



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS ERECHIM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES POR BIOCATALISADOR UTILIZANDO GORDURA  
RESIDUÁRIA PROVENIENTE DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E ENERGIA**

**MICHELE MAISA MALESKI**

**ERECHIM, 2018**

MICHELE MAISA MALESKI

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES POR BIOCATALISADOR UTILIZANDO GORDURA  
RESIDUÁRIA PROVENIENTE DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E ENERGIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul Campus Erechim para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

**Orientadoras:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Gean Delise L. P. Vargas e Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarissa Dalla Rosa

**ERECHIM, 2018**

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

Avenida General Osório, 413 D.  
CEP: 89802-265  
Caixa Postal 181  
Bairro Jardim Itália  
Chapecó - SC  
Brasil

**MICHELE MAISA MALESKI**

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES POR BIOCATALISADOR UTILIZANDO GORDURA  
RESIDUÁRIA PROVENIENTE DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E ENERGIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, defendido em banca examinadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2018.

Orientador (as): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. GeanDelise Leal Pasquali Vargas  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Dalla Rosa

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gean Delise Leal Pasquali Vargas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Dalla Rosa

---

Prof. Dr. Rogério Dallago- URI- Campus Erechim

---

Prof. Dr. João Paulo Bender– UFFS- Campus Chapecó

Erechim/RS, 26 de Fevereiro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por guiar meus caminhos e me mostrar que posso sempre ir além, até onde meus sonhos me permitir.

A minha mãe Marisa que como uma guerreira sempre esteve ao meu lado me incentivando e me dando forças para lutar pelos meus sonhos. E toda a minha família, minha base, que com muito carinho contribuíram de alguma forma para que chegasse até aqui.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Gean Delise Leal Pasquali Vargas por toda a dedicação, paciência e compreensão tanto para elaboração deste trabalho, quanto ao meu crescimento profissional e todo conhecimento adquirido.

A minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarissa Dalla Rosa pela enorme contribuição no desenvolver deste trabalho, por todo o conhecimento compartilhado e carinho envolvido. Levo comigo a certeza de que não ganhei apenas grandes professores mais sim grandes amigas que vou levar no meu coração.

Aos amigos, companheiros de mestrado, que juntos fomos mais fortes, dividindo angustias, conhecimentos, parcerias. Uma turma que com certeza vai deixar muitas saudades, agradeço cada um, foi um presente poder conhece-los.

Gostaria de agradecer ao Maiquel Bonato e toda a equipe do laboratório da Olfar que com muito orgulho pude fazer parte, por toda a gentileza e auxílio tanto por fornecer a matéria prima estudada quanto as análises realizadas, sua contribuição foi de extrema importância para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Marcela, Wesller, Diego, aos técnicos que com muita dedicação contribuíram para a elaboração deste trabalho, pelas trocas de conhecimento pela companhia em várias horas de experimentos.

A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos, pois sem a contribuição de cada um nada disso seria possível, ninguém constrói nada sozinho, levo todos no meu coração vocês fazem parte da minha construção tanto pessoal quanto profissional.

“Quem não sonha não realiza,  
Quem não ousa não conhece seus limites ! “

**Arquimedes Bastos.**

## RESUMO

A demanda global de energia tem aumentado significativamente, devido ao esgotamento dos combustíveis fósseis, e o crescimento contínuo da população mundial. A maioria dos combustíveis, utilizados nos dias de hoje, são obtidos principalmente de combustíveis fósseis. Estas fontes acabam prejudicando o meio ambiente, além de serem não renováveis, ocorrendo riscos de escassez ainda causam danos à saúde. Os biocombustíveis surgem como uma alternativa para a produção de uma energia limpa e sustentável. Este biocombustível pode ser definido como uma mistura de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, produzido com matérias renováveis, como óleo vegetal, gordura animal e gorduras residuais. Sob este contexto a busca por fontes alternativas e a produção de energia de uma maneira limpa e sustentável vem se justificando em forma de pesquisas que utilizem resíduos para produção de ésteres. Neste trabalho estudou-se a produção de biodiesel enzimático utilizando como substrato a gordura residual proveniente do processo de tratamento primário (coagulação química) do efluente de uma indústria de alimentos e energia, utilizando como catalisador a lipase comercial NS-40116. Neste trabalho avaliaram-se variáveis concentração de enzima (0,3%, 0,5%, 0,7%), razão molar gordura:etanol (1:3, 1:4, 1:5) para a produção de ésteres. Foram acompanhados como respostas a conversão de ésteres (biodiesel), ácidos graxos livres (AGL) e atividade enzimática residual. Os resultados demonstraram que na produção de ésteres os melhores resultados foram adquiridos no ensaio 6, onde obteve-se uma conversão de ésteres 87,9%, com concentração de enzima (0,5%) e a razão gordura:etanol (1:4) no tempo reacional de 8 horas. Nesta condição, foram produzidas bateladas destes ésteres de forma a obter volume de amostra necessário para comparar as análises de qualidade dos ésteres produzidos aos limites exigidos pela ANP. Ao compararmos os resultados, podemos concluir que todos os parâmetros avaliados, com exceção do teor de enxofre, encontraram-se dentro dos limites de conformidades exigidas pela ANP. Com esses resultados foi possível verificar o potencial de uso deste resíduo de estação de tratamento para a produção de biodiesel etílicos por transesterificação enzimática utilizando a enzima Novozymes NS-40116.

**Palavras-Chave:** Ésteres Etílicos; Lipase; Resíduo de Estação de Tratamento.

## ABSTRACT

Global demand for energy has increased significantly, due to the exhaustion of fossil fuels, and the continuous growth of world population. Most fuels, used today, are obtained primarily from fossil fuels. These sources end up harming the environment, besides being non-renewable (and, as such, facing risks of scarcity) and causing health damage. Biofuels appear as an alternative to produce clean and sustainable energy. Biofuel can be defined as a mixture of acid methyl esters of long-chain, produced with renewable materials, as vegetal oil, animal and residual fats. In this context the search for alternative sources and the production of energy through a clean and sustainable manner is being justified through research which utilizes residuals to produce esters. This work studies the production of enzymatic biodiesel using as a substrate residual fat coming from the process of flotation of the effluent from an industry of nutriment and energy, using as a catalyzer a new lipase obtained through *Thermomyces lanuginosus*, a NS-40116. Through testing variables of enzymatic concentration (0,3%, 0,7%, 0,5%) molar fraction fat:etanol (1:3, 1:5, 1:4) for the production of esters, the conversion of esters (biodiesel), free fatty-acids and residual enzymatic activity. The results show that in the production of esters the better results were acquired in the test 6, where it was attained a conversion of esters of 87,9%, with enzymatic concentration (0,5%) and the ratio fat:etanol (1:4) in the reactional time lapse of 8 hours. In this condition, batches of these esters were produced in a manner as of attaining volume of sample needed for quality analysis comparison of the esters produced in the required limits demanded by ANP. Through comparison of results, we can conclude that all the parameters evaluated, apart from sulfur content, find themselves within the limits of the conformities required by ANP. With those results it was possible to verify the potential use of this residue of treatment station for the production ethylic biodiesels through enzymatic transesterification using the enzyme Novozymes NS-40116.

Key-words: Biodiesel, Lipase, Residue of Treatment Station

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Selo Combustível Social. ....	21
Figura 2 - Evolução temporal das misturas de biodiesel adotada no Brasil. ....	22
Figura 3 - Produção mensal de biodiesel. ....	23
Figura 4 – Matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil. ....	24
Figura 5 – Evolução mensal da produção de biodiesel no país em m <sup>3</sup> , 2018. ....	25
Figura 6 – Vias de reação para a produção de biodiesel (R é um grupo alquil pequeno, R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> são cadeias de ácidos graxos; K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>3</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>5</sub> , K <sub>6</sub> são catalisadores químicos ou enzimáticos). ....	28
Figura 7 - Estrutura de formas aberta e fechada da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	31
Figura 8 - Resíduo proveniente da etapa de flotação do efluente de uma indústria alimentícia e de energia obtido na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE). ....	33
Figura 9 - Óleos e graxas extraídos da amostra de efluente .....	37
Figura 10 - Cadinhos com amostra de efluente após o procedimento de análise de teor de umidade. ....	38
Figura 11 - Amostra de ésteres preparadas para injeção no cromatógrafo gasoso (GC). ....	41
Figura 12 - Amostras de ésteres etílicos .....	42
Figura 13 - Cinética de concentração de ácidos graxos livres (AGL) por tempo de reação. ....	49
Figura 14 - Cinética de atividade enzimática residual por tempo de reação. ....	51
Figura 15 - Cinética de produção de ésteres etílicos por tempo de reação. ....	53

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental.....	36
Tabela 2 - Caracterização físico-química da gordura residuária de efluente de uma indústria de biodiesel.....	43
Tabela 3 - Composição percentual de ácidos graxos.....	45
Tabela 4 - Condições experimentais - Razão Molar 1:4, enzima (0,5%).....	47
Tabela 5 - Concentração de ácidos graxos livres por tempo de reação.....	48
Tabela 6 - Atividade enzimática por tempo de reação. ....	50
Tabela 7 - Porcentagem de ésteres produzidos por tempo de reação.....	52
Tabela 8 – Comparação dos resultados das análises obtidos com os parâmetros exigidos pela Agência Nacional do Petróleo. ....	55

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1 História do biodiesel no Brasil .....	20
3.2 BIODIESEL .....	26
3.2.1 Fontes de Matérias-primas .....	26
3.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	27
3.3.1 Produção por catálise enzimática .....	28
3.3.1.1 Lipases.....	29
3.3.1.1.1 Lipases de <i>Thermomyces Lanuginosus</i> .....	30
3.4 CARACTERÍSTICAS DO BIODIESEL COMERCIAL.....	31
3.5 RESÍDUO ESTAÇÃO DE TRATAMENTO.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.1 CATALISADOR ENZIMÁTICO .....	34
4.2 GORDURA RESIDUÁRIA DE EFLUENTE .....	34
4.2.1 Caracterização da Gordura Residuária .....	34
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	35
4.3.1 Reações de Transesterificação .....	35
4.3.2 Planejamento Experimental .....	35
4.4 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	36
4.4.1 Análise do pH .....	36
4.4.2 Óleos de Graxas.....	37
4.4.3 Teor de umidade.....	38
4.4.4 Identificação e quantificação de Ácidos Graxos Livres (AGL) .....	39

4.4.5 Determinação de ácidos graxos livres (AGL).....	39
4.4.6 Atividade da enzimática residual- NS-40116 .....	40
4.4.7 Determinação dos ésteres etílicos.....	41
4.4.8 Avaliação dos parâmetros do biodiesel segundo normas da ANP.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1 Caracterização da Gordura Residuária .....	43
5.2 Testes Preliminares.....	46
5.3 Reações de Transesterificação .....	47
5.3.1 Determinação de Ácidos Graxos Livres – AGL.....	47
5.3.2 Atividade Residual da enzima NS - 40116 .....	50
5.3.3 Determinação de ésteres etílicos.....	52
5.4 Avaliação dos parâmetros segundo normas da Agência Nacional de Petróleo - ANP .....	54
CONCLUSÃO .....	58
REFERÊNCIAS .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é considerado um combustível alternativo feito a partir de fontes naturais renováveis, tais como o óleo vegetal e gorduras (RATLEDGE, 1985; LEE et al., 2003). O uso de biocombustíveis tem muitos aspectos favoráveis; é biodegradável; apresenta redução de óxido de enxofre e gases de efeito estufa, não é considerado um material perigoso e existem inúmeras vantagens sociais e econômicas na sua utilização contribuindo para a proteção ambiental. (SCHUCHARDT et al., 1998; PARENTE, 2003; CHUAH et al., 2017).

Este biocombustível pode ser obtido através de três processos de produção: pirólise, microemulsão e trans/inter/esterificação (MA et al., 1999). O processo por pirólise envolve a decomposição térmica do material orgânico em moléculas menores por meio da aplicação de calor, sem a adição de ar suplementar ou oxigênio. (ALENCAR et al., 1983; OMAR et al., 2014). Já a microemulsão é um processo utilizado para formular combustíveis diesel híbridos, por solubilização das misturas de óleo vegetal/álcool com a adição de compostos anfífilos (SCHWAB et al., 1983). Dentre estes processos a transesterificação química é a mais utilizada atualmente, pois se trata de um método mais viável em comparação aos outros processos. A transesterificação consiste em converter o óleo ou gordura em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e como subproduto glicerol, a reação acontece na presença de um catalisador. Os catalisadores a serem utilizados podem ser alcalinos, ácidos ou enzimáticos (FUKUDA et al., 2001; ATADASHI et al., 2011).

Entre os processos de produção de biodiesel a transesterificação enzimática é mais adequado para uso em matérias-primas ricas em ácidos graxos livres, tais como: óleos residuais, graxas, sebo bovino, banha e resíduos de estação de tratamentos de efluentes, dentre outros. Utilizando métodos químicos a transesterificação ocorre de maneira incompleta, mas o custo elevado da enzima limita a sua produção em escala industrial (DU et al., 2008; BABAKI et al., 2017).

