

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

**DJÉSSICA TATIANE RASPE**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE MACAÚBA**  
**(*Acrocomia aculeata*)**

**Maringá**

**2014**

DJÉSSICA TATIANE RASPE

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE MACAÚBA**  
**(*Acrocomia aculeata*)**

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis.

Orientadora: Dra. Camila da Silva

Coordenador: Dr. Nehemias Curvelo Pereira

Maringá

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R226h Raspe, Djéssica Tatiane  
Hidrólise enzimática do óleo de macaúba:  
*acrocomia aculeata* / Djéssica Tatiane Raspe. -  
Maringá, 2014.

110 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de  
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em  
Bioenergia, 2014.

1. Tecnologia industrial - Óleos e gorduras. 2.  
Hidrólise. 3. Catálise enzimática. I. Silva, Camila  
da, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.  
Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia  
Química. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia.  
III. Título.

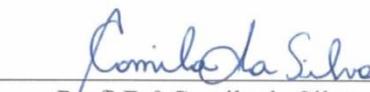
CDD 21. ed. 665.3

MGC - 001125

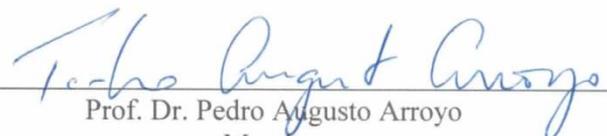
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por **Djéssica Tatiane Raspe** perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 18 de junho de 2014.

**COMISSÃO JULGADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila da Silva  
Orientadora/Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Heloísa Neves O. Scaliante  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo  
Membro

*Aos meus pais, Eldir e Ivete, por todo o amor e sacrifícios a mim  
devotados, tendo sempre como intuito me oferecer a mais  
valiosa das heranças: a Educação.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, principalmente. Pela vida, pelas bênçãos, pelos passos até aqui dados e especialmente, por este momento.

À minha família, pelo amor incondicional, pela paciência, amparo e dedicação. Embora minha caminhada esteja no início e tenhamos muitas adversidades pela frente, nunca lhes serei grata o suficiente por não desistirem e não cessarem esforços em me incentivar.

Às minhas queridas amigas de infância e as que a vida me presenteou no decorrer dos anos, de quem sempre tive apoio, independente da circunstância. Muito me ausentei, distanciei, mas sempre tive a compreensão, amizade, amor e torcida. Vocês representam um dos meus bens maiores, sou muito grata pela presença de cada uma, à sua maneira, em minha vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Camila da Silva, em especial, a quem tenho e sempre terei grande admiração e respeito. Gratidão sempre será pouco para definir a confiança em mim depositada, frente às minhas dificuldades e adversidades. Foram cinco anos de caminhada e momentos, dos quais sempre serei grata pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos transpassados! Pude contar com seu braço direito nos momentos de maior dificuldade profissional e pessoal. Seu exemplo teve papel significativo na minha formação! A incansável orientação e dedicação, à cumplicidade e apoio, às conversas, conselhos, os não menos necessários “puxões de orelha”, e por exigir e estimar sempre o meu melhor, sou grata!

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós Graduação em Bioenergia (PPB) e ao Departamento de Tecnologia (DTC), pela infraestrutura, materiais e equipamentos disponibilizados, os quais foram fundamentais para condução deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de estudo.

Aos companheiros e colegas de trabalho dos Laboratórios de Química de Alimentos, Físico-Química e Fermentação (DTC), obrigada pelo auxílio em momentos de dificuldade, por compartilharem momentos e experiências comigo.

*“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isto, mas todas as que vieram antes.”*

*(Jacob Riis)*

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos .....	3
1.2. Publicações.....	3
1.3. Estrutura do Trabalho .....	5
1.4. Referências.....	6
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
2.1. Situação Energética Mundial .....	10
2.1.1. Energias Não Renováveis.....	10
2.1.2. Energias Renováveis .....	12
2.1.2.1. Biodiesel.....	13
2.2. Matérias Primas para Produção de Biodiesel .....	15
2.2.1. Soja ( <i>Glycine max</i> ).....	17
2.2.2. Algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> ) .....	19
2.2.3. Pinhão-manso ( <i>Jatropha curcas</i> ) .....	19
2.2.4. Macaúba ( <i>Acrocomia aculeata</i> ).....	20
2.3. Técnicas para a produção de Biodiesel pelo método de Transesterificação.....	22
2.3.1. Produção catalítica de Biodiesel .....	24
2.3.1.1. Utilização de catalisadores homogêneos .....	25
2.3.1.2. Utilização de catalisadores heterogêneos .....	26
2.3.1.2.1. Catalisadores Químicos .....	26
2.3.1.2.2. Catalisadores Enzimáticos .....	27
2.3.2. Produção não catalítica de Biodiesel .....	29
2.3.3. Hidrólise de Triacilglicerídeos .....	30
2.3.3.1. Efeito do pH da solução tampão .....	36
2.3.3.2. Efeito da adição de solvente orgânico.....	37
2.3.3.3. Efeito da adição de sais e surfactantes .....	37
2.3.3.4. Efeito do percentual de catalisador .....	38
2.3.3.5. Efeito da proporção dos substratos.....	40
2.3.3.6. Efeito da temperatura.....	41

2.3.3.7. Efeito da agitação.....	42
2.4. Considerações em relação ao Estado da Arte.....	43
2.5. Referências.....	45
<b>3. ARTIGO 1: Efeito de aditivos e das variáveis de processo na hidrólise enzimática do óleo da amêndoa da Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) .....</b>	<b>61</b>
3.1. Introdução.....	62
3.2. Materiais e Métodos.....	64
3.2.1. Materiais.....	64
3.2.2. Aparato experimental e procedimento.....	64
3.2.3. Método analítico.....	65
3.3. Resultados e Discussões.....	66
3.3.1. Efeito de diferentes catalisadores enzimáticos e razão mássica óleo:água .....	66
3.3.2. Efeito do pH da solução tampão .....	68
3.3.3. Efeito da agitação.....	70
3.3.4. Efeito de sais e surfactantes .....	71
3.3.5. Efeito da adição de solventes .....	73
3.3.6. Efeito da temperatura.....	75
3.3.7. Efeito do percentual de catalisador .....	77
3.4. Conclusões .....	79
3.5. Agradecimentos .....	80
3.6. Referências.....	80
<b>4. ARTIGO 2: Produção de ácidos graxos a partir da hidroelise enzimática do óleo de Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>) em sistema com solvente orgânico .....</b>	<b>87</b>
4.1. Introdução.....	88
4.2. Materiais e Métodos.....	89
4.2.1. Materiais.....	89
4.2.2. Aparato experimental e procedimento.....	90
4.2.3. Metodologia analítica .....	91
4.2.5. Análise dos Dados .....	92
4.2.7. Reutilização dos Catalisadores .....	92
4.3. Resultados e Discussões.....	93

4.3.1. Testes Preliminares.....	93
4.3.2. Efeito das variáveis do processo.....	95
4.3.3. Estudo cinético da Produção Enzimática de Ácidos Graxos Livres do Óleo da Amêndoa da Macaúba.....	99
4.3.5. Reutilização do catalisador enzimático na reação de hidrólise .....	101
4.4. Conclusões .....	102
4.4. Agradecimentos .....	102
4.4. Referências.....	103
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>108</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Estudos reportados na literatura sobre a hidrólise enzimática de óleos vegetais .....	33
Tabela 3.1. Composição química do óleo da amêndoa da Macaúba.....	65
Tabela 3.2. Efeito de aditivos no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, 400 rpm, razão mássica óleo:solução tampão de 1:2, pH 8,0 da solução tampão, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação.....	72
Tabela 4.1. Composição química do óleo da amêndoa da macaúba.....	90
Tabela 4.2. Fatores e intervalos investigados nos dois planejamentos experimentais .....	91
Tabela 4.3. Matriz do primeiro planejamento experimental (valores codificados e reais) com os resultados em termos de rendimento em AGLs.....	95
Tabela 4.4. Matriz do delineamento composto centro rotacional $2^2$ e rendimento em AGLs.....	97

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1. Custos gerais da produção de biodiesel..... 16
- Figura 2.2. Fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*).....21
- Figura 2.3. Representação da reação de transesterificação de óleos vegetais;  
a) Equação Geral; b) Reações consecutivas e reversíveis .....23
- Figura 2.4. Representação das reações consecutivas e reversíveis da  
hidrólise dos triacilglicerídeos.....31
- Figura 3.1. Efeito de diferentes catalisadores enzimáticos e da razão mássica  
óleo:água na hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, à 55 °C,  
400 rpm, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação.  
Médias seguidas de mesmas letras (para uma mesma enzima)  
em cada coluna são as quais não diferem estatisticamente  
( $p>0,05$ ).....67
- Figura 3.2. Efeito do pH sobre o rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da  
amêndoa da macaúba a 55 °C, 400 rpm, mássica de óleo:água  
1:2, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias  
seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram  
estatisticamente ( $p>0,05$ ) .....69
- Figura 3.3. Efeito da agitação no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da  
amêndoa da macaúba a 55 °C, razão mássica de óleo:solução  
tampão de 1:2, pH de 8,0, percentual de catalisador de 5% e 6  
horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada  
coluna não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).....70
- Figura 3.4. Efeito da adição de solvents não rendimento em AGLs da hidrólise  
do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, razão mássica  
óleo:solvente de 1:1, 400 rpm, razão mássica de óleo:solução  
tampão de 1:2, pH da solução tampão de 8,0, percentual de

catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).....74

Figura 3.5. Efeito da temperatura no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 400 rpm, razão mássica de óleo:solução tampão de 1:2, pH de 8,0, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) .....76

Figura 3.6. Efeito do percentual de catalisados no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, 400 rpm, razão mássica de óleo:solução tampão de 1:2, pH de 8,0 e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).....78

Figura 4.1. Efeito da adição de diferentes razões mássicas (em relação à massa de óleo) de solventes orgânicos na reação de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, a 55 °C, percentual de solução tampão de 50%, pH de 8,0, percentual de catalisador de 5% durante 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ). .....94

Figura 4.2. Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de AGLs ( $p > 0,05$ ). As condições experimentais e os dados encontram-se apresentados na Tabela 4.3 .....96

Figura 4.3. Superfície de resposta para a produção de AGLs em função da concentração de solução tampão e concentração de enzima. As condições experimentais e os dados estão apresentados na Tabela 4.4 .....98

Figura 4.4. Cinética de produção de AGLs em concentração de enzima de 5 a 20%. A reação foi realizada a 55 °C, percentual de solução tampão de 50% (em relação à massa de óleo), razão mássica de óleo:solvente *n*-hexano 1:1 e 400 rpm .....100

Figura 4.5. Reutilização da Lipozyme® RM IM na reação de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba. Todas as reações foram conduzidas usando 20% de catalisador (em relação à massa dos substratos), 70% de solução tampão fosfato de sódio à pH 8,0 (em relação à massa de óleo), 100% de solvente orgânico *n*-hexano (em relação à massa de óleo), 55 °C e 400 rpm, durante 6 horas .....101

## RESUMO

RASPE, Djéssica Tatiane, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, Março de 2014. **Hidrólise Enzimática do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Orientadora: Profa. Dra. Camila da Silva.

A modificação de óleos vegetais e gorduras para a produção de biodiesel têm sido amplamente estudada, onde o incentivo à pesquisa de matérias-primas alternativas para a produção deste biocombustível tem sido foco de interesse. Visando a utilização de uma matriz oleaginosa sem fins alimentícios, com disponibilidade e baixo custo, tem sido reportado o óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*), com seu grande potencial de produção. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção de ácidos graxos livres (AGL) através do processo de hidrólise enzimática, reação inicial da hidroesterificação. Frente ao rendimento em ácidos graxos livres (AGLs), foram avaliados diferentes catalisadores enzimáticos comerciais (Lipozyme® RM IM, Lipozyme® TL IM e Novozyme® 435), adição de solução tampão fosfato de sódio em diferentes pHs (5,7-8,0), sais ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ), surfactantes (Triton X-100, Tween 80) e solventes orgânicos (*n*-hexano, *n*-heptano, Isopropanol, terc-Butanol), bem como as variáveis do processo: agitação (400-2000 rpm), temperatura (30-60 °C), razão mássica dos substratos (1:20-1:1 óleo:água) e percentual de catalisador (1-20% em relação à massa de óleo). Os resultados obtidos demonstram que a adição de solução tampão (pH 8,0) e solvente orgânico *n*-hexano contribuíram significativamente para o aumento no rendimento em AGLs da hidrólise, sendo obtidos aproximadamente 82% à 55 °C, razão mássica óleo:solução tampão 1:2, 100% de solvente *n*-hexano em relação à massa de óleo e 400 rpm, durante 6 horas de reação e 15% de Lipozyme® RM IM. As condições reacionais deste processo foram exploradas na presença de solvente orgânico *n*-hexano por meio de planejamentos experimentais, visando a maximização no rendimento em AGLs do processo, bem como a obtenção da cinética de produção de AGLs. Perante as variáveis, pode-se verificar que não houve aumento nos rendimentos em AGLs, ao aumentar a razão mássica de óleo:solvente *n*-hexano, sendo a temperatura, percentual de solução tampão e catalisador as variáveis que influenciaram significativamente o processo. Na cinética

reacional, cerca de 88% em AGLs foram produzidos em meio reacional composto por 70% de solução tampão, 100% de solvente *n*-hexano e 15% de catalisador, durante 8 horas reacionais. A reutilização do catalisador enzimático foi avaliada perante 20 ciclos reacionais, onde foi verificada diminuição de aproximadamente 50% do rendimento em AGLs inicial do processo.

**Palavras-chave:** Hidrólise, óleo da amêndoa da macaúba (*Acrocomia aculeata*), catálise enzimática.

## ABSTRACT

RASPE, Djéssica Tatiane, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, March de 2014, **Enzymatic hydrolysis from the Macaúba oil (*Acrocomia aculeata*)**. Adviser: Profa. Dra. Camila da Silva.

Modification of vegetable oils and fats for biodiesel production have been widely studied, where the incentive to search for alternative raw materials for the production of this biofuel has been the focus of interest. Aiming to use an oleaginous without food purposes, with availability and low cost matrix, oil Macaúba (*Acrocomia aculeata*) has been reported, with its large production potential. In this context, the aim of this study was to investigate the production of free fatty acids (FFA) through the enzymatic hydrolysis process, the initial reaction hidroesterificação. Front to yield free fatty acids (FFAs) were evaluated different commercial enzymatic catalysts (Lipozyme® RM IM, Lipozyme® TL IM and Novozyme® 435), addition of sodium phosphate buffer at different pHs (5.7-8.0), salts (CuCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>), surfactants (Triton X-100, Tween 80) and organic (*n*-hexane, *n*-heptane, isopropanol, tert-butanol) solvent, as well as process variables: agitation (400-2000 rpm), temperature (30-60 °C), weight ratio of substrates (1:20-1:1 oil:water) and percentage of catalyst (1-20% by mass of oil). The results show that the addition of a buffer solution (pH 8.0) and organic solvent *n*-hexane contributed significantly to the increase in free fatty acids in the hydrolysis yield being obtained approximately 82% at 55 °C oil weight ratio: Buffer 1:2, 100% *n*-hexane solvent relative to the weight of oil and 400 rpm for 6 hours reaction, 15% Lipozyme® RM IM. The reaction conditions of the process were explored in the presence of *n*-hexane organic solvent by means of experimental design, in order to maximize the yield FFAs in the process, as well as obtaining the kinetics of production of FFAs. Given the variables, it can be seen that no increase in yields of FFA by increasing the weight ratio of oil:solvent *n*-hexane, temperature, buffer and percentage of catalyst variables that influence the process significantly. In reaction kinetics, about 88% free fatty acids were produced in reaction medium consisting of 70% buffer, 100% of *n*-hexane solvent and 15% of catalyst, reaction for 8 hours. The reuse of the enzyme catalyst has been reported before 20 reaction cycles, where it was detected decrease of approximately 50% of revenue in the initial FFA process.

**Key words:** Hydrolysis, macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*), enzymatic catalysis.

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Vários aspectos socioeconômicos juntamente à crescente preocupação ambiental estão impulsionando a indústria para chegar a um combustível alternativo aos combustíveis fósseis. As principais razões socioeconômicas são a instabilidade política das regiões exportadoras de petróleo, seu esgotamento das reservas do mundo e do aumento na demanda, o que resulta no aumento de seu preço. Do ponto de vista ambiental, os combustíveis fósseis como o diesel são considerados pela maioria das pesquisas por serem os responsáveis pelos fenômenos de aquecimento global.

Neste contexto, vem-se intensificando o incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias energéticas que supram as necessidades exigidas pelo mundo globalizado. O estudo de fontes alternativas e renováveis de energia tem se tornado necessário devido à possível escassez de combustíveis fósseis e problemas de ordem ambiental. Dentre os recursos renováveis disponíveis para produção de combustíveis alternativos, a modificação de óleos e gorduras tem sido largamente investigada [1, 2, 3, 4]. Entre os processos para modificação de óleos vegetais, podemos destacar a esterificação, transesterificação e hidrólise [5].

O método de obtenção de biodiesel mais empregado é o de transesterificação, que consiste na reação química de triacilglicerídeos com álcoois (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático), ou na ausência do mesmo [6]. A glicerina é um subproduto da reação, e deve ser purificada antes da venda para se aumentar a eficiência econômica do processo. Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005 vigente no Brasil, biodiesel é um “combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” [6]. Apresenta características físico químicas semelhantes às do óleo diesel, porém é menos tóxico, derivado de fontes renováveis [7, 8], biodegradável, livre de enxofre, e reduz toxinas cancerígenas do ar (partículas, hidrocarbonetos não queimados, monóxido de carbono e sulfatos) de 75-90% em comparação com diesel

[9, 10, 11], podendo ser utilizado em qualquer motor de ignição por compressão, sem grande modificações [6].

Este cenário promove a busca por fontes alternativas de energia para manter o desenvolvimento econômico e social, distinguindo-se o biodiesel por seu potencial de redução de impactos ambientais [12]. Ressalta-se, contudo, que há de se considerar que as principais fontes de óleo para a produção de biodiesel são de culturas alimentares [13], merecendo o Brasil o posto de um dos maiores produtores de óleo de soja (CONAB) no mundo, o que estabelece um conflito entre as finalidades energética e alimentar no uso de terras aráveis [14]. Além disso, algumas pesquisas ressaltam que a aquisição da matéria-prima atualmente corresponde por mais de 75% das despesas de produção de biodiesel, que é uma séria ameaça para a viabilidade econômica da indústria de biodiesel [15].

A exploração e incentivo da utilização de demais substratos como fonte de óleo pode atender a esses requisitos e, portanto, contribuir para complementar a demanda primária de biodiesel. Visando com otimismo uma futura liderança mundial do país na produção de biodiesel, assim como a utilização de uma matriz oleaginosa sem fins alimentícios, o óleo do fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) destaca-se, devido ao grande potencial para produção, 1500 a 5000 Kg de óleo por hectare, comparativamente muito superior à produtividade exibida pela soja, cerca de 700 Kg/ha. A *Acrocomia aculeata* produz óleo de alta qualidade e é considerada uma matriz oleaginosa com grande potencial para a produção sustentável de biocombustíveis [16], destacando-se sob os aspectos ambiental, econômico e social [17] e tendo o estado do Paraná como potencial produtor [6].

O processo amplamente usado para produzir o biodiesel é a transesterificação dos triacilglicerídeos com metanol na presença de um catalisador alcalino [18]. Embora este processo possua bons rendimentos em AGLs e tempo de reação, possui alguns inconvenientes, como a dificuldade de separar o catalisador dos produtos da reação, a produção de resíduos líquidos altamente alcalinos e a necessidade de uma alta qualidade de matérias-primas (acidez inferior a 0,5% e teor de água de 0,06%) [11, 19]. Dentre as tecnologias disponíveis, a obtenção de ésteres de ácidos graxos em duas etapas reacionais para substratos com elevada acidez e umidade, que consiste na hidrólise dos triacilglicerídeos seguida da

esterificação dos ácidos graxos obtidos tem se destacado recentemente [20, 21, 22, 23, 24, 25], principalmente sobre o processo de transesterificação convencional, uma vez que este gera inevitavelmente sabões na presença de ácidos graxos [18, 26] inativando assim o catalisador, afetando a produtividade do processo [2, 5, 22, 27, 28, 29].

A hidroesterificação é a mais moderna alternativa na produção de biodiesel. Esse processo permite o uso de qualquer matéria prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros) [22], cujas quais são totalmente transformadas em biodiesel independente da acidez e da umidade que possuem. Este processo proporciona uma glicerina muito mais pura que a glicerina advinda da transesterificação, onde um significativo teor de sais, álcoois e outras impurezas encontram-se presente na glicerina. Após a hidrólise, os ácidos graxos gerados são então esterificados, obtendo-se os ésteres com elevada pureza [24, 25].

### **1.1. Objetivos**

Dentro do contexto exposto, o presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de tecnologia de produção de ácidos graxos livres do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) pela reação de hidrólise, em processo batelada. Para alcançar este objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- i. Avaliar o efeito da adição de aditivos ao meio reacional (sais, surfactantes, solventes);
- ii. Avaliar o efeito das variáveis de processo (temperatura, concentração de catalisador, razão mássica dos substratos, percentual de solvente) no rendimento em ácidos graxos livres;
- iii. Obtenção da cinética de produção de ácidos graxos livres;

### **1.2. Publicações**

Cabe ressaltar que durante a realização deste trabalho, o seguinte prêmio foi obtido:

- i. RASPE, D. T.; SILVA, C. **Seleção de Catalisadores para a Hidroesterificação enzimática do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Terceiro lugar geral dos melhores trabalhos apresentados no XII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, III Simpósio de Alimentos e FIIA 2013. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (sbCTA).

Os seguintes artigos foram submetidos e estão em processo de submissão para publicação em periódicos:

- i. RASPE, D. T.; SILVA, C.; CARDOZO FILHO, L. **Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*)**. International Journal of Chemical Engineering, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- ii. RASPE, D. T.; SILVA, C. **Produção de Hidrolisado do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) com adição de solvente orgânico ao meio reacional**. Revista de Ciências Exatas e Naturais, 2014.

Os trabalhos citados abaixo foram publicados em Anais de Congressos:

- i. RASPE, D. T.; LEUCHS, J. C. G.; SILVA, C. **Efeito das variáveis de processo e aditivos na produção de ácidos graxos livres do óleo de macaúba**. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos & X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2013, Foz do Iguaçu. Anais do XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos & X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2013.
- ii. RASPE, D. T.; SILVA, C. **Produção de Hidrolisado do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) com Adição de Solvente Orgânico ao Meio Reacional**. In: IV Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos, 2013, Guarapuava. Anais do IV Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos, 2013.
- iii. RASPE, D. T.; SILVA, C. **Efeito das variáveis de Processo na Obtenção de Ácidos Graxos Livres do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) em sistema livre de Solvente**. In: XII Encontro Regional Sul de Ciência e

Tecnologia de Alimentos, III Simpósio de Alimentos e FIIA 2013, 2013, Medianeira. Anais do XII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, III Simpósio de Alimentos e FIIA 2013, 2013.

- iv. RASPE, D. T.; SILVA, C. **Seleção de Catalisadores para a Hidroesterificação enzimática do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. In: XII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, III Simpósio de Alimentos e FIIA 2013, 2013, Medianeira. Anais do XII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, III Simpósio de Alimentos e FIIA 2013, 2013.

### 1.3. Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado de forma a apresentar no capítulo inicial (Capítulo 1) uma introdução que permita identificar algumas considerações acerca do trabalho em questão, e os objetivos da realização do mesmo, contemplando a origem do tema, a importância, a metodologia utilizada, as limitações, a estrutura da dissertação e o referencial bibliográfico do mencionado.

O Capítulo 2, apresenta a revisão bibliográfica da literatura publicada sobre o tema do presente trabalho. Visando a contextualização, o texto aborda inicialmente conceitos, premissas e legislações, destacando a importância dos biocombustíveis no contexto atual do desenvolvimento sustentável. Em seguida, encontram-se abordados o estado da arte em que se encontram as pesquisas sobre o tema do trabalho em questão, considerando os processos envolvidos separadamente.

As seções correspondentes aos Capítulos 3 e 4 serão apresentadas em forma de artigos científicos, estando dispostas conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Estes capítulos trazem uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além das conclusões de cada etapa.

O artigo que compõe o Capítulo 3, intitulado “Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*)” reporta os resultados obtidos em relação aos testes preliminares do presente trabalho, correspondendo aos resultados referentes ao melhor percentual de água adicionado ao meio reacional; à diferentes valores de pH da solução tampão; à influência da solução tampão no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba. Avaliação do efeito de aditivos ao meio reacional, sendo estes surfactantes, sais e solventes; das variáveis temperatura, razão mássica de AGLs:solução tampão e concentração de catalisador, sendo deste último, avaliadas três diferentes lípases comerciais.

No Capítulo 4, é apresentado o artigo correspondente à “Produção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise enzimática do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) em sistema com solvente orgânico”, o qual aborda as reações que objetivaram as melhores condições reacionais dos processos de hidrólise na adição de solvente orgânico no meio reacional, visando a maximização na produção de ácidos graxos livres (AGL). O percentual de solução tampão, concentração de catalisador e temperatura foram otimizados na etapa de hidrólise, visando a maximização da produção de AGLs.

Por fim, o Capítulo 5 contempla as conclusões obtidas no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho, acompanhado das perspectivas futuras, expostas no Capítulo 6.

#### **1.4. Referências**

- [1] FUKUDA, H.; KOND, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. Journal Of Bioscience And Bioengineefxng, v.92, n.5, pp.405-416, 2001.
- [2] LIMA, J. R. O.; SILVAM R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; JR, J. R. S.; MOURA, E. M. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de Babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. Química Nova, v.30, n.3, pp.600-603, 2007.

- [3] SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.3, pp.843-851, 2008.
- [4] MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology*, v.70, pp.1-15, 1999.
- [5] LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H.; A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v.87, pp.1083 – 1095, 2010.
- [6] PORTAL BIODIESEL BRASIL. [www.biodieselbr.com.br](http://www.biodieselbr.com.br). Acesso em Junho de 2012.
- [7] McCORNICK, R. L.; GRABOSKI, M. S.; ALLEMAN, T. L.; HERRING, A. M. Impact of biodiesel source material and chemical structure on emissions of criteria pollutants from a heavy-duty engine. *Environmental Science & Technology*, v.35, pp.1742-1747, 2001.
- [8] LANG X.; DALAI A.K.; BAKHSHI, N. N.; REANY, M. J.; HERTZ, P. B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, v.80, pp.53-62, 2001.
- [9] ANTOLIN, G.; TINAUT, F. V.; BRICENO, Y.; CASTANO, V.; PEREZ, C.; RAMIREZ, A. I. Optimization of Biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology*, v.83, pp.111-114, 2002.
- [10] MEHER, L. C.; SAGAR, D. V., NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review, *Renewable and Sustainable Energy*, v.10, n.3, pp.248–268, 2006.
- [11] CARIOCA, J. O. *Química verde no Brasil: 2010 – 2030*; CARIOCA, J. O.; ALMEIDA, M. F.; SEIDL, P. R., eds.; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Brasília, cap.1, 2010.
- [12] BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, pp.557-577, 2010.
- [13] CONCEIÇÃO, R. C.; FRASÃO, C. V.; SILVA, S. M. C. MEREIROS, J. L. ARAÚJO, O. Q. F.; PICARDO, M. C. Caracterização composicional e Transesterificação de óleo de microalga: uma abordagem computacional. *Química Nova*, v.35, n.7, pp.1336-1342, 2012.
- [14] MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q. J.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganism. *Renew Energy*, v.34, pp.1–5, 2009.

- [15] ABREU, A. G.; PRIOLLI, R. H. G.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; NUCCI, S. M.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, pp.116-121, 2012.
- [16] BHERING, F. Macaúba: matéria-prima nativa com potencial para a produção de biodiesel, 2009. [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br). Acesso em Outubro de 2012.
- [17] DEMIRBAS, A. Studies on cottonseed oil biodiesel prepared in non-catalytic SCF conditions. *Bioresourde Technology*, v.99, pp.1125-1130, 2008a.
- [18] HE, H.; TAO, W.; ZHU, S. Continuons production of biodiesel from vegetable oil using supercritical methanol process. *Fuel*, v.86, pp.442-447, 2007.
- [19] GAN, S.; NG, H. K.; OOI, C. W.; MOTALA, N. O.; ANAS, M.; ISMAIL, F. Ferric sulphate catalysed esterification of free fatty acids in waste cooking oil. *Bioresource Technology*, v.101, pp.7338–7343, 2010.
- [20] ROCHA, L. L. L.; RAMOS, A. L. D.; FILHO, N. R. A.; FURTADO, N. C.; TAFT, C. A.; ARANDA, D. A. G. Production of Biodiesel by a Two-Step Niobium Oxide Catalyzed Hydrolysis and Esterification. *Letters in Organic Chemistry*, v.7, pp.571-578, 2010.
- [21] SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. A.; ARANDAB, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.65, pp.133–137, 2010.
- [22] TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy Fuels*, v.24, pp.2016–2019, 2010a.
- [23] MENG, Y.; WANG, G.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J. LI, Y. LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, pp.1-9, 2011.
- [24] OLIVEIRA, E. C.; SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. *Enzyme Research* (doi:10.4061/2011/618692).

