

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Jucieli Weber

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE ÓLEO DE FRITURA
PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL
ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**

Florianópolis, SC

2013

JUCIELI WEBER

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE ÓLEO DE FRITURA
PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL
ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jane Mara Block

Florianópolis / SC

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

WEBER, Jucieli.

APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE ÓLEO DE FRITURA PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS. / Jucieli Weber; Orientadora: Jane Mara Block – Florianópolis, 2013.
138p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina / Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos; 2. Aproveitamento de Resíduos; 3. Biodiesel.
I. BLOCK, Jane Mara. II. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Aproveitamento do Resíduo de Óleo de fritura para produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos.

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE ÓLEO DE FRITURA
PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL
ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**

JUCIELI WEBER

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina, pela banca examinadora:

Presidente: _____
Profa. Dra. Jane Mara Block (UFSC) (Orientadora)

Membro: _____
Prof. Dra. Maria Manuela Camino Feltes (IFC)

Membro: _____
Prof. Dr. Francisco Carlos Deschamps (EPAGRI - UNIVALI)

Membro: _____
Profa. Dra. Débora de Oliveira (UFSC)

Membro: _____
Profa. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke (UNISUL - UFSC)

Membro: _____
Prof. Dr. Ana Carolina Maisonave Arisi (UFSC)

Florianópolis / SC
2013

À minha mãe Vera e ao meu esposo Márcio.

Por todos os momentos felizes que
gostariam de ter tido comigo
e não tiveram.

...portas que, uma vez abertas,
vão dar numa outra porta,
muito maior, é verdade,
que por sua vez dá em outra,
indefinidamente.

E aqui estamos nós abrindo portas
com as perguntas que geraram as nossas chaves.

Vamos seguir...

(Rubem Alves)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar e abençoar as minhas escolhas.

Àquela que sempre lutou pela minha causa, minha admirável mãe Vera, por seu amor incondicional, pelo apoio e incentivo às minhas escolhas, pela confiança depositada, paciência, compreensão e exemplo de vida. À minha família pelo apoio e em especial a minha avó Therezinha por seu carinho e suas orações.

Ao Márcio, meu marido e grande amor, agradeço o carinho e o afeto, a palavra e o ombro amigo, o incentivo, a compreensão, a paciência, o amor e o companheirismo de todas as horas. Agradeço, meu querido, por teres aberto mão do nosso convívio nos nossos primeiros 4 anos de casados para que eu realizasse meus sonhos profissionais.

Aos meus tios e padrinhos Odila e José e aos primos Thais, Carolline e Lippi por me acolherem em sua casa e fazerem dela a minha também. Pelo chimarrão aconchegante em todos os finais de tarde e pelo amor, carinho e risadas gostosas em todos os momentos, principalmente nos de saudade e dificuldade.

A minha orientadora prof^a. Dr^a Jane Mara Block, pela orientação, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me ofereceu e ajudou a conquistar, por seu exemplo de determinação, pela paciência e pelo incentivo nos momentos de dificuldades.

As amigas e colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras, Ana Cláudia, Ana Cristina, Bruna M., Bruna S., Paula H., Paula R., Rossana, Vanessa e Gisele, por terem sido parceiras incansáveis nas muitas horas

de trabalho e nos momentos de descontração, pela paciência, boas ideias, ajuda, palavras de incentivo e apoio.

As amigas e colegas Valéria e Tatiana pelos ótimos momentos de convívio, pela acolhida, pelo carinho, compreensão, paciência, apoio, incentivo e boas risadas. Da mesma forma, agradeço a todos os colegas, ex-colegas e amigos do PGCAL.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular, especialmente a prof^a Dr^a. Ana Carolina M. Arisi e a doutoranda Deise J. Kolling, pela parceria, ajuda, troca de experiências e por terem me aberto as portas para a realização das análises.

A todos os professores que participaram da minha formação, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelos conhecimentos adquiridos durante o Doutorado e pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão da bolsa de estudos.

A rede de restaurantes pela doação do óleo residual de fritura e a Novozymes pela doação das enzimas.

A relatora da tese e a banca pelas valorosas contribuições na melhora deste trabalho.

A UFFS pelo incentivo a qualificação docente. Aos colegas e amigos da UFFS-Campus Realeza que inúmeras vezes trabalharam por mim permitindo que eu me dedicasse à finalização do doutorado, pelo incentivo, companheirismo e compreensão.

Aos meus alunos da SETREM e da UFFS, que sempre foram compreensivos com minhas ausências e nas trocas de aula.

Agradeço de coração! Sem vocês eu não teria conseguido realizar esse trabalho.

WEBER, J. Aproveitamento do resíduo de óleo de fritura para produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos. 2013. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

No presente trabalho foram estudados dois suportes (sílica gel aminada e polipropileno – Accurel MP 1000) para a imobilização de lipase de *Candida rugosa*, utilizada para a produção de biodiesel (ésteres metílicos e etílicos) a partir de óleo vegetal proveniente do descarte do processo de fritura. A produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos também foi realizada utilizando duas enzimas imobilizadas comerciais (Novozym 435 e Lipozyme TL IM). A eficiência da imobilização enzimática da lipase de *Candida rugosa* foi de 87,84% para sílica e 92,51% para polipropileno Accurel MP1000 e em 2,97 e 6,27 mg de proteína/g, respectivamente. Para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos, diferentes condições de reação como tempo (12 e 24 horas) e temperatura (30 e 40° C) e diferentes concentrações de reagentes foram testados em meios reacionais contendo *tert*-butanol, etanol ou metanol e óleo residual de fritura. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições da reação. O óleo residual de fritura apresentava as seguintes características físico-químicas: umidade 0,37%; índice de iodo

65,7g/100g; matéria insaponificável 0,29g/100g; índice de peróxidos 19,75 mequiv O₂/kg; ácidos graxos livres 1,26%; ponto de fumaça 137°C; extinção específica (232 nm e 270 nm) 71,69 e 3,68 respectivamente. Os principais ácidos graxos presentes no óleo foram o oleico (37,57%); linoleico (34,93%) e palmítico (19,62%). O óleo residual de fritura foi utilizado sem nenhum tratamento preliminar às reações enzimáticas e não causou interferência nas mesmas. Uma conversão de 78% em etil ésteres foi obtida utilizando *Candida rugosa* imobilizada em sílica, a 40°C e 12hs de reação. Com a utilização do suporte polipropileno Accurel MP1000 foi obtido uma conversão de 49,8% de metil ésteres, a 30°C por 12 horas. Para as reações realizadas com as enzimas comercialmente disponíveis foi obtida uma conversão de 100% de metil ésteres utilizando Lipozyme TL IM como biocatalisador, a 50 °C e 16 h de reação. A conversão obtida com a enzima Novozym 435 foi de 99,8% em metil ésteres a 30°C por 16 h. Os resultados obtidos indicaram maior eficiência para a produção de ésteres a partir de lipase de *Candida rugosa* utilizando etanol e sílica como suporte. As enzimas comerciais Lipozyme TL IM e Novozym 435 apresentaram eficiência máxima para a produção de ésteres a partir de metanol.