As enzimas, tais como lipases, são biocatalisadores que oferecem uma via biológica de produção de biodiesel com uma série de vantagens ambientais e econômicas sobre a rota química, dentre elas estão o uso de temperaturas de reação amenas, eliminação de custos de tratamento associados à recuperação de catalisadores químicos, oportunidade para sua reutilização e maior estabilidade através da imobilização enzimática. A principal vantagem da catálise enzimática está na possibilidade da utilização de resíduos de baixo custo como matéria-prima para a produção de ésteres (KAZLAUSKAS et al., 1998; FUKUDA et al., 2001; SOUZA, 2010; ATADASHI et al., 2011).

As lipases são enzimas que pertencem ao grupo das serina hidrolases que não necessitam de qualquer cofator para a sua ligação catalítica. Os substratos naturais para lipases são os triacilgliceróis que têm baixa solubilidade em água. Geralmente catalisam a hidrólise da ligação éster a uma interface entre substrato aquoso e insolúvel. (MASSE et al., 2001). A ativação interfacial das lipases ocorre geralmente na interface água lipídica, sendo considerada como uma característica estrutural única. O sítio ativo das lipases são protegidos pela unidade oligopeptídeo helicoidal. Esta unidade após interação com uma interface hidrofóbica sofre alterações sequenciais e expõe o local ativo, de tal modo que proporcione o acesso livre para o substrato. Seu sítio ativo é composto principalmente por serina, histidina e aspartato, complexos de enzima acil (SCHMIDT e VERGER, 1998; JAEGER et al., 1999 e VILLENEUVE et al., 2000).

No entanto, existem vários desafios técnicos que precisam melhorar a viabilidade econômica para o uso do processo com biocatalisadores, dentre eles estão o alto custo das enzimas, perda de atividade durante o processo, a inibição da enzima por reagentes e produtos, e as taxas de reação lenta. Apesar disso, recentemente com os avanços na tecnologia, diferentes processos vem sendo utilizados para desenvolver sistemas que apresentem um melhor custo benefício, onde dentre eles estão o uso de lipases tolerantes a solventes a reutilização de catalisadores de lipases imobilizadas e diferentes fontes de materias primas. (FUKUDA et al., 2001; M. Iso et al., 2001).

O biodiesel a partir de fontes não alimentares, tais como lodo de esgoto, óleo de cozinha usado, microalgas, resíduos de gordura animal e resíduos de estação de tratamento de efluentes vem ganhando uma atenção significativa devido aos seus valores econômicos e ambientais em comparação ao diesel de

petróleo. Além disso as fontes não alimentares são classificadas como resíduos, proporcionando benefícios econômicos e ambientais se for utilizado para a produção de biodiesel (REHAN et al., 2018).

Com base nesses aspectos o presente trabalho tem como objetivo utilizar como fonte de matéria-prima, para a produção de biodiesel, triglicerídeos e ácidos graxos provenientes da etapa de flotação da estação de tratamento de efluentes (ETE) de uma indústria alimentícia e de energia. Sendo a reação utilizada neste trabalho a biocatalítica através da enzima lipase NS – 40116 de origem microbiana produzida pela indústria Novozymes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi realizar a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) através do biocatalisador lipase NS-40116, utilizando como substrato a gordura residuária proveniente de processo de flotação do efluente de uma indústria de alimentos e energia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a caracterização do resíduo, proveniente do processo de tratamento de efluente através de análises de óleos e graxas, teor de umidade, pH e perfil de ácidos graxos.
- ✓ Determinar a atividade da enzima NS-40116 durante o período das reações de transesterificação.
- ✓ Avaliar as variáveis razão molar gordura:etanol e concentração de enzima na produção de ésteres utilizando a gordura residuária.
- ✓ Realizar acompanhamento cinético da concentração de ácidos graxos, atividade enzimática residual e produção de ésteres.
- ✓ Avaliar e definir as condições experimentais com vista a produção de biodiesel.
- ✓ Caracterizar os ésteres produzidos quanto aos padrões estabelecidos pelas normas vigentes para a classificação como biodiesel.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 HISTÓRIA DO BIODIESEL NO BRASIL

A ideia de se utilizar óleos vegetais como um combustível líquido em motores de combustão interna surgiu em 1900, quando Rudolf Diesel utilizou óleo diesel de amendoim (SHAY, 1993). No entanto naquela época, o petróleo tornou-se a fonte de energia dominante, em função de seu baixo custo e grande disponibilidade, assim o diesel de petróleo foi em seguida, desenvolvido como o principal combustível para motores diesel. Entretanto, os combustíveis de petróleo e seus derivados, periodicamente, se tornaram uma fonte cada vez mais escassa, desta forma a procura de fontes de energia alternativa tem surgido como uma opção as fontes fósseis (SCHUCHARDT et al., 1998; ZANIN et al., 2000; PARENTE, 2003).

Neste mesmo período, outras tecnologias foram utilizadas, como a pirólise dos diferentes triglicerídeos para o abastecimento de combustíveis líquidos em diferentes países, um exemplo disso, foi a produção de hidrocarbonetos na China, por um sistema de pirólise utilizando óleo de tungue como matéria-prima. Há relatos que durante a década de 1940 no Brasil, ocorreram as primeiras tentativas de exploração de energia a partir de óleos e gorduras em motores de combustão interna. Com isso, existem vários estudos que relatam sobre a utilização de óleos vegetais puros, tais como de babaçu, de coco, semente de ricina (mamona) e semente de algodão, bem como o uso de hidrocarbonetos produzidos por craqueamento termo-catalítico (SANTOS; Ã; POUSA, 2007; ZAREH; ZARE; GHOBADIAN, 2017; LIN; CHEN, 2017).

O primeiro programa governamental relativo a utilização de biocombustíveis, surgiu durante a Segunda Guerra Mundial, sendo o óleo de algodão o principal óleo vegetal produzido na época, onde a sua exportação era proibida, afim de forçar uma queda no seu preço tornando possível a sua utilização como combustível em trens (Chemical & Engenharia Metalúrgica, 1943). Nas décadas de 1970 e 1980 houve escassez de petróleo, desta forma o Governo Federal do Brasil criou em 1980 um programa chamado PROALCOOL (GOLDEMBERG et al., 2004), que implementava e regulamentava o uso do etanol hidratado como combustível (adaptações do motor foram necessários

para utilizar este combustível) e etanol anidro que poderia ser misturado com éter de petróleo e gasolina. É importante mencionar que desde 1980 o Brasil não utiliza a gasolina pura de petróleo, e sim um blends, que nada mais são que uma mistura de etanol/gasolina.

No final do século XX, o Governo Federal reiniciou a discussão sobre o uso de biodiesel e muitos estudos foram feitos por comissões interministeriais em parceria com universidades e centros de pesquisa (VIGLIANO, 2003). A partir daí, o biodiesel deixou de ser um combustível experimental e começou a ser produzido em escala industrial (SANT'ANNA, 2003).

Os dois principais mecanismos de incentivo a produção de biodiesel foi o PROBIODIESEL (Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel), criado pelo Decreto Presidencial, nº 702 e introduzidas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia (MCT) em 30 de outubro de 2002 e o PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel), criado pela lei Federal nº 11097/2005 em 13 de janeiro de 2005, que foram responsáveis pela introdução oficial do biodiesel na matriz energética brasileira (SANTOS et al., 2007).

Com o objetivo de promover a inclusão social, no ano de 2004 com o Decreto Nº 5.297/2004, foi criado o selo “Combustível Social” (SCS), Figura 1, com a finalidade de fornecer um mecanismo de atribuições de um selo aos produtores de biodiesel, fornecendo incentivos financeiros e fiscais. Os pequenos produtores, eram membros de cooperativas rurais que foram registrados no Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar – PRONAF (BRASIL, 2004).

**Figura 1** - Selo Combustível Social.



Fonte: Site do Ministério de Minas e Energia (MME).

Logo após o início do programa PNPB, em 2005 a indústria Brasileira começou efetivamente a iniciar a produção de biodiesel, até o final de 2007 não havia nenhum mandato sobre os percentuais de mistura entre diesel fóssil e biodiesel puro (B100). Em 2008 o governo brasileiro transformou obrigatória a adição do B100 ao diesel com as seguintes porcentagens: 2% (B2) de janeiro a junho de 2008, 3% (B3) de julho de 2008 á junho de 2009, 4% (B4) de julho a dezembro de 2009, e 5% (B5) a partir de janeiro de 2010 a junho de 2014, demonstrado na Figura 2. Com todo esse avanço na produção e consumo, o Brasil se tornou o quarto maior produtor de biodiesel no mundo (OLIVEIRA; COELHO, 2017).

Neste período, os produtores de biodiesel pediram um aumento nos percentuais de mistura. Desta forma o governo concordou e de acordo com a Lei Nº 13.033/2014, a qual estabeleceu a adição obrigatória de 6% a partir de 1º de julho de 2014 e de 7% a partir de 1º de novembro de 2014, ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em todo o território nacional (BRASIL, 2014).

**Figura 2** - Evolução temporal das misturas de biodiesel adotada no Brasil.



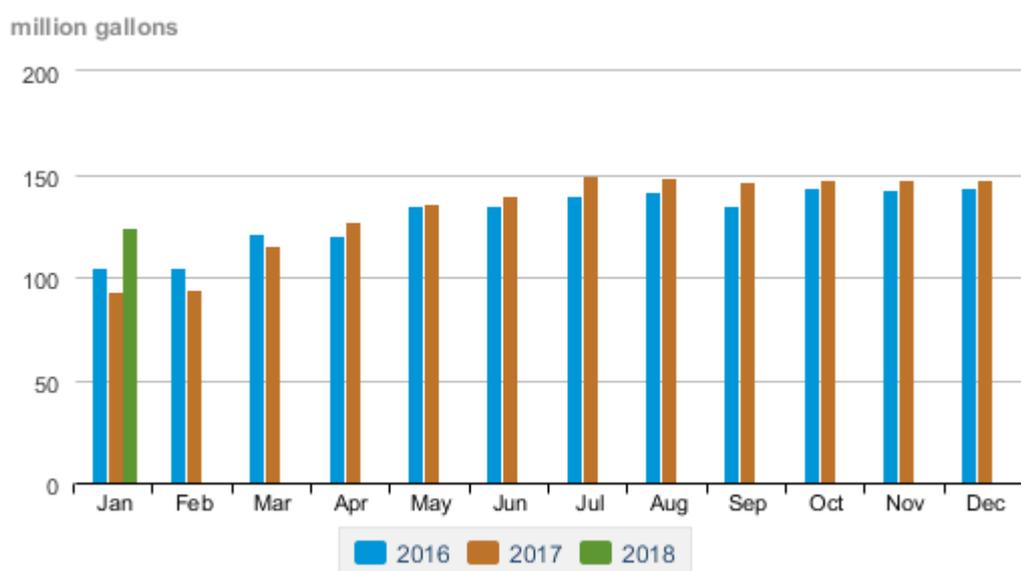
Fonte: OLIVEIRA e COELHO, 2017.

Nos dias de hoje, o biodiesel e o etanol foram responsáveis pela maior parte dos combustíveis renováveis utilizados na frota de transporte global, segundo o relatório de 2014 da Rede Renewable Energy Policy para o século 21 (REN21, 2014). Ambos os combustíveis representam um aumento da quota do mercado tanto no Brasil, como Estados Unidos e em alguns países Europeus. Em particular o biodiesel, teve um maior aumento entre os biocombustíveis na última década, esse crescimento representa 15 vezes o volume de produção 2002-2012. De acordo com o mesmo relatório, só em 2013 a produção e o

consumo de biocombustíveis nos transportes mundial aumentou 7%, ou seja, um pouco mais de 116 milhões de litros, onde o biodiesel representou cerca de 26 bilhões. Sendo a maior parte produzida e consumida pelo mercado Europeu (REN21, 2014).

Segundo dados mais recentes do relatório de janeiro de 2018, a produção americana de biodiesel foi de 124 milhões de galões, sendo que a região Centro-Oeste representou 68% do total dos Estados Unidos (Figura 3). Esta produção é representada por 94 usinas de biodiesel com capacidade de 2,4 bilhões de litros por ano. As vendas de biodiesel ao produtor durante este mesmo período incluíram 51 milhões de galões vendidos como B100 e um adicional de 65 milhões de galões de B100 vendidas em misturas de biodiesel em diesel de petróleo. Neste mesmo relatório, consta que o óleo de soja permaneceu como a maior matéria-prima para a produção de biodiesel, com 462 milhões de libras consumidas (EIA, 2018).

**Figura 3** - Produção mensal de biodiesel.

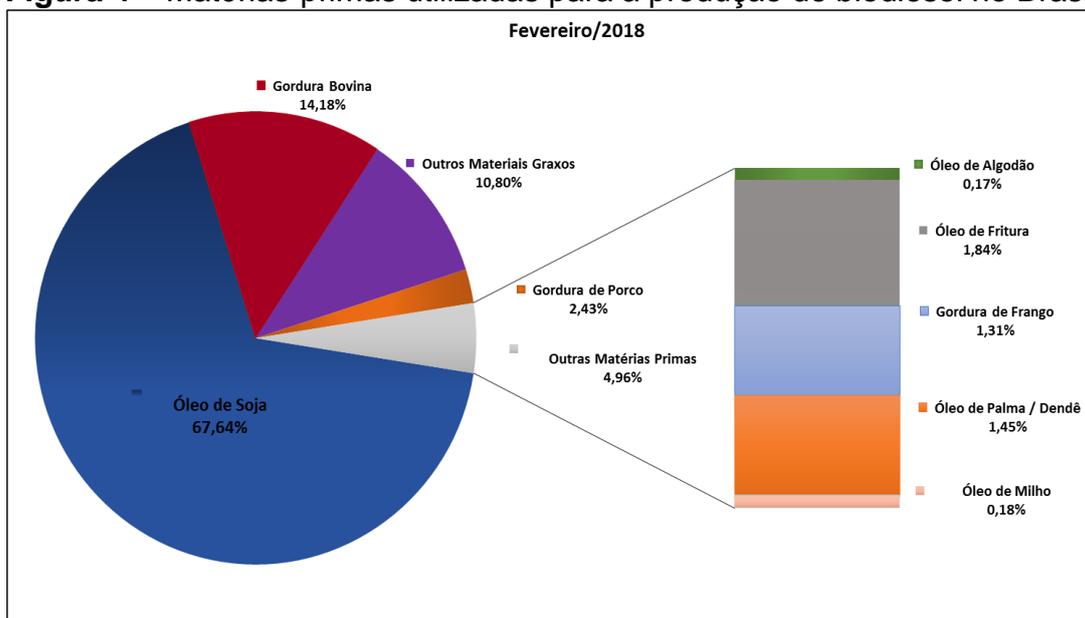


Fonte: Site da Energy Information Administration (EIA) 2018.