- [25]TING, W. J.; HUANG, C. M.; GIRIGHAR, N.; WU, W. T. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v.39, n.3, pp.203-210, 2008.
- [26]BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.9, n.4, pp.363-378, 2005.
- [27]AKON, C. C.; CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, pp.8995-9005, 2007.
- [28]RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v.99, pp.3975-3981, 2008.

## **CAPITULO 2. REVISÃO DA LITERATURA**

Os combustíveis fósseis são recursos energéticos não renováveis, e que, portanto, tendem a se esgotar com o passar do tempo. Há estudos prevendo que, mantidas as taxas atuais de produção e consumo, as reservas de petróleo não irão durar por mais de algumas décadas. Ademais, o uso intensivo de combustíveis fósseis está associado a diversos impactos ambientais, como a poluição do ar nos grandes centros urbanos, mudanças climáticas, que atualmente representam a principal ameaça à existência da espécie humana sobre a Terra [1].

Verifica-se, portanto, a necessidade da substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia que sejam renováveis e ambientalmente mais limpas, tanto no aspecto das emissões de gases de efeito estufa como no aspecto das emissões de poluentes atmosféricos.

Neste capítulo é apresentada como forma de fundamentação teórica deste trabalho uma breve explanação sobre energias renováveis e o contexto do biodiesel como alternativa ao diesel de petróleo. O presente capítulo aborda ainda alguns conceitos e métodos utilizados para produção de biodiesel, com ênfase no processo de hidrólise e sua aplicação na produção de biodiesel.

### **2.1. Situação Energética Mundial**

O mundo encontra-se em constante busca de energias, que possam suprir as necessidades de desenvolvimento de cada país. A seguir será feito um breve relato sobre algumas das principais fontes de energia usadas no mundo.

#### **2.1.1. Energias Não Renováveis**

A evolução do ser humano descreve uma trajetória de demanda crescente sobre os recursos naturais, sendo que uma parcela superior ao 50% da superfície terrestre e sua produtividade já são utilizadas [2]. Estima-se, por exemplo,

que a escassez de água atingirá 40% da população do Planeta em 2030 [3]. A partir do processo de industrialização da sociedade humana, com a Revolução Industrial como marco inicial comumente aceito, a utilização de energia observou aumento exponencial. Parcela substancial deste aumento deve-se à utilização da matriz fóssil como geradora de energia. Com isto, carvão e petróleo são pano de fundo para uma das mais rápidas e intensas modificações das sociedades humanas em sua história no Planeta. Como efeito, a atmosfera terrestre observa um aumento gradual, mas persistente, na concentração de gases que alteram seu balanço energético, definindo um quadro não análogo ao observado nos últimos setecentos mil anos [4, 5].

O processo de geração de energia é considerado um dos grandes marcos de referência na história da humanidade. É tido como limitante, e como forte entrave para o desenvolvimento sócio econômico mundial. Existem inúmeras formas de obtenção de energia, desde a hidroelétrica, que é a mais comum, até a nuclear, passando pela energia gerada por meio dos biocombustíveis [6, 7]. A primeira e principal fonte de energia utilizada pela humanidade foi e continua sendo representada pela energia fóssil, gerada em períodos geológicos passados a partir de matéria orgânica fossilizada. Esse tipo de energia não renovável, segundo a EIA [8] está representada atualmente pelo petróleo (32,8%), carvão mineral (27,2%) e gás natural (20,9%).

Os combustíveis fósseis constituem cerca de 80% da energia primária consumida no mundo, e mais de 57% daquela utilizada no setor de transportes [9]. Os combustíveis fósseis enfrentam atualmente uma forte crise devida ao contínuo aumento na demanda e o preço do petróleo, e ao imenso prejuízo que causam no meio ambiente, sendo este último um dos fatores mais agravantes, principalmente em se tratando do aquecimento global [10].

A combustão proveniente deste tipo de combustível gera uma quantidade significativa de gases de efeito estufa, sendo os mais importantes o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ). Desde meados do século passado, a concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  vem se elevando e atingindo níveis dramáticos [11, 12], devido em parte à utilização crescente de combustíveis fósseis. Acredita-se que seja este um dos fatores que contribuem sobremaneira às mudanças climáticas

que o planeta vem sofrendo, e que têm vindo manifestando fortes precedentes como alteração na intensidade e distribuição das chuvas, elevação do nível dos oceanos, e um crescente aumento na frequência e intensidade de fenômenos climáticos extremos [10].

### **2.1.2. Energias Renováveis**

Face ao acelerado crescimento do consumo mundial de energia associado às incertezas quanto ao suprimento das necessidades futuras, pesquisas por novas fontes energéticas são complementadas por outras que objetivam o seu melhor aproveitamento através de diferentes tecnologias, o que pode adiar no tempo a previsão de crises energéticas. A partir dessa problemática, os governos têm partido em busca de novas fontes de energia que sejam renováveis e ambientalmente limpas. Entre elas encontram-se os biocombustíveis, que, podendo ser líquidos, gasosos ou sólidos, são gerados a partir dos mais variados tipos de matéria-prima, como a cana-de-açúcar, plantas oleaginosas, biomassa de florestas, e outras fontes de matéria orgânica [13], incluindo as promissoras pesquisas com microalgas biocombustíveis [14, 15, 16]. Eles podem ser utilizados tanto isolados quanto adicionados a combustíveis convencionais.

Como exemplos têm-se o bioetanol, biodiesel, biometanol, biogás e bio-hidrogênio. O bioetanol, como o biocombustível mais tradicional, é gerado a partir da cana-de-açúcar, milho, trigo e beterraba, enquanto o biodiesel é comumente obtido a partir de sementes de plantas oleaginosas como soja, canola, algodão, girassol e mamona [2]. Em 1998, essas fontes de energia renováveis eram muito insignificantes, correspondendo a apenas 2% de toda a energia consumida mundialmente [17]. Atualmente, esse tipo de energia tem ganhado muito destaque na imprensa internacional, visto suas inúmeras vantagens, a segurança energética, diminuição com as perturbações ambientais e vantagens socioeconômicas e ambientais. Dessa forma, acredita-se que em 2050 esse tipo de energia represente pelo menos o 50% de toda a energia consumida pelos países em desenvolvimento [18].

No início de 2012, foi publicado no *Consumer Energy Report* a situação atual dos principais produtores de biocombustíveis a nível mundial. O relatório esboça que os EUA, o Brasil e a União Europeia a contam para 87% da produção mundial de biocombustíveis, sendo que os EUA produziram 48% do total mundial em 2011 de biocombustíveis, principalmente na forma de etanol de milho, e o Brasil produziu 22,4%, principalmente em etanol de cana. No entanto, a produção de etanol no Brasil apresentou um declínio nos últimos anos devido às decepcionantes safras de cana. A terceira maior produtora de biocombustíveis é a União Europeia, que é a principal região produtora de biodiesel do mundo. A União Europeia foi responsável por 16,5% da produção mundial de biocombustíveis. Os únicos países, produzindo mais de 3% do total mundial de biocombustíveis foram a Alemanha (4,8%) e Argentina (3,8%).

#### **2.1.2.1. Biodiesel**

Um dos grandes destaques da atualidade na área de biocombustíveis é o interesse pelo uso de recursos naturais baseados em materiais lignocelulósicos [8, 19] para a produção de etanol ou por fontes produtoras de lipídeos usados para a produção de biodiesel. O biodiesel é o produto da reação de um triacolglicerídeo ou ácido graxo (óleo vegetal ou gordura animal) e um reagente, na presença ou não de um catalisador, sendo denominado de ésteres de ácido graxos [20, 21]. Por definição, é um substituto natural do diesel de petróleo, que pode ser produzido por fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras de animais. Quimicamente, é definido como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos [22].

Biodiesel é o nome dado a ésteres alquílicos de ácidos graxos desde que atendam certos parâmetros de qualidade [23, 24, 25, 26, 27], e de acordo com a Resolução nº4 da ANP [28], somente as misturas de ésteres de ácidos graxos superiores a 96% podem ser denominadas de biodiesel. Além de esses ésteres serem derivados de fontes biológicas como plantas e animais, atuam como combustível substituto ao diesel de petróleo, com desempenho muito próximo, não exigindo modificações nos motores [29]. Na Europa as especificações físico-químicas de qualidade para o biodiesel estão agrupadas na norma EN 14214 [26],

nos Estados Unidos estas são regulamentadas pela norma ASTM D6751 [23], enquanto no Brasil o mesmo é feito através da resolução ANP 07/2008 [27], que é exigida para que o produto seja utilizado no mercado brasileiro, com os seus respectivos limites de contaminantes e os métodos que devem ser empregados no seu controle de qualidade.

Em relação aos biocombustíveis, o Brasil se encontra em posição confortável, principalmente por ser o líder mundial na produção de bioetanol, e também pelo seu enorme potencial natural e agrícola para produção de biomassa para biodiesel [13]. Em 2004 foi lançado no Brasil o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, como uma opção nacional ao uso de combustíveis. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, dispôs sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, e o definiu como um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil”. Esta mesma lei estabeleceu que a partir de janeiro de 2008 fosse obrigatório à adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo e que a partir do ano de 2013 torna-se obrigatório à adição de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo [30].

Desde 1º de Janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel, antecipando assim a meta prevista a ser implantada a partir de 2013. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis [28].

A fim de conferir uma dimensão à perspectiva de expansão da produção de biodiesel no Brasil, o portal Biodiesel BR [30] forneceu projeções efetuadas para o período 2005 – 2035. Para tal, foram considerados os seguintes parâmetros básicos para efetuar a projeção:

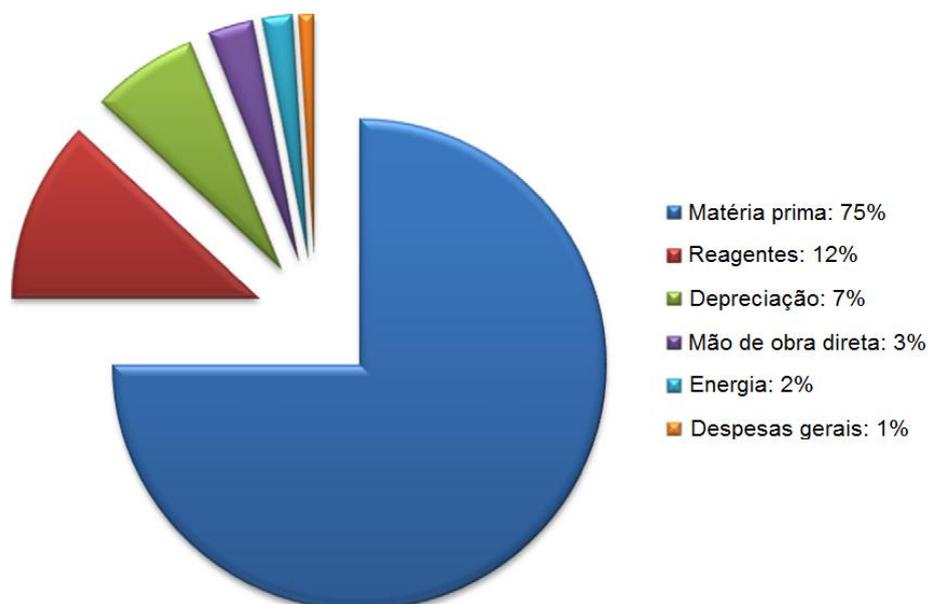
- i. Taxa geométrica de crescimento do consumo de óleo diesel de 3,5% a.a.;
- ii. Mistura de biodiesel ao óleo diesel iniciando em 2 % e finalizando em 40%;
- iii. Produtividade de óleo iniciando em 600 kg/h e finalizando em 5.000 kg/h;
- iv. Considerou-se grande usina aquela que processa acima de 100 kt/ano;
- v. Parcela da produção alocada a grandes usinas de 80%;
- vi. Craqueadores instalados em pequenas comunidades ou propriedades rurais atingindo 100.000 no final do período, com produção média de  $1,04 \times 10^{-11}$  km<sup>3</sup>/h.

O estudo mostra que o Brasil poderá produzir, apenas para o mercado interno, um volume aproximado de 189,27 litros, sendo a maior parcela produzida por transesterificação (80%) e o restante por craqueamento. A produção por transesterificação atenderá o grande mercado atacadista, direcionado à mistura com petrodiesel, o abastecimento de frotistas ou de consumidores interessados em aumentar a proporção de biodiesel no petrodiesel. Estima-se que a produção de biodiesel para os mercados externos e internos, no final do período, será equivalente. Entretanto, nos primeiros 10 anos, o mercado interno absorverá a totalidade da produção. No conjunto do mercado interno e externo, a rota de transesterificação etanólica responderá por 90% do total do biodiesel produzido. Nesse cenário, no final do período, haverá uma demanda de 22,71 litros de etanol e uma produção 4 milhões de toneladas de glicerol, evidenciando o potencial de integração de cadeias com a produção de biodiesel.

## **2.2. Matérias Primas para a Produção de Biodiesel**

Uma variedade de biolipídeos pode ser usada para produzir o biodiesel. A matéria-prima para a produção de biodiesel depende muito do clima, condições de solo e disponibilidade de locais; conseqüentemente diferentes regiões estão concentrando seus esforços em diferentes tipos de óleo [31]. No entanto, de acordo com algumas pesquisas, a aquisição de matéria-prima atualmente corresponde por mais de 75% das despesas de produção de biodiesel, que é uma séria ameaça para

a viabilidade econômica da indústria de biodiesel [32]. Por conseguinte, o custo final do biodiesel depende, principalmente, do preço da matéria-prima, conforme descrito na Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Custos gerais da produção de biodiesel [32].

Com preço de óleo vegetal aumentando consideravelmente nos últimos anos, o custo de produção do biodiesel vai continuar aumentando, e o biodiesel vai acabar perdendo sua vantagem competitiva devido ao preço elevado. Além disso, os problemas associados com os impactos sobre a segurança alimentar e mudança na terra também têm surgido. Baseando-se nisso, os cientistas estão desenvolvendo uma nova geração de biodiesel para ajudar a evitar tais problemas. Uma possível solução é o emprego de matérias-primas alternativas de diferentes tipos, qualidade e custo [31]. O cultivo de matérias-primas e a produção industrial de biodiesel têm grande potencial de geração de emprego, que é uma forma de inclusão social, especialmente quando se considera o amplo potencial produtivo da agricultura familiar.

O Brasil apresenta condições reais para se tornar um dos maiores produtores de biodiesel do mundo, principalmente por dispor de solo e clima

adequados ao cultivo de oleaginosas [33]. Além das áreas agricultáveis já utilizadas, o país ainda dispõe de aproximadamente 140 milhões de hectares agricultáveis, incluindo terras pouco viáveis para a produção de outras espécies alimentícias. Assim, o país se torna um dos poucos, se não o único, país do mundo capaz de expandir sua produção para os mais variados fins, incluindo as oleaginosas. A partir daí, acredita-se que o Brasil tem condições suficientes para liderar a produção mundial de biodiesel, possibilitando a substituição do 60% da produção mundial de óleo diesel [34]. Ademais, quando se observa o panorama geral da produção de biodiesel no Brasil, vê-se que mais de 70% do biodiesel produzido é originário da soja, um produto alimentício nobre com grande impacto econômico que, de quebra, traz para as regiões áridas e semiáridas uma situação de maior dependência dos Estados do Centro-Sul, fato que nos leva a importar biodiesel dessas regiões. É digno de nota, porém, que o Brasil não somente tem outras espécies promissoras nesse sentido, mas também o interesse a partir do qual está incentivando pesquisas científicas que visam levantar dados sobre a real capacidade de substituir o óleo de soja por óleos de outras oleaginosas. É possível que em um curto prazo não se consiga a substituição total do biodiesel de soja pelo produzido por outras espécies vegetais, mas acredita-se que o Brasil e outros países emergentes têm forte capacidade de liderar o mercado de oleaginosas alternativas.

Dentre o leque de oleaginosas estudadas para o desenvolvimento de biodiesel, abaixo serão apresentadas as principais características de quatro destas, uma das quais já é potencialmente utilizada na produção de biocombustíveis no Brasil e no Mundo. Primeiramente é apresentada a oleaginosa que é usada na alimentação humana e animal, e que apresenta potencial de uso como biocombustível. Na sequência, apresentam-se três outras espécies, cujas quais estão entre as mais estudadas pelas suas propriedades oleaginosas, merecendo destaque à última, objeto de estudo do presente trabalho.

### **2.2.1. Soja (*Glycine max*)**

A soja, com uma tecnologia agrícola já bem estabelecida, é hoje a principal matéria-prima na produção de biodiesel. Parte disso se deve a arranjos

produtivos muito bem estudados e implantados em boa parte do território brasileiro, sendo esta sua principal vantagem em relação às outras oleaginosas. Do ponto de vista do balanço energético, da ocupação de terras e da inclusão social, a soja não é a melhor opção. Porém, do ponto de vista econômico, e visando um baixo uso de fertilizantes nitrogenados e boa disponibilidade de sementes e tecnologia, a soja é, sim, muito importante como matéria-prima para a produção de biodiesel [35]. A soja é um vegetal nobre, já que possui destinos variados, especialmente aqueles ligados com a alimentação animal e humana, com fortes impactos sobre a balança comercial dos países produtores [36]. Além disso, o cultivo desta leguminosa exige condições edafoclimáticas específicas, que não se dão em diversas áreas que necessitam desenvolvimento.

Entre as oleaginosas, a soja ocupa o topo da lista no ranking Brasileiro de matérias-primas para a produção de biodiesel. Cerca de 80% do óleo biocombustível produzido no Brasil vem da soja [2]. Assim, muitos países vêm pesquisando fontes alternativas para o óleo de soja de forma a diminuir o impacto que a subtração desse tipo de óleo tem na alimentação humana e animal, e desmitificar o uso do óleo biocombustível como o causador da fome no mundo, como recentemente foi veiculado nos meios de comunicação. Na verdade a indústria do petróleo encontra-se em alerta, tendo em vista a possibilidade dos biocombustíveis como biodiesel e bioetanol reduzirem parte dos seus lucros.

A área agrícola destinada ao cultivo de oleaginosas é dezena de vezes menor quando comparada às áreas voltadas para alimentação. A ideia que os biocombustíveis podem levar ao desmatamento é outro mito, pois as áreas desmatadas são consequência da monocultura, da pecuária extensiva e da extração de madeiras, principalmente na Região Norte do Brasil [2]. Dessa forma, o governo brasileiro tem direcionado uma parcela significativa de recursos para viabilizar estudos de fontes alternativas de oleaginosas não convencionais, bem como nativas, visando a inclusão de pequenos agricultores nas regiões mais carentes do país, tal como o nordeste.

### **2.2.2. Algodão (*Gossypium hirsutum*)**

O óleo de algodão é um dos mais representativos no mercado mundial, ocupando o 9º lugar entre os mais produzidos [37]. Em 2006, o algodão representou 7% do mercado de óleos comercializados no Brasil, ficando atrás apenas da soja [38]. Há muito tempo que o algodoeiro é reconhecido no Brasil, principalmente na região nordeste, como importante fonte de renda e geração de emprego para a agricultura familiar. O óleo do algodão apresenta um perfil químico compatível com sua utilização como biodiesel, toda vez que suas sementes encerram cerca de 20% de óleo [37], constituído por ácidos graxos insaturados, especialmente ácidos oléico e linoléico. Além disso, esta cultura possui outras utilidades, como a produção de fibras e torta [38].

Dentre as oleaginosas, é a segunda mais produzida nas regiões nordeste e centro-sul do Brasil [34]. Porém, no listado das 10 melhores oleaginosas brasileiras avaliadas em termos da produção de óleo, aparece em último lugar devido a seu baixo rendimento de óleo por hectare (cerca de 0,1 a 0,2 ton ha<sup>-1</sup>) [34]. Isto faz com que a potencialidade da espécie para a produção de biodiesel fica comprometida. Entretanto, resultados ainda preliminares de uma pesquisa mais recente que levou em consideração os custos de produção e conservação do meio ambiente, entre outros fatores, indicam que o plantio de algodão voltado para a produção de biodiesel pode ser uma boa opção para os produtores das regiões áridas e semiáridas do Brasil. Porém, o estudo questiona, preliminarmente também, sua viabilidade econômica [2].

### **2.2.3. Pinhão-manso (*Jatropha curcas*)**

Dentre as plantas com potencial de utilização nos programas de agroenergia, o pinhão-manso mostra-se muito promissor. *J. curcas* apresenta sementes que encerram entre 25 e 32% de óleo [40], podendo render até 1,5 t ha<sup>-1</sup> de óleo ano em plantas de pelo menos 5 anos de idade [41, 42]. A semente produz um óleo com excelentes características físico-químicas e boa proporção de ácidos graxos insaturados os mais cobiçados para estes fins.

Segundo o Centro Experimental de Ségou, na antiga África Ocidental Francesa, a produtividade média anual estimada do pinhão-mansão é de 8.000 kg ha<sup>-1</sup> de sementes [43]. Se não bastasse, o pinhão-mansão pode ainda render uma torta rica em nitrogênio, potássio, fósforo e matéria orgânica. Outras aplicações dos subprodutos do pinhão-mansão incluem o uso da casca como carvão vegetal e matéria-prima na fabricação de papel. Esses fatores aliados favorecem a cultura do pinhão-mansão junto com suas principais vantagens, que consistem em possuir um óleo resistente ao deterioro [42], de alta acidez e de colheita programática em relação a outras espécies ricas em óleo, como as palmáceas [42].

O pinhão-mansão é considerado uma boa opção agrícola, principalmente para as regiões semiáridas do globo. Embora seja exigente em insolação, apresenta forte tolerância à seca. Porém, estudos mostram que a utilização comercial da espécie seria dependente de precipitações nunca menores a 600 mm ano<sup>-1</sup> [44, 45, 46]. Embora *J. curcas* tenha mostrado moderada tolerância à seca [45, 46, 47], estudos recentes têm mostrado que o estresse osmótico, atrelado ou não ao estresse hídrico, é fortemente inibitório do crescimento desta planta [48, 49].

#### **2.2.4. Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**

Dentre as diversas plantas capazes de produzir óleo, matéria-prima para produção de biodiesel, as palmas são consideradas, atualmente, as espécies mais promissoras. Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius), apresentada na Figura 2.2, é uma palmeira oleaginosa amplamente distribuída no continente americano, incluindo o México, Antilhas, Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Esta palmeira é nativa de florestas abertas da América Central ao Sul do Brasil [50, 51]. Diferente do óleo de palma (*Elaeis guineensis*), que requer um ambiente tropical quente e úmido para crescer, a macaúba é adaptada a diferentes ambientes climáticos, incluindo o mais frio e seco do ecossistema subtropical semi-árido [52]. A árvore produz frutos que podem ser transformados em óleo vegetal, ração animal e um granulado de biomassa densa [53, 54, 55].



**Figura 2.2.** Fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) [62].

Quantidade significativa de óleo é obtida a partir dos frutos desta palmeira, sendo que sua produtividade varia entre 1500 e 5000 kg de óleo por hectare por ano, que é a segundo maior produtividade depois de óleo de palma (*Elaeis guineensis*). A palmeira macaúba atinge uma alta produtividade após 4 anos de crescimento e mantém a produção por mais de 100 anos [56]. Outras características importantes desta palmeira são a elevada resistência a pragas e as variações de temperatura, e a capacidade de crescer em áreas de baixa pluviosidade [57]. Tem sido relatado que, se forem utilizados planejamentos específicos para o cultivo e o processo de extração, a produtividade do óleo da macaúba poderia chegar facilmente a 6000 kg por hectare [58].

Vários estudos indicam que os frutos da macaúba apresentam de 9 a 26% de óleo (base úmida), com um valor médio de 19%. Em base seca, a polpa apresenta 46 a 78% de óleo com um valor médio de 59%, sendo que a amêndoa apresenta de 43 a 60% de óleo, com um valor médio de 53% [59, 60]. O óleo proveniente da macaúba não tem tradição como alimento, porém, apresenta um perfil de ácidos graxos comparável ao azeite de oliva, e alto teor de compostos bioativos, como

carotenóides e tocoferóis [51, 61]. Por apresentar elevado valor ácido, torna-se impróprio para o consumo, bem como para uso como matéria-prima em processos de transesterificação convencional [56].

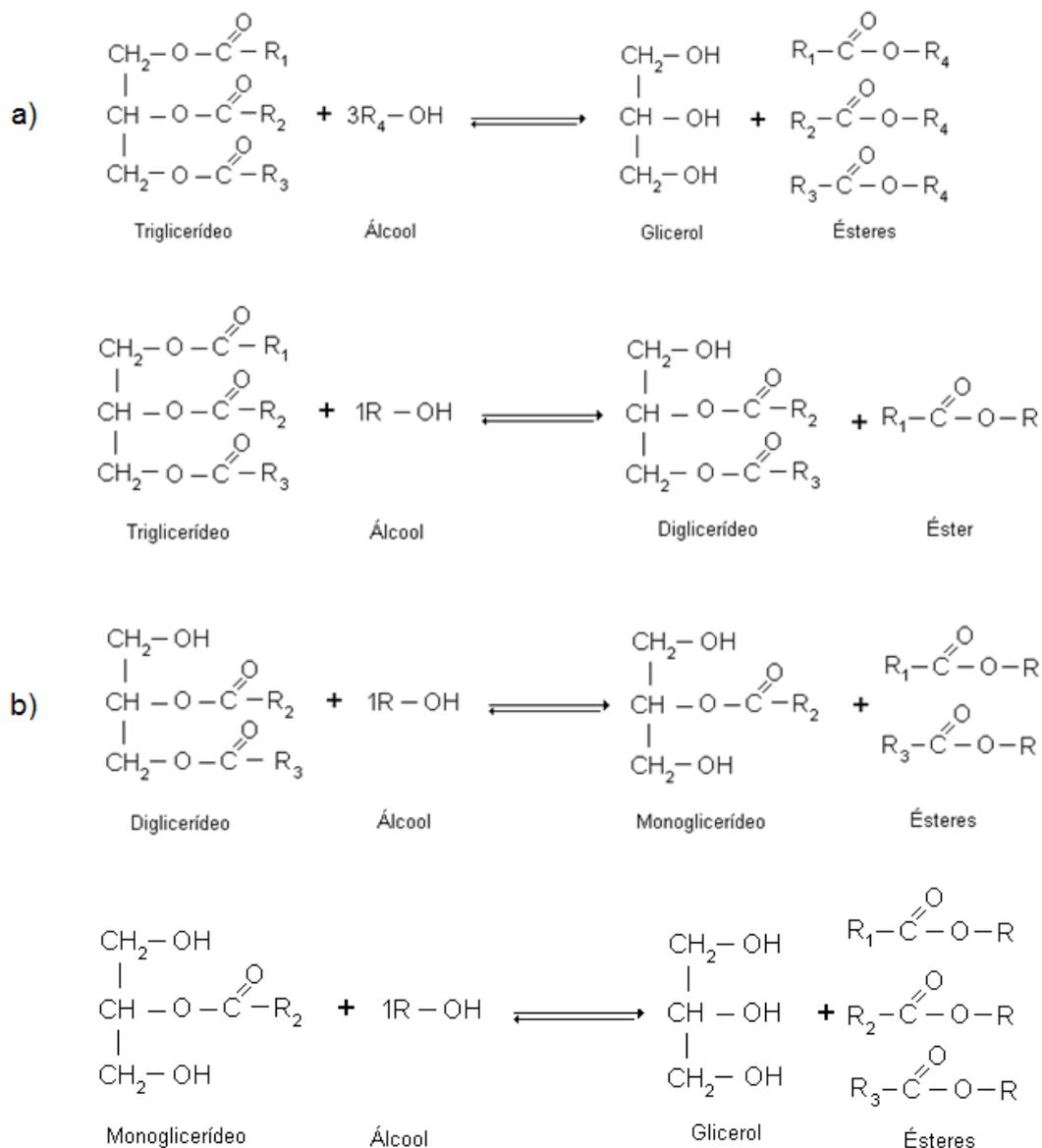
### **2.3. Técnicas para a produção do biodiesel pelo método de Transesterificação**

A maior parte do biodiesel atualmente produzido no mundo deriva do óleo de soja, utilizando metanol e catalisador alcalino [63], porém, todos os óleos vegetais, enquadrados na categoria de óleos fixos ou triacilglicerídeos, podem ser transformados em biodiesel [64]. Quanto aos alcoóis, os mais frequentemente empregados são os de cadeia curta, tais como metanol, etanol, propanol e butanol. No Brasil o uso de etanol anidro é vantajoso, pois este é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido através de biomassa e, dessa maneira, o processo torna-se totalmente independente do petróleo [65], promovendo a produção de um combustível completamente agrícola [66]. A produção de etanol está prosperando e já alcançou 7 bilhões de litros por ano, sendo que a capacidade instalada de produção no Brasil é da ordem de 16 bilhões de L/ano [64].

