, André Lazarin. **Uma alternativa sustentável para a produção de biodiesel: *Cyperus esculentus***. 2011. p. 104. Dissertação (Mestrado em Bioenergias)- Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-graduação em Bionergia, Guarapuava, 2011.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of Lipase in Kinetic Resolution of **Racemates**. **Chirality**, v. 17, p. 1-15, 2005.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, n.3, p. 379–386, novembro 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, 4ª edição, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n.4, p. 390–397, 2002.

JIANG, F. et al. Degumming of vegetable oils by a novel phospholipase B from *Pseudomonas fluorescens* BIT-18. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8052–8056, 2011.

KIRK, O; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications, v. 13, n.4, p. 345–351, 2002.

KRÜGER, R. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 2010. p. 131. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LEHNINGER, A. L., **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1986.

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

LUCENA, THOMAS KRISP. **O biodiesel na matriz energética brasileira**. 2004. p.80. Monografia (Bacharel em Economia)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Economia, Rio de Janeiro, 2004.

MANDARINO, J. M. G; HIRAKURI, M.H; ROESSING, A.C. Tecnologia para produção de óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. **EMBRAPA**, p. 1-43, junho, 2015.

MISHRA, M. K. et al. Lipase activity of Lecitase Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n.24, p. 2854–2860, 2009.

MORETTO, E. & FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais** – Na Indústria de alimentos. Ed. Varela, São Paulo, 1998. 150p.

NELSON, L.A; FOGLIA T. A; MARMER, W.N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **J Am Oil Chem Soc.** v. 73, p. 1191–5, 1996.

NOVOZYMES. The novozymes enzymatic biodiesel handbook, 2015.

PARENTE, E. D. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. **Tecbio**, Fortaleza/CE, 2003.

PINHEIRO, D. M. Produção de lipase por *Penicillium restrictum*. 1992. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992

POPIOLSKI, ARIANA SECCO. **Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom**. 2011.p.124. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Engenharia de Alimentos Erechim, 2011.

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.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel - Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, p. 28-37, jul/dez 2003.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n.5, p. 385-405, 2011.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.1, p. 317-369, 2017.

REDA, S.Y. **Estudo Comparativo de Óleos Vegetais Submetidos a Estresse Térmico**. 2004, p.153. Dissertação. Universidade Universidade Federal de Ponta Grossa, 2004.

RINALDI, R. et al. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Quím. Nova**, v.30, n.5, p. 1374-1380, 2007.

RODRIGUES, Hugo de Souza. Obtenção de ésteres etílicos e **metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira Latino Americana macaúba- *Acromia aculeata***.2007.p.236.Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, Pós-graduação em Química, Ribeirão Preto, 2007.

ROSA, G. O. et al. Modelagem e avaliação do processo de degomagem no refino de óleo de soja. **ENGEVISTA**, v. 18, p. 78-95, 2016.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHU, Z. Y. et al. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n.1, p. 1–8, 2010.

SOARES, Diniara. **Desenvolvimento do processo de esterificação etílica enzimática de ácidos graxos em reator de leito fixo**.2014. p. 156. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Ciências: Bioquímica, Curitiba, 2014.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technol.** v.3, p.182–96, 2010.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 308- 317, 2003.

WATANABE, Y et al. Enzymatic Production of Fatty Acid Methyl Esters by Hydrolysis of Acid Oil Followed by Esterification. **J Am Oil Chem Soc**, v. 84, n.11, p. 1015–1021, 2007.

ZENEVICZ, M. C. P. et al. Hidroesterificação enzimática de óleo de fritura em sistema de ultrassom utilizando lipases imobilizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014, Florianópolis. **Anais eletrônicos...**Florianópolis: COBEQ, 2014. Disponível em: < <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0938-22301-172268.pdf>>. Acesso em: 14 abr.2017.