Com o crescimento no mercado, houve também um aumento na busca de fontes alternativas de combustíveis renováveis, tecnicamente e economicamente viáveis no Brasil. Por ser uma fonte de energia parcialmente renovável, e ser quase totalmente compatível com o diesel de petróleo, o biodiesel está tomando espaço na composição da matriz de energia brasileira,

apresentando algumas vantagens quando comparado com o diesel mineral. Assim, o biodiesel cresce a medida que sua produção e consumo tem aumentado consideravelmente desde 2005, apesar de todas as dificuldades apresentadas no Brasil, devido ao domínio da soja como a principal matéria-prima (ANP, 2018; OLIVEIRA et al., 2017). Estes dados são apresentados na Figura 4, a qual traz as matérias primas utilizadas na produção de biodiesel nas diferentes regiões do país.

**Figura 4 – Matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil.**

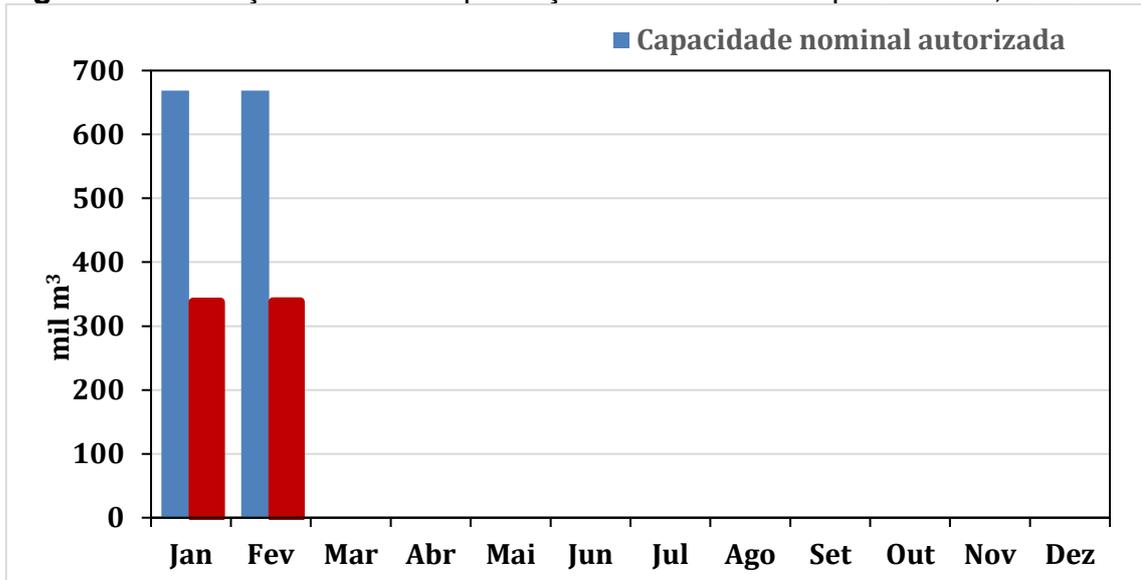


Fonte: Site Agência Nacional de Petróleo (ANP) 2018.

A produção de biodiesel no Brasil deu um grande salto, de 736 m<sup>3</sup> em 2005 para 3,419,838 m<sup>3</sup> em 2014. Existe uma vasta supremacia para o setor de transporte, o que representa 84% do consumo, seguindo pelo setor agrícola, com 13%, industrial 2%, comercial e setores públicos em conjunto com apenas 1% (GERALDES et al., 2014; ANP, 2015).

Segundo dados da ANP, atualmente existem 51 plantas produtoras de biodiesel autorizadas para produção no país, correspondendo uma capacidade total de 22286,81 m<sup>3</sup>/dia. Atualmente, foram produzidos em janeiro o equivalente á 337.818 m<sup>3</sup> e em fevereiro 338.267 m<sup>3</sup> de biodiesel, estes dados estão representados na Figura 5 (ANP, 2018).

**Figura 5** – Evolução mensal da produção de biodiesel no país em m<sup>3</sup>, 2018.



Fonte: Site Agência Nacional de Petróleo (ANP) 2018.

## 3.2 BIODIESEL

O biodiesel vem ganhando a atenção como um substituto viável para o diesel de petróleo devido as suas características notáveis, tais como biodegradabilidade, capacidade de renovação, ambientalmente menos tóxico, alta eficiência de combustão, elevado ponto de inflamação, menor quantidade de enxofre, melhor lubrificação, entre outros. A produção de biodiesel é persistente, ganhando relevância no mercado devido aos seus benefícios (AVHAD e MARCHETTI, 2015).

De acordo com According to the American Society for Testing and Materials (ASTM), o biodiesel é definido como uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos derivados de matérias primas lipídicas, tais como óleo vegetal ou gordura animal. Os principais componentes dos óleos vegetais e gorduras animais são os ésteres de ácidos graxos, glicerol e o triacilglicerol (TAG). Os TAGs consistem em diferentes composições de ácidos graxos que influenciam nas propriedades físicas e químicas dos óleos vegetais e gorduras animais, desta forma determinando a qualidade do biodiesel (AVHAD e MARCHETTI, 2015).

### 3.2.1 Fontes de Matérias-primas

As oleaginosas são a matéria prima principal utilizada para a produção de biodiesel, que são categorizadas como óleo comestível e óleo não comestível. Dentre os comestíveis as mais utilizadas são: óleo de amendoim, soja, girassol, cártamo, milho, farelo de arroz, palma, coco, óleo usado de fritura, oliva, colza, rícino, linhaça e de trigo. Entre as fontes de óleo não comestíveis estão: jatobá, semente de algodão, tabaco, carvalho, óleo de peixe, jojoba, semente de damasco. Além das culturas de óleo, microalgas, terpenos, resíduos de óleo de cozinha, gorduras animais e resíduos de estação de tratamento de efluentes também são utilizados para a produção de biodiesel (MACEIRAS et al., 2011; MAHMUDUL et al., 2017; ABDELFATTAH et al., 2018).

Devido a fatores como o esgotamento dos recursos convencionais utilizados na produção de biodiesel, as variações de mercado e principalmente as crescentes preocupações com as questões ambientais e sociais que tangem

a produção de alimentos, surge um grande interesse em ampliar o leque de matérias primas disponíveis para sua síntese (ATABANI et al., 2012; BASKAR e AISWARYA, 2016).

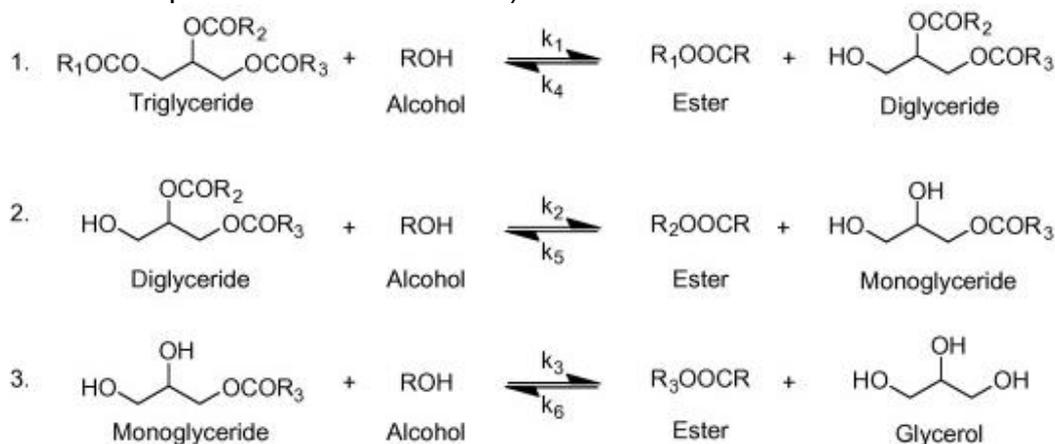
Atualmente, a grande maioria da energia consumida no mundo advém de fontes fósseis e não renováveis, principalmente o petróleo. Estimativas apontam que até o ano de 2035 será necessária uma redução de cerca de 30% no consumo. Sob este contexto a busca por fontes alternativas e a produção de energia de uma maneira limpa e sustentável vem se justificando em forma de pesquisas que utilizem resíduos de estação de tratamento de efluentes para produção de ésteres. (ATABANI et al., 2012; BASKAR e AISWARYA, 2016).

### 3.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O biodiesel pode ser produzido através de três vias: microemulsões, craqueamento térmico (pirólise), e trans/inter/esterificação. Dentre estes diferentes métodos de obtenção, o método mais eficiente e com um custo acessível para a produção de biodiesel é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (DAUD et al., 2015). A transesterificação consiste em um processo catalítico de troca do grupo alcóxi de um éster por um álcool (aceptor de acilo) que converte o triglicerídeo nos óleos em ésteres alquílicos de ácidos graxos (FAAE) e glicerol, sendo também conhecido como alcoolize, fazendo-se uso de álcoois de cadeia curta, tais como metanol e etanol como aceptores de acilo, representado na Figura 6 (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Já na interesterificação ocorre a transformação de triglicerídeos em biodiesel na presença de um éster (acetato de metilo) como aceitador de acilo. Neste processo em vez de glicerol, um outro triglicerídeo é formado como subproduto. E por fim, temos o biodiesel produzido por esterificação direta de ácidos graxos livres (FFA) com álcoois para produzir FAAE e como subproduto água. Como catalizadores utilizamos os agentes químicos (ácidos e/ou bases) e biológicos (enzimas) (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; DAUD et al., 2015).

**Figura 6** – Vias de reação para a produção de biodiesel (R é um grupo alquil pequeno, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> são cadeias de ácidos graxos; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, K<sub>5</sub>, K<sub>6</sub> são catalisadores químicos ou enzimáticos).



Fonte: CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE (2014).

No processo global de alcoolize inclui-se três reações reversíveis em que os di e mono-glicerídeos são formados como intermediários. A partir de cada molécula de triglicerídeos, três moléculas de biodiesel e uma molécula de glicerol são produzidas (fig.7) (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

### 3.3.1 Produção por catálise enzimática

Atualmente, a grande maioria do biodiesel produzido no mundo é obtido através de reações de transesterificação ácido/base, por apresentar um menor custo e possuir reações rápidas de conversão (MARX, 2016). Porém, apresenta algumas desvantagens como temperaturas de reação elevadas, pois demandam um alto consumo energético, a natureza corrosiva de ácidos, requerem esforços e gastos elevados nas etapas de purificação e recuperação do glicerol, necessitam de lavagens adicionais para remover as impurezas do biodiesel. Além disso, existem diversas condições que não se aplicam de maneira adequada, como quando se trabalha com matéria-prima de elevada acidez, onde as reações em meio alcalino acabam saponificando o óleo, produzindo sais de ácidos graxos (sabão) ao invés de biodiesel (HAMA; NODA; KONDO, 2018).

Estes problemas podem ser minimizados utilizando biocatalizadores (enzimas) para a produção de biodiesel. Enzimas tais como as lipases oferecem uma série de vantagens ambientais e econômicas sobre a rota química, tais

como: uso de temperaturas de reações amenas, eliminação de custo de tratamento associados a recuperação de catalisadores químicos, fácil recuperação e separação do produto, biodegradável e aceitável ambientalmente, e há oportunidade de reutilização através da imobilização enzimática (FUKUDA et al., 2001; ATADASHI et al., 2011).

A presença de ácidos graxos livres (AGL) na matéria-prima representa um grande problema para a transesterificação por métodos convencionais, enquanto que no processo enzimático pode ocorrer a conversão completa dos AGL contidos nos óleos e gorduras residuais em biodiesel. Desta forma, a transesterificação enzimática é o método mais adequado para uso em matérias-primas ricas em AGL, tais como óleos usados, gorduras, sebo bovino e suíno, ácidos graxos provenientes da etapa de flotação da estação de tratamento de efluentes (ETE) (DU et al., 2008).

No entanto, existem alguns desafios técnicos que devem ser superados para melhorar a viabilidade econômica dos bioprocessos utilizando lipases, pois estes apresentam algumas desvantagens como: o alto custo das enzimas, perda da atividade durante o processo, a inibição enzimática e as taxas de reações lentas, por estes fatores muitas empresas desistem de sua aplicação, apesar das inúmeras vantagens tecnológicas dos processos enzimáticos (CHRISTOPHER; KUMA; ZAMBARE, 2014).