Com relação aos catalisadores, a transesterificação, representada pela Figura 2.3, pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico [64] porém, ela ocorre de maneira mais rápida na presença de um catalisador alcalino que na presença da mesma quantidade de catalisador ácido, observando-se maior rendimento e seletividade em AGLs, além de apresentar menores problemas relacionados à corrosão dos equipamentos [64, 66, 67]. Os catalisadores mais eficientes para esse propósito são KOH e NaOH, sendo que o uso de hidróxido de sódio, ao invés de metóxido de sódio, é preferido por causa dos perigos e inconvenientes do uso de metal de sódio [64].

Para aumentar o rendimento de alquil ésteres e para permitir a formação de uma fase separada de glicerol um excesso de agente transesterificante (álcool primário) é usado, devido ao caráter reversível da reação [64]. Também, para que resulte uma transesterificação satisfatória, os óleos devem possuir baixo teor de ácidos graxos livres [68], pois esses durante o processo de transesterificação podem

reagir com o catalisador alcalino formando produtos saponificados [69], o que diminui a eficiência de conversão.



**Figura 2.3.** Representação da reação de transesterificação de óleos vegetais; a) Equação Geral; b) Reações consecutivas e reversíveis [70].

O processo geral é uma sequência de três reações consecutivas, na qual mono e diacilglicerídeos são formados como intermediários [71]. Para uma transesterificação estequiometricamente completa, uma proporção molar 3:1 de álcool por triacilglicerídeo é necessária [71, 72, 73]. Entretanto, devido ao caráter

reversível da reação, o agente transesterificante (álcool) geralmente é adicionado em excesso contribuindo, assim, para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado [73].

Existem várias tecnologias que têm sido bem estabelecidos para a produção de biodiesel. Óleos vegetais e gorduras animais são adequados para serem modificados de modo a reduzir as suas viscosidades, para que o produto obtido tenha propriedades adequadas para ser utilizado como combustíveis para motores do ciclo diesel. Há muitos procedimentos que realizam esta modificação e produzem um biodiesel de melhor qualidade, tais como o uso direto e mistura, microemulsões, pirólise de óleo vegetal a transesterificação [74, 75].

### **2.3.1. Produção Catalítica de Biodiesel**

Os óleos vegetais podem ser transesterificados aquecendo-os com um álcool e um catalisador. Catalisadores utilizados na produção de biodiesel são divididos em duas categorias gerais, os homogêneos e heterogêneos [76, 77].

Nos métodos catalíticos, a seleção apropriada do catalisador é um parâmetro importante para reduzir o custo de produção de biodiesel [78]. Assim, o biodiesel comercial é normalmente produzido por transesterificação homogênea. Outro fator que afeta a escolha do tipo de catalisador é a quantidade de ácidos graxos livres (AGL) presentes no óleo. Para óleos com menor quantidade de AGL, a reação catalisada por uma base dá uma melhor conversão de um tempo relativamente curto, enquanto que para óleos contendo alto teor de AGL, a esterificação ácida, seguida de transesterificação é a mais adequada [79]. Tem sido relatado que as reações enzimáticas são insensíveis ao e teor de ALG e água no óleo. Por isso, as reações enzimáticas podem ser utilizadas na transesterificação de óleo de cozinha utilizado [80, 81], bem como nas reações que envolvam culturas temporárias e perenes.

### 2.3.1.1. Utilização de Catalisadores Homogêneos

Os catalisadores homogêneos são categorizados em catalisadores básicos e ácidos. O processo de transesterificação homogênea especialmente a básica requer um elevado grau de pureza das matérias-primas e de separação do catalisador após a reação, tanto do subproduto quanto produto no final. Ambos os requisitos que elevam o custo do biodiesel [79, 82, 83, 84, 85]. Os catalisadores utilizados são de natureza química e podem ser ácidos ou básicos [72, 82]. Os catalisadores homogêneos básicos (NaOH, KOH etc.) são mais utilizados por terem maior eficiência e menor corrosividade, taxa de reação relativamente alta mesmo a baixas temperaturas (aproximadamente 60°C) e custo relativamente baixo [73, 82]. Inicialmente são adicionados ao álcool e, depois, tem lugar a reação com o óleo, formando biodiesel e glicerol.

O processo de purificação do biodiesel não é simples, devido à contaminação por glicerina residual, mono, di e triacilglicerídeos, sabões formados pela reação entre o catalisador e matérias graxas, além de contaminação por água [64, 73, 82]. Tais contaminantes geram problemas sérios nos motores do ciclo diesel, como corrosão ou formação de incrustações, exigindo purificação cuidadosa e aumentando os custos da produção, além de gerarem efluentes com impacto ambiental negativo. Uma forma alternativa de processamento para a produção de biodiesel é a utilização de um catalisador ácido. Transesterificação homogênea ácida pode economicamente competir com processo catalítico básico usando o óleo virgem, especialmente quando se trata de matérias-primas de baixo custo [79, 86]. Os ácidos mais comumente utilizados são sulfúrico, fosfórico, clorídrico ou sulfônico orgânico [87].

A catálise ácida ocorre perante a mistura direta entre o óleo com um álcool acidificado, de modo que a separação e a reação ocorrem em passo único, com o álcool agindo simultaneamente como solvente e como reagente de esterificação [88]. O efeito da utilização do álcool em excesso gera reduções significativas no tempo de reação necessário para a reação homogênea catalisada por ácido, quando as concentrações do catalisador e a proporção molar são mais elevadas [89]. Apesar de o rendimento obtido com a catálise ácida ser alto, os ácidos podem corroer os recipientes e vasos [87]. Assim, estudos que busquem

procedimentos com melhores conversões e materiais resistentes ao meio reacional são boas oportunidades para a pesquisa, o desenvolvimento e a inovação [86].

### **2.3.1.2. Utilização de Catalisadores Heterogêneos**

#### **2.3.1.2.1. Catalisadores Químicos**

Em comparação com catalisadores homogêneos que atuam na mesma fase que a mistura de reação, os catalisadores heterogêneos atuam numa fase diferente a partir da mistura de reação. Por estarem em uma fase diferente, os catalisadores heterogêneos possuem como vantagem a facilidade na separação e reutilização [90]. Devido o elevado consumo de energia e a dispendiosa etapa de separação do catalisador homogêneo a partir da mistura da reação tem voltado à atenção para o desenvolvimento e avanço nos usos dos catalisadores heterogêneos [79], além deste não produzir sabão [91].

O uso da catálise heterogênea na transesterificação de triacilglicerídeos implica a eliminação de várias etapas de lavagem/recuperação de biodiesel/catalisador, garantindo a eficiência e, assim, maior rentabilidade do processo, bem como reduzem os custos de produção. Comparado ao processo de transesterificação catalítica homogênea, o processo de transesterificação catalítica heterogênea pode tolerar as condições de reação extremas, podendo a temperatura ir de 70°C quanto a 200°C [92, 93], havendo ainda a possibilidade de poder ser implementado em regime de funcionamento contínuo processual [94, 95]. A avaliação econômica dos processos heterogêneo e homogêneo, em plantas de produção em grande escala de biodiesel, revelou as vantagens do processo heterogêneo em termos de maior rendimento em biodiesel e de pureza mais elevada de glicerina, bem como menores custos de catalisador e de manutenção. O consumo de energia e os custos associados são maiores no caso do catalisador heterogêneo.

Em relação aos aspectos ambientais, os autores reportam que a aplicação do processo heterogêneo resultaria em menor risco associado com perda ou vazamento de produtos químicos perigosos e inflamáveis. Benefícios ambientais

adicionais podem ser esperados a partir da energia desnecessária nas etapas de purificação glicerina, bem como dos produtos [79]. Segundo Bray [96], a principal limitação encontrada nos catalisadores heterogêneos usados para a transesterificação é que estes não se apresentam tão ativos quanto os homogêneos e, em geral, necessitam de condições experimentais mais severas ou tempos de reação maiores para alcançar valores de conversão similares aos obtidos no processo homogêneo.

#### **2.3.1.2.2. Catalisadores Enzimáticos**

A transesterificação de triacilglicerídeos com um álcool, na presença de uma lipase extracelular ou intracelular tem sido utilizada para a produção de biodiesel, sendo que a maioria das pesquisas publicadas tem usado preparações comerciais de lipases extracelulares em sistemas reacionais pseudo-homogêneos e também na forma imobilizada [97, 98, 99, 100, 101]. O uso de enzimas livres resulta em dificuldades técnicas, sendo praticamente impossível a recuperação e reuso das mesmas, o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto com atividade enzimática residual [97, 98, 101]. Essas dificuldades podem ser superadas pelo uso dessas enzimas na sua forma imobilizada, permitindo o reuso desse biocatalisador várias vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido [102, 103].

O confinamento ou localização física de uma enzima em uma determinada região de um espaço definido, com a manutenção das suas atividades catalíticas, podendo ser usada repetida e continuamente devido à facilidade de sua separação do meio reacional é que caracteriza a “imobilização” da mesma [104]. As atividades catalíticas e outras características das enzimas podem mudar dependendo do tipo de retenção (química ou física), da força da interação entre a enzima e o suporte utilizado que pode, em alguns casos, causar distorções estruturais na proteína. Ainda, a atividade catalítica da enzima em um determinado suporte pode ser alterada, aumentando ou diminuindo devido à fragmentação do suporte pela interação do sistema de agitação e o suporte [85].

Assim, durante a reação, a enzima pode ser removida do suporte devido a essa interação promovendo a “perda de atividade” no reuso, devido à lixiviação e não à inativação da enzima [105]. Por outro lado, se essa lixiviação não ocorrer e a enzima permanecer ligada ao suporte, o aumento da superfície de contato poderá ajudar no aumento da transferência de massa, aumentando conseqüentemente a eficiência da enzima como catalisador. A produção enzimática do biodiesel pode ser realizada usando solventes orgânicos (geralmente *n*-hexano ou *n*-heptano) ou simplesmente usando a mistura dos substratos (lipídeos e álcool). Neste último caso, é recomendado que o álcool seja adicionado em pequenas porções, de forma a manter baixas concentrações do mesmo, evitando assim a inativação da enzima [106].

Esse argumento tem sido sistematicamente repetido na literatura por muitos autores, afirmando que o uso de biocatalisadores é atrativo, pois o biodiesel obtido enzimaticamente poderia ser usado diretamente sem a necessidade de nenhuma purificação [106, 107, 108, 109]. Porém, isso deve ser melhor avaliado, uma vez que mesmo se o rendimento da transformação fosse 100%, fato incomum na catálise enzimática até o presente, após a separação da glicerina, a fase que contém os ésteres deverá ser submetida à evaporação para a completa remoção do álcool que foi usado em excesso. No caso de ter sido usado um cosolvente como, por exemplo, *n*-hexano [110] este também deverá ser removido. Os ésteres resultantes ainda poderão conter glicerina residual dissolvida, a qual deverá ser removida em uma etapa de purificação obrigatória para enquadrar o produto nas especificações de qualidade EN 14214 [25], ASTM D6751 [23] ou ANP 07/2008 [27].

Mesmo aceitando o grande potencial das lipases imobilizadas em resinas acrílicas ou em outros suportes e encontrando as soluções desejadas que promovam altos rendimentos das transformações, reduzindo os tempos reacionais e solucionando as limitações técnicas já mencionadas, o custo elevado desses biocatalisadores ainda faz com que este processo seja restritivo em termos econômicos para a aplicação comercial. Nestes casos tem-se utilizado como justificativa o fato dos catalisadores enzimáticos poderem ser reutilizados por vários ciclos sem perda de atividade ou com perda desprezível. Alguns autores sugerem técnicas de reativação das mesmas com o auxílio de solventes orgânicos [85].

### 2.3.2. Produção Não Catalítica de Biodiesel

Em uma reação catalítica de produção de biodiesel por meio da transesterificação, vários processos, tais como a purificação de ésteres, a separação e recuperação de reagentes que não reagiram e catalisadores, estão envolvidos. Estes processos tornam a produção de biodiesel através de um sistema convencional de transesterificação complicado, dando assim uma razão para investigar a produção de biodiesel a partir das reações não catalíticas. Ao lado de métodos catalíticos, existe o processo de álcool supercrítico. Transesterificação supercrítica é um método não catalítico para a produção de biodiesel em que em vez de utilizar catalisadores, são utilizadas alta pressão e temperatura [111]. A reação é rápida e o teor de conversão aumenta 50-95% nos primeiros 10 minutos, mas isso requer uma gama de temperatura de 250-400 °C [62, 112, 113].

Como é sabido, quando um fluido ou gás é submetido a temperaturas e pressões em excesso do seu ponto crítico, um certo número de propriedades não usuais são exibidas. Sob tais condições, uma fase líquida e de vapor distinta já não existe. Em vez disso, uma única fase de fluido é formada [114]. Devido ao baixo valor da constante dielétrica do álcool no estado supercrítico, acredita-se que esta abordagem é capaz de resolver os problemas associados com a natureza das duas fases do método convencional da mistura dos triacilglicerídeos e álcool, através da formação de uma única fase, onde a reação é concluída em um tempo muito curto [115]. Em contraste com a catálise alcalina, o presente processo tem vantagens que foram previamente discutidas [113, 116, 117, 118, 119]. A separação do produto e subproduto glicerina do biodiesel é simples, porque os produtos não são miscíveis entre si à temperatura ambiente, e não há catalisador na mistura para ser removido.

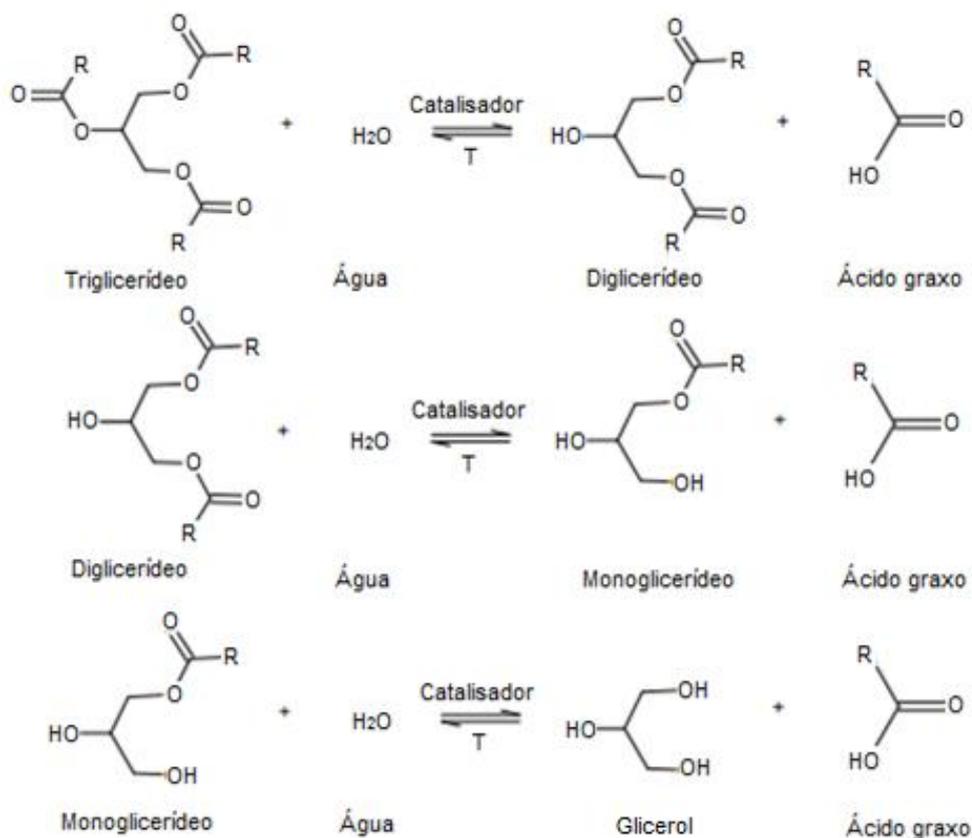
Além disso, neste processo, não há formação de sabão, que pode ocorrer no processo convencional. Por isto, o processo não catalítico supercrítico apresenta vantagens ambientais, pois não há produção de resíduos do tratamento do catalisador e separação do produto final [119]. A reação tem um tempo mais curto do que a transesterificação catalítica tradicional, e a taxa de conversão é muito alta [112, 120]. Para o método supercrítico, o índice de acidez e o teor de água na matéria-prima não tem nenhum efeito negativo sobre a reação, podendo até mesmo dar um impulso para a reação em certas condições [113, 121]. A principal vantagem

óbvia é a capacidade de processamento multi matérias-primas. Como a maior parte do preço final do biodiesel é ditada pelo preço da matéria-prima, a possibilidade de processamento de sebo bovino, gorduras residuais e de muitas outras matérias-primas baratas rejeitadas por algumas indústrias permitiria os processos supercríticos para produzir um biodiesel mais barato [79].

As desvantagens também foram salientadas. Pinnarat & Savage [119] reportam que se fazem necessárias elevadas quantidades de álcool nos experimentos (>40:1) em relação ao óleo, e se usado comercialmente, criaria dificuldades em separar o biodiesel deste excesso de álcool, para sua recuperação e reutilização. Em comparação com o método catalítico, a investigação sobre o método supercrítico ainda são limitadas, e a tecnologia de produção é raramente relatada. Geralmente, o biodiesel é produzido através do processo em batelada, onde as desvantagens são óbvias: o processo é bastante longo, a qualidade dos produtos não é confiável e possui alto custo de produção [120]. Os últimos relatos estão relacionados com as drásticas condições de operação do reator [122] que requer uma elevada quantidade de energia [20, 22, 112] encarecendo seu custo de implantação. Entretanto, apesar deste inconveniente, muitas patentes já foram emitidas na produção de biodiesel supercrítico [123, 124, 125].

### **2.3.3. Hidrolise de Triacilglicerídeos**

Dentre as rotas alternativas de obtenção do biodiesel, a hidroesterificação mostra-se como uma opção promissora, que consiste do processo de hidrólise seguido de uma esterificação. A hidrólise pode ser representada pela Figura 2.4.



**Figura 2.4.** Representação das reações consecutivas e reversíveis da hidrólise dos triacilglicerídeos [126].

Por meio dessa sequência de reações, obtêm-se um produto final considerado mais puro e menos propenso à formação de sabão durante seu processo de produção. A grande vantagem da hidroesterificação em relação à transesterificação é que o ácido graxo livre é reagente da mesma, não sendo, portanto, uma limitação em termos de especificação de matéria-prima. Isto faz com que seja possível a utilização de matérias-primas de alta acidez, tais como o biodiesel de algas, óleos e gorduras residuais e óleos vegetais com acidez acima de 1%, sem a necessidade de um pré-tratamento da matéria prima através de uma reação de neutralização. A rota se torna ainda mais atrativa se conjugada ao uso de catalisadores heterogêneos, eliminando a formação de sabão, diminuindo o número de operações unitárias de separação, tornando possível a reutilização do catalisador e produzindo uma glicerina de alta pureza, livre de sais [127].

A reação de hidrólise acontece na fase orgânica por meio de três etapas consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários, resultando em uma molécula de ácido graxo em cada etapa [84]. O desenvolvimento de estudos com o uso de catalisadores heterogêneos enzimáticos para promoção da reação de hidrólise ainda se encontra em fase inicial, destacando-se os apresentados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Estudos reportados na literatura sobre a hidrólise enzimática de óleos vegetais.

Referência	Temperatura (°C)	Água (%)	Catalisador	Aditivos	Tempo (h)	Agitação (rpm)	AGL (%)
[128]	40	100*	<i>Candida rugosa</i> imobilizada ( <i>Candida rugosa</i> )	Solução tampão C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> e K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	-	88
[129]	50	50*	<i>Candida rugosa</i> imobilizada ( <i>Candida rugosa</i> )	-	6	700	99
[130]	40	80**	Lipase pâncreas Porcina livre	Goma arábica	24	200	24
[131]	38	25*	Lipase pâncreas Porcina livre	Solução tampão NH <sub>4</sub> Cl-NH <sub>4</sub> OH	1	-	~45
[132]	45	67,5*	<i>Candida lipolytica</i> líquida ( <i>Candida lipolytica</i> )	Solução tampão fosfato de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12	150	75
[133]	45	100***	<i>Candida rugosa</i> sólida ( <i>Candida rugosa</i> )	Isooctano 100% e solução tampão fosfato	1,5	200	97
[134]	35	75**	<i>Candida rugosa</i> sólida ( <i>Candida rugosa</i> )	Solução tampão	6	1100	80
[135]	35-40	75**	<i>Aspergillus oryzae</i> líquida ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Solução tampão fosfato de sódio	1	-	36,9
[136]	30	100***	Novozyme® 435 ( <i>Candida rugosa</i> )	-	10	250	100
[137]	30	100***	Novozyme® 435 ( <i>Candida rugosa</i> )	Isooctano e solução tampão	4	250	100
[138]	45	76*	Novozyme® 435 ( <i>Candida rugosa</i> )	-	4	300	~40

\*em relação à massa de óleo; \*\*em relação ao volume dos substratos; \*\*\*em relação ao volume de óleo.

**Tabela 2.1.** Estudos reportados na literatura sobre hidrólise enzimática de óleos vegetais (continua).

Referência	Temperatura (°C)	Água (%)	Catalisador	Aditivos	Tempo (h)	Agitação (rpm)	AGL (%)
[139]	60	100***	Lipozyme® TL 100L líquida ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	-	48	200	89
[140]	30	6,16*	Lipozyme® TL líquida ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> ) e Lipozyme® RM IM ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	-	10	200	95
[141]	50	75***	Celluclast 1.5 L líquida e Novozyme 188 líquida	Solução tampão de ácido cítrico e citrato de sódio	72	-	~90
[142]	35	100*	Lipase pancreática Porcina sólida	Solução tampão hidróxido de sódio	6	900	50
[143]	40	100*	Lipase AY 30 livre ( <i>Candida rugosa</i> )	Solução tampão fosfato	4	200	~68
[144]	31	2,33*	Lipozyme® TL IM ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	-	4	300	73
[145]	35	50*	Lipase 1, Cat EU029c ( <i>Candida rugosa</i> )	Goma guar e solução tampão Tris-HCl	3	-	~90
[146]	35	80**	<i>Candida cylindracea</i> livre ( <i>Candida cylindracea</i> )	Isooctano	1	350	36,3
[147]	37,5	30	Extrato em pó da semente de mamona	Solução tampão fosfato e goma arábica	2	1000	~89

\*em relação à massa de óleo; \*\*em relação ao volume dos substratos; \*\*\*em relação ao volume de óleo.

**Tabela 2.1.** Estudos reportados na literatura sobre hidrólise enzimática de óleos vegetais (final).

Referência	Temperatura (°C)	Água (%)	Catalisador	Aditivos	Tempo (h)	Agitação (rpm)	AGL (%)
[148]	37	90**	<i>Candida cylindracea</i> líquida ( <i>Candida cylindracea</i> )	Solução tampão fosfato	24	200	~40
[149]	55	10*	Lipozyme® RM IM ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	-	8	300	~39
[150]	33	60*	Extrato em pó de sementes dormentes de mamona	Goma arábica	0,5	1000	38
[151]	27	10*	Lipozyme® TL IM ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	Solução tampão fosfato de potássio e Tween 80	50	200	~85
[152]	55	50*	Lipozyme® RM IM ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	Solução tampão fosfato de sódio	6	400	~88
[153]	27	10*	Lipozyme® TL IM ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	Tween 80 e solução tampão fosfato de potássio	100	-	~95
[154]	35	33,3*	Lipase-B IM (CAL-B) ( <i>Candida antarctica</i> )	Isooctano	1	400	~14
[155]	60	30*	Lipozyme® TL líquida ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	-	7	200	~63
[156]	45	100*	Lip Z líquida ( <i>Candida rugosa</i> )	Reação assistida por ultrassom	6	180	94,5
[157]	35	33,3*	Lipase-B IM (CAL-B) ( <i>Candida antarctica</i> )	Isooctano	1	400	97,4

\*em relação à massa de óleo; \*\*em relação ao volume dos substratos; \*\*\*em relação ao volume de óleo.

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior a quantidade de enzima adsorvida, acarretando taxas de hidrólise mais elevadas [128]. Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de gorduras usando enzimas como catalisadores [128, 130, 132, 133, 135, 139, 142, 146, 147, 153].

### **2.3.3.1. Efeito do pH da solução tampão**

Geralmente, as enzimas são ativas em uma faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido na qual sua atividade é máxima. A inter-relação da atividade enzimática com o pH, para qualquer enzima, depende principalmente do comportamento do substrato, da concentração de cofatores da enzima e da natureza química do tampão [156]. A fim de se avaliar a influência do pH no desempenho catalítico da hidrólise do óleo de soja, Ting *et al.* [128] obtiveram rendimentos em AGLs de aproximadamente 88% após 5 horas de reação à 40 °C, sob percentual de 100% de solução tampão (em relação à massa dos substratos) de ácido cítrico (0,1 M) e hidrogenofosfato de potássio (0,1 M) à um pH 8 e teor de lipase de 20% (em relação à massa de óleo). Os autores verificaram que nas faixas que antecedem e procedem este valor de pH, rendimentos em AGLs inferiores foram obtidos, sendo de aproximadamente 20% e 25% à pH 6 e 9, respectivamente.

Efeito semelhante foi verificado por Serri *et al.* [133], que obtiveram um rendimento em AGLs de aproximadamente 97% a pH 7,5 da solução tampão fosfato, enquanto que à pH de 6,5 e 8,5, estes rendimentos em AGLs foram significativamente menores (aproximadamente 75% e 45%, respectivamente). Em contrapartida, reporta-se na literatura o estudo de Oliveira *et al.* [139], os quais propuseram a hidroesterificação do óleo de soja, visando produzir biodiesel. Os autores obtiveram, na etapa de hidrólise, apreciáveis rendimentos (89% em AGLs) após 48 horas de reação à 60 °C em meio aquoso, livre de solvente orgânico, solução tampão e agente emulsificante. Mais recentemente, Penci *et al.* [157],

avaliando o perfil de obtenção enzimático de AGLs em sistema livre de solvente orgânico em óleo de soja e óleo de girassol, constataram ausência de diferença significativa para os rendimentos em AGLs obtidos à pH 7,0 e 8,0. Para o óleo de soja, os autores verificaram produção de 84% de AGLs à 50 °C e pH 7,0, enquanto que para a mesma temperatura, à pH 8,0, 83% de AGLs foram obtidos. Efeito semelhante foi verificado para o óleo de girassol, que sob a mesma temperatura, apresentou rendimento em AGLs de 92% para pH 7,0 e 93%, para pH 8,0.

### **2.3.3.2. Efeito da adição de Solvente orgânico**

O uso de solventes no meio reacional também tem sido descrito como um fator responsável no aumento das taxas de hidrólise dos triacilglicerídeos [133, 135, 146, 152]. Para Sharma *et al.* [146], a presença do solvente orgânico isooctano proporcionou maior produção de AGLs perante a hidrólise do óleo de fígado de bacalhau. Os autores avaliaram em seu estudo diferentes razões mássicas de solvente orgânico:óleo, onde obtiveram aproximadamente 125  $\mu\text{mols/mL}^{-1}$  de AGLs na razão 1:1 com o uso da lipase *Candida cylindracea*, resultado consideravelmente superior às demais razões avaliadas para a mesma lipase. Mesmo efeito foi verificado para a hidrólise do óleo de atum, realizada por Sharma *et al.* [155], onde as razões mássicas de óleo:solvente orgânico variaram no intervalo de 1:1 à 1:5, sendo que aproximadamente 14% de AGLs foram obtidos para a razão 1:1, enquanto que para a razão 1:3 e 1:5, rendimentos em AGLs de 10% e 12% foram alcançados. Dos solventes avaliados pelos autores, isooctano foi o qual apresentou maior percentual de hidrólise, sendo de 13,4%.

### **2.3.3.3. Efeito da adição de Sais e Surfactantes**

Os sais exercem uma influência na atividade enzimática das lipases, podendo aumentar ou reduzir a sua ação lipolítica, conforme reportado na literatura [130, 135, 142, 147]. Avaliando a influência de diferentes sais sobre a atividade hidrolítica da lipase pancreática, Freitas *et al.* [130] verificaram aumento superior à 10% na atividade relativa da hidrólise do óleo de soja na presença de NaCl, quando

comparado ao hidrolisado sem quaisquer aditivo. Efeito oposto foi verificado quando os autores adicionaram ao meio reacional  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , sendo verificada uma atividade relativa de aproximadamente 20%. Efeito similar foi verificado por Goswami *et al.* [142], onde a adição dos sais  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$  aumentou aproximadamente 8, 28 e 47% o percentual de hidrólise, respectivamente, enquanto que o  $\text{CuCl}_2$  reduziu este percentual em 30%.

Aumento no rendimento em AGLs da hidrólise também foi verificado mais recentemente, por Avelar *et al.* [147], por meio da adição de  $\text{CaCl}_2$  ao meio reacional da hidrólise do óleo de canola. No entanto, Rathod & Pandit [135] verificaram efeito oposto em seu trabalho, onde houve diminuição no percentual de hidrólise do óleo de mamona ao serem adicionados os sais  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{NaCl}$  em quantidades gradativas ( $\text{mol/mL}^{-1}$ ). A influência negativa da adição de diferentes agentes tensoativos à hidrólise, visando a produção de ácido erúxico, foi avaliada por Goswami *et al.*, [142]. O percentual de ácido produzido na ausência de surfactantes apresentou significativa diferença quando comparado as reações conduzidas com agentes ao meio reacional.