PALAVRAS-CHAVE: metil e etil ésteres, óleo residual de fritura, *Candida rugosa*, sílica, polipropileno, Novozym 435, Lipozyme TL IM

WEBER, J. Using of waste cooking oil for enzymatic production of ethyl and methyl esters of fatty acid. 2013. Thesis (Ph.D. in Food Science).Program of Post Graduation in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

In this study were investigated two supports (silica aminated and polypropylene – Accurel MP 1000) for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* that was used to the biodiesel production (methyl and ethyl esters) from vegetable oil discarded from the frying process. The biodiesel production was also realized using two commercial immobilized enzymes (Novozym 435 e Lipozyme TL IM). The efficiency of the enzymatic immobilization of *Candida rugosa* lipase was 87.84% for silica and 92.51% for polypropylene Accurel MP1000, at 2.97 and 6.27 mg of protein/g, respectively. To the biodiesel production, different reaction conditions like time (12 and 24 hours) and temperature (30 and 40°C) and different concentrations of reagents were tested in reactional environment with *tert*-butanol, ethanol or methanol and waste frying oil. The response superficial methodology was used to optimize the reactional conditions. The waste frying oil had the following physico-chemical characteristics: water content 0.37%; iodine value 65.7g/100g; unsaponifiable material 0.29g/100g; peroxide value 19.75 meq O₂/kg; free fatty acids 1.26%; smoke point 137°C; and

specific extinction (232 nm and 270 nm) 71.69 and 3.68, respectively. The main fatty acids present in the oil were oleic (37.57%), linoleic (34.93%) and palmitic (19.62%). The wastefrying oil was used without any preliminary treatment and caused no interference in the enzymatic reactions. A yield of 78% ethyl esters was obtained using immobilized *Candida rugosa* lipase into silica, at 40°C an 12 hours of reaction. With the utilization of polypropylene Accurel MP1000 a yield of 49,8% of methyl esters was obtained, at 30°C for 12 hours. To the reactions realized with the commercially available enzymes it was obtained a yield of 100% of methyl esters using Lipozyme TL IM like biocatalyst, at 50°C and 16 hours of reaction. The best result using the support Novozym 435 was 99.8% with the use of methanol at 30 °C for 16 h. These results illustrate the biggest efficiency to the production of esters by *Candida rugosa* lipase using ethanol and silica support. The commercial enzymes Lipozyme TL IM e Novozym 435 showed the maximum efficiency using methanol.

KEY-WORDS: methyl and ethyl esters, waste cooking oil, Novozym 435, Lipozyme TL IM, *Candida rugosa*, silica, polypropylene

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Produção percentual das principais matérias-primas utilizadas para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos (janeiro de 2011 a setembro de 2012)	22
Figura 2 - Reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool (a) equação geral (b) reações consecutivas e reversíveis.....	27
Figura 3 - Reação de hidrólise sequencial de ácidos graxos catalisada por lipase.....	31
Figura 4 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipase.....	33
Figura 5 - Ambiente de reação na ausência e presença de solvente.....	46

Capítulo 2

Figura 1 - Superfície de resposta referente a conversão de etil ésteres em função de etanol e concentração de enzima (A), concentração de etanol e terc-butanol (B) e concentração de terc-butanol e enzima em sílica, a temperatura de 40°C por 12hs.....	71
Figura 2 - Superfície de resposta referente a conversão de metil ésteres em função de metanol e concentração de enzima (A), concentração de metanol e terc-butanol (B) e concentração de terc-butanol e enzima em polipropileno, em temperatura de 40°C por 24hs.....	72

Capítulo 3

Figura 1. Superfícies de resposta da conversão em metil ésteres em função da concentração de metanol e enzima (A), terc-butanol e enzima (B), temperatura e enzima (C), terc-butanol e metanol (D), temperatura e metanol (E) e temperatura e terc-butanol (F) utilizando Lipozyme TL IM, a 50°C por 16 horas. 89

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Comparação entre as vantagens e desvantagens do uso do etanol e metanol na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos...	44
Tabela 2 - Trabalhos realizados com produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos utilizando enzimas imobilizadas.....	49

Capítulo 2

Tabela 1 - Níveis de variação experimental das variáveis independentes	64
Tabela 2 - Condições experimentais de suporte, álcool e temperatura mantidas constantes nos 18 dias de análise para cada experimento realizado (de A a H)	65
Tabela 3 - Caracterização físico-química do óleo de fritura utilizado para a produção de ésteres metílicos e etílicos.....	68
Tabela 4 - Eficiência, quantidade de proteína e atividade da lipase após a imobilização de lipase de <i>Candida rugosa</i> em dois suportes	68
Tabela 5: Conversão em ésteres metílicos e etílico a partir do óleo de fritura com diferentes suportes, polipropileno ou sílica e diferentes condições de reação utilizadas	69

Capítulo 3:

Tabela 1 - Fatores experimentais e níveis das variáveis independentes utilizados	85
--	----

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial de composto central para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos a partir de óleo residual de fritura	85
Tabela 3 – Conversão máxima em ésteres metílicos e etílicos a partir do óleo residual para diferentes condições de reação utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme TL IM em 10g de óleo.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

MME – Ministério de Minas e Energia

OCDE – Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

DOU – Diário Oficial da União

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

PROÁLCOOL – Programa Nacional do Alcool

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SODD – Óleo de soja destilado e desodorizado

FAME – Ésteres metílicos de ácidos graxos

FAEE – Ésteres etílicos de ácidos graxos

RSM – Metodologia de Superfície de Resposta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	17
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO 1.....	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.1. MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS ATRAVÉS DA VIA ENZIMÁTICA.....	20
1.1.1. Óleos e gorduras.....	20
1.1.2. Óleo residual de fritura.....	22
1.2. A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	26
1.3. MEIO REACIONAL PARA ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	31
1.3.1. Lipases.....	31
1.3.1.1 Imobilização de lipases.....	38
1.3.3. Solventes.....	46
1.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	49
CAPÍTULO 2.....	53

Produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos utilizando óleo residual de fritura em lipase imobilizada em sílica gel aminada ou polipropileno.....	53
2.1. INTRODUÇÃO.....	56
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.2.1. Materiais.....	59
2.2.1.1. Matéria-prima.....	59
2.2.1.2 Solução de lipase.....	59
2.2.2. Métodos.....	60
2.2.2.1. Caracterização do óleo residual de fritura.....	60
2.2.2.2. Imobilização da lipase em suporte de sílica ativada.....	61
2.2.2.3. Imobilização da lipase em polipropileno.....	61
2.2.2.4. Ensaio de atividade da lipase.....	62
2.2.2.5. Determinação da eficiência da imobilização e quantificação da proteína aderida ao suporte.....	62
2.2.2.6. Desenho experimental fatorial e otimização de parâmetros.....	63
2.2.2.7. Produção enzimática de metil e etil ésteres.....	65
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
2.3.1. Identidade e qualidade de óleo residual de fritura.....	66
2.3.2. Imobilização em sílica e polipropileno (Accurel MP1000).....	69
2.3.3. Produção enzimática de ésteres metílicos e etílicos.....	70
2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
CAPÍTULO 3.....	79
Utilização do óleo residual de fritura para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos a partir de lipases imobilizadas comerciais.....	79
3.1. INTRODUÇÃO.....	81

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
3.2.1. Materiais.....	84
3.2.2. MÉTODOS.....	84
3.2.2.1. Desenho experimental e otimização de parâmetros.....	84
3.2.2.2. Condições experimentais.....	87
3.2.2.3. Produção enzimática de metil e etil ésteres.....	87
3.2.2.4. Determinação dos metil e etil ésteres de ácidos graxos produzidos.....	87
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	88
3.3.1. Otimização do processo de metanólise e etanólise pela metodologia de superfície de resposta.....	88
3.3.2. Efeito do tempo sobre a conversão média das reações de metanólise e etanólise.....	95
3.4. CONSIDERAÇÕES.....	97
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
5. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
6.1. CAPÍTULO 1.....	103
6.2. CAPÍTULO 2.....	115
6.3. CAPÍTULO 3.....	118

INTRODUÇÃO

Óleos comestíveis, quando usados em frituras, geram um passivo ambiental capaz de causar grandes problemas de poluição, especialmente quando descartado via esgoto doméstico. Diariamente são geradas grandes quantidades de óleo de cozinha nos lares, indústrias e estabelecimentos produtores de refeições no país. O resíduo deste óleo, por falta de informação da população, muitas vezes é descartado de forma inadequada, ou seja, despejado diretamente em águas, como rios e riachos, pias e vasos sanitários, causando danos pelo entupimento de canos e o encarecimento dos processos de tratamento do esgoto, além de poluição do meio aquático devido à formação de filmes oleosos na superfície da água dificultando a troca de gases com a atmosfera (CASTANELLI, 2008).

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

De acordo com Pinto *et al.* (2005), a transesterificação apresenta-se como a melhor e mais simples rota para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em larga escala, com características do diesel derivado de fóssil e sem formação de depósitos em motores. A

transesterificação mais comumente aplicada para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos é a química. Entre as desvantagens da catálise química estão a dificuldade de recuperação do glicerol e sais de potássio e sódio, a necessidade de exclusão do catalisador químico e a natureza energética intensiva do processo (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HA *et al.*, 2007). Uma alternativa para minimizar tais desvantagens seria a utilização de biocatalisadores para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos. Diversos estudos sugerem a transesterificação com enzimas como catalisadoras para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos, utilizando como substratos as mais diversas fontes, tais como óleo de soja (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; DIZGE *et al.*, 2009), arroz (LAI *et al.*, 2005), milho (WANG; WU; ZONG, 2008), girassol (DIZGE *et al.*, 2009) e óleo residual de fritura (DIZGE *et al.*, 2009; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009).

A utilização de biocatalisador para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos apresenta um grande potencial em relação aos métodos químicos, uma vez que nenhuma operação complexa é necessária para recuperação do glicerol ou para eliminação de catalisador. Enzimas do tipo lipases já têm sido utilizadas para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em forma livre ou imobilizadas em diferentes materiais como cerâmicas e sílica (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HA *et al.*, 2007; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009). Os inconvenientes atuais para a esterificação enzimática são o alto custo da enzima comercial e sua curta vida útil (WANG; WU; ZONG, 2008), além da possível inativação pelo metanol

e pelo glicerol produzidos na reação (LI *et al.*, 2006). A imobilização apresenta-se como alternativa para evitar inativação, uma vez que o suporte protege a enzima do solvente desnaturante, pode melhorar a estabilidade térmica, facilita a separação da enzima no meio reacional, permite a reutilização da enzima, aumenta a solubilidade do substrato e diminui custos de produção em relação a processos que utilizem enzimas sem imobilização (MATEO *et al.*, 2007; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HUANG *et al.*, 2010; LEE; LIN; MOU, 2009; KHARRAT *et al.*, 2011; YÜCEL *et al.*, 2011).

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um material determinado, sendo que os métodos de imobilização podem ser divididos em dois grandes grupos: a encapsulação, que pode ser em matriz ou em membrana polimérica; ou a ligação, que pode ser covalente ou por adsorção (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

As pesquisas disponíveis na literatura sobre reações de esterificação enzimática são focadas principalmente na investigação das concentrações adequadas dos diferentes reagentes envolvidos nas reações que proporcionem os melhores rendimentos. Nestes sistemas, o *tert*-butanol é amplamente empregado como solvente, já que oferece bons rendimentos. Estudos de reuso de enzimas são realizados como forma de diminuir custos de produção (ROYON *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008).

Desta forma, sugere-se, no presente trabalho, o aproveitamento do óleo residual de fritura para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos utilizando lipases imobilizadas. Foram utilizadas lipases

provenientes de *Candida rugosa* imobilizadas em dois suportes diferentes (sílica e polipropileno) e as enzimas comerciais (Novozym 435 e Lipozyme TL IM) provenientes, respectivamente, de *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosus*, imobilizadas em resina acrílica e resina macroporosa, respectivamente. Foram testadas diferentes concentrações de reagentes em meios reacionais contendo o solvente *tert*-butanol, etanol ou metanol e óleo de fritura, além de diferentes tempos de reação e temperaturas. A utilização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica e polipropileno são estratégias ainda pouco exploradas pela literatura para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos, principalmente quando se utiliza um óleo de fritura de descarte sem tratamento prévio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Utilizar o óleo residual de fritura para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos por transesterificação enzimática utilizando lipases provenientes de *Candida rugosa* imobilizadas em sílica ou polipropileno e as enzimas comerciais imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme TL IM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o óleo de fritura utilizado através da determinação do seu perfil de ácidos graxos, índice de iodo, índice de saponificação, índice de peróxidos, dienos e trienos conjugados, acidez, umidade, ponto de fumaça, matéria insolúvel em hexano;

- Estudar diferentes suportes (polipropileno e sílica) para a imobilização da lipase proveniente de *Candida rugosa* para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos.