Outra grande vantagem do processo enzimático é o fato do mesmo apresentar um “layout” mais simplificado, com menos etapas do que os processos convencionais. Tornando-se um grande atrativo para os investimentos pelo segmento industrial, e por consequência disso há uma menor quantidade de gastos energéticos e operacionais (RANGANATHAN et al., 2008; YU et al., 2015).

#### 3.3.1.1 Lipases

As lipases (carboxilesterases) são enzimas que são produzidas a partir de animais, plantas ou microrganismos, principalmente fungos e bactérias (HAMA; NODA; KONDO, 2018). As lipases de origem microbiana são mais estáveis do que as lipases vegetais e animais e estão disponíveis em grandes quantidades a um custo menor. Ainda assim, comparado aos processos convencionais o

custo de produção é um dos principais obstáculos para sua aplicação industrial. Este obstáculo pode ser reduzido através da imobilização enzimática ou a utilização de matérias-primas mais acessíveis (POURZOLFAGHAR et al., 2016).

Apesar das desvantagens a sua utilização na produção de biodiesel apresenta características gerais atraentes, como a fácil recuperação do biodiesel e glicerol, a atividade da lipase se torna versátil para a catálise simultânea de triglicerídeos e ácidos graxos, e além disso o uso de temperaturas e pressão atmosférica relativamente baixos, consequentemente reduzindo o consumo de energia (HAMA; NODA; KONDO, 2018).

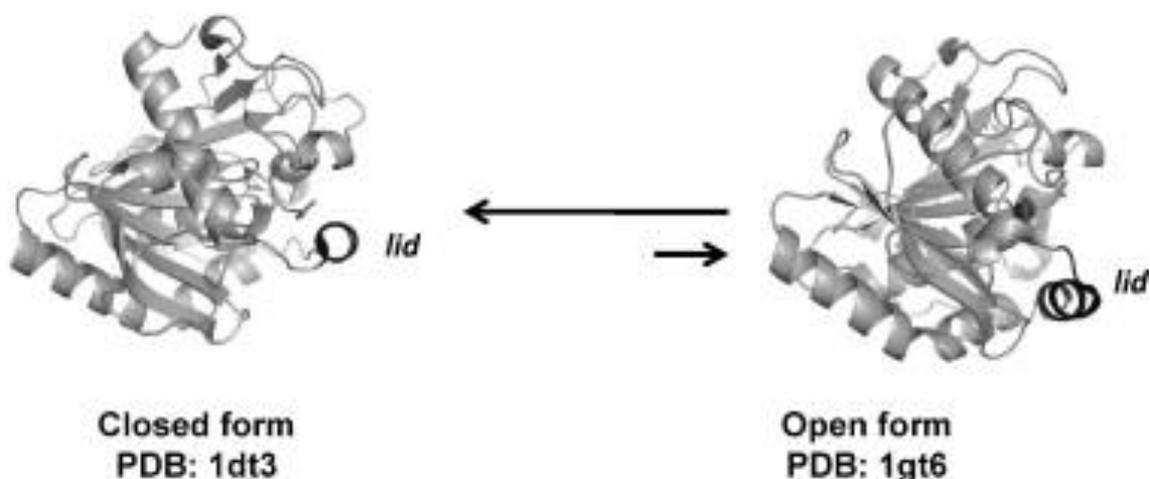
As lipases são enzimas ubíquas que pertencem ao grupo das serina hidrolases, onde não necessitam de qualquer cofator para a sua ação catalítica. Os triglicerídeos são substratos naturais para as lipases, estas possuem baixa solubilidade em água, características estruturais únicas, como a ativação interfacial que ocorre geralmente na interface água lipídica, seu sítio ativo são protegidos por unidades oligopeptídeos helicoidais. Esta unidade após interação com uma interface hidrofóbica sofre alterações sequenciais e expõe o local ativo, de tal maneira que dá acesso livre ao substrato. O local ativo das lipases são compostas principalmente de serina, histidina e aspartato e complexos enzimáticos acilos (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

#### 3.3.1.1.1 Lipases de *Thermomyces lanuginosus*

A partir do cultivo de um microrganismo geneticamente modificado – *Thermomyces lanuginosus*, foi produzida a lipase NS- 40116 (PRICE et al., 2016).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma hidrolase constituída por uma única cadeia de proteína que consiste em 269 aminoácidos com um peso molecular de 29kDA. Sua faixa de pH ótimo encontra se entre 11-12. (KUMAR et al/2015). Possui um formato aproximadamente esférico, é constituída por uma estrutura predominantemente paralela de oito cadeias com cinco hélices alfa interligadas. A figura 7 apresenta as estruturas aberta e fechadas desta enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

**Figura 7** - Estrutura de formas aberta e fechada da lipase de *Thermomyces lanuginosus*



Fonte: FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010.

Uma das principais características das lipases é sua capacidade de catalisar, inclusive em temperaturas altas, em solventes orgânicos, pH alcalinos e em baixas atividades de água. Nas indústrias o uso desse biocatalisador é difundida e inclui aplicações na formulação de detergentes, combustíveis, química fina, papel e couro (SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2016). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é utilizada em processos de biodiesel, degradação de polímeros, pré-tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos, ésteres aromatizantes entre outras aplicações (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; MENDES et al., 2011a; MENDES et al., 2012).

### 3.4 CARACTERÍSTICAS DO BIODIESEL COMERCIAL

Para assegurar a qualidade do biodiesel comercializado, parâmetros e diretrizes devem ser seguidas. Para que isso aconteça, existem órgãos responsáveis pela sua fiscalização. Os mesmos regulamentam um conjunto de normas, decretos e portarias que devem ser seguidos. A especificação do biodiesel tem sido aprimorada constantemente ao longo dos anos, contribuindo assim para a sua harmonização junto com as normas internacionais e alinhamento da sua qualidade as condições do mercado brasileiro.

A agência nacional do petróleo é um órgão federal responsável pela regulação das indústrias de petróleo e gás natural e de biocombustíveis no

Brasil. Seu foco principal é garantir o abastecimento de combustíveis e atuar na defesa dos interesses dos consumidores. Regula mais de 110 mil empresas, em atividades desde a prospecção de petróleo e gás natural nas bacias sedimentares do Brasil até os procedimentos para assegurar a qualidade dos combustíveis, através de fiscalizações das normas estabelecidas (ANP).

Na Europa a normalização dos padrões para o biodiesel é estabelecida pelas Normas DIN 14214, já nos Estados Unidos a normalização provém das Normas ASTM D-6751, e aqui no Brasil utilizamos a norma EN 14214 sendo a versão mais atualizada da norma europeia. As normas determinam valores para as propriedades e características do biodiesel. Tais características e propriedades determinantes dos padrões de identidade e qualidade contemplados pelas normas são: ponto de fulgor, teor de água e sedimentos, viscosidade, cinzas, teor de enxofre, corrosividade, número de cetano, ponto de névoa, resíduo de carbono, número de acidez, teor de glicerina total, glicerina livre, temperatura de destilação para 90% de recuperação (Parente, 2003).

Estas normas são de suma importância para assegurar a produção de um biodiesel com qualidade suficiente para ser adicionado ao diesel a fim de garantir segurança e qualidade quando utilizado em motores, sem diminuir o rendimento do veículo.

### 3.5 RESÍDUO ESTAÇÃO DE TRATAMENTO

O resíduo de estação de tratamento de efluentes é proveniente do material sobrenadante da etapa primária do tratamento, através de um flotador (figura 8). Este flotador consiste em um sistema modular de flotação física e química, cilíndricos ou retangulares (RATTANAPAN et al., 2011), onde sua principal função encontra-se na remoção de óleos e graxas, sólidos suspensos totais e cargas orgânicas (DBO e DQO). O efluente bruto entra pela tubulação existente abaixo do flotador, passando por esta tubulação no formato de uma serpentina, onde recebe os produtos químicos (coagulante e floculante) e a mistura ocorre pela agitação da água na tubulação.

Neste processo, o coagulante é adicionado para separar o conteúdo de partículas pequenas em um tempo determinado. Essas partículas são desestabilizadas e floculam em flocos maiores. Dois estágios de misturas são

envolvidos no processo a mistura lenta e a rápida. A mistura rápida tem como objetivo ajudar os coagulantes a dispersar em solução aquosa, já a mistura lenta em aumentar o tamanho dos flocos. Este processo oferece algumas vantagens, como sendo simples e econômico, possui uma efetiva redução dos níveis de DQO, DBO cor e compostos orgânicos (DAUD et al., 2015).

**Figura 8** - Resíduo proveniente da etapa de flotação do efluente de uma indústria alimentícia e de energia obtido na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE).



Fonte: Autor

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais e métodos adotados para a realização dos experimentos, assim como os procedimentos laboratoriais utilizados. Este trabalho foi realizado no laboratório de efluentes e central de análises, todos pertencentes a Universidade Federal Fronteira Sul (UFFS). A determinação do perfil de ácidos graxos do resíduo da estação de tratamento de efluentes foi realizado no laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidade la Republica (UDELAR), no Uruguai. As análises para avaliar o potencial de comercialização da amostra de ésteres etílicos produzida a partir do resíduo de efluente da estação de tratamento, foram realizadas através de um laboratório credenciado localizado na empresa Olfar S/A Alimento e Energia.

### 4.1 CATALISADOR ENZIMÁTICO

O catalisador enzimático utilizado é a enzima lipase livre “NS-40116”, enzima de origem microbiana produzida a partir do cultivo de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificada. Produzida pela indústria Novozymes e gentilmente cedida pela empresa Transfertech Gestão de Inovação.

### 4.2 GORDURA RESIDUÁRIA DE EFLUENTE

As amostras de gordura utilizadas como matéria-prima na produção de ésteres foram fornecidas por uma indústria do segmento de alimentos e energia, localizada no município de Erechim- RS. Esta gordura é proveniente da etapa de flotação da estação de tratamento de efluentes (ETE). O material flotado é resultante da primeira etapa de tratamento que se divide em duas partes: uma líquida e uma sólida, sendo a fração sólida utilizada neste trabalho.

#### 4.2.1 Caracterização da Gordura Residuária

Realizou-se uma caracterização físico-química da gordura residuária, com o objetivo de verificar sua potencialidade para a produção de ésteres. Para isso

foram realizadas análises de pH, umidade, óleos e graxas, ácidos graxos livres, e caracterização do perfil de ácidos graxos livres presentes na amostra, sendo que todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

##### 4.3.1 Reações de Transesterificação

Nos ensaios de transesterificação foi realizado um estudo onde avaliou-se as variáveis concentração de enzima e razão molar gordura:etanol utilizada nas reações. O tempo de reação avaliado para cada experimento foi de 18 horas sendo retiradas amostras a cada 1 hora, a fim de verificar a quantidade de ácidos graxos livres presentes durante o período de reação, a atividade enzimática residual, bem como a quantidade de ésteres formados.

##### 4.3.2 Planejamento Experimental

Foram feitos ensaios preliminares com o objeto de identificar se realmente haveria um potencial na produção de ésteres, utilizando como matéria-prima a gordura resíduaria proveniente do flotado da estação de tratamento de efluentes. As condições escolhidas para os testes foram razão molar óleo:álcool (1:4), e a concentração da enzima NS-40116 foi de (0,5%) em 18 horas de reação.

Com base nos resultados dos testes preliminares, elaborou-se um planejamento experimental completo com duas variáveis e dois níveis, para avaliar o efeito das variáveis razão molar e concentração de enzima, a partir do efluente em estudo, foi utilizada a metodologia de Planejamento Experimental (Tabela 1), buscando otimizar o número de ensaios realizados e reconhecer o comportamento do resíduo nas reações de transesterificação. Os níveis utilizados nesta etapa da investigação partiram da observação da literatura relacionada a esta nova enzima, como os estudos de Santos, 2016 e Dantas, 2017.

**Tabela 1** - Matriz do planejamento experimental.

Ensaio	Razão molar Gordura:Etanol	Concentração de Enzima
1	-1 (1:3)	-1 (0,3%)
2	+1 (1:5)	-1 (0,3%)
3	-1 (1:3)	+1 (0,7%)
4	+1 (1:5)	+1 (0,7%)
5	0 (1:4)	0 (0,5%)
6	0 (1:4)	0 (0,5%)
7	0 (1:4)	0 (0,5%)

A partir do planejamento experimental foram realizados ensaios para determinação de ácidos graxos livres (AGL), atividade da enzimática e análise de ésteres. Para tanto, a cada ensaio realizado prepara-se seis meios reacionais contendo 20 g da matéria-prima (gordura residuária), enzima NS- 40116 e etanol 92% de acordo com o planejamento. Os erlenmeyers contendo a mistura reacional foram vedados, afim de manter as condições internas no momento da agitação durante o tempo reacional.

Os meios reacionais permaneceram por um período total de 18 horas em agitador orbital a temperatura de 45 °C e agitação de 250 rpm, a cada 1 hora um dos meios foi retirado para análise, sendo submetido a centrifugação à 12000 rpm e 10°C por 20 minutos para separação das fases líquida e sólida resultantes da reação, sendo a fase líquida utilizada para a determinação dos ésteres e a fase sólida (enzima líquida precipitada) para a quantificação da atividade enzimática residual.

#### 4.4 METODOLOGIA ANALÍTICA

##### 4.4.1 Análise do pH

A análise do pH das amostras de gordura residuária foi realizada através do método potenciométrico, segundo Standard Methods (AWWA, 1995).