#### **2.3.3.4. Efeito do percentual de catalisador**

As enzimas são bastante versáteis e possuem um número de propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores. Em geral, toda enzima, especialmente, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem que ocorram reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Além disso, apresenta alta eficiência catalítica, elevando a velocidade das reações. As condições de atuação de enzimas são sempre brandas, ao contrário dos processos químicos em que se tornam necessários temperaturas mais elevadas e valores de pH distantes da neutralidade. Outra vantagem na utilização de enzimas é a regulação da atividade enzimática com relativa facilidade, bastando, para isso, modificar a natureza do meio de reação, como por exemplo, pela alteração do pH ou pela adição de algum efetor. Por esses motivos, o emprego de enzimas em processos industriais os torna relativamente

simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente, além de os produtos formados apresentarem melhor qualidade [157, 158, 159].

Grande parte dos estudos reportados pela literatura apresenta influência significativa nos rendimentos em AGLs obtidos, quando correlacionados ao aumento no percentual de catalisador em meios hidrolíticos. Rooney & Weatherley [160], obtiveram rendimentos em AGLs de 88% durante 100 minutos e 0,4% de catalisador *Candida rugosa* na hidrólise do óleo de girassol, enquanto que para o percentual de 0,1%, este rendimento em AGLs foi de 50%. Mesmo catalisador foi aplicado na hidrólise do óleo de soja por Freitas *et al.* [130] e Serri *et al.* [133] os quais verificaram o aumento de cerca de 7% e 5%, respectivamente, no percentual de hidrólise ao aumentar o percentual de catalisador de 1 à 3%, durante 24 horas de reação [130] e 4 à 11%, durante 90 minutos de reação [133]. Liu *et al.* [132] ao analisarem o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de soja livre de solvente orgânico, não observaram aumento significativo no valor ácido ( $\text{mg/KOH g}^{-1}$ ) aumentando-se a concentração mássica de catalisador *Candida lipolytica* de 0,01 à 0,03% durante 5 horas de reação à 50 °C. Para 1 hora de reação à 45 °C o efeito foi significativo e positivo, variando o valor ácido de 50% à concentração de 0,01% para aproximadamente 57% à concentração de 0.03%.

Utilizando a lipase líquida *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme® TL 100L) e a *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® RM IM), Oliveira *et al.* [139] e Rodrigues & Ayub [140] verificaram aumento significativo no rendimento em AGLs da hidrólise ao aumentarem o percentual de catalisador. Sob temperatura de 55 °C, concentração de óleo no meio reacional de 73% e 0,5% de catalisador TL 100L, Oliveira *et al.* [139] obtiveram uma concentração final de AGLs de 70%, enquanto que para o percentual de catalisador de 9,5%, 81,7% de AGLs foram obtidos, decorridas 19 horas de reação à pH 8,0. Já Rodrigues & Ayub [140], com 15% de catalisador e razão molar de água:óleo 7,1:1, por meio da Lipozyme® RM IM obtiveram 48%, enquanto que para a TL 100L, rendimento em AGLs de 44,6% foi verificado, após 10 horas de reação à 30 °C. Avaliando a concentração da lipase pancreática na hidrólise do óleo de mostarda em pH 9,0, razão mássica de óleo:solução tampão de 1:1, sob 900 rpm e 6 horas de reação, Goswami *et al.* [142] verificaram aumento gradual no percentual de hidrólise conforme houve o aumento no percentual de

catalisador, de 2 à 10 mg/g de óleo. Cerca de 17% de AGLs foram produzidos à 2 mg/g de óleo de mostarda, enquanto que para 10 mg/g de óleo, aproximadamente 37% de AGLs foram obtidos.

### 2.3.3.5. Efeito da proporção dos substratos

Reações de hidrólise catalisadas por enzimas ocorrem na interface entre a fase aquosa e a fase oleosa [161]. Assim, a área interfacial é afetada pela mistura e concentração dos substratos, o que influencia na taxa de reação [132, 134, 139, 140, 142, 160, 161, 162]. Para Noor *et al.* [162], um dos maiores problemas encontrados na hidrólise de óleos é a inibição do substrato, quando a razão da fase oleosa e da fase aquosa é superior a 3-5% (v/v). Com relação as razões dos substratos na hidrólise, Rooney & Weatherley [162] indicam que o equilíbrio no rendimento em AGLs de emulsões de óleo:água nas proporções de 3:1 e 8:1 foram de 90 e 72%, respectivamente. Isto implica em uma inversão proporcional entre as razões dos substratos e a extensão da hidrólise, ou seja, quanto menor a razão óleo:água, maior foi o rendimento em AGLs obtido. Semelhante ao estudo citado, Oliveira *et al.* [139] hidrolisando o óleo de soja com a lipase líquida *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100L), verificaram acentuada diminuição no conteúdo final de AGLs ao aumentar o percentual volumétrico de óleo de 62 à 84%. Os rendimentos obtidos em AGLs remetendo estes percentuais de óleo foram de 80,4 e 66,9%, respectivamente, à 50 °C e 2,3% de lipase. Ao avaliar o efeito das variáveis de processo e aditivos na hidrólise do óleo de mostarda com a lipase pancreática, Goswami *et al.* [142] constataram diminuição de 30% no rendimento em AGLs da hidrólise ao aumentar o conteúdo de solução tampão tris-maleato de 1:1 à 1:5.

No entanto, este efeito pode ser contraditório, dependendo dos substratos e condições operacionais envolvidos. Aumento no valor ácido da hidrólise do óleo de soja foi verificado por Liu *et al.* [132] ao variar a razão água:óleo de 0,1:1 à 1,4:1, tendo como catalisador a *Candida lipolytica* e substratos o óleo de soja e tampão fosfato à pH 7.7. Similarmente, Goswami *et al.* [134] por intermédio da *Candida rugosa* na hidrólise do óleo de mamona, verificou aumento significativo no percentual de hidrólise entre as razões volumétricas de 1:1 à 1:3. Ao avaliar o efeito

da combinação das lípases *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* na hidrólise do óleo de soja, Rodrigues & Ayub [140] obtiveram aumento de 16% no rendimento em AGLs da hidrólise, aumentando a razão molar de 4,8:1 de água:óleo para 10,2:1.

#### 2.3.3.6. Efeito da Temperatura

Os processos comumente empregados para produzir ácidos graxos são o químico e o enzimático. O processo de hidrólise química se caracteriza por ser homogêneo e utiliza catalisadores químicos, temperaturas altas, tempos de residência variáveis e altas pressões. Os produtos assim obtidos são muito variados na sua natureza e pureza. A hidrólise enzimática utiliza baixas temperaturas, meios reacionais específicos e variáveis controladas, e os ácidos graxos sofrem pouca modificação [163]. A temperatura pode afetar a reação de hidrólise de uma forma positiva ou negativa. Romero *et al.* [164] explicam que um aumento na temperatura irá aumentar a velocidade de reação, conforme explicado pela teoria do estado de transição. No entanto, a uma temperatura de reação mais elevada, a estrutura da enzima pode ser afetada, fazendo com que a mesma seja desnaturada.

Avaliando o comportamento da lípase *Candida rugosa* na hidrólise do óleo de palma, Serri *et al.* [133] verificaram comportamento crescente em termos de rendimento em AGLs no intervalo de 35 à 45 °C, sendo obtidos aproximadamente 82% de AGLs e aproximadamente 95%, respectivamente. Liu *et al.* [132], verificaram que o efeito da temperatura, combinado ao uso do ultrassom, aumentou o valor da acidez do produto obtido da hidrólise do óleo de soja pela *Candida lipolytica*. No intervalo de 30-55 °C, durante 5 horas de reação, 5% de acidez foi acrescida ao produto obtido. Mesmo efeito foi verificado por Oliveira *et al.* [139], ao hidrolisarem o óleo de soja com a lípase *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100L) em 50 e 60 °C, onde cerca de 5% de AGLs foram produzidos perante a temperatura mais alta. Utilizando-se da mesma lípase, Xu *et al.* [154] obtiveram um conteúdo de AGLs após 7 horas de hidrólise da estearina de palma à 60 °C de cerca de 65%, enquanto que para 50 °C, este conteúdo foi de aproximadamente 52%. Sharma *et al.* [145] ao hidrolisar o óleo de fígado de bacalhau por meio da lípase *Candida rugosa*, verificou

que o aumento na temperatura, de 25 à 35 °C, apresentou aumento na produção de AGLs, para uma razão mássica de óleo:água 1:4 e adição de solvente isooctano na razão mássica de 1:1 em relação ao óleo. Mais recentemente, Avelar *et al.* [147] utilizando uma lipase advinda do extrato em pó das sementes de mamona, obtiveram a completa hidrólise quando utilizada uma temperatura de 50 °C, enquanto que para 25 °C, este grau foi de 81%.

### 2.3.3.7. Efeito da Agitação

Sabe-se, que o óleo é imiscível na fase aquosa, para tanto, agitação vigorosa faz-se necessária para dispersá-lo sob a forma de uma emulsão. No entanto, um aumento da velocidade de agitação pode ter um efeito negativo sobre a taxa de hidrólise, como também aumenta o cisalhamento sobre a enzima [163]. Vale ressaltar que ao associarem-se variáveis umas as outras, outro efeito pode ser visto, como o caso de Al-Zuhair *et al.* [161], os quais obtiveram a diminuição no diâmetro médio da gota de óleo à medida que a temperatura e a agitação aumentaram, o que proporcionou um maior rendimento em AGLs da hidrólise. Noor *et al.* [162] avaliaram a influência da agitação de 200 à 2000 rpm para a hidrólise do óleo de palma, catalisada pela lipase SP398. Os autores verificaram um aumento gradativo, conforme o aumento da agitação, no rendimento em AGLs da hidrólise ( $\mu$  mol/l/min). Serri *et al.* [133] obtiveram aumento de >10% na hidrólise do óleo de palma entre 180 e 200 rpm, no entanto, de 200 à 260 rpm este rendimento em AGLs caiu cerca de 12%. Avaliando um intervalo de agitação de 500-1100 rpm, Goswami *et al.* [134] verificaram que 12% de AGLs do óleo de mamona foram produzidos por intermédio da *Candida rugosa*. Mesmo efeito foi verificado por Goswami *et al.* [142], por meio da catalise com a lipase pancreática, obteve aumento de 15% na hidrólise do óleo de mostarda em um intervalo de 500 à 900 rpm.

Sharma *et al.* [146] obtiveram formação crescente de AGLs do óleo de fígado de bacalhau, no intervalo de agitação avaliado para as lipases *Candida cylindracea* e *Candida rugosa*. Para a *Candida cylindracea*, aumento significativo no grau de hidrólise foi obtido, sendo de 50  $\mu$  mol/mL à 80 rpm à 120  $\mu$  mol/mL à 400 rpm, enquanto que para a *Candida rugosa*, este aumento foi de iniciais 30  $\mu$  mol/ml à

80 rpm para 90  $\mu$  mol/ml à 350 rpm. Recentemente, Sharma *et al.* [154] avaliaram o efeito das variáveis na hidrólise do óleo de atum na presença de solvente isooctano e catalisada pela *Candida antarctica*, onde verificaram que o aumento da agitação de 200 à 400 rpm aumentou cerca de 6% o rendimento em AGLs da hidrólise, enquanto que agitações superiores a esta, provocaram a diminuição no rendimento em AGLs em aproximadamente 3%.

#### **2.4. Considerações em relação ao Estado da Arte**

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, procurou-se relatar o estado da arte em relação à produção de ácidos graxos livres de óleos vegetais pela reação de hidrólise dos triacilglicerídeos, utilizando catalisadores enzimáticos. Esta reação produz ácido graxo e glicerina, como produtos reacionais, e fundamenta a primeira etapa reacional da hidroesterificação. As principais peculiaridades deste processo, é que o mesmo dispensa qualquer tipo de tratamento da matéria-prima, diminuindo assim a carga de poluidores no efluente, além da glicerina produzida ser mais pura que a obtida a partir da transesterificação, dispensando qualquer tipo de tratamento.

A transesterificação a nível industrial ocorre por catálise alcalina, gerando inevitavelmente sabões e exigindo invariavelmente matérias-primas semi-refinadas, o que tem acarretado custo ao processo. Este problema afeta o rendimento em AGLs dessas plantas, bem como a dificuldade de separação do biodiesel da glicerina. Para resolver tal interferente, a transesterificação faz uso de grandes quantidades de ácidos para quebra de emulsão, o que associado aos custos já mencionados, tem gerado uma despesa operacional elevada.

Os inconvenientes existentes na obtenção do biodiesel produzido pela rota convencional, como a dificuldade de separar o catalisador do glicerol e dos ésteres, a produção de resíduos altamente alcalinos e a necessidade de uma alta qualidade de matérias-primas, são sanados pela obtenção do mesmo pela hidroesterificação. Além disto, este processo tem demonstrado significativa diminuição nos problemas relacionados à separação/purificação dos produtos;

possibilita a reutilização do catalisador no processo e não apresenta restrições em relação ao teor de água e ácidos graxos livre nos substratos.

No entanto, as rotas catalíticas do processo, quando correlacionados à matéria prima, têm apresentado limitações, haja vista a possibilidade de saponificação, no caso da catálise alcalina. Neste sentido o processo é restrito, dificultando a utilização de resíduos ou óleos não processados, que apresentam custos mais acessíveis. No caso de se utilizar resíduos de óleos não processados, faz-se necessária a separação, recuperação e purificação do glicerol e dos catalisadores, o que apresenta-se dispendiosa, contribuindo à elevação do consumo energético e os custos associados ao processo.

Embora a catalise ácida permita a utilização de óleos e gorduras que possuam um alto teor de ácidos graxos livres, esta rota apresenta as conversões de triacilglicerídeos semelhantes aos obtidos na catálise básica, entretanto, demanda quantidades maiores de catalisador. Os tempos de reação são mais longos e o consumo energético maior, visto que a maioria dos processos demanda aquecimento.

Neste contexto, o processo catalisado por enzimas vem se apresentando como uma alternativa atrativa para a indústria, principalmente quando são consideradas algumas das vantagens desta rota como maior rendimento em AGLs do processo, menor consumo de energia, redução do teor de resíduos e introdução de rotas mais acessíveis de produção. Estes catalisadores permitem ainda a utilização de condições mais brandas de reação, maior especificidade e reutilização, gerando assim menos produtos indesejáveis e diminuição dos custos operacionais.

Apesar das vantagens acima citadas, são escassos os estudos na literatura que abordam a produção de ácidos graxos pela reação de hidrólise enzimática. Tais fatos despertaram interesse e motivação para a realização da presente proposta, justificando assim os esforços no estudo a ser desenvolvido.

## 2.5. Referências

- [1] GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. Estudos Avançados, São Paulo, n.59, pp.7, 2007.
- [2] POMPELLI, M. F.; JARMA, O. A. J.; DE OLIVEIRA, M. T.; RODRIGUES, B. R. M.; BARBOSA, M. O.; SANTOS, M. G.; DE OLIVEIRA, A. F. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. Agronomía Colombiana, v.29, n.2, pp.231-240, 2011.
- [3] ONU. 2002. Relatório da ONU alerta: escassez de água já afeta 40% da população mundial. [www.ecopress.org.br](http://www.ecopress.org.br).
- [4] HENDRIKS, C.; GRAUS, W. Global carbon dioxide storage: potencial and cost. Ecofys Utrecht, The Netherlands, 2004.
- [5] SIEGENTHALER, U.; STOCKER, E. T.; MONNIN, D.; LUTHI, J.; SCHWANDER, B.; STAUFFER, D.; RAYNAUD, J. M.; BARNOLA, H.; FISHER, V.; MASSON-DELMOTTE; JOUZEL, J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. Science Direct, v.310, pp.1313-1317, 2005.
- [6] KATWAL, R. P. S.; SONI, P. L. Biofuels: an opportunity for socioeconomic development and cleaner environment. Indian For, v.129, pp.939-949, 2003.
- [7] DOVI, V. G. F. FRIEDLER, D.; HUISINGH, J.; KLEMES, J. Cleaner energy for sustainable future. Journal of Cleaner Production, v.17, pp.889-895, 2009.
- [8] Energy Information Administration's (EIA's), Annual Energy Outlook, 2007.
- [9] LINDFELDF, E. G.; WESTERMARK, M. O. Biofuel production with CCS as a strategy for creating a CO<sub>2</sub>-neutral road transport sector. Energy Procedia, v.1, pp.4111-4118, 2009.
- [10] ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YANEZ, E.; CASTILLO, E. F. 2009. Biofuels: environment, technology and food security. Renewable & Sustainable, v.13, pp.1275-1287, 2009.
- [11] OBERSTEINER, M.; AZAR, C. H.; KAUPPI, P.; MÖLLERSTEM, K.; MOREIRA, J.; NILSON, S.; READ, P.; RIAHI, K.; SCHLAMADINGER, B.; YAMAGATA, Y.; YAN, J.; YPERSELE, J. P. Managing climate risk. Science Direct, v.294, pp.786-787, 2001.

- [12] PETTERSSON, K.; HARVEY, S. CO<sub>2</sub> emission balances for different black liquor gasification biorefinery concepts for production of electricity or second-generation liquid biofuels. *Energy & Fuels*, v.35, pp.1101-1106, 2010.
- [13] NASS, L. L.; PEREIRA, P. A. A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. *Crop Science*, v.47, pp.2228-2237, 2007.
- [14] CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v.25, pp.294-306, 2007.
- [15] GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, v.7, pp.703-726, 2010.
- [16] RADAKOVITS, R.; JINKERSON, R. E.; DARZINS, A.; POSEWITZ, M. C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, v.9, pp.486-501, 2010.
- [17] UNDP, United Nations Development Programme. *Energy and the challenge of sustainability*, 2000.
- [18] DEMIRBAS, A. Studies on cottonseed oil biodiesel prepared in non-catalytic SCF conditions. *Bioresourde Technology*, v.99, pp.1125-1130, 2008a.
- [19] HERRERA, S. Wood-based ethanol advances on international front: Cellulosic fuels from trees gets a closer look. *Ind Biotechnology*, v.2, n.2, pp.101–107, 2006.
- [20] DEMIRBAS, A. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Conversion & Management*, v.43, pp.2349-2356, 2002.
- [21] TAPANES, N. C. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ANTUNES, O. A. C. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. *Energy Fuels*, v.87, pp.2286-2295, 2008.
- [22] DEMIRBAS, A. Current technologies in biodiesel production. In: *Biodiesel*, pp.161–173, 2008b.
- [23] Biodiesel Standard; ASTM D6751, USA, 2002.
- [24] Biodiesel Standard; ASTM PS 121, USA, 1999.
- [25] Biodiesel Standard; EN 14214, European Standard Organization, 2003.

- [26] Biodiesel Standard; DIN V51606, Germany, 1994.
- [27] Biodiesel Standard; Resolução ANP nº7, Diário Oficial da União, Brasil.
- [28] ANP: Agência Nacional de Petróleo. [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acesso em Abril de 2012.
- [29] CASTELLANELLI, M.; SOUZA, S. N. M.; SILVA, S. L.; KAILER, E. K. Desempenho de motor ciclo diesel em bancada dinamométrica utilizando misturas diesel/biodiesel. *Engenharia Agrícola*, v.28, pp.145-153, 2008.
- [30] PORTAL BIODIESEL BRASIL. [www.biodieselbr.com.br](http://www.biodieselbr.com.br). Acesso em Junho de 2012.
- [31] LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*, v.88, pp.1020–1031, 2011.
- [32] MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q. J.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganism. *Renew Energy*, v.34, pp.1–5, 2009.
- [33] LIMA-FILHO, D. O.; PRADO-SOGABE, V.; COSTA-CALARGE, T. C. Mercado de biodiesel: un panorama mundial. *Espacios* v.29, pp.5-27, 2008.
- [34] SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2009. Biodiesel. [www.sebrae.com.br](http://www.sebrae.com.br).
- [35] DEVRIES, S. C.; VAN DE VEN, G. W. J.; VAN ITTERSUM, M. K.; GILLER, K. E. Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops processed by first generation conversion techniques. *Biomass & Bioenergy*, v.34, pp.588-601, 2010.
- [36] ACIKGOZ, E.; SINCIK, M.; KARASU, A.; TONGEL, O.; WIETGREFE, G.; BILGILI, U.; OZ, M.; ALBAYARAK, S.; TURAN, Z. M.; GOKSOY, A. T. Forage soybean production for seed in Mediterranean environments. *Field Crops Research*, v.110, pp.213-218, 2009.
- [37] LI, W.; ZHOU, Z.; MENG, Y.; XU, N.; FOK, M. Modeling boll maturation period, seed growth, protein, and oil content of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in China. *Field Crops Research*, v.112, pp.131-140, 2009.
- [38] ABIOVE, Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. 2007. Capacidade instalada da indústria de óleos vegetais. [www.abiove.com.br/capacidade\\_br.html](http://www.abiove.com.br/capacidade_br.html).

- [39] REDDY, K. R.; KOTI, S.; DAYIDONIS, G. H.; REDDY, V. R. Interactive effects of carbon dioxide and nitrogen nutrition on cotton growth, development, yield, and fiber quality. *Agronomy Journal*, v.96, pp.1148-1157, 2004.
- [40] POMPELLI, M. F.; FERREIRA, D. T. R. G.; CAVALCANTE, P. P. G. S.; SALVADOR, T. L.; HSIE, B. S.; ENDRES, L. Environmental influence on the physico-chemical and physiological properties of *Jatropha curcas* L. seeds. *Australian Journal of Botany*, v.58, pp.421-427, 2010.
- [41] OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy*, v.19, pp.1-15, 2000.
- [42] TIWARI, A.; KUMAR, A.; RAHEMAN, H. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process. *Biomass Bioenergy*, v.31, pp.569-575, 2007.
- [43] UNGARO, M. R. G.; MORAIS, U. L. K.; REGITANO-NETO, A.; GODOY, I. J. Espaçamento e poda na cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). IV Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas. UFLA, Varginha, Brasil, pp.272, 2007.
- [44] ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N.; ANDRADE, A.; PEREIRA, W.; SEVERINO, L. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) como alternativa para o semi-árido nordestino. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, v.8, pp.789-799, 2004.
- [45] ABOU, K. A. A.; ATTA, N. M. M. Response of *Jatropha curcas* L. to water deficit: yield, water use efficiency and oil seed characteristics. *Biomass & Bioenergy*, v.33, pp.1343-1350, 2009.
- [46] POMPELLI, M. F.; BARATA-LUÍS, R. M.; VITORINO, S.; GOLÇALVES, E. R.; ROLIM, E. V.; SANTOS, M. G.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; ENDRES, L. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass Bioenergy*, v.34, pp.1207-1215, 2010.
- [47] ACHTEN, W. M. J.; MAES, W. H.; REUBENS, B.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; VERCHOT, L.; MUYS, B. Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *Biomass & Bioenergy*, v.34, pp.667-676, 2010.
- [48] NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N.; SILVA, M. B. R.; FERNANDES, P. D.; CHAVES, L. H. G.; DANTAS-NETO, J.; GHEYI, H. R. Crescimento do pinhão-

- manso irrigado com águas salinas em ambiente protegido. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.13, pp.551-558, 2009.
- [49] HSIE, B. S.; CAMPOS, M. L. O.; GRANJA, J. A. A.; CORREIA, R. M.; SILVA, S. R. S.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; POMPELLI, M. F. Photosynthetic changes, osmoregulation and protective mechanisms in saltstressed *Jatropha curcas* plants. Journal of Agronomy and Crop Science, aprovado para publicação.
- [50] MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). Scientia Agricola, v.67, pp.375-495, 2010.
- [51] COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syogrus oleracea*), jerivá (*Syogrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. Food Research International, v.44, pp.2138-2142, 2011.
- [52] AVERDUNK, K.; ZELT, T.; GOLKA, P.; HÖPFNER, M.; MÜLLER, C.; BETTERMANN, I. Macauba – Sustainable Palm Oil Results of the Feasibility Study of the Leuphana University of Lüneburg. Executive Summary. Leuphana Incubator, 2013.
- [53] CARGNIN, A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FOGAÇA, C. M.; COSTA, C. J.; AGUIAR, J. L. P. Potencial da Macaubeira como Fonte de Matéria-prima para Produção de Biodiesel. Documentos 217, Embrapa Cerrados, Planaltina, Brasil. 2008.
- [54] BHERING, L. L.; VILELA, M. F.; AQUINO, F. G.; LAVIOLA, B. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CARGNIN, A. Mapeamento de Maciços Naturais de Ocorrência de Macaúba (*Acrocomia Aculeata*) Visando a Exploração Sustentável. Embrapa Agroenergia, Brasília and Embrapa Cerrados, Planaltina, Brasil, 2010.
- [55] FERRARI, R. A.; FILHO, J. A. Macauba as Promising Substrate for Crude Oil and Biodiesel Production. Journal of Agricultural Science and Technology B, v.2, p.1119-1126, 2012.
- [56] NAVARO-DIAZ, H. J.; GONZALEZ, S. L.; IRIGARAY, B.; VIEITEZ, I.; JACHMANIÁN, I.; HENSE, H.; OLIVEIRA, J. V. Macauba oil as na alternative feedstock for biodiesel: Characterization and ester conversion by the supercritical method. The Journal of Supercritical Fluids, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.008>

- [57] MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; GOMES, J. B. V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relações com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, pp.1023-1031, 2002.
- [58] SILVA, C. C. R.; ANDRADE, M. H. C. Development and simulation of a new oil extraction process from fruit of macaúba palm tree. *Journal Food Process Engineering*, v.36, pp.134-145, 2013.
- [59] RODRIGUES, S. H. Production of ethyl and methyl esters by transesterification reaction of the Latin American palm macaúba – *Acrocomia aculeata* (in Portuguese, Abstract in English). D. Sc. Dissertation, University of São Paulo, Brazil. 2007.
- [60] FARIAS, T. M. Biometry and processing of fruits from macaúba (*Acrocomia* sp.) to oil production (in Portuguese. Abstract in English). M. Sc. Dissertation, Federal University of Minas Gerais, Brazil. 2010.
- [61] AOQUI, M. Characterization of polp oil from macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loff. Ex Mart.) and olive oil (*Olea europaea* L.) extra virgin and their effects over dyslipidemia e others blood parameters liver tissue and mutagenesis in wistar rats (in Portuguese, Abstract in English). Dom Bosco Catholic University, Campo Grande, Brazil, 2012. M. Sc. Thesis.
- [62] AGROTECH, Comércio de sementes e mudas de Macaúba. [www.agrotech.com.br](http://www.agrotech.com.br). Acesso em Novembro de 2012.
- [63] CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v.44, pp.1429-1436, 2001.
- [64] FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v.28, n.1, pp.19, 2005.
- [65] NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, v.17, pp.28-31, 2001.
- [66] ENCINAR J. M.; GONZALEZ J. F.; RODRIGUEZ J. J.; TEJEDOR A. Biodiesel Fuel from vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol, *Energy and Fuels*, v.16, n.2, pp.443-450, 2002.

- [67] NOUREDDINI, H.; MEDIKONDURU, V. Glycerolysis of Fats and Methyl Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.74, n.4, pp.419-425, 1997.
- [68] DORADO, M. P.; ARNAL, J. M.; GOMEZ, J.; GIL, A.; LOPEZ, F. J. The effect of waste vegetable oil blend with diesel fuel on engine performance. *Trans. ASAE*, v.45, pp.525-529, 2002.
- [69] KUSDIANA, D.; SAKA, S. Methyl esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v.34, pp.383-387, 2001.
- [70] SILVA, Camila. Produção contínua de Biodiesel por Transesterificação não catalítica de óleo de soja. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil, 2009.
- [71] GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de Soja – Reação de Transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, v.30, n.5, pp.1369-1373, 2007.
- [72] MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology*, v.70, pp.1-15, 1999.
- [73] MEHER, L. C.; SAGAR, D. V., NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review, *Renewable and Sustainable Energy*, v.10, n.3, pp.248–268, 2006.
- [74] PATIL, P. D.; DENG, S. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. *Fuel*, v.88, pp.1302-1306, 2009.
- [75] LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H.; A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v.87, pp.1083 – 1095, 2010.
- [76] HELWANI, Z.; OTHMAN, M. R.; AZIZ, N.; KIM, J.; FERNANDO, W. J. N. Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: a review. *Applied Catalysis A: General*, v.363, pp.1–10, 2009a.
- [77] ZABETI, M.; WAN, M.; WAN, D. Activity of solid catalysts for biodiesel production: a review. *Fuel Process Technology*, v.90, pp.770–777, 2009.
- [78] SHERMA, Y. C.; SINGH, B. UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel Processing Technology*, v.87, pp.2355–2373, 2008.