- Otimizar as condições de reação (tempo, temperatura, concentração e tipo de enzima (lipase proveniente de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes e duas enzimas comerciais - Novozym 435 e Lipozyme TL IM) concentração de solvente (*tert*-butanol), razão álcool:óleo e tipo de álcool (etanol, metanol).

- Estudar os efeitos das condições de reação, concentração do solvente, razão álcool:óleo e tipo de álcool sobre a conversão em ésteres etílicos e metílicos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS ATRAVÉS DA VIA ENZIMÁTICA

1.1.1. Óleos e gorduras

Os lipídios inicialmente utilizados como combustíveis renováveis eram constituídos por óleos vegetais ou gorduras animais 100% puros, sem modificação, que trouxeram diversos prejuízos devido à baixa potência de motor, alta viscosidade do combustível, geleificação do óleo lubrificante, estabilidade oxidativa e combustão incompleta, dentre outros. Diversas alternativas foram testadas com o objetivo de diminuir a viscosidade dos combustíveis, como a pirólise da gordura (decomposição térmica a elevadas temperaturas), microemulsões, diluição de óleos com solventes e transesterificação de óleos com alcoóis de cadeia curta para diminuir o tamanho da cadeia de alquil ésteres de ácido graxo (AKOH *et al.*, 2007).

Os maiores componentes de óleos vegetais e gorduras animais são os triacilgliceróis. Quimicamente, os triacilgliceróis são ésteres de ácidos graxos com glicerol. Os triacilgliceróis de óleos vegetais e gorduras animais contêm diferentes tipos de ácidos graxos. Assim, diferentes ácidos graxos podem estar ligados à cadeia do glicerol de óleos vegetais e gorduras animais. Como cada ácido graxo apresenta

propriedades químicas peculiares, o perfil de ácidos graxos é provavelmente o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais (KNOTHE *et al.*, 2006).

Metil e etil ésteres de ácidos graxos podem ser obtidos de diferentes óleos vegetais ou gorduras animais. As propriedades químicas e físicas da matéria-prima estão diretamente associadas ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, à qualidade do produto final (SARAF; THOMAS, 2007). A composição em ácidos graxos das diferentes matérias-primas utilizadas na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos é um dos fatores que influencia diretamente a qualidade do biocombustível produzido. Elevados níveis de ácidos graxos saturados, por exemplo, aumentam a turbidez, o número de cetanos, mas geram metil e etil ésteres de ácidos graxos de boa estabilidade (KNOTHE *et al.*, 2006). Parâmetros de qualidade do óleo podem influenciar na produção do metil e etil ésteres de ácidos graxos e na qualidade final do produto, principalmente quando se utiliza óleo residual de frituras, cuja quantidade de ácidos graxos livres e umidade é elevada e deve ser removida para evitar a formação de sabões nas catálises alcalinas (KASTEREN; NISWORO, 2004). Cvengros; Cvengrosova (2004) recomendam o pré-tratamento de óleo residual de fritura até que valores de 3 mg de KOH/g de óleo e 0,1% de umidade sejam obtidos.

No Brasil, os óleos vegetais mais comumente usados são os óleos de soja, milho, girassol, amendoim, algodão e palma. Outras matérias-primas, que são menos importantes para a cadeia de produtos alimentícios como o pinhão manso, têm sido estudadas. Na Figura 1 são

apresentadas proporções de uso das principais matérias-primas utilizadas no Brasil na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos no ano de 2011 e 2012. Outras matérias-primas, citadas na Figura 1, referem-se à gordura suína, gordura de frango, óleo de canola, óleo residual de fritura e outros materiais graxos (ANP, 2012). Podem ser utilizadas ainda outras matérias-primas não convencionais como óleo de peixe (FELTES *et al.*, 2010), gorduras provenientes de cultivo de micro-organismos (algas, fungos e bactérias) e esgotos urbanos (WUST, 2004; MONDALA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010; WILLSON; WIESMAN; BRENNER, 2010).

1.1.2. Óleo residual de fritura

A utilização dos rejeitos de óleo de fritura oriundos de restaurantes e empresas de gêneros alimentícios apresenta-se como uma alternativa para reciclagem deste contaminante ambiental devido a sua abundância e aos baixos custos. As propriedades dos óleos residuais podem variar em função de diversos fatores e podem influenciar na produção do metil e etil ésteres de ácidos graxos (SHIMADA *et al.*, 2002; TOMASEVIC; SILER-MARINKOVIC, 2003; BOUAID; MARTINEZ; ARACIL, 2007; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; YUAN *et al.*, 2008; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; SUNTHITIKAWINSAKUL, SANGATITH, 2012).

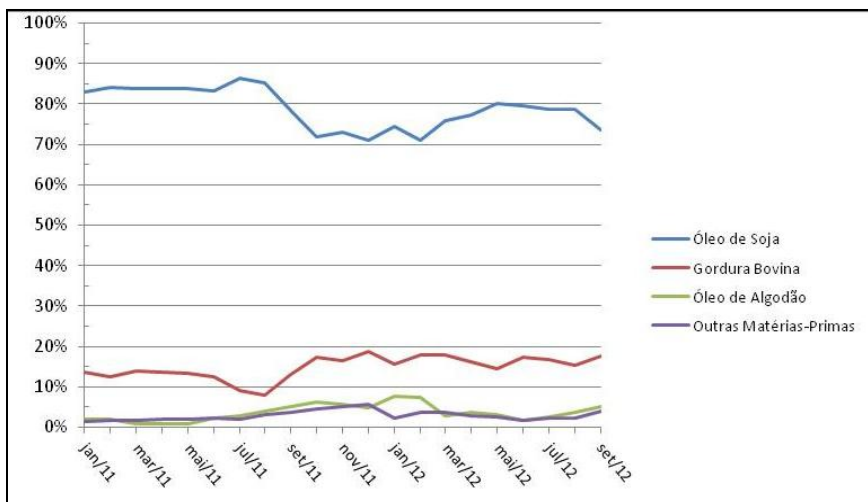


Figura 1 - Percentual das principais matérias-primas utilizadas para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos no Brasil (janeiro de 2011 a setembro de 2012).