#### 4.4.2 Óleos e Graxas

Para determinar a quantidade de óleos e graxas presente na amostra de efluente, foi utilizando o método de extração em Soxhlet, com solvente o n-hexano (AWWA, 1995). Utilizou-se 5 gramas de amostra de efluente que foi pesada em um papel filtro e em seguida empacotado e colocado no cartucho de extração. Previamente, os frascos de extração foram secos em estufa por uma hora a temperatura de 105°C e levados ao dessecador para resfriamento e posterior pesagem. Os cartuchos com a amostra foram colocados no extrator, sendo o período de extração de 3 horas. Após a extração, foi realizada a recuperação do n-hexano, e os frascos contendo a gordura presente na amostra, foram encaminhados a estufa para secagem (105°C) por 1 hora, e depois para o dessecador para esfriar por 1 hora e então foram pesados, sendo demonstrado na figura 9. Os valores de óleos e graxas foram determinados segundo a Equação 1, sendo expressos em %.

$$\text{Óleos e Graxas (\%)} = \frac{(M_2 - M_1)}{V_a} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

$V_a$  = volume da amostra

$M_1$  = massa do frasco vazio seco

$M_2$  = massa do frasco + amostra

**Figura 9** - Óleos e graxas extraídos da amostra de efluente



Fonte: O Autor

#### 4.4.3 Teor de umidade

Obteve-se o teor de umidade presente no efluente através do método gravimétrico, que se baseia na quantificação da massa, devido à perda de água por evaporação, que é determinado por dessecação direta. Três cadinhos foram previamente secos em estufa com temperatura de 105°C por duas horas. Logo após os cadinhos foram colocados no dessecador por 2 horas para resfriamento e em seguida pesados em balança analítica. Amostras de 10 g da matéria graxa foram adicionadas nos cadinhos e em seguida pesados e levados à estufa a 105°C, onde permaneceram por 24 horas, após o término as três amostras foram retiradas da estufa, levadas ao dessecador para resfriamento e por fim novamente pesadas, demonstrado na figura 10. Para a obtenção da porcentagem de umidade contida na matéria graxa foi utilizada a Equação 2.

$$Umidade (\%) = \frac{M_1 - M_2}{(M_1 - M_0)} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

$M_0$  = massa do cadinho

$M_1$  = massa do cadinho + massa da amostra

$M_2$  = massa da amostra seca

**Figura 10** - Cadinhos com amostra de efluente após o procedimento de análise de teor de umidade.



Fonte: O Autor

#### 4.4.4 Identificação e quantificação de Ácidos Graxos Livres (AGL)

A caracterização da gordura residuária em termos de porcentagem e identificação dos ácidos graxos livres foi obtida por cromatografia gasosa, realizada em parceria com o laboratório de óleos e graxas da Universidade da República – UDELAR de Montevideú.

#### 4.4.5 Determinação de ácidos graxos livres (AGL)

A determinação de ácidos graxos livres foi realizada nas amostras após a reação de transesterificação e através da técnica de titulação de acordo com a IUPAC 2.201 o AOCS Cd 3d-63 que consiste na determinação da acidez do meio, devido a presença de ácidos graxos livres. Estes ácidos são capazes de reagir com a solução de hidróxido de potássio, normalmente a acidez titulável corresponde ao dobro do percentual do ácido presente na amostra. Desta forma pesou-se uma alíquota de 1,5 g da amostra em um erlenmeyer de 300 ml. Em seguida, adicionou-se 50 ml de uma solução de etanol anidro:éter etílico (v/v), homogeneizando e à esta, adicionou-se 5 gotas de indicador fenolftaleína 1% para indicar o ponto de viragem, e titulado com uma solução de KOH 0,1N. O índice de acidez é determinado pela seguinte equação 3:

$$A = \frac{56,1 * V_{KOH} * N_{KOH}}{M_{amostra}} \quad \text{Eq.3}$$

Onde:

A= índice de acidez (mg KOH/g)

56,1= equivalente grama do KOH

$V_{KOH}$  = volume de KOH gasto na titulação (mL)

$N_{KOH}$  = normalidade do KOH usado na titulação

$M_{amostra}$  = massa de amostra utilizada para titular (em g).

Para determinar o percentual de conversão do ácido graxo, utilizou-se o resultado da acidez inicial e final (após a reação), pois está diretamente relacionado com o teor em ésteres da mistura. O cálculo para conversão dos ácidos graxos é apresentado na equação 4:

$$x_{AGL} (\%) = \frac{A_i - A_t}{A_i} * 100 \quad \text{Eq.4}$$

Onde:

$X_{AGL}$  = conversão de ácido graxo livre (%).

$A_i$  = índice de acidez inicial.

$A_f$  = índice de acidez final.

A acidez no tempo  $t$  é calculada pontualmente, de acordo com a cinética realizada, ou seja, assim que a amostra foi coletada já foi devidamente pesada e titulada evitando a evaporação dos componentes.

#### 4.4.6 Atividade enzimática residual livre - NS-40116

A atividade enzimática residual foi determinada segundo metodologia adaptada dos procedimentos descritos por Oliveira et al. 2006. Onde uma alíquota de 0,10 g do precipitado resultante da centrifugação foi adicionada em um recipiente de vidro juntamente com 10 g de óleo de soja e 2 % (2 mL) de água, este meio permanece sob agitação de 250 rpm a uma temperatura de 45 °C, após 30 minutos de reação, foi então adicionado 20 mL de acetona-etanol (1:1) com finalidade de cessar a reação enzimática. A quantidade de ácidos graxos foi determinada por titulação com NaOH 0,05 M. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1  $\mu$ mol de ácido por minuto nas condições experimentais descritas. A Equação 5 será utilizada para o cálculo da atividade da lipase.

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{(V_{30} - V_0) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot ma} \quad \text{Eq.5}$$

Onde:

$M$  = molaridade da solução de NaOH

$V_0$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero

$V_{30}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra após 30 minutos de reação

$ma$  = massa do precipitado contendo a enzima utilizada na reação

$t$  = tempo de reação (min).

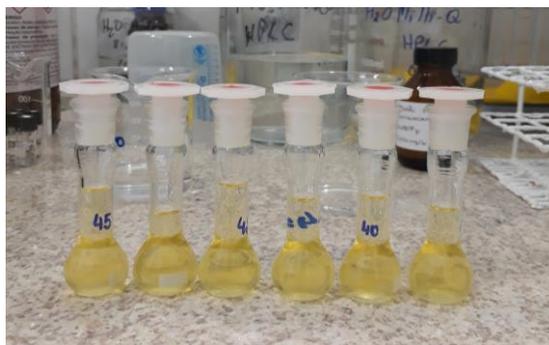
A atividade da enzima foi determinada no início e ao final das reações, objetivando o acompanhamento de possíveis alterações na atividade da enzima NS - 40116 quando do seu emprego na reação de transesterificação.

#### 4.4.7 Determinação dos ésteres etílicos

Para a quantificação de ésteres de ácidos graxos, as amostras foram previamente preparadas, transferindo-se 250 mg das mesmas para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume até o menisco do mesmo com o solvente n-heptano. Após, transferiu-se uma alíquota de 50  $\mu$ L desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e foi adicionado 50  $\mu$ L do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000 mg/L e completou-se o volume com n-heptano, demonstrado na figura 11. As amostras de cada experimento foram preparadas em triplicata.

A solução foi então injetada (1  $\mu$ L) em cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Foi utilizado a coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) nas condições cromatográficas descritas pela Norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. A temperatura inicial da coluna foi em torno de 120 °C permanecendo por 1 minuto, seguido pelo aquecimento de 15 °C/min até 180 °C permanecendo por 2 minutos, e novamente aquecendo 5 °C/min até 250°C permanecendo assim por mais 2 minutos. Ar sintético e nitrogênio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250 °C e a taxa de split de 1:50.

**Figura 11** - Amostra de ésteres preparadas para injeção no cromatógrafo gasoso (GC).



Fonte: O Autor

#### 4.4.8 Avaliação dos parâmetros do biodiesel segundo normas da ANP

Para avaliar o potencial de comercialização da amostra de ésteres etílicos produzida a partir do resíduo de efluente da estação de tratamento, análises foram realizadas através de um laboratório credenciado e os resultados obtidos foram comparados com os parâmetros exigidos pelas conformidades da norma da ANP.

A partir de uma avaliação dos resultados obtidos do planejamento experimental, foi selecionado o ensaio com a melhor condição referente a produção de ésteres etílicos, e realizou-se o mesmo com o maior número de bateladas possíveis a fim de se obter o maior volume de amostra, conforme representado na figura 12. Esta amostra foi encaminhada para realizar as seguintes análises; índice de iodo, metais, massa específica, enxofre, entupimento, teor de ésteres, índice de acidez, monoglicerol, diglicerol, triglicerol, glicerol e glicerina total.

**Figura 12** - Amostras de ésteres etílicos



Fonte: O Autor

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa, referente a caracterização da gordura residuária, testes preliminares, determinação de ácidos graxos livres, atividade residual da enzima, porcentagem de ésteres produzidos. Também é apresentado a avaliação dos parâmetros conforme a ANP.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA GORDURA RESIDUÁRIA

A Tabela 2 abaixo apresenta as características físico-químicas da gordura residuária proveniente de processo de tratamento de efluentes de uma indústria de biodiesel.

**Tabela 2** - Caracterização físico-química da gordura residuária de efluente de uma indústria de biodiesel.

Análise	Quantidade
pH	4,0 - 5,5
Óleos e Graxas (%)	59,5
Ácidos Graxos Livres (mg KOH/g)	17,3
Umidade (%)	35,3

Através dos resultados apresentados na Tabela 2 pode-se observar que a quantidade média da umidade presente na amostra foi superior a 30%. Deve-se destacar que a presença de certa quantidade de água no material usado como substrato para a produção de ésteres por via enzimática, desempenha um papel importante, principalmente em reações catalisadas por lipases, pois há necessidade de se formar uma interface água/óleo (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

A melhor concentração de água para a produção de biodiesel pode variar entre as lipases, de forma a contribuir para minimização de reações de hidrólise do substrato e maximização de reações de transesterificação. Ao utilizar-se lipases solúveis, há uma maior quantidade de água para a metanólise, pois ao diminuir o conteúdo de água a velocidade da reação diminui significativamente. (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013).

No entanto, o excesso de água em torno da lipase pode envolver a região polar da enzima, reduzindo assim a sua atividade e taxa de reação. Segundo estudos realizados por Rafiei, et al. (2018) utilizando a lipase @ZIF-67, o efeito da concentração da água foi analisado na faixa de 5 a 20 %, o que demonstrou uma maior produção de biodiesel na concentração de 10 % de água. Observa-se que a concentração de água na amostra de resíduo de efluente foi superior aos 30 %, valor esperado uma vez que esta gordura é proveniente do processo de flotação. Com vista a evitar custos adicionais com pré-tratamentos, não foi realizada secagem nos ensaios que seguem.

Foi realizado um teste utilizando esta mesma matéria-prima sem pré-tratamento para a produção de ésteres através da catálise química, como era previsto, em função da alta concentração de água, podemos observar que ocorreu a saponificação da amostra. Justificando assim, a escolha pela produção através da catálise enzimática.

A produção por catálise química só é possível neste caso, se a amostra passar por um pré-tratamento, que consiste em separar o óleo contido na mesma através da adição de um solvente orgânico, separação de fases através da centrifugação e a evaporação do solvente. Visto que, a empresa que forneceu o resíduo utiliza a catálise química como processo para a produção de biodiesel, podendo ser mais uma alternativa, pois se trata de um método simples e viável onde o resíduo produzido passaria por este pré-tratamento e em seguida retornaria ao processo de produção. Deixando assim, de ser tratado como um resíduo agregando custos a empresa para seu devido descarte.

Quanto ao pH da gordura residuária quando da coleta, ficou na faixa entre 4,0-5,5, sendo assim necessária a correção, utilizando NaOH, para que o mesmo ficasse dentro de uma faixa mais favorável de atuação das enzimas, em pH 6,0. As lipases trabalham em uma faixa ampla de atuação. O comportamento desses biocatalisadores normalmente é estudado em valores de pH próximos a neutralidade, mas em alguns casos também se trabalha com valores fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0) (FERRAZ, 2010). Vale ressaltar que o ajuste do pH foi o único pré-tratamento realizado na amostra, sendo que se optou por fazê-lo em função de trabalhos já publicados utilizando esta enzima NS - 40116, nos quais a ótima de atuação foi encontrada na faixa de pH 9, onde foi constatado um aumento de 23% na atividade (DANTAS, 2017).

Rafiei *et al* (2018) avaliou o efeito do pH em uma faixa entre pH 5-9, os resultados apresentaram que o efeito não mostrou diferenças consideráveis dentro de uma faixa de atuação entre pH 6-7, atingindo a atividade máxima em pH 7. Estes testes foram comparados com a lipase livre e a encapsulada, sendo que a encapsulada apresentou uma maior tolerância em regiões alcalinas e ácidas.