- [79] ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, v.63, pp.138-148, 2012.
- [80] KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K. Waste cooking oil-an economical source for biodiesel: a review. *Industrial & Engineering*, v.45, pp.2901–2913, 2006.
- [81] HSU, A.; JONES, K. C.; MARMER, W. N. Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in pylosilicate sol–gel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.78, n.6, pp.585–588, 2008.
- [82] PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. de P.; DE ANDRADE, J. B.; Biodiesel: an overview. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.16, pp.1313, 2005.
- [83] RAMADHAS, A. S.; JAYARAJ, S.; MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel*, v.84, pp.335-340, 2005.
- [84] SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES E MELQUIZEDEQUE, J. P.; ALVES, B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, v.32, n.3, pp.768-775, 2009.
- [85] DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. I.; RAMPI, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, v.32, n.3, pp.776-792, 2009.
- [86] QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral Com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova*, v.32, n.3, pp.793-808, 2009.
- [87] MOHAMAD, I. A. W.; ALI, O. A. Evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology*, n.85, pp.250-256, 2002.
- [88] CERVERÓ, P. J. M.; COCA, J.; LUQUE, S. Production of biodiesel from vegetable oils. *Grasas y Aceites*, v.59, n.1, pp.76–83, 2008.

- [89] ENWEREMADU, C. C.; MBARAWA, M. M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil – a review. *Renewable & Sustainable*, v.13, pp.2205–2224, 2009.
- [90] PUNA, J. F.; GOMES, J. F.; CORREIA, J. N.; DIAS, A. P. S.; BORDADO, J. C. Advances on the development of novel heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides in biodiesel. *Fuel*, v.89, pp.3602-3606, 2010.
- [91] WANG, L.; YANG, S. T. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications*, Chapter 18: Solid State Fermentation and Its Applications. Editora: Elsevier, pp. 465-489. 2007.
- [92] SINGH, A. K.; FERNANDO, S. D. Reaction kinetics of soybean oil transesterification using heterogeneous metal oxide catalysts. *Chemical engineering*, v.30, n.12, pp.1–6, 2007.
- [93] KISS, F. E.; JOVANOVIĆ, M.; BOSKOVIĆ, G. C. Economic and ecological aspects of biodiesel production over homogeneous and heterogeneous catalysts. *Fuel Process Technology*, v.91, pp.1316–1320, 2010.
- [94] KISS, A. A.; OMOTA, F.; DIMIAN, A.; ROTHENBERG, G. The heterogeneous advantage: biodiesel by catalytic reactive distillation. *Topics in Catalysis*, v.40, n.1-4, pp.141-150, 2006.
- [95] CORDEIRO, C. S.; DA SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores Heterogêneos para Produção de Monoésteres Graxos (Biodiesel). *Química Nova*, v.34, n.3, pp.477-486, 2011.
- [96] BRAY, R. G. Process Economics Program Report 251. Biodiesel Production, SRI Consulting, pp.7-14, 2004.
- [97] AL-ZUHAIR, Sulaiman. Production of Biodiesel: Possibilities and Challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v.1, pp.57-66, 2007.
- [98] AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*, v.42, pp.951-960, 2007.
- [99] RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 2007; .doi:10.1016/j.biortech.2007.04.060.

- [100]HERNANDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresource Technology*, v.99, pp.277-286, 2008.
- [101]JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.28, pp.253–264, 2008.
- [102]KINAST, J. A.; TYSON, K. S. Production of biodiesel from multiple feedstocks and properties of biodiesel and biodiesel/diesel blends. Final report', NRL, Golden, CO, pp.57, 2003.
- [103]HAAS, M. J.; McALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource Technology*, v.97, n.4, pp.671-678, 2006.
- [104]DABDOUB, M. J.; DABDOUB, V. M. B.; HURTADO, G. R.; BATISTA, A. C. F.; BORTOLETO, D. Processo de Preparação de Biodiesel e Biodiesel assim obtido. PI0502795-0. 2005.
- [105]YADAY, G. D.; JADHAY, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. *Microporus and Mesoporous Materials*, n.86, v.1-3, pp.215-222, 2005.
- [106]SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y.: Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.17, pp.133-142, 2002.
- [107]WU, W. H.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N.; PHILLIPS, J. G. Optimizing products of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists'Society*, v.76, pp.517–521, 1999.
- [108]FUKUDA, H.; KOND, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal Of Bioscience And Bioengineefxng*, v.92, n.5, pp.405-416, 2001.
- [109]RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of the American Oil Chemists'Society*, v.85, pp.925-930, 2008.

- [110] TALUKDER, R.; MAHABUBUR, M.; PUAH, S. M.; WU, J. C.; WON, C. J.; CHOW, Y. Lipase-catalysed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel. *Biocatalysis and Biotransformation*, v.24, pp.257-262, 2006.
- [111] TAN, T.; LU, J.; KAILI, N.; LI, D.; FANG, W. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology Advances*, v.28, pp.628–634, 2010.
- [112] KUSDIANA, D., SAKA, S. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel*, v.80, pp.225-231, 2001.
- [113] KUSDIANA, D.; SAKA, S.; Two-Step Preparation for Catalyst-Free Biodiesel Fuel Production – Hydrolysis and Methyl Esterification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp.781 – 792, 2004.
- [114] VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel production technology: August 2002–January 2004. Other information: PBD: 2004; related information: work performed by Iowa State University, Renewable Products Development Laboratory, and USDA/NCAUR, pp.110, 2004.
- [115] HAN, H. W.; CAO, W. L.; ZHANG, J. C. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO<sub>2</sub> as co-solvent. *Process Biochemistry*, v.40, pp.3148–3151, 2005.
- [116] SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.4, pp.111-133, 2000.
- [117] WARABI, Y.; KUSDIANA, D.; SAKA, S. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. *Bioresource Technology*, v.91, pp.283–287, 2004.
- [118] BUSTO, M.; D’LPPOLITO, S.; YORI, J.; ITURA, M.; PIECK, C.; GRAU, J.; VERA, C. Influence of the axial dispersion on the performance of tubular reactors during the noncatalytic supercritical transesterification of triglycerides. *Energy Fuels*, v.20, pp.2642–2627, 2006.
- [119] PINNARAT, T.; SAVAGE, P.E. Noncatalytic esterification of oleic acid in ethanol. *Journal of Supercritical Fluids*, v.53, pp.53–59, 2010.
- [120] HE, H.; TAO, W.; ZHU, S. Continuous production of biodiesel from vegetable oil using supercritical methanol process. *Fuel*, v.86, pp.442-447, 2007.

- [121] KUSDIANA, D.; SAKA, S. Methyl esterification of free fatty acids from rapeseed oil as treated in supercritical methanol. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v.34, pp.383-387, 2001.
- [122] MANUALE, D. L.; MAZZIERI, V. M.; TORRES, G.; VERA, C. R.; YORI, J. C. Non-catalytic biodiesel process with adsorption-based refining. *Fuel*, v.90, pp.1188–1196, 2011.
- [123] STERN, R.; HILLION, G.; ROUXEL, J. Improved process for the production of esters from fatty substances having a natural origin. Institut, Français Du Pétrole (Rueil-Malmaison, FR). United States Patent US 5424466; 1995.
- [124] SASAKI, T.; SUZUKI, T.; OKADA, F. Method for preparing fatty acid esters and fuel comprising fatty acid esters. Sumitomo Chemical Company, Limited (Osaka, JP). United States Patent US 6187939; 2001.
- [125] GOTO, F.; SASAKI, T.; TAKAGI, K. Method and apparatus for preparing fatty acid esters. Sumitomo Chemical Company, Limited (Osaka, JP). United States Patent US 6812359; 2004.
- [126] FELTES, Maria Manuela Camino. Produção de Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática do óleo de peixe. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis. Brasil, 2011.
- [127] ARANDA, D. A. G.; GONÇALVES, J. A.; PERES, J. S.; RAMOS, A. L. D.; MELO - JUNIOR, C. A. R.; ANTUNES, O. A. C.; FURTADO, N. C.; TAFT, C. A. The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v.22, pp.709-716, 2009.
- [128] TING, W. J.; TUNG, K. Y.; GIRIDHAR, R.; WU, W. T. Application of binary *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.42, n.1-2, pp.32-38, 2006.
- [129] YOU, L. L.; BAHARIN, B. S. Effects of enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Food Lipids*, v.13, n.1, pp.73-87, 2006.

- [130]FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23, pp.1725–1731, 2007.
- [131]PADILHA, M. E. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*, v. 27, n.2, pp. 285-290, 2007.
- [132]LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.15, pp.402–407, 2008.
- [133]SERRI, N. A.; KAMARUDIN, A. H.; ABDUL RAHAMAN, S. N. Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil Using *C. rugosa* Lipase. *Journal of Physical Science*, v.19, n.1, pp.79–88, 2008.
- [134]GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Optimization of Process Variables in Castor Oil Hydrolysis by *Candida Rugosa* Lipase with Buffer as Dispersion Medium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.14, pp.220-224, 2009.
- [135]RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. *Biochemical Engineering Journal*, v.47, pp.93–99, 2009.
- [136]TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy Fuels*, v.24, pp.2016–2019, 2010.
- [137]TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, v.49, pp.207–212, 2010.
- [138]KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acid in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, v.129, pp.1552-1558, 2011.
- [139]OLIVEIRA, E. C.; SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. *Enzyme Research*, v.2011, pp.1-8, 2011.
- [140]RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the

- transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v.46, pp.682–688, 2011.
- [141] CHO, H. S.; OH, Y. K.; PARK, S. C.; LEE, J. W.; PARK, J. Y. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, v. 54, pp.156-160, 2013.
- [142] GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Optimal hydrolysis of mustard oil to erucic acid: A biocatalytic approach. *Chemical Engineering Journal*, v.181–182, pp.542– 548, 2012.
- [143] KLEINER, L.; VAZQUEZ, L.; AKUH, C. C.; Lipase-Catalyzed concentration of stearidonic acid in modified soybean oil by partial hydrolysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 89, pp.1999-2010, 2012.
- [144] RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; BARRETO, D. W. Production of concentrated natural beta-carotene from buriti (*Mauritia vinifera*) oil by enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, v.90, pp.141-147, 2012.
- [145] RUPANI, B.; KODAM, K.; GADRE, R.; NAJAFPOUR, G. D. Lipase-mediated hydrolysis of flax seed oil for selective enrichment of  $\alpha$ -linolenic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.114, pp.1246-1253, 2012.
- [146] SHARMAA, C.; SATYENDRA, P.; CHAURASIAB, A. DALAI, K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today*, v.207, pp. 93-199, 2012.
- [147] RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v.46, pp.682–688, 2011.
- [148] ABDELMOEZ, W.; MOSTAFA, N. A.; MUSTAFA, A. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*, v.59, pp. 290-297, 2013.
- [149] AWADALLAK, J. A.; VOLL, F.; RIBAS, M. C.; SILVA, C.; CARDOZO FILHO, L.; SILVA, E. A. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.20, pp.1002-1007, 2013.

- [150] GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Optimization of Process Variables in Castor Oil Hydrolysis by *Candida Rugosa* Lipase with Buffer as Dispersion Medium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.14, pp.220-224, 2009.
- [151] GOMES, N.; BRAGA, A.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Impact of Lipase-Mediated Hydrolysis of Castor Oil on  $\gamma$ -Decalactone Production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.90, n.8, pp.1131-1137, 2013.
- [152] XU, Y.; GUO, S.; WANG, W.; WANG, Y.; YANG, B. Enzymatic hydrolysis of palm steatin to produce diacylglycerol with a highly thermostable lipase. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.115, pp.564-570, 2013.
- [153] JADHAV, S. H.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted enzymatic conversion of non edible oil to methyl esters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.12.018.
- [154] SHARMA, A.; SATYENDRA, P.; CHAURASIA; DALAI, A. K. Non-selective hydrolysis of tuna fish oil for producing free fatty acids containing docosahexaenoic acid. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.92, pp.344-356, 2014.
- [155] PEREIRA, E. B.; FURIGO, A. Jr. *Cinética enzimática*. Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.
- [156] PENCI, M. C.; CONSTENIA, D. T.; CARELLI, A. A. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. *Food Chemistry*, v.120, pp.332-338, 2010.
- [157] PIZARRO, L.; PARK EY, AV. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, v.38, pp.1077-1082, 2003.
- [158] CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, n.1, pp.146-156, 2004.
- [159] HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, pp.235-251, 2006.
- [160] ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon the lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochemistry*, v.36, n.10, pp.947-954, 2001.

- [161]AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, M. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, v.38, n.8, pp.1155–1163, 2003.
- [162]NOOR, I. M.; HASAN, K. B.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, v.39, pp.13-20, 2003.
- [163] TORALLES, R. P.; AUGUSTO-RUIZ, W. Produção e utilização de ácidos graxos. *Óleos e Grão*, pp.20-32, 2001.

## CAPITULO 3. ARTIGO 1

### Efeito de aditivos e das variáveis de processo na hidrólise enzimática do óleo da amêndoa da macaúba (*Acrocomia aculeata*)

Djéssica Tatiane Raspe<sup>a</sup>, Lúcio Cardozo Filho<sup>b</sup> e Camila da Silva<sup>a,c</sup>

International Journal of Chemical Engineering, v.2013, p.1-8, 2013.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Universidade Estadual de Maringá, (UEM). Av. Colombo 5790, Maringá, PR, 87020-900, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, (UEM). Av. Colombo 5790, Maringá, PR, 87020-900, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, (UEM), Umuarama, PR, 87506-370, Brasil.

#### Resumo

Este trabalho investiga a produção de ácidos graxos livres (AGLs) a partir da hidrólise enzimática de óleo da amêndoa da macaúba. Os experimentos foram realizados em modo batelada, visando avaliar o efeito de diferentes catalisadores enzimáticos e a adição de sais, agentes tenso-ativos e solventes e ao meio reacional, bem como o efeito de variáveis do processo (temperatura, razão mássica de óleo:água, pH da solução tampão, percentual de catalisador e agitação) durante 6 horas de reação. Os resultados mostraram que os rendimentos em AGLs obtidos para uso de Lipozyme® RM IM foram maiores do que aqueles obtidos a partir de Lipozyme® TL IM e Lipozyme® 435. A adição de sais e surfactantes não promoveu aumento no rendimento em AGLs, enquanto a adição de *n*-hexano e *n*-heptano ao meio reacional levou a um aumento da taxa de reação. Pode-se observar pelos resultados que a temperatura, a razão mássica óleo:água e o percentual de catalisador tiveram efeitos positivos sobre o rendimento em AGLs no intervalo de 35

°C a 55 °C; 1:20 a 1:2; e de 1 a 15%, respectivamente, e que a partir destes limites, os aumentos destas variáveis não acarretou qualquer aumento significativo na produtividade em AGLs. A adição da solução tampão promoveu um aumento no rendimento em AGLs , bem como o pH do tampão, sendo relatado por fim, que uma agitação de 400 rpm resultou em rendimentos mais elevados na gama investigada (400 a 2000 rpm )

Palavras-Chave: Hidrólise; Ácido graxo livre; Óleo da amêndoa da macaúba.

### 3.1. Introdução

Atualmente, a conversão de óleos e gorduras em produtos com alto valor agregado, tais como ácidos graxos livres (AGLs) e seus derivados, tem sido de grande interesse comercial, uma vez que estes compostos atuam como componentes essenciais na indústria oleoquímica [1]. Um número significativo de produtos requerem ácidos graxos para a fabricação no setor industrial, estimulando a investigação sobre a resolução de misturas racêmicas [2], a síntese de emulsificantes [3, 4], na transformação de lipídios, a fim de se produzir lipídios estruturados com elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados [5, 6], e na obtenção de bioaromas [7]. Recentemente, os AGLs têm sido utilizados para a produção de biodiesel [8].

Diferentes oleaginosas tem sido foco de interesse nos setores agrônomo e industrial. Conflitos industriais entre fontes alimentícias e não alimentícias surgem por conta do número limitado de opções entre culturas, que são principalmente oleaginosas com fins comestíveis. Uma solução seria a introdução de novas espécies de plantas oleaginosas que têm como alvo setores estratégicos [9]. A *Acrocomia aculeata* é considerada uma das espécies de palmeiras mais evidentes no Brasil [10, 11]. Esta espécie tem frutos oleaginosos em cachos que podem pesar aproximadamente 25 kg em condições naturais, sendo recentemente considerada como uma matéria-prima potencial para a produção de biodiesel [12], podendo produzir 10 vezes mais óleo por hectare (ha) quando comparada à soja [13]; projetando-se que sob os cuidados agrônômicos adequados, uma planta

comercial pode render de 16000-25000 kg ha<sup>-1</sup> de frutos e produção de até 6200 kg ha<sup>-1</sup> de óleo [12].

A reação de hidrólise de triacilglicerídeos acontece na fase orgânica por meio de três etapas consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como produtos intermediários, resultando em uma molécula de ácido graxo em cada etapa e o glicerol como subproduto. Os processos comumente empregados para produção de ácidos graxos são o químico e o enzimático. O processo químico se caracteriza por envolver temperaturas e pressões altas e tempos de residência variáveis [14]. Os produtos assim obtidos são muito variados na sua natureza e pureza, adquirindo coloração e odores indesejáveis no produto, e em alguns casos pode ocorrer a desnaturação dos produtos [15]. A hidrólise enzimática, no entanto, utiliza pressões normais, requer baixo consumo de energia e propicia a obtenção de elevado grau de pureza do produto [16].

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando no aumento da taxa de reação [17, 18]. Estudos prévios reportam o aumento da taxa de reação com a adição de aditivos no meio reacional, tais como agentes tensoativos [16, 19, 20, 21] e sais [6, 16, 20, 22, 23, 24], além do aumento da atividade enzimática na presença de solventes orgânicos [25, 26, 27, 28, 29]. Outro foco de interesse refere-se ao efeito das variáveis de processo no rendimento em AGLs da reação de hidrólise, onde reporta-se a avaliação do efeito da temperatura, percentual de água, agitação, percentual de catalisador e adição de buffer em diferentes pHs [12, 27, 29, 30, 31, 32, 33].

Neste sentido, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar a hidrólise enzimática do óleo de macaúba para obtenção de um hidrolisado rico em ácidos graxos livres. Para isto, foram avaliados os efeitos de diferentes catalisadores enzimáticos (Lipozyme® RM IM, Lipozyme® TL IM e Lipozyme® 435); adição de aditivos ao meio reacional (sais e agentes tensoativos); adição de solventes; avaliação da temperatura na faixa de 35 a 55 °C; da proporção mássica de óleo:água de 1:1-1:20; percentual de catalisador, que variou de 5 a 20% (em relação

à massa dos substratos); o pH da solução tampão 5,7-8,0 e a agitação de 400 a 2000 rpm.

## **3.2. Materiais e Métodos**

### *3.2.1. Materiais*

Nas reações de hidrólise foram utilizados óleo da amêndoa de Macaúba (Cocal Brasil), solução tampão fosfato de sódio (Neon) preparada conforme Gomori [34] e como catalisadores as enzimas comerciais imobilizadas Lipozyme® RM IM, Lipozyme® TL IM and Lipozyme® 435 (Novozymes®). A composição química do óleo da amêndoa da macaúba usado neste trabalho encontra-se reportada na Tabela 3.1, determinada pelo método Ce 2-66, da AOCS (1990). O conteúdo de AGLs (mg AGLs/100 mg) e conteúdo de água (% mássico, método de titulação Karl Fischer, DL 50, Mettler-Toledo) foi determinado em aproximadamente  $23,0 \pm 0,4$  e  $0,7 \pm 0,05$ , respectivamente. Foram utilizados os sais cloreto de cobre (Vetec), cloreto de cálcio (Nuclear), cloreto de potássio (Nuclear), cloreto de amônio (Vetec), cloreto de sódio (Synth), cloreto de magnésio (Synth) e como solventes *n*-hexano (Nuclear), *n*-heptano (Nuclear), isopropanol (Fmaia), *t*-butanol (Sigma-Aldrich) e os surfactantes Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) e Tween 80 (Oxiten). Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de éter etílico:álcool etílico 2:1 (v:v) (Vetec/Nuclear), hidróxido de sódio 0,1N (Nuclear) e o indicador fenolftaleína (Nuclear).

### *3.2.2. Aparato experimental e procedimento*

As reações foram conduzidas em um reator encamisado de vidro de 40 mL, conectado a um banho termostatizado com controle da temperatura (Marconi) e uma chapa de agitação magnética (Marconi, MA 085). A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40 °C/1 h para ativação. Convencionalmente, cerca de 16 g de substrato (óleo vegetal e água ou tampão) foram adicionados ao reator, enquanto que as quantidades de enzima e de solventes ou aditivos foram adicionados de acordo com

valores pré-estabelecidos. No final da reação, a lipase imobilizada foi removida por filtração à vácuo, e os produtos foram recuperados para posterior análise. As amostras sem a enzima foram transferidas para frascos de amostragem e colocados em rota evaporador à vácuo para a evaporação do excesso de solvente. Por fim, as amostras foram refrigeradas para posterior análise dos produtos de interesse.

**Tabela 3.1.** Composição química do óleo da amêndoa da Macaúba.

Ácido graxo	Percentual (%)
Láurico (C12:0)	0,02 ± 0,00
Mirístico (C14:0)	0,12 ± 0,01
Palmítico (C16:0)	11,07 ± 0,22
Palmitoleico (C16:1n-7)	1,50 ± 0,03
Esteárico (C18:0)	3,46 ± 0,03
Oleico (C18:1n-9)	19,74 ± 0,07
<i>cis-vacênico (C18:1n-7)</i>	0,75 ± 0,00
Linoleico (C18:2n-6)	62,33 ± 0,15
Linolenico (C18:3n-3)	0,33 ± 0,01
Araquídico (C20:0)	0,35 ± 0,00
Eicosadienoico (C20:2n-6)	0,27 ± 0,00

### 3.2.3. Método analítico

O percentual de ácidos graxos livres foi determinado com base no método Ca 5a-40 [35], que se baseia no método de titulação ácido-base, utilizando uma solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH) previamente padronizada (0,1 mol L<sup>-1</sup>) como titulante, conforme apresentada na equação 1. Cada amostra foi titulada em duplicata e o rendimento em AGLs das reações de hidrólise foi calculada a partir da equação 2.

$$\text{Teor de AGLs (\%)} = \frac{M \times PM \times V}{m \times 100} \quad (1)$$

onde: *M* corresponde à molaridade da solução titulante (mol L<sup>-1</sup>), *PM* corresponde ao massa molar do AGL predominante na amostra (280 g/mol), *v* corresponde ao

volume gasto na titulação (mL) e  $m$  corresponde à massa da amostra utilizada para a análise (g).

$$\text{Rendimento em AGLs (\%)} = \frac{AGL_t}{TAG_0} \times 100 \quad (2)$$

onde  $AGL_t$  corresponde ao teor de AGLs produzido após a reação de hidrólise e  $TAG_0$  corresponde ao teor de triacilglicerídeos presente no óleo da amêndoa da macaúba.

Os resultados serão apresentados em termos de rendimento em AGLs e teor de AGLs. Os dados foram submetidos à análise de variância, analisados pela ANOVA, teste de Tukey e Dunnett ( $p > 0,05$ ) para avaliar as diferenças das médias dos tratamentos e a diferença entre o percentual de aditivos em comparação com a amostra padrão (sem aditivos).

### **3.3. Resultados e Discussão**

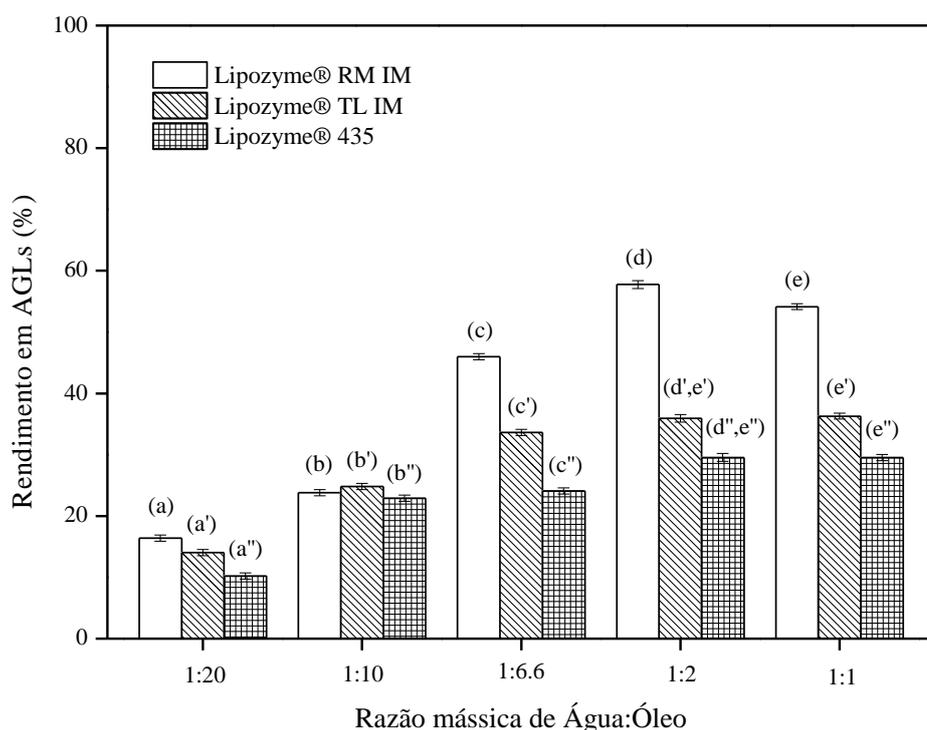
#### *3.3.1. Efeito de diferentes catalisadores enzimáticos e razão mássica óleo:água*

O efeito das enzimas Lipozyme® RM IM, Lipozyme® TL IM, e Lipozyme® 435 sobre a hidrólise de óleo da amêndoa da macaúba foi avaliada, mantendo-se a temperatura fixa em 55 °C, agitação a 400 rpm, percentual de catalisador (em relação aos substratos) a 5%, e razão mássica de água:óleo de 1:1-1:20 (Figura 3.1). Como pode ser visto na Figura 3.1, os rendimentos em AGLs mais elevados foram obtidos com o uso da enzima Lipozyme® RM IM para todas as quantidades de água avaliadas. Pode ser visto a partir da Figura 3.1 que os rendimentos em AGLs no intervalo de 58% em massa foram obtidos com Lipozyme® RM IM, enquanto que para Lipozyme® TL IM e Lipozyme® 435, rendimentos em AGLs máximos de 29% e 36% em massa foram obtidos, respectivamente.

Em relação à quantidade de água no meio reacional, a Figura 3.1 mostra que o aumento na produção de AGLs ocorreu com o aumento da quantidade de água no meio reacional, na gama avaliada, de 1:2 a 1:20. No entanto, cabe notar que quando um excesso de água foi aplicado ao meio (razão mássica água:óleo 1:1), não houve

nenhum efeito significativo sobre o rendimento em AGLs ( $p>0,05$ ), principalmente com a Lipozyme® TL IM e Lipozyme® 435, sendo que, no caso de Lipozyme® RM IM e Lipozyme® 435, rendimentos em AGLs inferiores que a razão mássica 1:2 foram adquiridos.

O teor de água nos sistemas orgânicos é geralmente muito limitado, no entanto, sua presença em quaisquer quantidades não pode ser negligenciada. A água desempenha um papel importante no controle do desempenho da enzima em meios reacionais, e uma pequena quantidade se faz necessária para a ativação da ação catalítica. No entanto, a quantidade de água necessária varia de caso para caso, visto que uma quantidade ótima de água necessária depende de vários parâmetros, incluindo o tipo de solvente do meio, a polaridade do sítio ativo da enzima, o substrato, o suporte sólido, e das condições de reação [36].