Fonte: ANP, 2012.

A fritura por imersão é um método tradicional de preparo de alimentos porque é uma operação rápida e que confere aos alimentos fritos características únicas de saciedade, aroma, sabor e palatabilidade, além de ser economicamente atrativo pelo baixo custo de processamento. A fritura por imersão é um método popular muito utilizado no ambiente familiar, empresas de *fast-food* e indústrias (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ; VELASCO, 2000).

Durante o processo de fritura o alimento é submerso em óleo quente na presença de ar e, assim, é exposto à oxidação interagindo com uma série de agentes (ar, água, alta temperatura e componentes dos alimentos que estão sendo fritos). As alterações que são observadas nos

processos de fritura não dependem apenas das reações de decomposição dos constituintes dos alimentos, matérias-primas e do óleo, mas também das alterações provenientes da interação entre estes constituintes e da grande transferência de massa entre matéria-prima e óleo (DOBARGANES, MÁRQUEZ-RUIZ, VELASCO, 2000). Influencia ainda nas alterações físico-químicas envolvidas no processo de fritura a natureza da matéria-prima e do óleo/gordura, o tempo, a temperatura, aquecimento intermitente ou contínuo, complementação com óleo fresco, uso de filtros e modelo da fritadeira (ZHANG *et al*, 2012). A temperatura recomendada para fritura é de 180°C, embora o que se observe na prática são temperaturas superiores a esta (FIRESTONE, 1993), o que pode levar ao aumento nas alterações indesejáveis nos alimentos fritos e no óleo residual obtido após o processamento.

Dentre as alterações provenientes do processo de fritura há as que são desejáveis como desenvolvimento de cor e sabor atrativos, provenientes de reações de Maillard, e as que são indesejáveis, como perda de nutrientes (carboidratos, proteínas e vitaminas termoláveis), produção de aldeídos, cetonas, acrilamida e ácidos graxos *trans*, hidrólises, isomerização, polimerização (BOSKOU, 2003). A utilização excessiva do óleo de fritura causa ainda o fenômeno de *off-flavor*, formação de espuma, aumento de intensidade de cor e viscosidade do óleo (ZHANG, 2012) e sugere-se que o mesmo seja descartado quando a quantidade de ácidos graxos livres alcançar 0,9%, o teor de compostos polares máximo for de 25% e os valores de ácido linolênico presente forem de até 2% (ANVISA, 2004).

Dentre os métodos analíticos mais utilizados para determinar a rejeição do óleo de fritura, os principais são o teor de compostos polares e de oligômeros de triacilgliceróis (BASTIDA; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2002). Embora, do ponto de vista nutricional, existam outras substâncias prejudiciais ao ser humano que são formadas durante o processamento e armazenamento de óleos comestíveis (TOTANI *et al*, 2008), como o valor de peróxidos. A determinação do valor de peróxidos é um dos parâmetros mais utilizados para assegurar a qualidade dos óleos comestíveis, pois permite que se estime o grau de oxidação dos mesmos (BENDINI *et al*, 2006).

Outro parâmetro importante e bastante utilizado na avaliação da qualidade dos óleos de fritura é a formação de ácidos graxos livres (FFA), uma vez que há um aumento no seu nível à medida que aumenta a degradação do óleo. Em temperaturas de fritura, uma quantidade considerável de umidade dos alimentos é liberada na forma de vapor, que reage com triacilgliceróis que, por hidrólise, formarão ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (PAUL; MITTAL, 1997).

Uma vez constatado que o óleo já não é mais apropriado para consumo, o mesmo não deve ser descartado na rede pública de esgoto, pois provoca impactos ambientais significativos (SABESP, 2011). Os óleos nos esgotos pluviais e sanitários emulsificam-se com a matéria orgânica, ocasionando entupimentos em caixas de gordura e tubulações. Devido à imiscibilidade com a água e inferior densidade, há tendência à formação de filmes oleosos na superfície da água dificultando a troca de gases com a atmosfera, ocasionando depleção das concentrações de

oxigênio e anaerobiose, com morte de peixes e outros organismos aeróbios. Na rede de esgotos, os entupimentos podem ocasionar pressões que conduzem à infiltração do esgoto no solo, poluindo o lençol freático ou havendo refluxo à superfície. Já nos municípios que possuem tratamento de esgoto, o mesmo quando ingressa aos sistemas com resíduos gordurosos dificulta o tratamento, podendo encarecê-lo em até 45% (REIS; ELLWANGER; FLECK, 2007).

Castellaneli (2008), pesquisando alternativas para reciclagem de rejeitos de óleo de fritura, estimou que em uma cidade brasileira da região sul do país com população de 260.000 habitantes haja uma produção média de 50.000 litros mensais de óleo já utilizado. O elevado montante de alimentos fritos que são consumidos diariamente pela população – 0,5 g/dia *per capita* de batata frita, 10,1 g/dia *per capita* de salgados fritos ou assados (IBGE, 2011) – leva a uma grande produção de resíduos de óleo utilizado nos processos de fritura. Atualmente, o destino do óleo residual de fritura, quando corretamente descartado e coletado, é a fabricação de sabões, ração animal e mais recentemente, metil e etil ésteres de ácidos graxos.

1.2. A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

O método tradicional de produção de energia a partir de óleos e gorduras é a transesterificação com alcoóis de cadeia curta, método que resulta na formação de ésteres alquílicos de óleos e gorduras, comumente denominados biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006). A

transesterificação apresenta-se como a melhor e mais simples rota para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em larga escala, com características do diesel derivado de fósseis (PINTO *et al.*, 2005).

O processo comumente utilizado para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos é o processo químico que utiliza catalisadores alcalinos para converter óleos vegetais ou gorduras animais e metanol ou etanol em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos. A reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool apresenta três reações consecutivas e reversíveis. Na primeira etapa ocorre a conversão do triacilglicerol para diacilglicerol, seguido pela conversão do diacilglicerol para monoacilglicerol e do monoacilglicerol para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada etapa. Na Figura 2 (a) pode ser observada a equação geral da reação de transesterificação de triacilgliceróis com álcool e na Figura 2 (b) estão ilustradas as reações consecutivas e reversíveis que sofrem os triacilgliceróis na transesterificação.

Di e monoacilgliceróis são formados como intermediários durante a reação de transesterificação. Em princípio, a reação de transesterificação é uma reação reversível, embora, durante a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos, a reação reversa não ocorra, ou seja, é irrelevante porque o glicerol formado na reação não é miscível no produto, levando a um sistema de duas fases (KNOTHE *et al.*, 2006).