A amostra de gordura residuária analisada apresentou uma concentração de ácidos graxos livres de 17,38  $\mu\text{mol/mg}$ . Quanto aos resultados de percentual de ácidos graxos majoritários e a concentração de ácidos graxos saturados e insaturados presentes na gordura residuária, os mesmos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Composição percentual de ácidos graxos

<b>Ácido graxo</b>	<b>Concentração (%)</b>
Ácido Láurico (C12:0)	0,58
Ácido Tridecanoico (C13:0)	0,42
Ácido Mirístico (C14:0)	2,97
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,31
Ácido Palmítico (C16:0)	24,43
Ácido Palmitoléico (C16:1)	1,68
Ácido Heptadecanóico (C17:0)	0,36
Ácido Heptadecenóico (C17:1)	0,26
Ácido Esteárico (C18:0)	6,40
Ácido Oléico (C18:1 Cis)	25,26
Ácido Linoleico (C18:2Cis)	31,16
Ácido Linolênico (C18:3)	3,70
Ácido Eicosenóico (C20:1)	0,29
<b>Total</b>	<b>97,83</b>

Fonte: O Autor

Através da Tabela 3 é possível verificar que há uma concentração maior de ácido graxo insaturado C18:2 Cis (Linoleico) com 31,16 %, em seguida do C18:1 Cis (Oléico) com 25,26% e C16:0 (Palmítico), sem insaturações, com 24,43%, respectivamente. Visto que estes resultados são esperados, pois se trata de um resíduo apartir de uma indústria, onde se utiliza como matéria-prima óleo de soja. Observa-se que a composição de ácidos graxos presente no resíduo são parecidas com as encontradas nesta matéria-prima. Uma maior

concentração de ácidos graxos insaturados confere o estado líquido desta matéria em temperatura ambiente (LEHNINGER, 2002).

Nos estudos realizados por Katre et al., 2018, onde foi utilizado óleo de cozinha residual para otimização da produção de biodiesel, os mesmos apontam que o perfil dos ácidos graxos determinam a qualidade do biodiesel.

Segundo estudos realizados por Kumar et al., 2016 os óleos com elevado teor de ácido oléico são matéria-prima adequada para a produção de biodiesel de boa qualidade. A concentração de metil palmitoléico (1,68%) presente na amostra é vantajosa especialmente no que se diz respeito as propriedades de baixa temperatura.

Os ésteres de ácidos graxos saturados (láurico, palmítico, esteárico) como os poli-insaturados (linoleico, linolênico) apresentam algumas desvantagens, uma delas é a baixa resistência a oxidação e geralmente menor número de cetano. Porém, em contrapartida são facilmente degradados, desaparecendo do meio ambiente em um período inferior, sendo vantajoso do ponto de vista ambiental (KUMAR et al., 2016).

Com base nos resultados apresentados na amostra de gordura residuária da estação de tratamento de efluentes de indústria de alimentos e energia pode-se verificar um potencial de utilização deste subproduto, como substrato para a produção de biodiesel por via enzimática, o que é interessante do ponto de vista ambiental.

## 5.2 TESTES PRELIMINARES

Antes de realizar o planejamento experimental, foram feitos alguns testes preliminares, com o objetivo de identificar se realmente haveria um potencial na produção de ésteres, utilizando como matéria prima a gordura residuária proveniente do flotado da estação de tratamento de efluentes. As condições escolhidas para os testes preliminares foram razão molar óleo:álcool (1:4), e a concentração da enzima NS-40116 foi de (0,5%) em 18 horas de reação. Os resultados estão apresentados na Tabela 4, sendo que as análises de atividade enzimática e conversão em ésteres foram escolhidas e realizadas em amostras aleatórias.

**Tabela 4** - Condições experimentais - Razão Molar 1:4, enzima (0,5%)

<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácido Graxo Livre (mg KOH/g)</b>
0	28,04
2	31,28
4	24,26
6	26,60
8	34,24
10	56,07
12	56,83
14	57,11
16	57,18
18	28,04

<b>Tempo (h)</b>	<b>Atividade Enzimática (U/g)</b>
10	1,26
18	1,20

<b>Tempo (h)</b>	<b>Conversão em ésteres (%)</b>
2	96,7
10	96,7
18	96,7

Fonte: O Autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, pode-se observar que há um potencial na utilização da gordura residuária como matéria-prima para a produção de ésteres. Observa-se que com o passar do tempo de reação há uma geração maior de ácidos graxos livres, desta forma entende-se que isso ocorre, pois, a amostra deve conter uma quantidade maior de triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos do que ácidos graxos livres. E destaca-se a concentração de ésteres com 96,7%, demonstrando um alto teor de conversão de ácidos graxos livres em ésteres.

### 5.3 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

A seguir serão apresentados os resultados referentes as amostras produzidas pelas condições estabelecidas no planejamento.

#### 5.3.1 Determinação de Ácidos Graxos Livres – AGL

A Tabela 5 apresenta o monitoramento da concentração de ácidos graxos livres durante as 12 horas de reação nas diferentes condições experimentais, os

mesmos mostram a geração destes ácidos sob a ação da enzima NS-40116 no decorrer do período de reação.

**Tabela 5** - Concentração de ácidos graxos livres por tempo de reação.

	Razão Molar	Enzima (%)	Tempos de Amostragem AGL ( $\mu\text{mol/mL}$ )					
			2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
1	1:3	0,3	14,8	34,9	29,9	32,4	36,2	35,3
2	1:5	0,3	55,5	60,6	56,0	59,9	56,9	53,9
3	1:3	0,7	42,0	44,9	42,7	45,9	43,6	41,9
4	1:5	0,7	59,0	57,0	57,6	59,3	56,0	50,5
5	1:4	0,5	49,3	52,2	55,2	53,2	52,3	53,2
6	1:4	0,5	55,2	56,0	53,4	43,5	45,2	54,3
7	1:4	0,5	53,5	48,1	52,3	40,1	46,9	51,3

O ensaio 1 foi conduzido até 18 horas de reação, entretanto, verificou-se que não houve variação nos resultados obtidos para AGL a partir de 12 horas de reação, o mesmo observou-se para a atividade enzimática residual e concentração de ésteres. Sendo assim optou-se por fixar o tempo de reação para os demais ensaios em 12 horas.

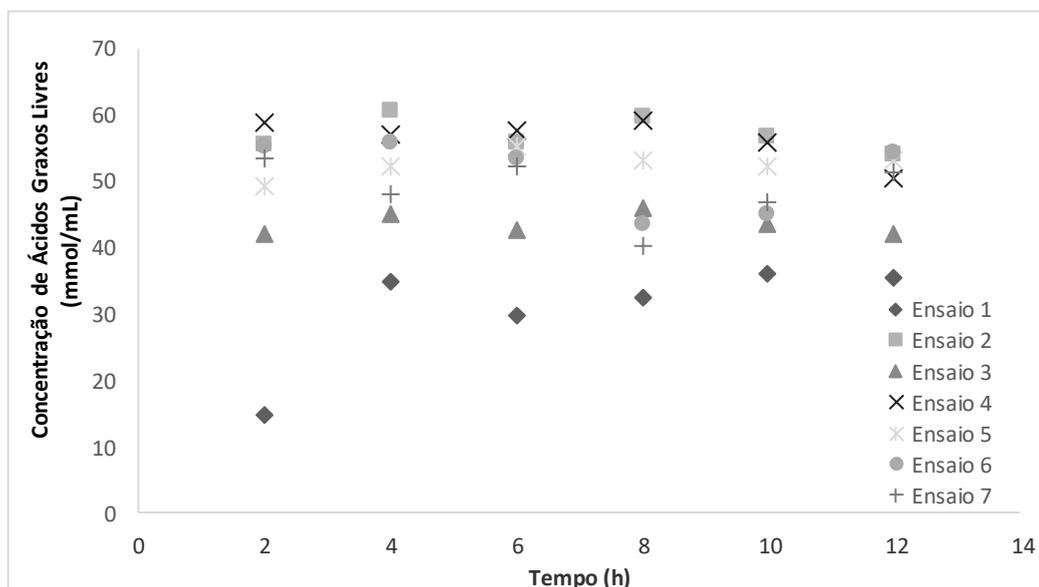
Pode-se verificar uma semelhança no comportamento apresentando uma menor concentração de ácido graxos no início da reação, aumentando ao longo das horas, o que indica que a amostra apresenta uma maior concentração de triglicerídeos que acabam sendo convertidos em ácidos graxos livres no decorrer da reação. O ponto central, realizado em triplicata, apresentou resultados semelhantes, indicando a confiança na metodologia desenvolvida.

Faccio, 2004 utilizou como substrato óleo de soja rico em triglicerídeos, portanto com baixa concentração de ácidos graxos ( $\approx 1\%$ ), nos resultados pode-se verificar um aumento em AGL quando empregou-se maiores concentrações de enzima, comportamento observado no presente estudo.

Quanto a maior relação gordura:etanol (1:5) e a utilização de diferentes concentrações de enzimas (0,3%) e (0,7%) nos ensaios 2 e 4, observou-se uma maior conversão de ácidos graxos livres a partir de 4 horas de reação esse consumo se mantém até o fim da reação (12h). As diferentes concentrações de enzima não foi um fator que teve influência direta no consumo de ácidos graxos,

mas sim a relação gordura:etanol. A Figura 14 apresenta a cinética de reação para ácidos graxos em todos os ensaios realizados.

**Figura 6** - Cinética de concentração de ácidos graxos livres (AGL) por tempo de reação.



O efeito da concentração óleo:álcool e enzima sobre a liberação de ácidos graxos para as diferentes condições experimentais é verificada nos ensaios 2 e 4 referentes a uma maior concentração de álcool em ambos (1:5) e a concentração de enzima diferentes 0,3% e 0,7% respectivamente. Comparando os ensaios 2 e 4 (Figura 14), ambos com a mesma razão gordura:etanol (1:5), constatou-se que os ensaios com diferentes concentrações de enzima não apresentam diferença nos resultados na liberação de AGL neste caso.

As concentrações de ácidos graxos livres por tempo de reação para todos os ensaios indicam que após 5 horas de reação a conversão do substrato gordura residuária em AGL cai, o que pode demonstrar uma relação com o aumento de ésteres a partir deste período, deixando o AGL disponível para as reações e conversão em ésteres, nos tempos que seguem, 6 horas em diante.

Os resultados de AGL anteriores as 5 horas de reação, são resultados das sucessivas e alternadas reações de quebra, hora transesterificação, hora esterificação, mas que em todo momento levam a produção de AGL e as sucessivas conversões de ésteres etílicos.

Kleiner et al. 2015, observaram uma grande diminuição no teor de AGL em solução à medida que os ésteres etílicos estavam sendo gerados com uma relação direta entre o consumo de AGL e as taxas de produção de ésteres. O estudo foi direcionado a produção de biodiesel através de óleos ácidos residuais em duas etapas utilizando as formulações líquidas de enzima livre Callera Trans L e Lipozyme TL 100L.

### 5.3.2 Atividade Residual da enzima NS - 40116

Os resultados de atividade enzimática residual obtidos para as diferentes condições experimentais estão apresentados na Tabela 6.

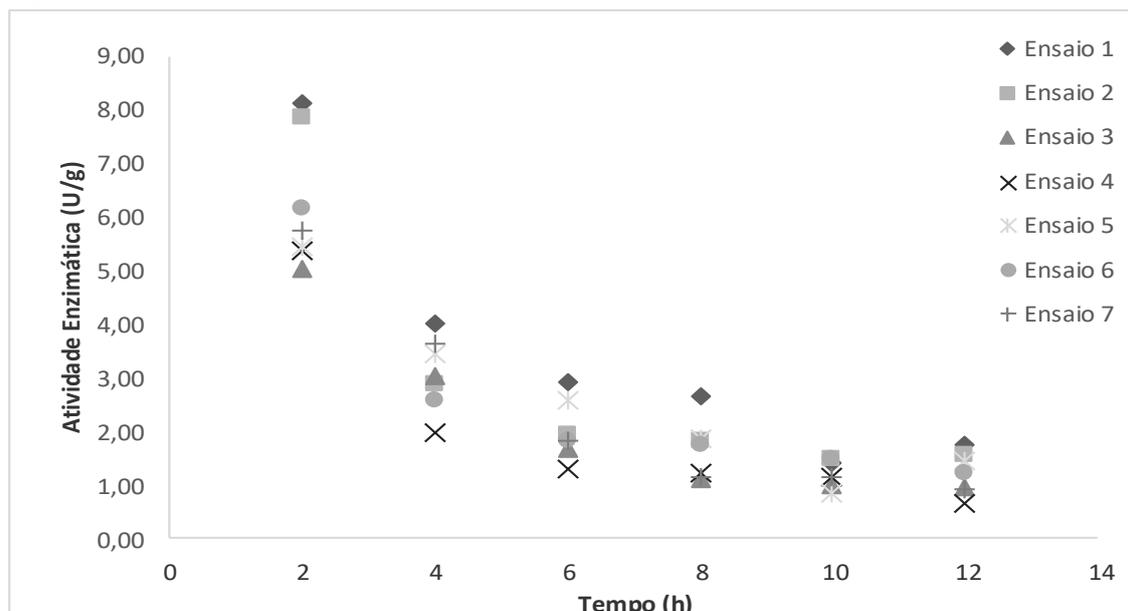
Os resultados mostram que a enzima NS-40116 ao longo do tempo reacional apresenta perda de atividade, sendo que este efeito foi acentuado a partir das 8 horas.