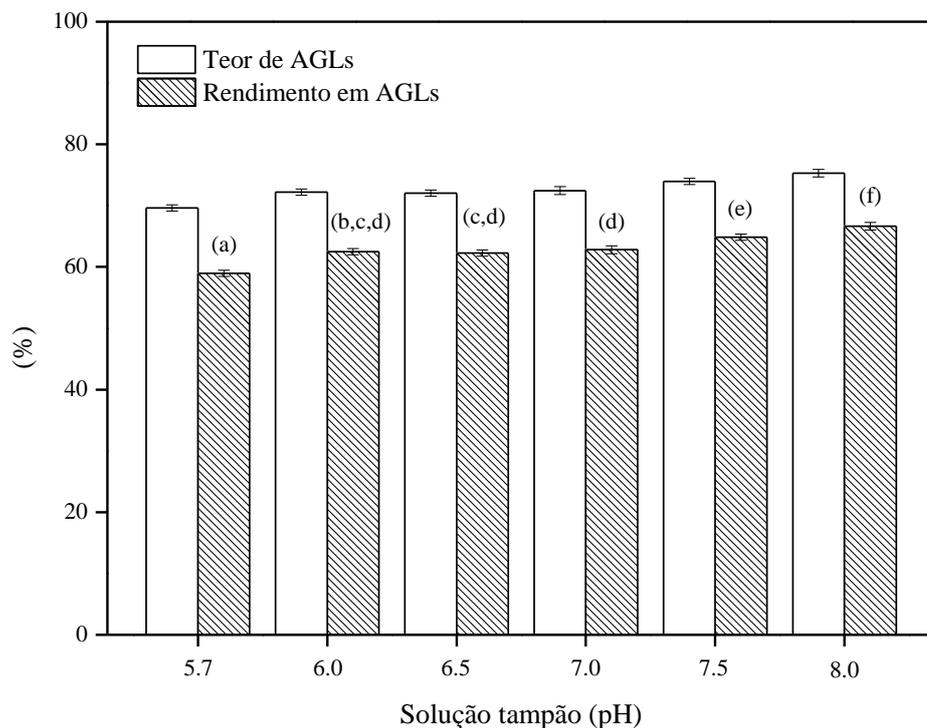


**Figura 3.1.** Efeito de diferentes catalisadores enzimáticos e da razão mássica água:óleo na hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, à 55 °C, 400 rpm, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de mesmas letras (para uma mesma enzima) em cada coluna são as quais não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Cavalcanti-Oliveira *et al.* [33], examinando a hidrólise do óleo de soja, utilizando a lipase *Thermomyces lanuginosus* (líquida), reportam que o aumento do conteúdo de água no meio reacional leva a um aumento no rendimento em AGLs, de 14% na razão mássica de água:óleo 1:6,6, à 80%, sob razão mássica de água:óleo 1:2,5, a 60 °C, 2,3% de lipase (em relação ao volume dos substratos) e um tempo de reação de 24 horas. Liu *et al.* [37], ao investigarem o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática de óleo de soja, descobriram que maiores quantidades de água no meio reacional resultou no aumento da produção de AGLs. Na razão mássica de 0,1:1, cerca de 17% do óleo foi hidrolisado em AGLs, enquanto que, ao aumentar-se a proporção para 2,5:1, um hidrolisado com 33% de AGLs foi obtido. Na produção do concentrado natural de beta-caroteno a partir de óleo de buriti por hidrólise enzimática, Ribeiro *et al.* [38] observaram crescente rendimentos em AGLs de 56,6% para 62,9% nas razões mássicas de água:óleo 1:1,4 e 1:2,6, respectivamente, a 29 °C e uma enzima TL IM (imobilizada) concentrada em 10,7 U (conteúdo de enzima) .

### 3.3.2. Efeito do pH da solução tampão

A literatura reporta que o pH desempenha um papel importante na reação de hidrólise para obtenção de AGL [27, 39], e por esta razão o efeito do pH da solução tampão fosfato de sódio foi avaliado na faixa de 5,7 a 8,0, adotando a temperatura de 55 °C, agitação de 400 rpm, percentual de catalisador (em relação à massa dos substratos) de 5% e razão mássica água:óleo de 1:2. A Figura 3.2 mostra os resultados obtidos para os diferentes valores de pH avaliados. Como se pode ver na Figura 3.2, o aumento do pH ocasionou o aumento da taxa de hidrólise dos triacilglicerídeos, reportando-se rendimento em AGLs de 59% a pH 5,7 e 66,8% a pH 8,0. Comparando com os resultados apresentados com os da Figura 3.1, verifica-se que a adição da solução tampão ao meio reacional aumentou o rendimento em AGLs de aproximadamente 57,8% (na reação com a água) para aproximadamente 67% a pH 8,0, nas mesmas condições de reação.

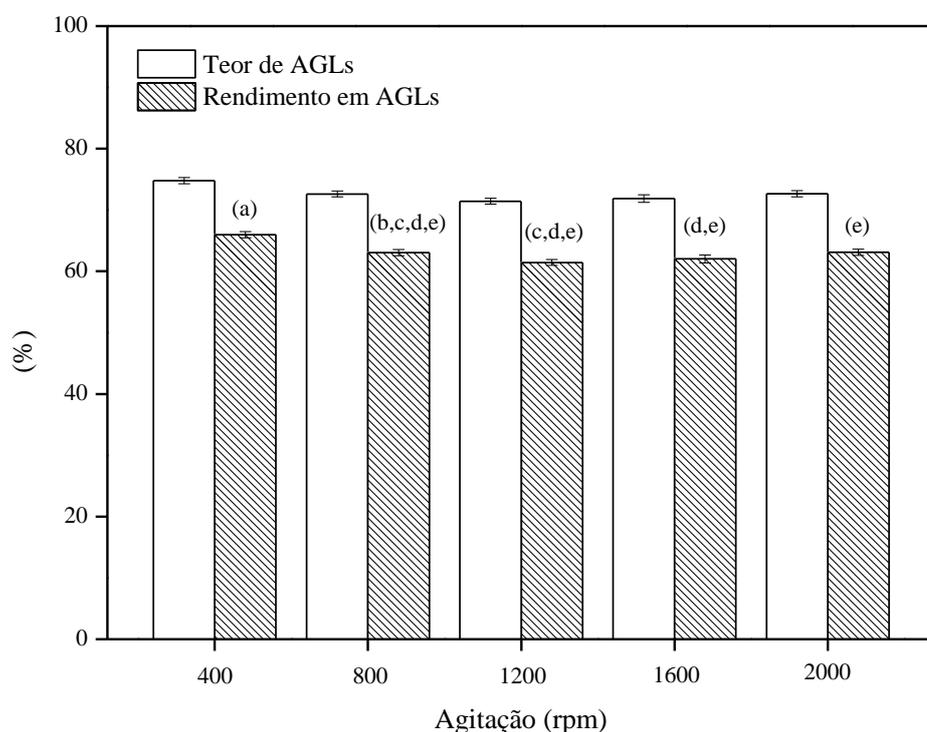


**Figura 3.2.** Efeito do pH sobre o rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, 400 rpm, mássica de água:óleo 1:2, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

A Lipozyme® RM IM tem sido utilizada em muitos casos e com boas propriedades nas reações de hidrólise, utilizando a sua especificidade para liberar ácidos graxos livres e sua atividade e estabilidade em meios não convencionais é uma das vantagens desta enzima, mesmo nesta reação hidrolítica [40]. O pH do meio de funcionamento é um quesito crítico para a atividade de uma enzima e sua seletividade [39]. Hernaiz *et al.* [41] mostraram as alterações de atividade em relação à conformação da proteína for vários valores de pHs. O pH é o responsável pela abertura ou bloqueio do centro catalítico que fornecerá a ligação ao substrato [42]. O aumento do rendimento em AGLs com a adição de solução tampão e o aumento do pH pode ser verificado em trabalhos recentes da literatura [16, 27, 28, 37].

### 3.3.3. Efeito da agitação

O efeito da agitação foi avaliado de 400 a 2000 rpm, em temperatura de 55 °C, percentual de catalisador (em relação aos substratos) de 5%, e razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2, onde os resultados encontram-se na Figura 3.3. De acordo com a Figura 3.3, no intervalo avaliado no estudo, os melhores rendimentos em AGLs foram obtidos para agitação a 400 rpm ( $p>0,05$ ).



**Figura 3.3.** Efeito da agitação no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2, pH de 8,0, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Sadana [43] explica que as enzimas atuam com eficiência na fase interfacial dos substratos, onde a taxa de hidrólise aumenta com o aumento da superfície de contato. O aumento da agitação do meio reacional promove o aumento do número de gotículas no meio, levando ao aumento do rendimento em AGLs da reação de hidrólise. Em contrapartida, a agitação causa a exposição da enzima a uma tensão de cisalhamento, podendo ocorrer a desnaturação de sua superfície, o que conduz à

sua desativação e conseqüentemente, diminui o rendimento em AGLs da hidrólise. Vale ressaltar, no entanto, que em baixa agitação, o efeito do aumento da área interfacial dos substratos da hidrólise é maior do que o efeito da desativação da enzima [16, 31], o que explica que, no caso deste estudo, a menor agitação mostrou-se mais eficiente em termos de rendimento em AGL. Efeito similar foi verificado por Babicz *et al.* [44], os quais avaliaram intervalos de agitação de 400-1300 rpm na hidrólise do óleo de soja com a Lipozyme® RM IM (imobilizada) onde relatam rendimentos em AGLs de 19% a 700 rpm, 16% a 400 rpm e de 9% a 1300 rpm.

#### 3.3.4. Efeito da adição de sais e surfactantes

A Tabela 3.2 apresenta os resultados das reações de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba conduzidas na presença de aditivos no meio reacional. O efeito da adição de dois surfactantes (Triton® X-100 and Tween 80) e seis sais foram avaliados. Como pôde ser visto na Tabela 3.2, ambos os surfactantes ocasionaram o decréscimo na produção de AGL. Para o uso do Triton® X-100, o rendimento em AGLs máximo de 60% foi obtido com 5%, enquanto que com o percentual de 10%, o Tween 80 forneceu um rendimento em AGLs de aproximadamente 60,6%. Sem adição de surfactantes, o rendimento em AGLs obtido foi de 67,3%.

Goswami *et al.* [16] avaliaram o efeito de diferentes surfactantes na obtenção de ácido erúico a partir da hidrólise catalisada pela lipase de pâncreas suína à 35 °C, 10 mg de lipase g<sup>-1</sup> de óleo, 900 rpm e 6 horas de reação, reportam 55% de AGLs na ausência de surfactante, e 3,8% e 8,76% na adição de Triton® X-100 e Tween 80 no meio reacional, respectivamente. Comparativamente, ao ser avaliada a hidrólise de óleos e gorduras para a obtenção de ácidos graxos por catalisadores ácidos sólidos, como o Fe-Zn DMC, Satyarthi *et al.* [45] constataram que a adição de surfactantes, como Triton® X-100, também reduz o rendimento em AGLs da hidrólise para 8,8%, enquanto que sem adição de surfactante o rendimento em AGLs obtido foi de 45,7%.

**Tabela 3.2.** Efeito de aditivos no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, 400 rpm, razão mássica solução tampão:óleo de 1:2, pH 8,0 da solução tampão, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação.

	Aditivo	Percentual (%)	Rendimento (%)	
Surfactante (em relação à massa dos substratos)	Nenhum	0	67,30 ± 0,19 <sup>A</sup>	
	Triton <sup>®</sup> X-100	5	60,00 ± 0,09 <sup>B; a,e</sup>	
		10	45,89 ± 0,08 <sup>C; b</sup>	
		15	43,88 ± 0,74 <sup>D; c</sup>	
		5	57,01 ± 0,19 <sup>E; d</sup>	
	Tween 80	10	60,58 ± 0,03 <sup>F; e</sup>	
		15	58,33 ± 0,00 <sup>G; f</sup>	
		Sais	CuCl <sub>2</sub>	0.01 M na solução tampão
	CaCl <sub>2</sub>			61,77 ± 0,04 <sup>I; b', c', d'</sup>
	KCl			62,65 ± 0,26 <sup>J; A; c', d', f'</sup>
NH <sub>4</sub> Cl			61,06 ± 0,09 <sup>K; d'</sup>	
NaCl			68,07 ± 0,05 <sup>L; A; e'</sup>	
MgCl <sub>2</sub>			65,07 ± 0,11 <sup>M; A; f'</sup>	

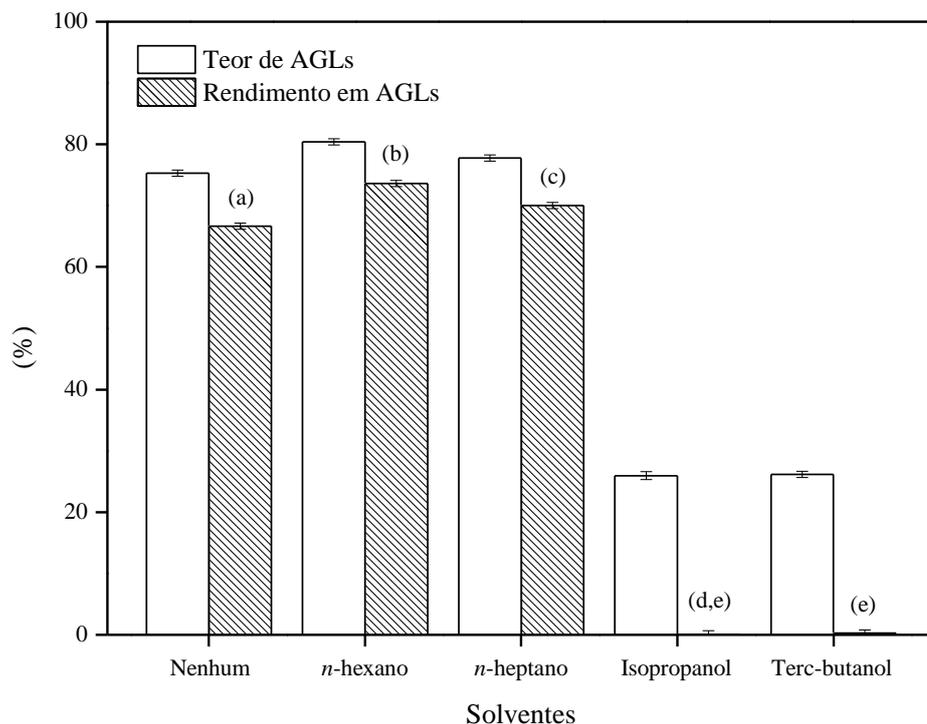
Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas (em comparação com a amostra sem aditivos) e letras minúsculas (nos mesmos aditivos) não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Como apresentado na Tabela 3.2, a presença de sais no meio reacional ocasionou o decréscimo do rendimento em AGLs da reação, apenas adição de NaCl forneceu maior rendimento, de no entanto, o mesmo não apresenta diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado a amostra sem adição de sais. Sharon *et al.* [22], avaliando o efeito de diferentes sais metálicos na hidrólise do óleo de mamona por *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 (líquida) e constataram que a atividade residual da lipase diminuiu na adição de metais ao meio reacional. O controle dos autores apresentou atividade de 100% na ausência de metais, passando a possuir atividade de 81,5%, 70,0%, 77,7%, 95,6% e 73,3%, ao serem adicionados os sais metálicos de Na, K, Cu, Ca e Al, respectivamente. Goswami *et al.* [16] avaliaram a presença de sais no meio reacional da hidrólise, onde verificaram que na ausência de sal, rendimento em AGLs de 37,46% foi obtido, enquanto que para a adição de íons de Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> o rendimento em AGLs aumentou significativamente, para 45%, 84,35% e 65,36%, respectivamente.

### 3.3.5. Efeito da adição de solvente

A Figura 3.4 apresenta os resultados do efeito da adição de diferentes solventes sobre o rendimento em AGLs das reações conduzidas a 55 °C, percentual de catalisador (em relação aos substratos) de 5% e razão mássica de solução tampão:óleo 1:2, sendo avaliados como solventes o *n*-hexano, *n*-heptano, isopropanol e *t*-butanol.

Segundo a Figura 3.4, dentre os solventes avaliados, *n*-hexano e *n*-heptano levaram ao aumento no rendimento em AGLs da hidrólise, e isopropanol e *t*-butanol à redução do mesmo. O melhor desempenho foi obtido pelo solvente *n*-hexano, o qual promoveu um aumento de aproximadamente 10% no rendimento em AGLs da reação. Tem sido relatado que a atividade das enzimas mostra-se mais eficiente na presença de diferentes solventes orgânicos. Solventes como o isooctano [16, 26] e *n*-hexano [46, 47] têm sido utilizados com sucesso em reações enzimáticas que obtenham rendimentos em AGLs elevados. Batistella *et al.* [48] relataram aumento na atividade enzimática da Lipozyme® RM IM (imobilizada), quando em contato com os solventes *n*-hexano e iso-octano.



**Figura 3.4.** Efeito da adição de solventes não rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, razão mássica óleo:solvente de 1:1, 400 rpm, razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2, pH da solução tampão de 8,0, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Os solventes são normalmente usados nas reações de hidrólise de óleos vegetais, porque eles aumentam a velocidade de reação, reduzem a viscosidade do óleo, a facilidade de emulsificação, e de aumentar a área interfacial que promove a reação [32]. Rathod e Pandit [32], avaliaram o efeito de vários solventes (metanol, *n*-hexano, acetona, e iso-octano) na produção de AGLs a partir de óleo de mamona por lipase de *Aspergillus oryzae* (líquida), onde, exceto para o solvente iso-octano solvente, todos os outros solventes utilizados inibem a atividade da lipase. Kwon *et al.* [49], conduzindo a síntese de glicerídeo de cadeia média por lipase no solvente orgânico, encontraram um aumento significativo no rendimento em AGLs da reação usando *n*-hexano como um solvente.

De modo geral, para a otimização dos sistemas constituídos por solventes orgânicos e catalisados por enzimas, o log P é considerado um bom método

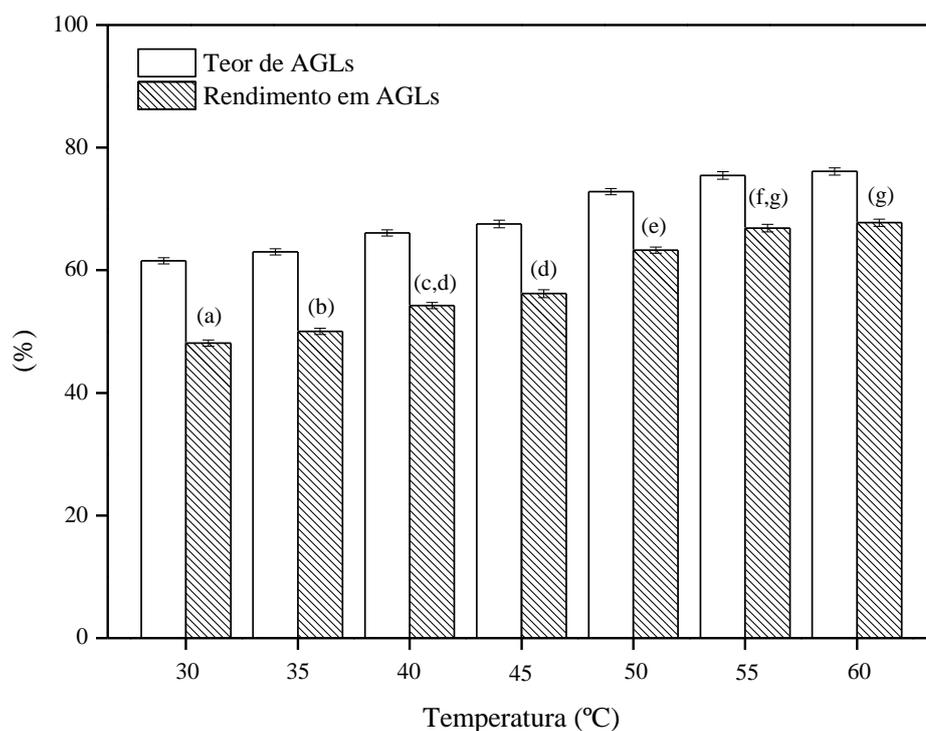
quantitativo, uma vez que representa a polaridade do solvente. A classificação seguinte é recomendada para escolher os solventes orgânicos mais adequados para a catálise enzimática: (1) solventes com  $\log P < 2$ , devido a sua alta polaridade, os quais podem causar a desnaturação do catalisador, (2) solventes com  $2 < \log P < 4$  são considerados moderados, e (3) solventes com  $\log P > 4$  podem ser considerados os mais apropriados, uma vez que são apolares [36, 48, 50, 51]. Chua e Sarmidi [36] explicam que outro fator relevante é o teor de água no solvente orgânico, o qual geralmente é muito limitado. No entanto, a presença de quaisquer quantidades de água não pode ser negligenciada, uma vez que ela desempenha um papel importante no controle do desempenho da enzima em meios orgânicos. Porém, não há um princípio para orientar a seleção do solvente orgânico para os processos enzimáticos em particular. O único critério é o grau de compatibilidade do solvente com a manutenção da atividade da enzima e de sua estabilidade [36].

Neste trabalho, o *n*-hexano ( $\log P=3,5$ ) mostrou ser o solvente orgânico mais adequado para a hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, resultando em rendimentos em AGLs de 73,58%, seguido pelo *n*-heptano ( $\log P=4,0$ ) com 70%. As reações conduzidas com isopropanol e *t*-butanol ( $\log P=0,05$  e  $\log P=0,35$ , respectivamente), resultaram em rendimentos em AGLs de 0,3%. Este resultado pode estar relacionado com o fato dos solventes com elevada polaridade poderem remover as moléculas de água da enzima, de modo a que a enzima não receba água suficiente para manter a sua configuração ativa [52].

### 3.3.6. Efeito da Temperatura

A Figura 3.5 mostra o efeito da temperatura, avaliada no intervalo de 30 a 60 °C, a 400 rpm, razão mássica de solução tampão:óleo 1:2 e percentual de catalisador (em relação à massa dos substratos) de 5%. A partir da Figura 5, pode-se observar que o aumento da temperatura aumenta a produtividade de AGLs no intervalo de 30 a 55 °C. Efeito semelhante foi observado por Phuah *et al.* [53] ao investigar o efeito da temperatura na hidrólise de óleo de palma catalisada pela Lipozyme® RM IM (imobilizada) no intervalo de 45 a 55 °C. Avelar *et al.* [24] avaliaram a hidrólise de diferentes óleos vegetais e relataram que o aumento na

temperatura, leva a um aumento nos rendimentos em AGLs, resultando na obtenção de um rendimento em AGLs de 81% a 25 °C, enquanto que a 50 °C, a hidrólise procedeu-se de maneira completa.

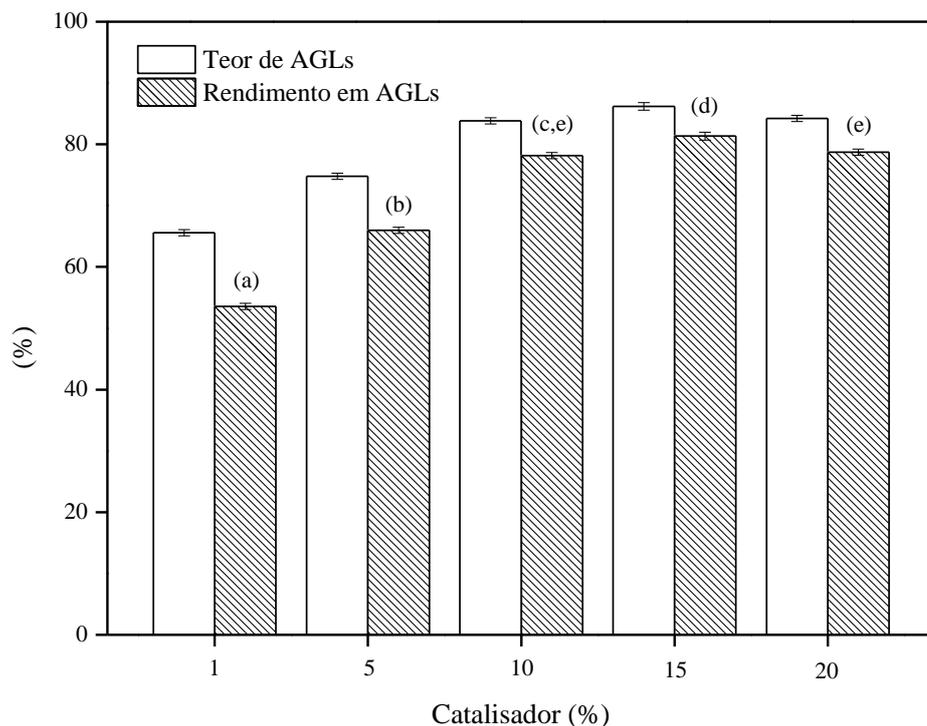


**Figura 3.5.** Efeito da temperatura no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 400 rpm, razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2, pH de 8,0, percentual de catalisador de 5% e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Termoestabilidade das enzimas frente a diferentes valores de temperatura são importantes parâmetros para uso de enzimas em reações de hidrólise de triacilgliceróis. É conhecido que as propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas podem variar significativamente, em função de sua origem, condições dos ensaios, tempo de incubação, pH e temperatura, do método e dos substratos utilizados, tornando, muitas vezes, a comparação difícil [54].

### 3.3.7. Efeito do percentual de catalisador

A concentração da enzima tem um forte impacto sobre o processo catalítico, visto que o aumento da concentração de enzima no meio reacional faz com que ela se desloque da fase aquosa para a interface a uma taxa crescente, fazendo com que o aumento de sua interação com os substratos leve ao aumento da taxa de hidrólise [16]. A Figura 3.6 apresenta os resultados dos experimentos realizados, por meio da variação da concentração de catalisador de 1 a 20% (em relação à massa de óleo) obtidos a 400 rpm, razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2 e percentual de catalisador (relação à massa dos substratos) de 5%. Pode-se observar a partir da Figura 3.6, que um aumento no percentual de catalisador conduz a um aumento acentuada do rendimento em AGLs, passando de 53,6% a 81,34%. A um percentual de enzima de 5%, rendimentos em AGLs na ordem dos 66% foram alcançados, enquanto que 78,2% foram obtidos com a adição de 10% do catalisador no meio reacional. Um crescente aumento da taxa de reação paralela ao aumento da concentração do catalisador pode ser visto nos resultados, principalmente entre 10 e 15%, embora não seja significativa. Isto pode ser explicado devido à saturação da enzima na interface entre o óleo e a fase aquosa, onde o aumento da concentração da enzima não forneceu quaisquer alterações significativas na taxa de reação [55].



**Figura 3.6.** Efeito do percentual de catalisados no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba a 55 °C, 400 rpm, razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2, pH de 8,0 e 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

O aumento no rendimento da reação, proporcional ao aumento do teor de enzima também foi verificado no estudo de Freitas *et al.* [6], os quais obtiveram hidrolisado com 35% de AGLs após 24 horas de reação à 40°C e agitação de 200 rpm. O percentual de catalisador avaliado pelos autores variou de 1-3% (em relação à massa de óleo), onde o percentual de catalisador de 3% correspondeu ao maior rendimento em AGLs obtido. You *et al.* [56] avaliando o efeito da concentração de enzima no rendimento em AGLs da hidrólise do óleo de palma bruto catalisada pela lipase *Candida rugosa* (forma bruta), verificaram que o percentual de AGL produzido aumentou com o aumento da concentração da enzima, especialmente de 0,5 a 1%, mostrando um aumento drástico no rendimento em AGL, devido ao aumento da atividade hidrolítica. Fato semelhante foi verificado por Meng *et al.* [57], na hidroesterificação do óleo de soja com a lipase *Yarrowia lipolytica* (imobilizada),

onde na etapa de hidrólise, de 25-100 Uw/g<sup>-1</sup> de enzima foram avaliados, sendo que rendimentos em AGLs em torno de 90% foram reportados para a maior quantidade de enzima.

Neste estudo, rendimentos em AGLs de aproximadamente 82% foram obtidos em 6 horas de reação, na razão mássica de solução tampão:óleo de 1:2, uma temperatura de 55 °C , agitação de 400 rpm, solução tampão fosfato de sódio (pH 8,0) e percentual de catalisador de 15%. Rendimentos em AGLs apreciáveis (80%) foram relatados por Cavalcanti-Oliveira *et al.* [33] , utilizando razão mássica de solução tampão:óleo 1:2 , a pH 8,0 e 50 °C durante 24 horas, utilizando 2,3% de catalisador *Thermomyces lanuginosus* (TL 100L) (líquida). Freitas *et al.* [6] mostraram melhores rendimentos (65%) em AGLs para a hidrólise do óleo de soja com 3% de lipase pancreática porcina, após 6 horas de reação. Goswami *et al.* [16] relataram um rendimento de 37,46% em AGLs por meio da hidrólise do óleo de mostarda após 6 horas, razão mássica de solução tampão:óleo de 1:1, pH 9,0, 900 rpm e percentual de lipase pancreática de 1% (em relação à massa de óleo). Baharin [56] relatam rendimentos em 96% AGLs para a hidrólise enzimática do óleo de palma bruto com a lipase *Candida rugosa* a 50 °C, 1% de lipase *Candida rugosa*, razão mássica água:óleo de 1:2 e 6 horas de reação. Cheong *et al.* [57] reportam redução de aproximadamente 20% no percentual de TG ao aumentar o teor de enzimas no meio reacional de 5 para 10% a 65 °C, razão mássica de água:óleo 1:2 e tempo de reação de 11 horas.

### 3.4. Conclusões

O presente trabalho relatou dados experimentais relacionados à produção de AGLs do óleo da amêndoa da Macaúba, obtidos por hidrólise enzimática. Os resultados reportam que a Lipozyme® RM IM é mais eficiente para a realização desta reação, quando comparada às demais lípases avaliadas. Na gama experimental investigada, verificou-se que a temperatura e o pH tiveram um efeito positivo sobre o rendimento em AGLs, enquanto que o aumento da agitação não mostrou nenhum aumento significativo. Para o percentual de catalisador e a razão mássica óleo:água, efeito positivo dentro de um determinado intervalo do estudo foi

verificado. A adição de sais e surfactantes ao meio reacional da hidrólise não foi eficaz no aumento da velocidade da reação nas condições consideradas ( $p > 0,05$ ). A presença de *n*-hexano e *n*-heptano, no meio reacional aumentou a produção de AGLs. Pelos resultados obtidos, rendimentos em AGLs apreciáveis (aproximadamente 82% em massa) foram obtidos à 55 °C, razão mássica solução tampão:óleo 1:2, a pH 8,0, 15% da enzima, 400 rpm, e 6 horas de reação.