Os catalisadores químicos são os mais utilizados, sendo que os básicos (hidróxido de sódio ou potássio) são os que possuem maior utilização industrial pelo seu baixo custo, principalmente. O ponto negativo de sua utilização é que eles formam sabões, consomem o

catalisador utilizado, diminuindo o rendimento e tornando a purificação e isolamento dos metil e etil ésteres difícil, além de haver alto consumo de energia (AKOH; SWANSON, 1988).

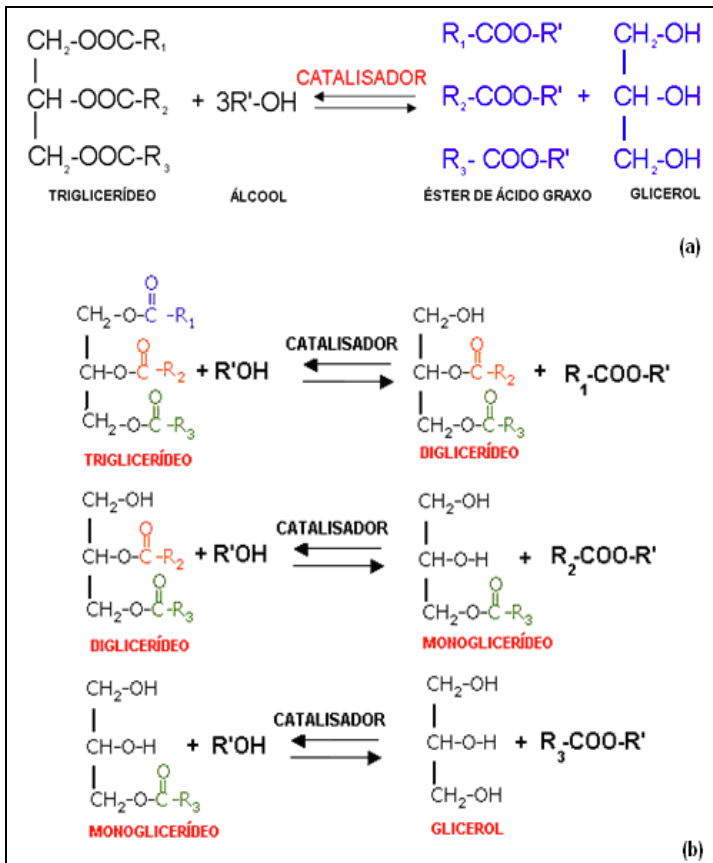


Figura 2 - Reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool (a) equação geral (b) reações consecutivas e reversíveis. Fonte: DORS (2011).

Catalisadores ácidos, como ácido clorídrico, sulfônico e sulfúrico também produzem metil e etil ésteres de ácidos graxos, mas raramente são utilizados por serem corrosivos, pelas reações de transesterificação que catalisam mais lentamente do que as realizadas com bases e pelo baixo rendimento. São mais utilizados em óleos com alto teor de ácidos graxos livres. Na catálise ácida não há a formação de sabão, mas altas temperaturas são requeridas assim como altos níveis de substrato molar (MARCHETTI *et al.*, 2007).

Catalisadores químicos utilizados para a produção industrial de metil e etil ésteres de ácidos graxos fornecem uma conversão do óleo perto de 99% (MITTELBACH; ENZELSBERGER, 1996). Apesar desta alta produtividade, a produção global de metil e etil ésteres de ácidos graxos é relativamente limitada, principalmente devido aos inconvenientes, tais como a necessidade de aplicação de óleos vegetais refinados, os problemas relacionados com a recuperação do glicerol e formação de sabões, mono e diacilgliceróis e pigmentos. A concentração de ácidos graxos livres nos óleos vegetais utilizados na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos deve ser inferior a 0,5%, uma vez que estes diminuem o rendimento de transesterificação (MEHER; SAGAR; NAIK *et al.*, 2006). A necessidade de grandes quantidades de álcool e completa remoção de água também se apresenta como grande desvantagem na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos. Em países produtores de metil e etil ésteres de ácidos graxos, com exceção do Brasil, o álcool está disponível apenas com 95% de pureza e exige desidratação para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos. Este passo aumenta os custos do processo (ANTCZAK *et al.*, 2009).

As reações de transesterificação ou alcoólise podem ser realizadas também mediante o uso de enzimas. Existe um grande interesse na utilização de lipases como biocatalisadores para converter óleos vegetais e gorduras em metil e etil ésteres de ácidos graxos.

Algumas desvantagens referidas nos processos químicos podem ser eliminadas quando lipases são escolhidas como catalisadores na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos. A investigação de métodos alternativos para a produção de ésteres surge da necessidade de reduzir custos com catalisadores, volume gerado de efluente e dificuldades na purificação do produto gerado.

As enzimas são eficientes, altamente seletivas, necessitam de menor consumo de energia (as reações podem ser conduzidas em temperatura ambiente) e produzem menor quantidade de resíduos, sendo, desta forma, ambientalmente favorável (PARK; MORI, 2005). Além das vantagens citadas, as enzimas apresentam ainda a capacidade de reutilização, podendo ser utilizadas diversas vezes, diminuindo o custo de produção do metil e etil ésteres de ácidos graxos. O rendimento da esterificação de ácidos graxos catalisada por lipase é modulado pela razão de substrato (álcool/óleo), tipo de álcool, temperatura da reação, conteúdo de água, pureza dos triacilgliceróis e enzimas (TAN *et al.*, 2010).

1.3. MEIO REACIONAL PARA ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

1.3.1. Lipases

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases, sendo classificadas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3). As lipases são enzimas cuja função biológica é catalisar a hidrólise de ésteres, especialmente triacilgliceróis de cadeia longa em ácidos graxos livres. Esta não é uma definição restrita, uma vez que as lipases podem hidrolisar também gliceróis e ésteres de cadeia curta (menor que 10 átomos de carbono), sendo a hidrólise destes substratos uma atividade característica de esterases (Cf. figura 3) (JAEGER; DIJKSTRA, REETZ, 1999; VILLENEUVE *et al*, 2000; CARVALHO, CAMPOS, NOFFS, 2003).