**Tabela 6 - Atividade enzimática por tempo de reação.**

Ensaio	Razão Molar	Enzima (%)	TEMPOS DE AMOSTRAGEM					
			Atividade Enzimática Residual (U/g)					
			2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
1	1:3	0,3	8,1	4,0	2,9	2,7	1,4	1,8
2	1:5	0,3	7,8	2,9	1,9	1,8	1,5	1,6
3	1:3	0,7	5,0	3,0	1,7	1,1	1,0	1,0
4	1:5	0,7	5,4	1,9	1,3	1,2	1,1	0,6
5	1:4	0,5	5,4	3,4	2,6	1,9	0,8	1,5
6	1:4	0,5	6,2	2,6	1,8	1,7	1,5	1,20
7	1:4	0,5	5,8	3,6	1,8	1,2	1,1	0,9

Através da Figura 15, verifica-se a cinética do comportamento da enzima ao longo do tempo, deve se observar uma atividade máxima de 8,1 U/g no ensaio 1, correspondente a 2 horas de reação.

**Figura 7** - Cinética de atividade enzimática residual por tempo de reação.



Verificou-se que a atividade enzimática decai ao longo do tempo em todos os ensaios. Esta característica normalmente é observada neste tipo de reação pois com o passar do tempo a enzima tende a perder atividade pelo desempenho que exerce.

Segundo estudos realizados por Rafiei et al., 2018 a relação óleo:álcool é de grande importância devido aos efeitos negativos que o excesso de álcool pode proporcionar sobre a atividade da lipase. Os resultados demonstraram que a conversão mais elevada foi obtida com a razão molar óleo:metanol 6:1, com o aumento da razão molar a conversão diminuiu drasticamente, devido a inativação da enzima.

A qualidade da matéria-prima pode interferir na qualidade do produto, sendo assim, os óleos residuais que contenham alto teor de ácidos graxos livres, podem implicar em interferências na atividade enzimática, além destes, outros componentes ou possíveis impurezas, como os fosfolipídeos, um componente comum encontrado em diversos óleos vegetais e residuais, tem sido citado como inibidor da atividade de lipases (RABU et al., 2013).

### 5.3.3 Determinação de ésteres etílicos

Os resultados de conversão em ésteres etílicos para as diferentes condições experimentais no decorrer de 12 horas de reação estão apresentados na Tabela 7 a seguir:

**Tabela 7** - Porcentagem de ésteres produzidos por tempo de reação.

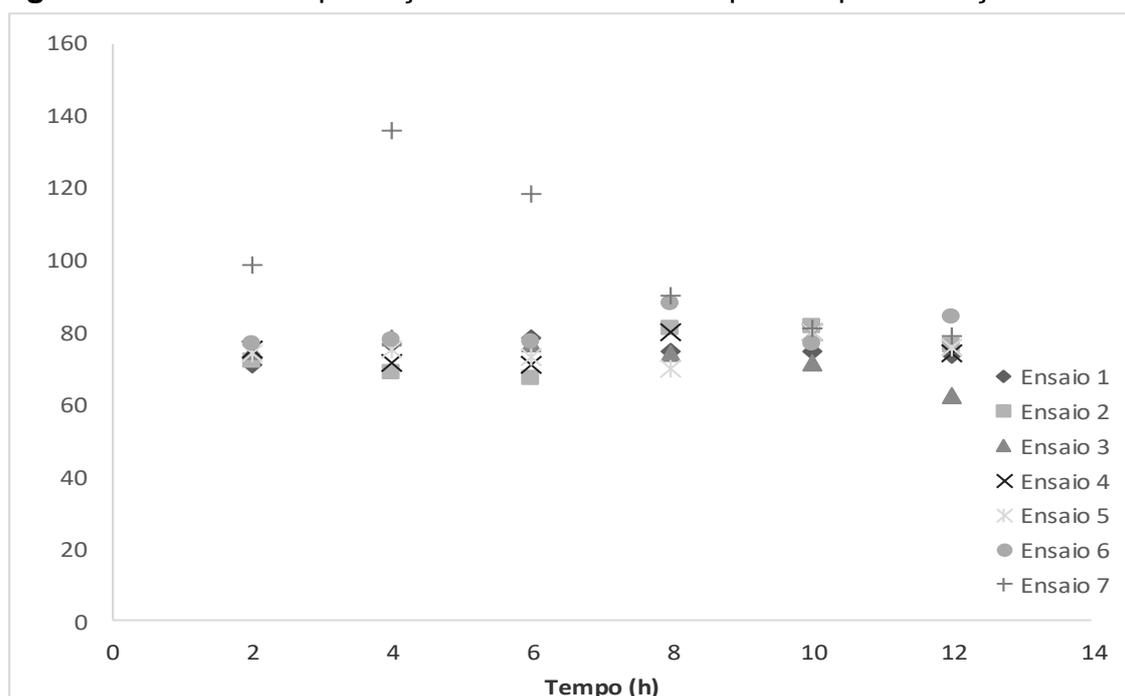
Ensaio	Razão Molar	Enzima (%)	Tempos de Amostragem Conversão em ésteres (%)					
			2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
1	1:3	0,3	71,2	77,0	78,7	74,5	74,5	73,6
2	1:5	0,3	72,0	68,7	67,2	81,2	81,5	76,5
3	1:3	0,7	74,6	78,6	77,0	74,1	71,5	62,5
4	1:5	0,7	75,0	71,5	71,1	80,3	79,9	74,0
5	1:4	0,5	74,0	75,5	73,3	69,8	79,8	75,8
6	1:4	0,5	76,6	77,9	77,3	87,9	76,9	84,5

Verificou-se as maiores conversões de ésteres 87,9% na condição de concentração de enzima (0,5%) e a razão gordura:etanol (1:4) no tempo reacional de 8 horas, que correspondem ao Ensaio 6. De uma forma geral, pode-se afirmar que os valores de teor de ésteres não obtiveram uma grande variação. Isso significa que o catalisador utilizado é bastante robusto e conseqüentemente capaz de tolerar até mesmo grandes variações em diferentes condições operacionais, apresentando bons resultados em praticamente quase todas as condições em que o mesmo foi empregado.

Através dos resultados é possível observar que a variação na concentração da enzima utilizada não apresentou uma diferença expressiva na conversão dos ácidos graxos, bem como dos ésteres. Sendo que a enzima é um dos principais limitantes no processo, em relação a se utilizar altas concentrações, contribuindo assim para o aumento no custo. Porém em pequenas quantidades torna-se um método competitivo com os convencionais como a catalise química (CESARINI *et al.*, 2014).

Levando-se em consideração o fato de que as novas formulações de enzima livre apresentam um custo inferior as enzimas convencionais imobilizadas, isto contribui consideravelmente na redução de seu custo. Outra vantagem é a possibilidade de empregar matérias primas de menor qualidade, reduzindo ainda mais o seu custo final (CESARINI et al., 2014; NOVOZYMES, 2014). A cinética de conversão dos ésteres etílicos é observada na Figura 16.

**Figura 8** - Cinética de produção de ésteres etílicos por tempo de reação.



Analisando a figura acima em relação a concentração de enzima é possível identificar que os resultados obtidos não tiveram uma grande diferença. As conversões de ésteres foram expressivas, o que não nos levou a um novo planejamento para otimização das variáveis, mas as análises de qualidade dos ésteres produzidos, comparando os resultados com os limites exigidos pela ANP.

Santos, 2016 realizou testes utilizando óleo de macaúba como matéria-prima e a enzima NS-40116 como catalisador para a produção de biodiesel. Os resultados referentes a valores de produção de ésteres produzidos variaram entre as condições nele testadas (40°C, razão molar óleo:álcool de 1:4, 0,65% do composto enzimático e 1,0% de água adicionada), sendo o maior valor atingido (84,78%).

Cesarini et al. 2013 encontraram bons resultados para a produção de FAMEs a partir de óleo de soja não degomado em praticamente todas as condições analisadas. Após 24 h de reação, obtiveram resultados próximos a 90% de teor de ésteres, eles utilizaram como catalizador a enzima livre Callera Trans L, a qual possui características semelhantes a usada neste trabalho.

Yan et al., 2015 realizaram estudos onde foram aplicadas diversas razões molares (1:1 até 1:4), os melhores resultados de conversão foram alcançados em ensaio com razão molar 1:2 obtendo-se uma conversão de ésteres de aproximadamente 97,3% em 32 horas. Já nos demais ensaios apresentaram baixas conversões, que de acordo com o autor eram esperadas, pois a elevada concentração de álcool no meio provoca a inativação ou inibição da enzima.

Por se tratar de um resíduo, podemos considerar que os valores obtidos (87,9%), são de grande relevância, comparados aos resultados relatados nos estudos.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEGUNDO NORMAS DA AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO - ANP

A fim de identificar se as amostras de ésteres produzidas, possui potencial de comercialização, satisfazendo assim as conformidades exigida pela ANP, foram realizadas algumas análises como; índice de iodo, metais, massa específica, enxofre, entupimento, teor de ésteres, índice de acidez, monoglicerol, diglicerol, triglicerol, glicerol e glicerina total. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

**Tabela 8** – Comparação dos resultados das análises obtidos com os parâmetros exigidos pela Agência Nacional do Petróleo.

Análises	Unidade	Resultados	ANP
<b>Monoacilglicerol</b>	% massa	0,023	0,7 máx
<b>Diacilglicerol</b>	% massa	0,291	0,20 máx
<b>Triacilglicerol</b>	% massa	0,055	0,20 máx
<b>Glicerol livre</b>	% massa	0,000	0,02 máx
<b>Glicerol Total</b>	% massa	0,054	0,25 máx
<b>Índice de iodo</b>	g/100g	82,16	
<b>Ca</b>	mg/kg	0,504	5 máx
<b>Mg</b>	mg/kg	0,117	5 máx
<b>P</b>	mg/kg	1,397	5 máx
<b>Na</b>	mg/kg	0	5 máx
<b>K</b>	mg/kg	0	10 máx
<b>Massa específica a 20° C</b>	kg/m <sup>3</sup>	875,0	850 a 900
<b>Enxofre total</b>	mg/kg	65,39	10 máx
<b>Ponto de entupimento de filtro a frio</b>	°C	+4°C	14°C máx
<b>Índice de acidez</b>	mg KOH/g	0,074	0,50 máx
<b>Teor de éster</b>	%mm	94,6	96,5 min

Através dos resultados apresentados na tabela 8 podemos observar que quase todos os parâmetros avaliados, com exceção do teor de enxofre, diacilglicerol e o teor de éster encontram-se dentro dos limites de conformidades exigidas pela ANP.

Fora dos padrões encontra-se o teor de enxofre total com 65,39 mg/kg sendo que a norma exige no máximo 10 mg/kg. Como os óleos vegetais e as gorduras animais não possuem enxofre, o biodiesel deveria ser isento desse elemento. Pois os produtos derivados do enxofre são danosos ao meio ambiente, tanto ao motor quanto seus pertences. O enxofre normalmente é encontrado no diesel mineral (PARENTE, 2003).

O índice de acidez é extremamente importante, principalmente na armazenagem do biodiesel, pois a mudança de valores neste período pode significar a presença de água, seu controle evita a corrosão nos motores (MARTINS et al., 2015). A amostra de ésteres etílicos avaliada apresentou um nível de acidez bem baixo (0,074 mg KOH/g).

A análise do ponto de entupimento de filtro a frio também é uma das análises mais indicadas para avaliar a qualidade do biodiesel produzido. Em baixas temperaturas o biodiesel tende a solidificar parcialmente ou perder a sua fluidez, ocasionando problemas na partida do motor. Esta análise indica a

temperatura em que o combustível perde a filtrabilidade quando resfriado (ZANETTI, 2012).

O valor obtido +4°C atende o estabelecido na ANP, isso indica que o biodiesel irá funcionar bem em regiões de baixa temperatura, como é o caso da nossa região, no inverno.

O índice de iodo encontrado, também atende o estabelecido na norma europeia, que determina valor máximo de 120 (g/100g), sendo que o valor encontrado nesta investigação 82,16 g/100g, fica dentro da faixa determinada. A legislação brasileira não determina padrão para esta análise, mas sim, sugere tomar nota.

Segundo Gomes, (2010) o índice de iodo acima de 135 levam a produção de um biodiesel inaceitável para fins carburantes, devido à tendência a formar depósitos de carbono.

O valor de massa específica determinado para o resíduo da estação de tratamento (875,0 kg/m<sup>3</sup>), encontra-se dentro do valor padrão determinado pela norma (850 a 900 kg/m<sup>3</sup>).

Segundo Folquenin, 2008 a massa específica do biodiesel apresenta valores ligeiramente superiores à do óleo diesel convencional, o que exerce efeito direto sobre o desempenho do motor. Essa propriedade fluidodinâmica sempre deve ser avaliada para garantir o bom funcionamento de motores diesel.

A presença de Monoglicerídeos, Diglicerídeos e Triglicerídeos fora dos valores especificados causam problemas de entupimento nos filtros de combustíveis. Além disso, a determinação do teor de ésteres presentes é imprescindível, uma vez que os mesmos são os componentes principais do biodiesel (MITTELBAACH, 1996).

Os valores encontrados de Monoglicerídeos e Triglicerídeos estão dentro dos parâmetros exigidos pela norma, já na concentração de teor de éster encontra-se abaixo com 94,6% e o teor de diacilglicerol encontra-se a cima do recomendado com 0,291%.

O controle de qualidade do biodiesel limita as concentrações máximas de Na, K, Ca, Mg e P, de acordo com a legislação brasileira, para que o excesso desses contaminantes, oriundos do processo de produção do biodiesel ou da própria matéria-prima, como o P, não venham prejudicar de alguma forma o desempenho do combustível e do motor (LÔBO et al., 2009).