### 3.5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro e à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela infraestrutura.

### 3.6. Referencias

- [1] J. Huang, Y. Liu, Z. Song, Q. Jin, Y. Liu, X. Wang, "Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol.17, nº 3, pp.521–525, 2010.
- [2] S. S., Kaki, P. Adlercreutz, "Quantitative analysis of enzymatic fractionation of multiple substrate mixtures," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 110, nº 1, pp. 78–86, 2013.
- [3] I. Itabaiana Jr, M. C. Floresa, F. K. Sutili, S. G. F. Leite, L. S. M. Miranda, I. C. R. Leal, R. O. M. A. Souza, "Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 77, nº 1, pp. 53– 58, 2012.
- [4] I. Itabaiana Jr, F. K. Sutili, S. G. F. Leite, K. M. Gonçalves, Y. Cordeiro, I. C. R. Leal, L. S. M. Miranda, M. Ojeda, R. Luqued, R. O. M. A. Souza, "Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases," *Green Chemistry*, vol. 15, nº 1, pp. 518–524, 2013.
- [5] O. W. D. Gamboa, L. A. Gioielli, "Comportamento de Cristalização de Lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe," *Química Nova*, vol. 29, nº 4, pp. 646-653, 2006.

- [6] L. Freitas, T. Bueno, V. H. Perez, J. Santos, H. F. De Castro, "Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, nº 1, pp. 1725–1731, 2007.
- [7] N. Paroul, L. P. Grzegozeski, V. Chiaradia, H. Treichel, R. L. Cansian, J. V. Oliveira, D. Oliveira, "Solvent-Free Production of Bioflavors by Enzymatic Esterification of Citronella (*Cymbopogon winterianus*) Essential Oil," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 166, nº 1, pp. 13-21, 2012.
- [8] P. Goyal, M. P. Sharma, S. Jain, "Optimization of Conversion of High Free Fatty Acid *Jatropha curcas* Oil to Biodiesel Using Response Surface Methodology," *ISRN Chemical Engineering*, vol. 2012, nº 1, pp. 1-8, 2012.
- [9] D. C. Lopes, A. J. Steidle-Neto, "Potential crops for biodiesel production in Brazil: a review," *World Journal of Agricultural Sciences*, vol. 7, nº 2, pp. 206-217, 2011.
- [10] P. E. Motta, A. T. Oliveira Filho, J. B. V. Gomes, "Ocorrência da Macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais," *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 37, nº 7, pp. 1023-1031, 2002.
- [11] J. A. Ratter, S. Bridgewater, J. F. Ribeiro, "Analysis of the floristic composition of the vegetation III: comparison of the woody vegetations of 376 areas," *Edinburgh Journal of Botany*, vol. 60, nº 1, pp.57-109, 2003.
- [12] T. P. Pires, E. S. Souza, K. N. Kuki, S. Y. Motoike, "Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop," *Industrial Crops and Products*, vol. 44, nº 1, pp. 200-210, 2013.
- [13] R. Roscoe, A. Richetti, E. Maranhão, "Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul," *Revista Política Agrícola*, vol 16, nº 1, pp. 48-59, 2007.
- [14] J. S. S. Pinto, F. M. Lança, "Hidrólise do Óleo de *Azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas," *Química Nova*, vol. 33, nº 2, pp. 394-397, 2010.
- [15] D. Goswami, R. Sen, J. K. Basu, S. De, "Surfactant enhanced ricinoleic acid production using *Candida rugosa* lipase," *Bioresource Technology*, vol. 101, nº 1, pp. 6-13, 2010.

- [16] D. Goswami, J. K. Basu, S. De, "Optimal hydrolysis of mustard oil to erucic acid: A biocatalytic approach," *Chemical Engineering Journal*, vol. 181, pp. 542–548, 2012.
- [17] H. F. Castro, A. A. Mendes, J. C. Santos, C. L. Aguiar, "Modification of oils and fats by biotransformation," *Química Nova*, vol. 27, nº 1, pp. 146-156, 2004.
- [18] A. A. Mendes, H. F. Castro, "Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 135–142, 2005.
- [19] P. Skagerlind, M. Jansson, B. Bergenstahl, K. Hult, "Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 4, nº 3, pp. 129-135, 1995.
- [20] M. Persson, I. Mladenoska, E. Wehtje, P. Adlercreutz, "Preparation of lipases for use in organic solvents," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 31, nº 6, pp. 833–841, 2002.
- [21] J. K. Satyarthi, D. Srinivas, P. Ratnasamy, "Estimation of free fatty acid content in oils, fats, and biodiesel by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy," *Energy Fuels*, vol. 23, nº 4, pp. 2273–2277, 2009.
- [22] C. Sharon, M. Nakazato, H. I. Ogawa, Y. Kato, "Lipase-induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 21, nº 1, pp. 292-295, 1998.
- [23] M. T. Ru, J. S. Dordick, J. A. Reimer, D. Clark, D., "Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents," *Biotechnology Bioengineering*, vol. 63, nº 2, pp. 233-241, 1999.
- [24] M. H. M. Avelar, D. M. J. Cassimiro, K. C. Santos, R. C. C. Domingues, H. F. Castro, A. A. Mendes "Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds," *Industrial Crops and Products*, vol. 44, nº 1, pp. 452–458, 2013.
- [25] S. R. Kulkarni, A. B. Pandit, "Enzymatic hydrolysis of castor oil: An approach for rate enhancement and enzyme economy," *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 4, nº 2, pp. 241-245, 2005.
- [26] M. S. Puthli, V. K. Rathode, A. B. Pandit, "Enzymatic hydrolysis of castor oil: process intensification studies," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 31, nº 1, pp. 31-41, 2006.

- [27]N. A. Serri, A. H. Kamarudin, S. N. Abdul Rahaman, "Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil Using *C. rugosa* Lipase," *Journal of Physical Science*, vol. 19, n<sup>o</sup> 1, pp. 79–88, 2008.
- [28]M. M. R. Talukder, J. C. Wu, N. M. Fen, Y. L. S. Melissa, "Two-step lipase catalysis for production of biodiesel," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 49, n<sup>o</sup> 2, pp. 207–212, 2010.
- [29]C. Sharma, P. Satyendra, A. Chaurasiab, K. Dalai, "Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production," *Catalysis Today*, vol. 207, n<sup>o</sup> 1, pp. 93-100, 2013.
- [30]W. J. Ting, K. Y. Tung, R. Giridhar, W. T. Wi, "Application of binary candida rugosa lipase for hydrolysis of soybean oil," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 42, n<sup>o</sup> 1-2, pp. 32-38, 2006.
- [31]D. Goswami, J. K. Basu, S. De, "Optimization of Process Variables in Castor Oil Hydrolysis by *Candida rugosa* Lipase with Buffer as Dispersion Medium," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 14, n<sup>o</sup> 1, pp. 220-224, 2009.
- [32]V. R. Rathod, A. B. Pandit, "Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 47, n<sup>o</sup> 1-3, pp. 93–99, 2009.
- [33]E. A. Cavalcanti-Oliveira, P. R. Da Silva, A. P. Ramos, D. A. G. Aranda, D. M. G. Freire, "Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification," *Enzyme Research*, vol. 2011, n<sup>o</sup> 1, pp. 1-8, 2011.
- [34]G. Gomori, "Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies, in *Methods in Enzymology*," vol. 1. (Eds.) Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., *Academic Press Inc.*, New York, 1955.
- [35]AOCS, American oil chemists' society. Official methods and recommended practices, 2: 4. ed. *Champaign*, 1998.
- [36]L. S. Chua, M. R. Sarmidi, "Effect of solvent and initial water content on (R, S)-1-phenylethanol resolution," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, n<sup>o</sup>. 3-4, pp. 551–556, 2006.
- [37]Y. Liu, Q. Jin, L. Shan, Y. Liu, W. Shen, X. Wang, "The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 15, n<sup>o</sup> 4, pp. 402–407, 2008.

- [38]B. D. Ribeiro, M. A. Z. Coelho, D. W. Barreto, "Production of concentrated natural beta-carotene from buriti (*Mauritia vinifera*) oil by enzymatic hydrolysis," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 90, n° 2, pp. 141–147, 2012.
- [39]Z. A. Jarjes, R. S. Mohammed, A. G. Sulaiman, "Bio-electrode in Mechanistic Study of Lipoxygenase with Fatty Acids from Cooking Palm Oil," *The Open Electrochemistry Journal*, vol. 4, n° 1, pp. 13-19, 2012.
- [40]R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, "Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 66, n° 1-2, pp. 15–32, 2010.
- [41]M. J. Hernáiz, M. Rúa, B. Celda, P. Medina, J. V. Sinisterra, J. M. Sánchez-Montero, "Contribution to the study of the alternation of lipase activity of *Candida rugosa* by ions and buffers," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 44, n° 3, pp. 213-229, 1994.
- [42]S. Benjamin, A. Pandey, "Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 44, n° 2, pp. 213-221, 2001.
- [43]A. Sadana, "Biocatalysis Fundamentals of Enzyme Deactivation Kinetics," *Prentice Hall*, New Jersey, 1991.
- [44]I. Babicz, S. G. F. Leite, R. O. M. A. Souza, O. A. C. Antunes, "Lipase-Catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 17, n° 1, pp.4-6, 2010.
- [45]J. K. Satyarthi, D. Srinivas, P. Ratnasamy, "Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts," *Applied Catalysis A: General*, vol. 391, n° 1-2, pp. 427-435, 2011.
- [46]L. S. Chua, M. Alitabarimansor, C. T. Lee, R. Mat, "Hydrolysis of Virgin Coconut Oil Using Immobilized Lipase in a Batch Reactor," *Enzyme Research*, vol. 2012, n° 1, pp. 1-5, 2012.
- [47]C. Pizarro, M. C. Branes, A. Markovits, G. F. Lorente, J. M. Guisán, R. Chamy, L. Wilson, "Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 78, n° 1, pp. 111– 118, 2012.
- [48]L. Batistella, M. K. Ustra, A. Richetti, S. B. Pergher, H. Treichel, J. V. Oliveira, L. Lerin, D. Oliveira, "Assessment of two immobilized lipases activity and stability to

- low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 35, n° 3, pp. 351-358, 2012.
- [49] D. Y. Kwon, H. N. Song, S. H. Yoon, “Synthesis of Medium Chain Glyceride by Lipases in Organic Solvent,” *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, vol. 73, n° 11, pp. 1521–1525, 1996.
- [50] C. S. Chen, C. J. Sih, “General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 28, n° 6, pp. 695-707, 1989.
- [51] S. J. Kuo, K. L. Parkin, “Solvent polarity influences product selectivity of lipase-mediated esterification reactions in microaqueous media,” *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, vol. 73, n° 1, pp. 1427-1433, 1996.
- [52] L. A. Lerin, A. Rechetti, R. Dallago, H. Treichel, M. A. Mazutti, J. V. Oliveira, O. A. C. Antunes, E. G. Ostreicher, D. Oliveira, “Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation,” *Food Bioprocess Technology*, vol. 5, n° 1, pp.1068–1076, 2012.
- [53] E. T. Phuah, O. M. Laia, T. S. Y. Choong, C. P. Tan, S. K. Lo, “Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 78, n° 1, pp. 91–97, 2012.
- [54] N. Lopez, M. A. Pernas, L. M. Pastrana, A. Sanchez, F. Valero, M. L. Rua, “Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media: influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media,” *Biotechnology Progress*, vol. 20, n° 1, pp. 65-73, 2004.
- [55] D. Rooney, L. R. Weatherly, “The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor,” *Process Biochemistry*, vol. 36, n° 10, pp. 947–953, 2001.
- [56] L. L. You, B. S. Baharin, “Effects of enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *Candida rugosa*,” *Journal of Food Lipids*, vol. 13, n° 1, pp. 73–87, 2006.
- [57] Y. Meng, G. Wang, N. Yang, Z. Zhou, Y. Li, X. Liang, J. Chen, Y. Li, J. Li, “Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 4, n° 1, pp. 1-9, 2011.

[58]L. Z. Cheong, C. P. Tan, K. Long, M. S. A. Yusoff, N. Arifin, S, K. Lo, O. M. Lai, "Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology," *Food Chemistry*, vol. 105, n° 4, pp. 1614-1622, 2004.

## CAPÍTULO 4. ARTIGO 2

### **Produção de Ácidos Graxos Livres por meio da Hidrólise Enzimática do Óleo de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) em sistema com solvente orgânico**

Djéssica Tatiane Raspe<sup>a</sup>, Giovana Rodrigues de Menezes<sup>b</sup>, Lúcio Cardozo Filho<sup>c</sup> e  
Camila da Silva<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Universidade Estadual de Maringá, (UEM). Av. Colombo 5790, Maringá, PR, 87020-900, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, (UEM), Umuarama, PR, 87506-370, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, (UEM). Av. Colombo 5790, Maringá, PR, 87020-900, Brasil.

#### **RESUMO**

O objetivo do presente trabalho é a produção de ácidos graxos livres (AGLs) do óleo de macaúba por hidrólise enzimática. A reação dos triacilglicerídeos do óleo da amêndoa da macaúba foi conduzida, primeiramente, em diferentes solventes orgânicos com a Lipozyme® RM IM, da qual, obteve-se como melhor resultado nesta etapa, conduzida a condições fixas de solução tampão (70% em relação à massa de óleo), pH (8,0), concentração de catalisador (20% em relação à massa dos substratos), temperatura (55 °C) e agitação (400 rpm), onde rendimentos em AGLs apreciáveis de aproximadamente 88%, após 8 horas de reação, na presença de solvente *n*-hexano (razão mássica 1:1 óleo:solvente). A avaliação da reutilização do catalisador enzimático foi realizada, sendo verificada diminuição de aproximadamente 30% e 40% no rendimento em AGLs do processo decorridos 10 ciclos e 20 ciclos reacionais, respectivamente.

*Palavras-Chave:* Hidrólise; ácidos graxos livres; óleo de macaúba.

## 4.1. Introdução

A produção de óleos e gorduras tem-se disseminado, tornando este produto importante matéria no contexto econômico mundial. Sua maior parte destina-se ao setor alimentício, no entanto, é crescente o interesse de obter produtos químicos de maior valor agregado a partir destas matérias químicas [1, 2], como a resolução de misturas racêmicas [3], a síntese de emulsificantes [4, 5], a transformação de lipídios, a fim de se produzir lipídios estruturados com elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados [6, 7], e a obtenção de bioaromas [8], além da sua crescente utilização na produção de biodiesel [9].

Diversos trabalhos vêm investigando a possibilidade do emprego de matérias-primas diversas na obtenção destes compostos, principalmente as que se destacam por possuírem baixo custo e que possuam parcela expressiva no contexto atual. Entre estas matérias-primas, tem-se a Macaúba [*Acrocomia aculeata* Lodd arara (Jacq.). ex Mart] que destaca-se por ser amplamente distribuída em todo o país. A alta produtividade de óleo proveniente dessa palmeira (1500 a 5000 kg/ha<sup>-1</sup>) [10], a alta qualidade de seu óleo [11, 12, 13] e sua resistência à seca criaram interesse em seus usos agroindustriais.

Um dos primeiros passos para a obtenção de derivados químicos de óleos vegetais é a hidrólise, que conduz à glicerina, mono, diglicerídeos e uma mistura de ácidos graxos [14]. As transformações de óleos e gorduras são predominantemente baseadas em processos químicos convencionais [15, 16]. No caso da hidrólise, o processo mais utilizado opera em temperaturas e pressões elevadas, ocasionando reações secundárias que exigem posteriores operações de separação e purificação [17, 18].

Neste processo, a catalise pela rota enzimática tem merecido destaque sob à convencional, por requer baixas temperaturas, o que impede a degradação dos produtos e reduz os custos de energia [19]. Além disso, as enzimas são catalisadores biodegradáveis, sendo, portanto, menos poluente do que os catalisadores químicos [19], podendo ser reutilizadas e apresentarem alta estabilidade em solventes orgânicos [20, 21, 22, 23, 24]. Embora o custo elevado da produção de catalisadores enzimáticos tem sido reportado como o maior obstáculo

para a efetivação de processos por eles intermediados, os avanços nesta tecnologia, como a utilização de enzimas tolerantes à solventes e/ou imobilizadas, que tem permitido sua ampla reutilização, tem promovido sistemas de baixo custo [25, 26]. Adicionalmente, tem sido reportada a utilização de sistemas reacionais não convencionais, em solventes orgânicos, para as reações enzimáticas, tendo como principal vantagem, a relação com o deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação em favor da síntese e com a maior solubilidade dos produtos de interesse [20, 21, 22, 23, 27].

Neste sentido, objetivou-se no presente trabalho a produção de ácidos graxos livres (AGL) a partir do processo de hidrólise enzimática do óleo de macaúba, em meio com solvente orgânico. Diferentes solventes e suas razões mássicas foram avaliadas, sendo posteriormente avaliados os efeitos das variáveis do processo (temperatura, percentual de solução tampão e concentração de enzima) na sua presença, sendo por fim, obtidas as cinéticas de produção de AGLs em diferentes percentuais de catalisador e reutilização do catalisador enzimático.

## **4.2. Materiais e Métodos**

### *4.2.1. Materiais*

Nas reações de hidrólise foram utilizados o óleo da amêndoa de macaúba (Cocal Brasil), tampão fosfato de sódio (Neon) preparado conforme reporta Gomori [28] e como catalisador a enzima Lipozyme® RM IM (Novozymes®). A composição química do óleo da amêndoa da macaúba usado neste trabalho é apresentada na Tabela 4.1, a qual foi determinada pelo método Ce 2-66, da AOCS (1990). O teor de AGLs (mg AGL/100 mg) e o conteúdo de água (% em peso, pelo método de titulação de Karl Fischer, a DL 50, Mettler-Toledo) foram determinadas em, aproximadamente,  $23,0 \pm 0,4$  e  $0,7 \pm 0,05$ , respectivamente. Os solventes utilizados foram: *n*-hexano (Nuclear), *n*-heptano (Nuclear), isopropanol (Fmaia), terc-butanol, (Sigma-Aldrich). Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de éter etílico:álcool etílico 2:1 (v:v) (Vetec/Nuclear), hidróxido de potássio (Nuclear) e fenolftaleína como indicador (Nuclear).

**Tabela 4.1.** Composição química do óleo da amêndoa da macaúba.

Ácido Graxo	Percentual (%)
Laurico (C12:0)	0,02 ± 0,00
Mirístico (C14:0)	0,12 ± 0,01
Palmitico (C16:0)	11,07 ± 0,22
Palmitoleico (C16:1n-7)	1,50 ± 0,03
Estearico (C18:0)	3,46 ± 0,03
Oleico (C18:1n-9)	19,74 ± 0,07
cis-vacênico (C18:1n-7)	0,75 ± 0,00
Linoleico (C18:2n-6)	62,33 ± 0,15
Linolênico (C18:3n-3)	0,33 ± 0,01
Araquídico (C20:0)	0,35 ± 0,00
Eicosadiênico (C20:2n-6)	0,27 ± 0,00

#### 4.2.2. Aparato experimental e procedimento

As reações foram conduzidas em um reator de vidro encamisado de 40 mL, conectado a um banho termostatizado com controle da temperatura (Marconi) e uma chapa de agitação magnética (Marconi, MA 085). A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada conforme reportado no Capítulo 3. A Tabela 4.2 apresenta a matriz dos planejamentos experimentais com os valores reais e codificados referentes à hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, que foram analisadas visando explorar as variáveis significativas. No final da reação, a Lipozyme® RM IM foi removida por filtração à vácuo, e os produtos foram recuperados para posterior análise. As amostras sem a enzima foram transferidas para frascos de amostragem e colocados em rota evaporador à vácuo para a evaporação do excesso de solvente. Por fim, as amostras foram refrigeradas para posterior análise dos produtos de interesse.

**Tabela 4.2.** Fatores e intervalos investigados nos dois planejamentos experimentais.

Variável	Primeiro Planejamento				
	Experimental				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura - T (°C)	-	35	45	55	-
Solução Tampão - ST (%)	-	10	30	50	-
Concentração de enzima - E (%)	-	5	7,5	10	-

Variável	Segundo Planejamento				
	Experimental				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Solução Tampão - ST (%)	21,71	30	50	70	78,28
Concentração de enzima - E (%)	7,92	10	15	20	22,07

#### 4.2.4. Metodologia analítica

O percentual de ácidos graxos livres foi determinado com base no método de Ca 5a-40 [29] que se baseia na titulação ácido-base, utilizando como solução titulante, hidróxido de potássio etanólico (KOH) previamente padronizada (0,1 mol L<sup>-1</sup>). Cada amostra foi analisada em duplicata, sendo o teor de AGLs calculado a partir da Equação 1 e o rendimento em AGLs da reação de hidrólise calculado a partir da Equação 2:

$$\text{Teor de AGLs (\%)} = \frac{M \times MM \times V}{m \times 100} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:  $M$  corresponde à molaridade da solução titulante (mol L<sup>-1</sup>),  $MM$  corresponde ao massa molar do AGL predominante na amostra (280 g/mol),  $v$  corresponde ao volume gasto na titulação (mL) e  $m$  corresponde à massa da amostra utilizada para a análise (g).

$$\text{Rendimento em AGLs (\%)} = \frac{AGLs_f}{TAG_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:  $AGL_f$  corresponde ao conteúdo de AGLs produzida após a reação de hidrólise, e  $TAG_0$  corresponde ao conteúdo de triacilglicerídeos presentes no óleo da amêndoa da macaúba.

#### *4.2.5. Análise dos Dados*

A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável foi realizada utilizando o erro global e o desvio-padrão relativo entre os dados experimentais e previstos. Vale ressaltar que os resultados obtidos e apresentados neste trabalho são os valores médios de duplicatas. As análises dos dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), avaliando as diferenças entre as médias dos diferentes tratamentos, utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc, EUA).

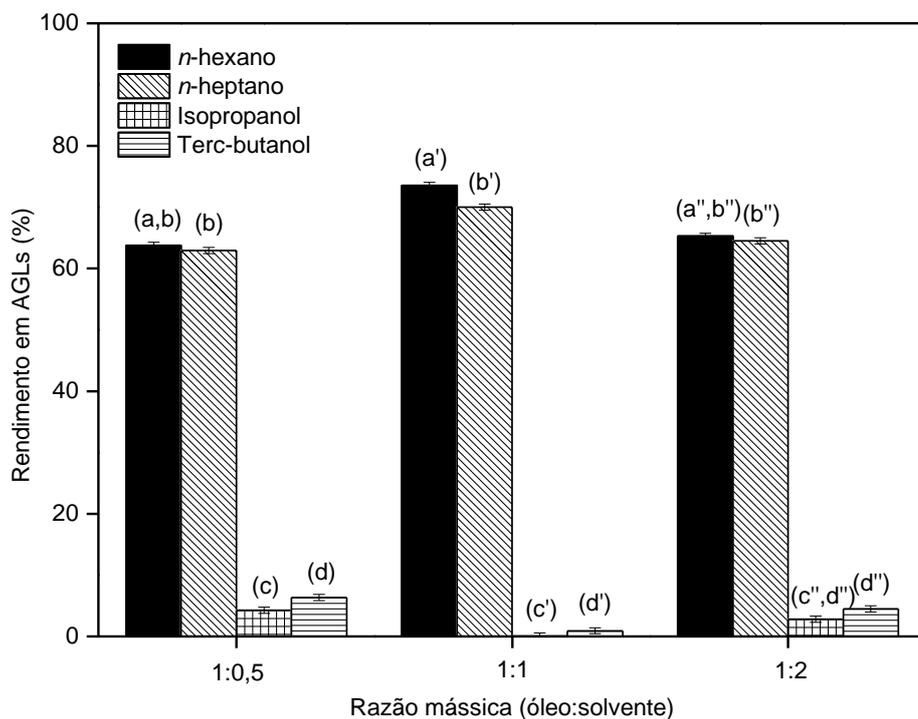
#### *4.2.6. Reutilização dos Catalisadores*

Condições fixas foram estabelecidas para avaliação da reutilização do catalisador no processo de hidrólise proposto. A reutilização da enzima Lipozyme® RM IM foi avaliada na reação de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com 70% de solução tampão fosfato de sódio (pH 8,0) (em relação à massa de óleo), 55 °C, 400 rpm, com concentração de enzima de 20% (em relação à massa dos substratos) e razão mássica de óleo:solvente *n*-hexano 1:1, sendo considerada a perda de massa do catalisador com o decorrer das reações. Decorrida a etapa reacional, as respectivas enzimas foram inicialmente separadas do meio reacional por decantação, lavadas com *n*-hexano e filtradas à vácuo. Posteriormente, as enzimas recuperadas foram acondicionadas em dessecador à vácuo durante 24 horas para secagem. Após este tratamento, a enzima foi novamente reutilizada.

### 4.3. Resultados e Discussões

#### 4.3.1. Testes preliminares

A Figura 4.1 apresenta os resultados do efeito da adição de diferentes solventes orgânicos sobre o rendimento em AGLs na reação de hidrólise conduzida a 55 °C, percentual de catalisador (relação aos substratos) de 5%, e percentual de solução tampão de 50% em relação à massa de óleo, sendo avaliados como solventes o *n*-hexano (log P=3,5), *n*-heptano (log P=4,0), isopropanol (log P=0,05) e terc-butanol (log P=0,80) em diferentes proporções mássicas ao meio reacional. De acordo com a Figura 4.1 os solventes *n*-hexano e *n*-heptano proporcionaram aumento no rendimento em AGLs da hidrólise na razão mássica 1:1, enquanto os solventes isopropanol e terc-butanol reduziram o mesmo. Para as razões mássicas de 1:0,5 e 1:2, diminuição na produção de AGLs foi verificada para todos os solventes avaliados. Sharma *et al.* [30] explicam que o solvente atua na interface bifásica da hidrólise, passando a fornecer maior facilidade para separar o produto do meio reacional. No entanto, quantidades excessivas de solvente reduzem a acessibilidade dos substratos aos sítios ativos das enzimas [31], provocando menores rendimentos em AGLs a reação.



**Figura 4.1.** Efeito da adição de diferentes razões mássicas (em relação à massa de óleo) de solventes orgânicos na reação de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, a 55 °C, percentual de solução tampão de 50%, pH de 8,0, percentual de catalisador de 5% durante 6 horas de reação. Médias seguidas de letras iguais para cada coluna não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Um dos principais critérios a considerar na seleção de um solvente orgânico é a sua capacidade de solubilização dos substratos e produtos, e as suas propriedades de transferência de massa [32]. O logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P$ ), de um composto, tem sido amplamente empregado para prever o rendimento em AGLs de uma reação, em presença de determinado solvente [33]. Segundo Laane *et al.* [34], a reação enzimática ocorre em maior extensão na presença de solventes hidrofóbicos ( $\log P > 3,0$ ) e em menor na presença de solventes hidrofílicos ( $\log P < 2,0$ ). Existe, porém, uma tendência de se utilizar critérios adicionais, como densidade, viscosidade, toxicidade, ponto de ebulição, entre outros, para garantir um adequado grau de biocompatibilidade do solvente com o catalisador enzimático [35]. Outro aspecto a ser ressaltado é que os solventes podem agir na enzima inibindo sua atividade, alterando ligações de hidrogênio,

interações hidrofóbicas, competindo pelo seu sítio ativo [36], podendo retirar a água essencial que se encontra na superfície externa das moléculas das enzimas, a qual é crucial para manutenção da atividade catalítica [37].