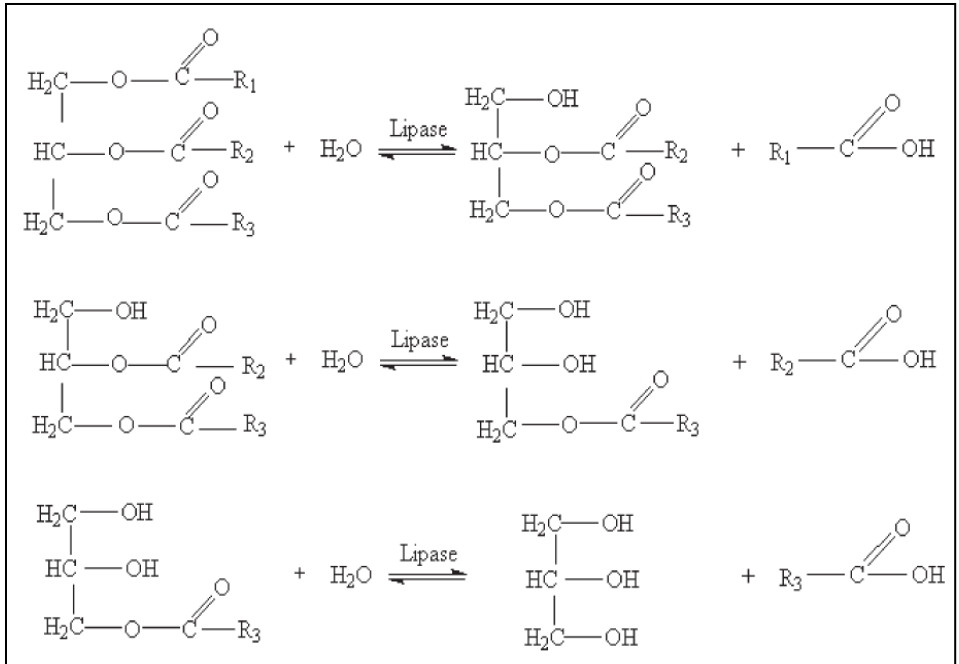


Figura 3 - Reação de hidrólise sequencial de ácidos graxos catalisada por lipase. Fonte: DE CASTRO *et al* (2004).

As lipases são capazes de catalisar diferentes reações, tais como: hidrólise, esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação e alcoólise), aminólise e tiotransesterificação (Cf. figura 4). As lipases estão entre as enzimas hidrolíticas de maior interesse, pois são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Estas enzimas possuem considerável potencial biotecnológico, industrial e significância fisiológica (SHARMA; SINGH, 2001; MOSBAH *et al.*, 2005) devido à existência de alguns fatores como estabilidade em

solventes orgânicos, o não requerimento de cofatores, a especificidade por substratos variados (JAEGER; REETZ, 1998; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A reação de hidrólise é utilizada quando se deseja obter ácidos graxos de triacilgliceróis utilizando a lipase como catalisador. O uso dessa enzima como biocatalisador é atraente, pois a reação se processa em condições brandas de temperatura e pressão, bem como com uma baixa produção de resíduos (VILLENEUVE *et al.*, 2000). A reação de esterificação catalisada por uma lipase pode ser facilitada e ter seus rendimentos aumentados na presença de um solvente orgânico no meio reacional que é geralmente composto pela presença dos substratos (um álcool e um ácido carboxílico), da enzima e de água (que atua como subproduto da reação) (JAEGER; DIJKTRA; REETZ, 1999).

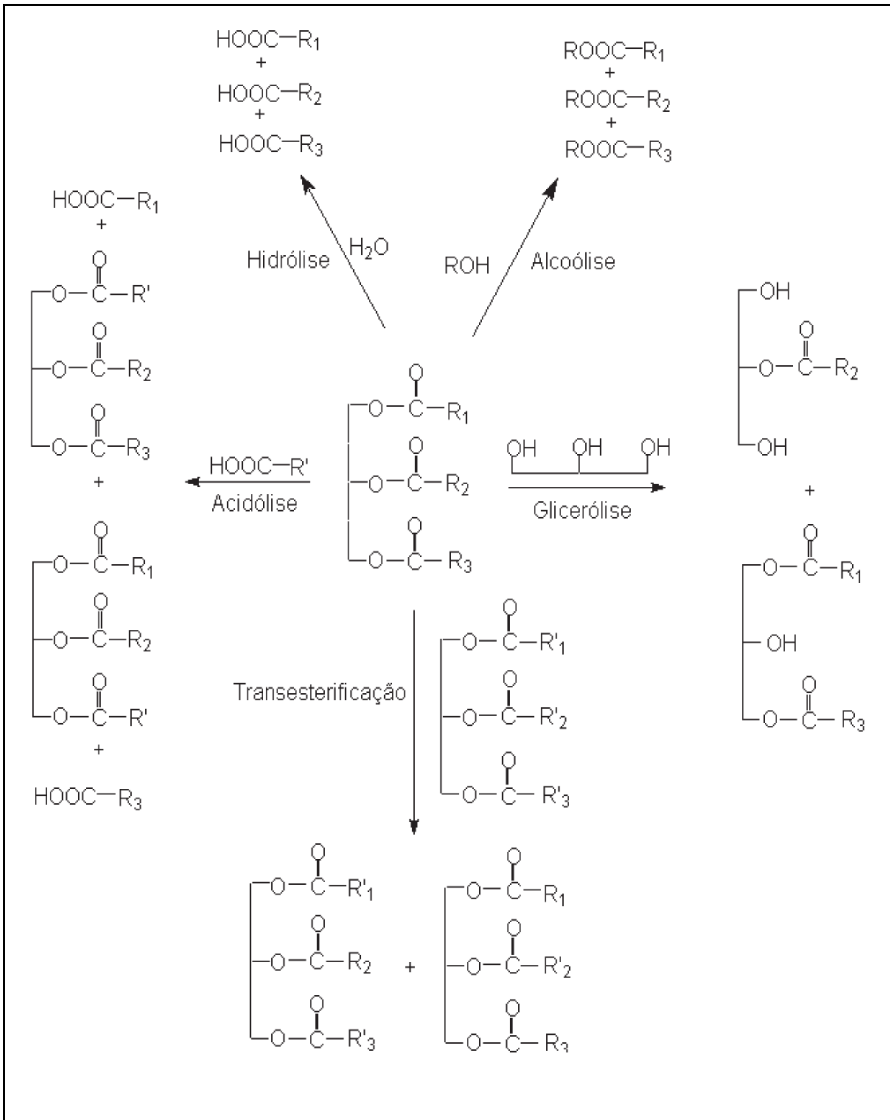


Figura 4 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipase.
 Fonte: DE CASTRO *et al*, 2004.