Já os resultados obtidos nas análises realizadas de Na, K, Ca, Mg e P todos encontram-se dentro dos padrões exigidos.

## CONCLUSÃO

A seguir serão apresentadas conclusões em relação a produção enzimática de ésteres etílicos utilizando como substrato a gordura residuária proveniente de processo de flotação do efluente de uma indústria de alimentos e energia utilizando a enzima livre Novozymes NS-40116.

Referente as características dessa matéria-prima observaram-se que o elevado teor de água e o baixo pH podem inviabilizar as possíveis reações de produção de éster pelos métodos convencionais de catálise química, justificando o uso de técnicas como a catalise enzimática.

Ao se utilizar um catalisador enzimático, se tem uma maior facilidade na recuperação do glicerol produzido, comparado aos processos de catálise química, além disso sua qualidade é superior. A produção de resíduos e efluentes químicos também é reduzido significativamente nos processos enzimáticos, colaborando a relevância ambiental e de conservação a nível de processo produtivo que envolve este estudo.

De uma forma geral, podemos afirmar que os valores de teor de ésteres encontrados em todos os ensaios não obtiveram uma grande variação, o que significa que as variáveis de planejamento de experimentos podem ser melhor exploradas, a fim de possibilitar a investigação dos parâmetros que influenciam este processo.

Ao comparar os resultados obtidos para as análises de qualidade de biodiesel, podemos concluir que todos os parâmetros avaliados, com exceção do teor de enxofre, encontram-se dentro dos limites de conformidades exigidas pela ANP. Com esses resultados foi possível verificar o potencial de uso da gordura residuária na produção de ésteres etílicos por transesterificação enzimática utilizando a enzima Novozymes NS-40116, que apresenta um custo inferior se comparado com as outras formulações enzimáticas encontradas no mercado, competindo economicamente com os processos de catálise química.

Vale ressaltar a importância de utilizarmos um resíduo como matéria-prima para a produção de biodiesel, trazendo inúmeras vantagens sócio-econômicas e ambientais. Este resíduo proporcionaria impacto ambiental e custo de tratamento para a indústria geradora, desta forma podemos converte-lo em energia e lucratividade para a empresa.

## REFERÊNCIAS

ABDELFATTAH, M. S. H. et al. On biodiesels from castor raw oil using catalytic pyrolysis. **Energy**, v. 143, p. 950–960, 2018.

AGÊNCIA NAC DO PETRÓLEO 2015. **Domestic Pure Biodiesel Production - B100 (cubic meters)**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?Dw=8740>>. Acesso em: 09 out. 2017

AGÊNCIA NAC DO PETRÓLEO. **Atribuições da ANP**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/institucional>. Acesso em: 06 jan. 2018.

ALENCAR, J.W.; ALVES, P.B.; CRAVEIRO, A.A. Pyrolysis of tropical vegetable oils. **J Agric Food Chem**,v.31, p.268–270, 1983.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Lipases : An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Evolução mensal da produção e da capacidade nominal autorizada pala ANP no país em 2018**. 2018.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel**. 2018.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012.

ATADASHI I, AROUA M, AZIZ, A.A.; Biodiesel separation and purification: a review. **Renew Energy**, v.36, p. 437–443,2011.

AVHAD, M. R.; MARCHETTI, J. M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 696–718, 2015.

AWWA, (1995). STANDARD METHODS for the Examination of Water and Wastewater. 19th edition. Publication Oficce American Public Health Association, Washington. APHA,AWWA, WEF.

BABAKI, M. et al. Process optimization for biodiesel production from waste

cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 105, p. 465–472, 2017.

BASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 496–504, 2016.

BRASIL. Lei Nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. **Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências.** 2014.

BRASIL. Decreto Nº 5.297, de 6 de dezembro de 2004. **Dispõe sobre os coeficientes de redução das alíquotas da Contribuição para o PIS/PASEP e da COFINS incidentes na produção e na comercialização de biodiesel, sobre os termos e as condições para a utilização das alíquotas diferenciadas, e dá outras providências.** 2004.

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

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, n. 3, p. 484–487, 2013.

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

CHUAH, L. F. et al. A review of cleaner intensification technologies in biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 146, p. 181–193, 2017.

DANTAS, Adriana. **Imobilização e caracterização da lipase NS-40116 em poliestireno.** 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2017.

DAUD, N. M. et al. Production of biodiesel and its wastewater treatment technologies. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 94, n. C, p. 487–508, 2015.

DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D.; Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, p. 331–337, 2008.

EIA.GOV. INTERNATIONAL ENERGY STATISTIC. Renewables - Biofuels Production. United States Energy Inf Adm. [Disponível em: http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?Tid=79&pid=81&aid=1&cid=ww,&syid=2000&eyid=2012&unit=TBPD](http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?Tid=79&pid=81&aid=1&cid=ww,&syid=2000&eyid=2012&unit=TBPD) : 2014 Acesso em: 10 nov. 2017.

EIA.GOV. INTERNATIONAL ENERGY STATISTIC. Renewables - Biofuels Production. United States Energy Inf Adm. [Disponível em: https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/](https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/) : 2018. Acesso em: 01 abril. 2018.

FACCIO, Carina. **Estudo da Produção de Ésteres Etílicos a Partir da Alcoólise de Óleos Vegetais**. Dissertação de Mestrado - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2004.

FERRAZ, Lenir Rigoli. **Produção e caracterização parcial de lipase de *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando como substratos resíduos agroindustriais**. 2010. Dissertação de Mestrado—Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

F. MA, M.A. HANNA, Biodiesel production—a review, **Bioresour. Technol**, v. 70, (1999)1.

FOLQUENIN, E. K. F. Validação das análises físico-químicas exigidas pela ANP para misturas diesel-biodiesel. 2008. Dissertação (Mestrado em Química de Materiais), Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

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

GERALDES, C. É.; GRISOLI, R.; FREIRE, F.; PECORA, V.; COELHO, S. T. Environmental sustainability of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 65, p. 680–691, 2014.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; PLÍNIO, M.N.; LUCOND, O. Ethanol learning curve—the Brazilian experience. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 301–304, 2004.

GOMES, M. A. Obtenção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos obtidos da gordura animal – vísceras de frangos. 2010. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, 2010.

HAMA, S.; NODA, H.; KONDO, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57–64, 2018.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology three dimensional structures and biotechnological application softlipases. **AnnuRev.Microb.** v. 53, p. 315–351, 1999.

KATRE, G. et al. Optimization of the in situ transesterification step for biodiesel production using biomass of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil. **Energy**, v. 142, p. 944–952, 2018.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with lipases. In: Rehm, H.J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P.J.W. (Eds.), **Biotechnology**, VCH, New-york, v. 8, p. 37–192, 1998.

KLEINER, B.; FLEISCHER, P.; SCHÖRKEN, U. two-step-one-pot approach with free lipases suitable for acidic and used oil processing. **Process Biochemistry**, 2015.

KUMAR, M.; MUKHERJEE, J.; SINHA, M.; KAUR, P.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N.; SINGH, T. P. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Sustainable Chemical Processes**, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2015.

KUMAR, M. et al. Biodiesel production from municipal secondary sludge. **Bioresource Technology**. v. 216, p. 165–171, 2016.

LEE, I.; JOHNSON, L. A.; HAMMOND, E. G. Use of branched-chain esters to reduce the crystallization temperature of Biodiesel. **JAOCs**, v. 72, p. 1155–1160, 1995.

LEHNINGER, Albert L; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIN, J. J.; CHEN, Y. W. Production of biodiesel by transesterification of *Jatropha* oil with microwave heating. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 75, p. 43–50, 2017.

LÔBO, I.; FERREIRA, S.; CRUZ, R. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, p.1596-1608, 2009.

M. ISO,; B. CHEN,; M. EGUCHI,; T. KUDO,; S. SHRESTHA. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 16, p. 53, 2001.

MACEIRAS, R. et al. Macroalgae: Raw material for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3318–3323, 2011.

MAHMUDUL, H. M. et al. Production , characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, n. April 2016, p. 497–509, 2017.

MARTINS, G. I. et al. Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 154–157, 2015.

MARX, S. Glycerol-free biodiesel production through transesterification: A review. **Fuel Processing Technology**, v. 151, p. 139–147, 2016.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. P. The effect of an enzymatic pre treatment on the biocatalysis and size reduction of fat particle sin slaughter house waste water. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.76, p. 629–635, 2001.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011b.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P.C.; VÉLEZ, A.M.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; CASTRO, H.F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 503-511, 2012.

MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 56, p.7-11, 1996.

NOVOZYMES. **The Novozymes enzymatic biodiesel handbook**. 70 p. Bagsvaerd – Dinamarca, 2014.

OLIVEIRA, F. C. DE; COELHO, S. T. History , evolution , and environmental impact of biodiesel in Brazil : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, n. November 2016, p. 168–179, 2017.

OMAR, R.; ROBINSON, J. P. Conventional and microwave-assisted pyrolysis of rapeseed oil for bio-fuel production. **J Anal Appl Pyrol**, v. 105, p. 131–142, 2014.

PARENTE, Expedito José de Sá. Biodiesel: **Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003.

POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.

PRICE, J. et al. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m<sup>3</sup> using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, p. n/a–n/a, 2016.

RABU, A. R., et al. Transesterification of waste cooking oil: Process optimization and conversion rate evaluation. **Energy Conversion and Management**. v. 65, p. 764–769, 2013.

RAFIEI, S. et al. Efficient biodiesel production using a lipase@ZIF-67 nanobioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, n. August 2017, p. 1233–1241, 2018.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975–3981, 2008.

RATTANAPAN, C.; SAWAIN, A.; SUKSAROJ, T.; SUKSAROJ, C. Melhorada eficiência de flotação por ar dissolvido para o tratamento de águas residuais de biodiesel por processos de acidificação e de coagulação. **Dessalinização**, v. 280, p. 370 – 377, 2011.

RATLEDGE.; BOULTON, C. A. Fats and oils. In: Moo Young M., Blanch HN, Dream S, Wang DIC, editors, **Comparative Biotechnology in industry, agriculture and medicine**, v. 3, p. 983–1003, 1985.

REHAN, M. et al. Waste to biodiesel: A preliminary assessment for Saudi Arabia. **Bioresource Technology**, v. 250, n. August 2017, p. 17–25, 2018.

REN21. Renewables 2014 Global Status Report. Renew Energy Policy Netw 21st Century 2014:216. Disponível em: <http://www.ren21.net/REN21Activities/GlobalStatusReport.aspx> . Acesso em 13 nov. 2017.

R. VIGLIANO. Combustível socialmente correto. **Brasil Energia**, v. 274, p. 54-55, 2003.

SANT'ANNA, J.P. Biodiesel alimenta motor da economia. **Química e Derivados**, v. 416, p.8–18, 2003.

SANTOS, Jaime Marcos Bohn dos. **Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*Acrocomia aculeata*) empregando enzima livre**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2016.

SANTOS, L. F.; Ã, P. A. Z. S.; POUSA, G. P. A. G. History and policy of biodiesel in Brazil. v. 35, p. 5393–5398, 2007.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.199–210, 1998.

SCHWAB, A. W.; NIELSEN, H. C.; BROOKS, D. D.; PRYDE, E. H. Triglyceride/aqueous ethanol/1-butanol microemulsions. **J Dispersion Sci Technol**, v. 4, p. 1–17, 1983.

SCHMIDT, R. D.; VERGER, R. Lipases:interfacial enzymes with attractive applications. **Angew.ChemInt.Ed.Engl.** v. 37, p. 1608–1633, 1998.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass Bioenergy**, v. 4, p.227–242, 1993.

SKJOLD-JØRGENSEN. J; VIND, J.; MOROZ, O. V.; BLAGOVA, E.; BHATIA, V. K.; SVENDSEN, A.; WILSON, K. S.; BJERRUM, M. J. Controlled lid-opening in *Thermomyces lanuginosus* lipase– an engineered switch for studying lipase function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2016, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.09.016.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizin glipases for biocatalysts: asurvey of chemical physical and molecular biological ap- proaches. **Mol.Catal.B:Enzym**, v. 9, p. 113–148, 2000.

ZANETTI, Micheli. **Produção de biodiesel a partir de gordura abdominal de frangos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de pós-graduação química, Florianópolis, 2012.

ZANIN, G.; SANTANA, C.C.; BON, E. P. S.; JORDANO, R. C. L.; MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; CARVALHO NETO, C. C.; MACEDO, I. C.; LAHR

FILHO, D.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. Brazilian bioethanol program. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 84–86, p. 1147–1161, 2000.

ZAREH, P.; ZARE, A. A.; GHOBADIAN, B. Comparative assessment of performance and emission characteristics of castor, coconut and waste cooking based biodiesel as fuel in a diesel engine. **Energy**, v. 139, p. 883–894, 2017.

YAN, Y; ZHANG, H.; XU, L,. Enhancing biodiesel production via a synergic effect between immobilized *Rhizopusoryza* lipase and Novozym 435. **Fuel Processing Technology**. Wuhan, v. 137, n. 1, p.298-304, 2015

YU, H.; YUE, H.; HALLING, P. Optimal Experimental Design for an Enzymatic Biodiesel Production System. **IFAC-PapersOnLine**, v. 48, n. 8, p. 1258–1263, 2015.