#### 4.3.2. Efeito das variáveis do processo

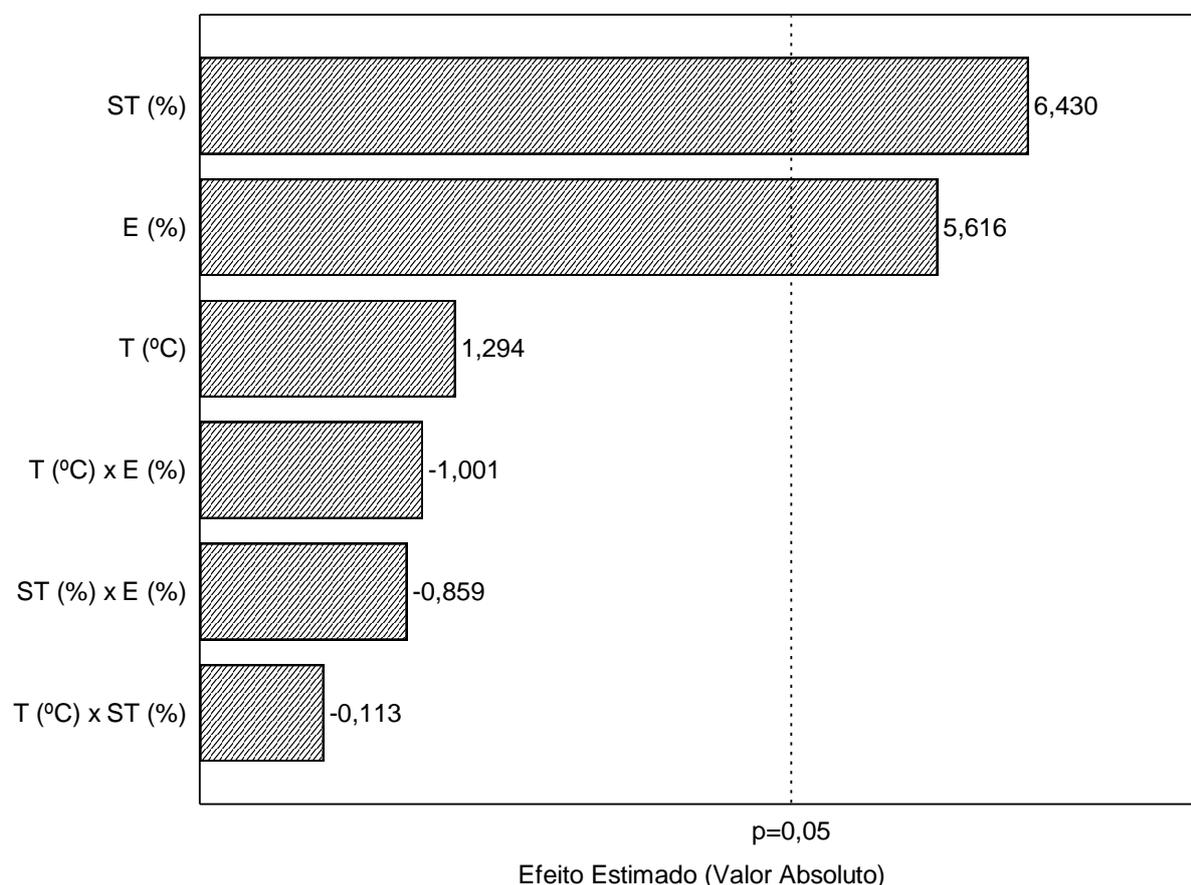
Inicialmente, foram investigadas as condições de reação para a hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba catalisada pela lipase Lipozyme® RM IM na presença de *n*-hexano na razão mássica 1:1 (óleo:solvente) no meio reacional. A partir dos resultados obtidos anteriormente, um planejamento experimental com 2<sup>3</sup> com triplicata do ponto central foi realizado para avaliar o efeito da temperatura, concentração de enzima e a concentração da solução tampão sobre o rendimento em AGLs. A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados e as respostas em termos de rendimento em AGLs da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba.

**Tabela 4.3.** Matriz do primeiro planejamento experimental (valores codificados e reais) com os resultados em termos de rendimento em AGLs.

Ensaio	T (°C)	ST (%)	E (%)	Rendimento em AGLs (%)
1	35 (-1)	10 (-1)	5 (-1)	43,55 ± 2,26
2	35 (-1)	30 (0)	10 (+1)	72,78 ± 0,27
3	35 (-1)	50 (+1)	7,5 (0)	70,99 ± 0,09
4	45 (0)	10 (-1)	10 (+1)	64,76 ± 1,21
5	45 (0)	50 (+1)	5 (-1)	67,96 ± 1,00
6	55 (+1)	10 (-1)	7,5 (0)	58,80 ± 0,12
7	55 (+1)	30 (0)	5 (-1)	60,46 ± 0,01
8	55 (+1)	50 (+1)	10 (+1)	78,12 ± 0,55
9	45 (0)	30 (0)	7,5 (0)	76,93 ± 0,01
10	45 (0)	30 (0)	7,5 (0)	70,66 ± 0,04
11	45 (0)	30 (0)	7,5 (0)	72,94 ± 0,55

Os dados apresentados na Tabela 4.3 foram tratados estatisticamente, e os principais efeitos das variáveis são apresentados na Figura 4.2, onde podemos

observar, dentro do intervalo das variáveis considerado, que a solução tampão e concentração de enzima apresentaram efeito positivo significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o rendimento em AGLs de reação. A temperatura não apresentou efeito significativo sobre a produção de AGLs.



**Figura 4.2.** Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de AGLs ( $p > 0,05$ ). As condições experimentais e os dados encontram-se apresentados na Tabela 4.3.

Com base nos resultados do primeiro planejamento experimental, realizou-se um delineamento composto central rotacional  $2^2$  foi proposto, mantendo a temperatura constante (55 °C), proporção mássica de óleo:solvente de 1:1, velocidade de agitação (400 rpm) e tempo de reação de 6 horas, variando-se o percentual de solução tampão e a concentração de enzima, mostrando o efeito positivo destas variáveis no rendimento em AGLs da reação.

**Tabela 4.4.** Matriz do delineamento composto centro rotacional 2<sup>2</sup> e rendimento em AGLs.

Ensaio	ST (%)	E (%)	AGLs (%)	$RED [\%]^a = \left  \frac{Y_{EXP} - Y_{MODEL}}{Y_{EXP}} \right  \times 100$
1	30 (-1)	10 (-1)	68,62 ± 0,38	-1,12
2	30 (-1)	20 (+1)	77,64 ± 0,29	-0,47
3	70 (+1)	10 (-1)	70,66 ± 0,82	-1,19
4	70 (+1)	20 (+1)	80,21 ± 0,39	-0,54
5	21,71 (-1,41)	15 (0)	76,17 ± 0,90	0,78
6	78,28 (+1,41)	15 (0)	79,63 ± 0,48	0,88
7	50 (0)	7,92 (-1,41)	68,35 ± 0,36	1,29
8	50 (0)	22,07 (+1,41)	79,65 ± 0,05	0,37
9	50 (0)	15 (0)	76,96 ± 0,05	-0,66
10	50 (0)	15 (0)	77,88 ± 0,27	0,25
11	50 (0)	15 (0)	78,04 ± 0,75	0,41

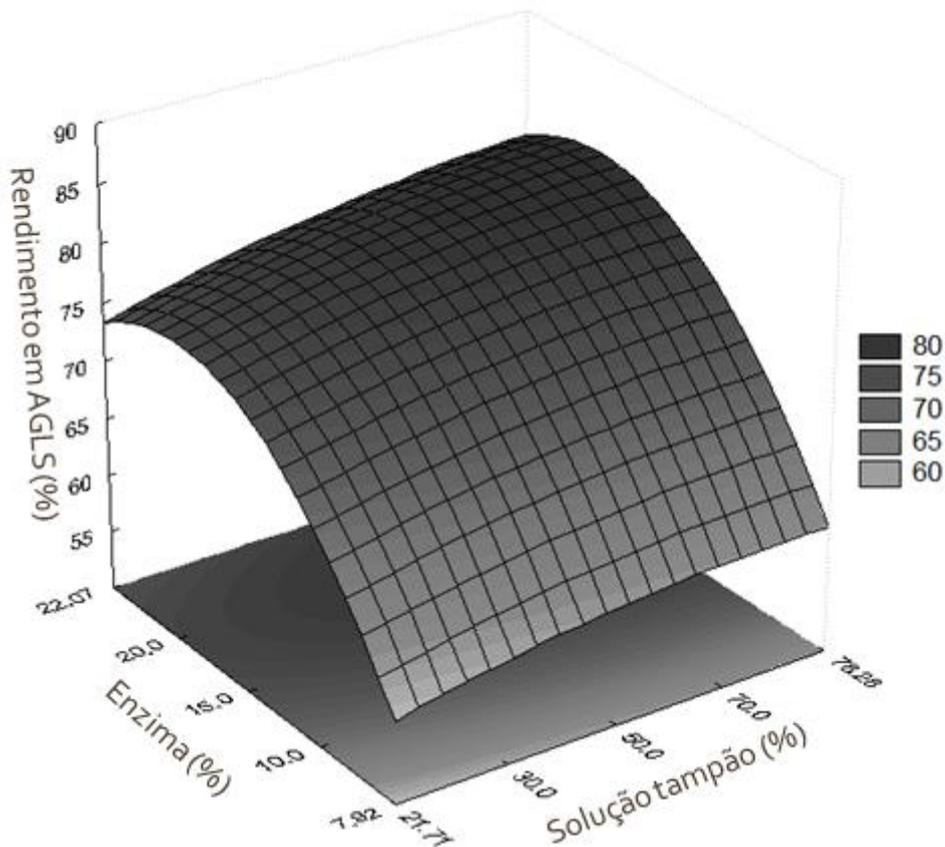
Os parâmetros fixos foram a temperatura (55 °C), razão mássica de óleo:solvente (1:1), a velocidade de agitação (400 rpm) e o tempo de reação (6 horas)

<sup>a</sup> RED desvio relativo do erro

Após a análise estatística dos resultados obtidos no segundo planejamento experimental, um modelo foi proposto visando a produção otimizada de AGLs em função da solução tampão e concentração de enzima. A análise de variância (ANOVA) levou a valores de teste de F da regressão maior que o calculado, no valor de 21,71, e listando em um R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação) no valor de 0,96. Isto implica em uma representação satisfatória do processo pelo modelo, dentro da gama de valores avaliada para cada variável, conforme se ilustra pelos rendimentos em AGLs experimentais (terceira coluna da Tabela 4.4) e o desvio relativo de erro (RED) (quinta coluna da Tabela 4.4). O modelo codificado montado pela análise de regressão é dada pela Equação 3.

$$Rendimento\ em\ AGLs\ (\%) = 77,63 + 1,18ST - 0,28ST^2 + 4,32E - 2,24E^2 + 0,13ST \times E \quad (Eq. 3)$$

Onde *ST* corresponde à solução tampão e *E* à concentração de enzima.



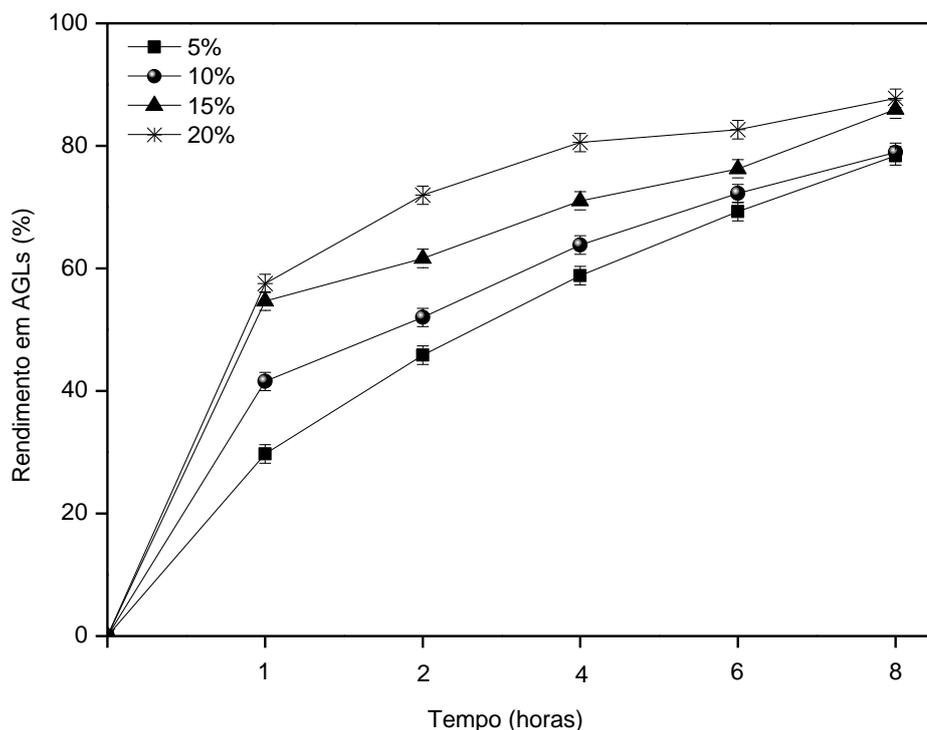
**Figura 4.3.** Superfície de resposta para a produção de AGLs em função da concentração de solução tampão e concentração de enzima. As condições experimentais e os dados estão apresentados na Tabela 4.4.

O planejamento de experimentos foi usado para compor a superfície representada na Fig. 4.3, onde verifica-se que as melhores taxas de rendimento em AGLs devem ser obtidas no maior percentual de solução tampão e concentrações de catalisador. Como visto, o modelo indica que os melhores rendimentos em AGLs (78,28%) são obtidos com concentrações de lipase entre 15% e 20%. Cavalcanti-Oliveira *et al.* [38] relatam a existência de uma gama de concentração ótima de enzima pode ser explicada por dois fatores: a concentrações inferiores a 15 %, mais enzima pode favorecer a acessibilidade de uma grande quantidade de reagentes para os seus sítios ativos, e em concentrações superiores a 20%, dímeros com menor atividade pode estar se formando. O aumento da taxa de reação, com um aumento no teor de enzima também foi observado por Freitas *et al.* [39], os quais reportam a hidrólise com 35% de AGLs depois de 24 horas, na temperatura da reação de 40 °C e agitação a 200 rpm. O percentual de catalisador relatado pelos

autores variou de 1 a 3% (em relação à massa de óleo), onde o percentual de 3% correspondeu a um maior rendimento em AGLs. You *et al.* [40] avaliaram o efeito da concentração da enzima em função do rendimento em AGLs da oleína de palma bruta na hidrólise catalisada pela *Cândida rugosa* e descobriram que o percentual de produção de AGLs aumentou com o aumento da concentração de enzima, especialmente de 0,5 a 1%.

#### 4.3.3. Estudo cinético da Produção Enzimática de Ácidos Graxos Livres do Óleo da Amêndoa da Macaúba

O efeito de concentração da Lipozyme® RM IM (5 , 10, 15, e 20% em relação à massa dos substratos) foi avaliada no rendimento em AGLs da hidrólise, visando à otimização da produção de AGLs do óleo da amêndoa da macaúba, em condições fixas de temperatura (55 °C), percentual de solução tampão (50% em relação à massa de óleo), razão mássica de óleo:solvente (1:1) e agitação (400 rpm). A Figura 4.4 mostra os dados experimentais e os resultados do modelo cinético obtido nesta etapa. Ao utilizar 20% de enzima, pode-se observar que elevadas taxas iniciais de reação foram obtidas, levando a um rendimento em AGLs elevado, em tempos relativamente curtos de reação. Por outro lado, em condições experimentais utilizando concentração de enzima de 10%, baixa velocidade inicial de reação foi observada, sendo atingidos 63% em AGLs como rendimento, após 4 h de reação. Pode-se observar que o melhor rendimento em AGLs foi atingido com 20% de enzima, bem como elevadas taxas de reação, resultando em alta produtividade com tempos de reação relativamente curtos.

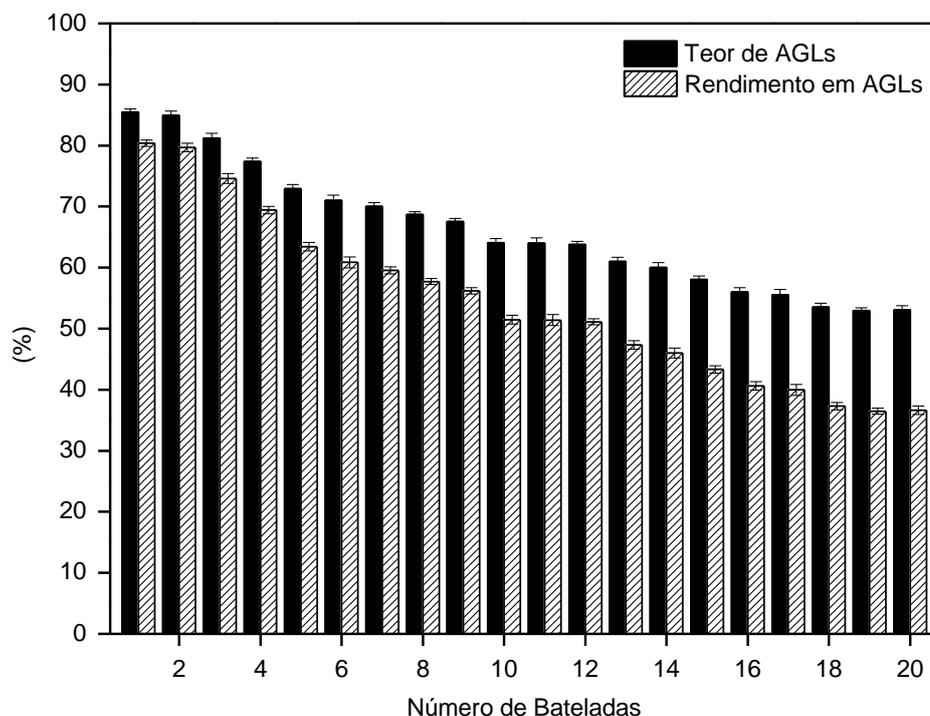


**Figura 4.4.** Cinética de produção de AGLs em concentração de enzima de 5 a 20%. A reação foi realizada a 55 °C, percentual de solução tampão de 50% (em relação à massa de óleo), razão mássica de óleo:solvente *n*-hexano 1:1 e 400 rpm.

Coelho *et al.* [41] reportam que o aumento da concentração de extrato enzimático bruto de semente de mamona, de 1 a 5% proporcionou um aumento no rendimento em AGLs de mais de 40% para a hidrólise do óleo de milho, após 30 minutos de reação. Similarmente, Cavalcanti-Oliveira *et al.* [38] reportam aumento de mais de 10% na hidrólise do óleo de soja quando aumentado o percentual da lipase TL 100L de 0,5 à 9,5%, a temperatura de 55 °C e concentração de óleo de 73%. Aumento no percentual de hidrólise do óleo de mostarda foi verificado quando aumentado a concentração de enzima, de 17% a 2% de catalisador, para aproximadamente 37% com 10% de catalisador. Neste trabalho, após 8 horas de reação, um rendimento em AGLs de cerca de 88% foi obtido à 20% de catalisador, enquanto que para o percentual de 5, 10 e 15%, rendimentos em AGLs máximos de 78, 79 e 86% foram obtidos, respectivamente.

#### 4.3.5. Reutilização do catalisador

Considerando-se que uma das grandes limitações da catálise enzimática é o custo do catalisador, a reutilização da Lipozyme® RM IM foi avaliada nas reações de síntese dos AGLs do óleo da amêndoa da macaúba em as condições reacionais ótimas, previamente definidas, conforme mostra a Figura 4.5. A fim de verificar a viabilidade do processo, foram realizadas lavagens na enzima com *n*-hexano, solvente este que tem sido reportado como eficaz na remoção de qualquer tipo de substrato ou produto remanescente na superfície do catalisador, melhorando assim, sua capacidade de reutilização [42, 43].



**Figura 4.5.** Reutilização da Lipozyme® RM IM na reação de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba. Todas as reações foram conduzidas usando 20% de catalisador (em relação à massa dos substratos), 70% de solução tampão fosfato de sódio à pH 8,0 (em relação à massa de óleo), 100% de solvente orgânico *n*-hexano (em relação à massa de óleo), 55 °C e 400 rpm, durante 8 horas.

Nos resultados reportados na Figura 4.7, pode-se observar uma queda contínua no rendimento em AGLs com o número de reutilizações, sendo o

rendimento em AGLs na 20ª reutilização igual a apenas 45% do rendimento em AGLs da 1ª reação em batelada. A perda de atividade é notória ao fim das reutilizações, uma vez que os rendimentos em AGLs foram sempre inferiores em relação às reutilizações anteriores. A nível industrial este é um fator importante, uma vez que para a catálise enzimática ser monetariamente competitiva, as enzimas têm de ser reutilizadas diversas vezes.

Lee *et al.* [44] verificaram uma diminuição de 20% da atividade inicial da mistura das lípases *R. oryzae* e *C. rugosa* após 5 reutilizações. Rodrigues & Ayub [45] avaliaram a reutilização da mistura da Lipozyme® RM IM e TL IM na hidrólise do óleo de soja. Os autores verificaram diminuição acentuada na atividade das lípases após a 3ª reutilização, passando de 100% de rendimento em AGLs à aproximadamente 85%. Após 10 bateladas, a atividade catalítica das lípases correspondeu a apenas 20% da atividade inicial.

#### **4.4. Conclusões**

O processo de produção de AGLs por meio da hidrólise enzimática do óleo da amêndoa da macaúba foi reportado. Cerca de 88% de AGLs foram obtidos na reação de hidrólise catalisada pela Lipozyme® RM IM. Sendo otimizada, a hidrólise teve produção máxima de AGLs conduzida na presença de 20% de catalisador (em relação à massa dos substratos) em meio aquoso formado pela solução tampão fosfato de sódio (70% em relação à massa de óleo) a pH 8,0 e solvente *n*-hexano (1:1 em relação à massa de óleo), decorridas 8 horas de reação a 400 rpm. Na reutilização da Lipozyme® RM IM pode-se verificar diminuição no rendimento em AGLs do processo, sendo verificada perda de aproximadamente 50% do rendimento em AGLs inicial após o 20º ciclo.

#### **4.5. Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro e à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela infraestrutura.

#### 4.6. Referencias

- [1] CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- [2] FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELLA, C. B. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1539-1543, 2009.
- [3] KAKI, S. S.; ADLERCREUTZ, P. Quantitative analysis of enzymatic fractionation of multiple substrate mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, n. 1, p. 78–86, 2013.
- [4] ITABAIANA JR, I.; FLORESA, M. C.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; MIRANDA, L. S. M.; LEAL, I. C. R.; SOUZA, R. O. M. A. Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 77, n. 1, p. 53– 58, 2012.
- [5] ITABAIANA JR, I.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; GONÇALVEZ, K. M.; CORDEIRO, Y.; LEAL, I. C. R.; MIRANDA, L. S. M.; OJEDA, M.; LUQUED, R.; SOUZA, R. O. M. A. Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases. *Green Chemistry*, v. 15, n. 1, p. 518–524, 2013.
- [6] GAMBOA, O. W. D.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de Cristalização de Lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 646-653, 2006.
- [7] FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 1, p. 1725–1731, 2007.
- [8] PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Solvent-Free Production of Bioflavors by Enzymatic Esterification of Citronella (*Cymbopogon winterianus*) Essential Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. 1, p. 13-21, 2012.

- [9] KORN, M. G. A.; DOS SANTOS, D. S. S.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIREIRA, A. P.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels - A review. *Talanta*, v. 73, p. 1-11, 2007.
- [10] SILVA, G. C. R.; ANDRADE, M. H. C. Development and Simulation of a new oil extraction process from fruit of Macauba palm tree. *Journal of Food Process Engineering*, v. 36, n.1, p. 134-145, 2013.
- [11] MANFIOL, E. C.; MOTOIKEL, S. Y.; SANTOS, C. E. M.; PIMENTEL, L. D.; QUEIROZ, V.; SATO, A. Y. Repetibilidade em características biométricas do fruto de macaúba. *Ciência Rural*, v. 41, n. 1, p. 70-76, 2011.
- [12] COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jervivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, n. 3, p. 679-684, 2012.
- [13] AOQUI, Marcio. Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos *Wistar*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, MS. 2012.
- [14] RASPE, D. T.; SILVA, C.; CARDOZO FILHO, L. Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*). *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- [15] KÖCKRITZ, A.; MARTIN, A. Synthesis of azelaic acid from vegetable oil-based feedstocks. *European journal of lipid science and technology*. special issue: Fats and oils as renewable feedstock for the chemical industry, v. 113, n. 1, p. 83–91, 2011.
- [16] ARYEE, A. N. A.; DUTILLEUL, P.; PASZTI, M.; SIMPSON, B. K. Optimized transformation of animal fats to alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v. 109, p. 103–110, 2013.
- [17] PINTO, J. S. S.; LANÇA, F. M. Hidrólise do Óleo de *Azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura e cromatografia

- gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.
- [18] GOSWAMI, D.; SEN, R.; BASU, J. K.; DE, S. Surfactant enhanced ricinoleic acid production using *Candida rugosa* lipase. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 1, p. 6-13, 2010.
- [19] SKAGERLIND, P.; JANSSON, M.; BERGENSTAHL, B.; HULT, K. Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 4, n. 3, p. 129-135, 1995.
- [20] PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.
- [21] SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Estimation of free fatty acid content in oils, fats, and biodiesel by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Energy Fuels*, v. 23, n. 4, p. 2273-2277, 2009.
- [22] SHARON, C.; NAKAZATO, M.; OGAWA, H. I.; KATO, Y. Lipase-induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 292-295, 1998.
- [23] RU, M. T.; DORDICK, J. S.; REIMER, J. A.; CLARK, D. Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents. *Biotechnology Bioengineering*, v. 63, n. 2, p. 233-241, 1999.
- [24] AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products*, v. 44, n. 1, p. 452-458, 2013.
- [25] FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.
- [26] ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.
- [27] KULKAMI, S. R.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: An approach for rate enhancement and enzyme economy. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 241-245, 2005.

- [28] GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies, in *Methods in Enzymology*, v. 1. (Eds.) Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press Inc., New York, 1955.
- [29] AOCS, American oil chemists' society. *Official methods and recommended practices*, 2: 4. ed. Champaign, 1998.
- [30] SHARMA, C.; SATYENDRA, P.; CHAURASIAB, A.; DALAI, K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today*, v. 207, n. 1, p. 93-100, 2013.
- [31] YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase system containing immobilized lipase from *Candida Antarctica*. *Biochemical Engineering Journal*, v, 17 p. 57–63, 2004.
- [32] AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim da Biotecnologia*, p. 2-12, 2002.
- [33] KRISHNA, S.; PLANCHE, T.; AGBENYEGA, T. Bioavailability and preliminary clinical efficacy of intrarectal artesunate in Ghanaian children with moderate malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 509–516, 2001.
- [34] LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 81–87, 1987.
- [35] CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n. 3, p. 237-241, 1997.
- [36] ALVAREZ-MACARIE E, BARATTI J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 377-383, 2000.
- [37] WU, J. C.; SONG, B.; XING, A.; HAYASHI, Y.; TALUKDER, M. M. R.; WANG, S. Esterification reactions catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in organic solvents. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 11, p. 1229-1233, 2002.
- [38] CAVALCANTI-OLIVEIRA, P. R.; SILVA, A. P.; RAMOS, D. A. G.; ARANDA, FREIRE, D. M. G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. *Enzyme Research*, v. 2011, n. 1, p. 1-8, 2011.

- [39]FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 1, p. 1725–1731, 2007.
- [40]YOU, L. L.; BAHARIN, B. S. Effects of enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Food Lipids*, v. 13, n. 1, p. 73–87, 2006.
- [41]COELHO, A. D.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; MENDES, A. A. Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase vegetal. *Química Nova*, v. 36, n. 8, p. 1164-1169, 2013.
- [42]VOLL, F.; KRÜGER, R. L.; CASTILHOS, F.; CARDOZO FILHO, L.; CABRAL, V.; NINOW, J.; CORAZZA, M. L. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 56, p. 107–115, 2011.
- [43]CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 71–80, 2007.
- [44]LEE, J. H.; LEE, D. H.; LIM, J.S.; UM, B.H.; PARK, C.; KANG, S.W.; KIM, S.W. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 1927-1931, 2008.
- [45]RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi investigada a produção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba.

Primeiramente, foi avaliado o efeito de aditivos (sais, surfactantes e solventes orgânicos) e das variáveis do processo (agitação, temperatura, razão mássica dos substratos e percentual de catalisador) de hidrólise na obtenção de ácidos graxos livres. Com base nos objetivos propostos em relação a presente proposta, conclui-se que:

1. Considerável aumento no rendimento em AGLs do processo de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba foi verificado, perante a adição de solução tampão fosfato de sódio e solvente orgânico *n*-hexano ao meio reacional;
2. Das variáveis avaliadas, a velocidade de agitação, que variou entre 400-2000 rpm, foi a que não apresentou influência significativa quando aumentada. Cerca de 82% de ácidos graxos livres foram obtidos após 6 horas de reação em temperatura reacional de 55 °C, 20% de catalisador enzimático Lipozyme® RM IM, razão mássica óleo:solução tampão 1:2 e 100% em relação à massa de óleo, de solvente orgânico *n*-hexano;

Sequencialmente, vislumbrando a exploração e otimização das variáveis do processo mencionado, foram propostas a análise, perante planejamentos experimentais, das variáveis do processo de hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, e reutilização do catalisador enzimático, podendo-se concluir que:

3. O aumento da razão mássica de óleo:solvente orgânico *n*-hexano não promoveu aumento nos rendimentos em ácidos graxos livres da hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba, sendo a razão ótima de 1:1;
4. Das variáveis que contribuíram fortemente no rendimento em ácidos graxos livres da reação de hidrólise, verificou-se que a temperatura, dentro da faixa experimental investigada, demonstrou contínuo incremento na quantidade de

ácidos graxos formados. Acompanhado a esta variável, teve-se o percentual de solução tampão e concentração de catalisador;

5. A utilização consecutiva da Lipozyme® RM IM na etapa de hidrólise, visando avaliar sua reutilização, promoveu uma perda de 2 à 5% de sua atividade durante o decorrer das 20 bateladas realizadas;

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros foram definidas:

- a) Acompanhar a produção de monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos durante a reação, bem como acompanhar quimicamente possíveis produtos paralelos oriundos das reações de hidrólise na presença de solvente orgânico no meio reacional;
- b) Realizar o processo de hidrólise enzimática na ausência de solvente orgânico no meio reacional;
- c) Acompanhar a produção de monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos durante a reação, bem como acompanhar quimicamente possíveis produtos paralelos oriundos das reações de hidrólise na ausência de solvente orgânico no meio reacional;