O teor de água tem um efeito primordial no comportamento das lipases afetando, diretamente, a hidratação da enzima ou, indiretamente,

alterando a natureza do meio de reação (DORS, 2011). A ausência de água elimina a competição da reação de hidrólise. Além disso, a especificidade por substrato, a regioselectividade e a estereoselectividade de uma enzima podem ser controladas variando o meio reacional. Embora os solventes orgânicos usados nestas reações sejam caracterizados como anidros, eles geralmente apresentam traços de água. Este conteúdo de água afeta a atividade da enzima e atua também como um concorrente nucleofílico (GANDHI; SAWANT; JOSHI, 1997). A quantidade de água presente na mistura reacional controla o deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

As enzimas lipolíticas apresentam preferência por compostos insolúveis em água e permanecem adsorvidas na interface óleo/água para hidrólise do substrato, aumentando drasticamente sua ação nesta condição (ARPIGNY; JAEGER, 1999). O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (JAEGER; REETZ, 1998). Segundo Castro *et al* (2004) a presença de uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica não

mostraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica cobrindo seus sítios ativos (JAEGER; REETZ, 1998).

Existem duas categorias principais de biocatalisador enzimático: lipases extracelulares e lipases intracelulares. No caso das lipases extracelulares, a enzima é obtida a partir do caldo de produção dos microrganismos vivos e, em seguida, purificado. Já para as lipases intracelulares, estas permanecem no interior ou nas paredes das células (GOG *et al.*, 2012). As lipases microbianas possuem grande diversidade de atividade catalítica, alto rendimento e baixo custo de produção, bem como a relativa facilidade de manipulação genética (SHU *et al.*, 2010). Além disso, essas enzimas microbianas são relativamente estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores e possuem ampla especificidade de substrato (SAXENA *et al.*, 2003) e também grande potencial catalítico em ambos meios, aquoso e não aquoso (ROUSTAN *et al.*, 2005).

Existe um grande interesse na utilização de lipases como biocatalisadoras para converter comercialmente óleos vegetais e gorduras em FAME e em FAEE como biocombustíveis. As enzimas são mais eficientes, altamente seletivas, necessitam de menor consumo de energia (as reações podem ser conduzidas em temperatura ambiente) e produzem menor quantidade de resíduos, sendo desta forma ambientalmente favorável (PARK; MORI, 2005). No entanto, muitas lipases apresentam baixa estabilidade, baixa atividade ou seletividade e seu custo ainda limita a utilização em larga escala das lipases nativas (TAN *et al.*, 2010).

A enzima comercial Novozym® 435 é uma preparação de lipase de *Candida antarctica* (lipase B) produzida por fermentação submersa de um microrganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*) (Novozymes, 2010a) e imobilizada por adsorção em resina aniônica macroporosa (Lewatit® VP OC 1600, Bayer). Essa preparação de lipase é classificada como não específica e termoestável, podendo ser usada em temperaturas entre 30 a 70 °C. No entanto, para estender a estabilidade operacional, é recomendado trabalhar em temperaturas na faixa de 50 a 60 °C (NOVOZYMES, 2010). Esta lipase é usada na indústria de óleos e gorduras em reações de esterificação e rearranjo de ácidos graxos nos triacilgliceróis. As misturas reacionais típicas compreendem triacilgliceróis, com ou sem ácidos graxos livres. Sua temperatura de reação típica é 70°C (NOVOZYMES, 2010a).

A lipase comercial Lipozyme TL IM, comercializada pela Novozymes, trata-se de uma triacilglicerol lipase 1,3-específica. Ela é extraída do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa do microrganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*. A Lipozyme TL IM é imobilizada em sílica porosa granulada com tamanho de partícula variando entre 300 µm a 1000 µm. A temperatura de utilização recomendada é na faixa de 55°C a 70°C. E a principal utilização da Lipozyme TL IM é na interesterificação de óleos vegetais para produção de margarinas e *shortenings* (NOVOZYMES, 2010b).

A lipase de *Candida rugosa* é uma enzima extracelular, de massa molecular de 60kDa. A *Candida rugosa* lipase é um biocatalisador

versátil, que catalisa a esterificação, hidrólise e transesterificação de triacilgliceróis e de outros ésteres hidrofóbicos (PANDEY *et al*, 1999) e não possui especificidade de posição. A atividade da enzima ocorre em temperatura ótima de 40°C e pH ótimo de 7,5 (SOARES *et al*, 1999).

1.3.1.1 Imobilização de lipases

As lipases têm sido muito utilizadas em reações nas quais solventes orgânicos são utilizados no meio reacional, porém, muitos desses solventes promovem a desnaturação da enzima. A imobilização apresenta-se como alternativa para evitar esta inativação, uma vez que o imobilizante protege a enzima do solvente desnaturante e melhora a estabilidade térmica, pois a torna estruturalmente mais rígida, facilita a separação da enzima no meio reacional e permite a reutilização da enzima, aumenta a solubilidade do substrato e, conseqüentemente, diminui custos de produção (VILLENEUVE *et al*, 2000; MATEO *et al.*, 2007; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; LEE; LIN; MOU, 2009; HUANG *et al.*, 2010; KHARRAT *et al.*, 2011; YÜCEL *et al.*, 2011; KOLLING *et al.*, 2011). Podem ser utilizadas ainda como possibilidade de aumento de atividade, seletividade, estabilidade ou solubilidade enzimática em solventes orgânicos, modificações químicas ou engenharia genética (VILLENEUVE *et al*, 2000).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção das suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (JEGANNATHAN *et al*, 2008). A seleção da

estratégia de imobilização é baseada na eficácia da utilização da enzima, custo da imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedade final desejada do biocatalisador imobilizado (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO, SOLDI 2004; KARRA-CHÂABOUNI, et al. 2008; TAN, et al 2010).

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um suporte sólido insolúvel. Os métodos para imobilizar enzimas são a modificação física através de adsorção física em um material suporte ou confinamento e microencapsulação ou modificação química através de ligação covalente a um material insolúvel, ligação cruzada da lipase a uma matriz por ligação covalente ou formação de ligações cruzadas na matriz da lipase utilizando reagentes bi ou multifuncionais (VILLENEUVE et al, 2000).

Os procedimentos envolvidos na adsorção física são simples, tornando-a um dos métodos mais utilizados para imobilização de enzimas. São fatores importantes na eficiência do processo de adsorção o tamanho da proteína e a sua concentração, a área superficial do adsorvente, a porosidade do suporte e o tamanho do poro (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO, SOLDI 2004). Fatores como características do suporte, grupos reativos e condições de imobilização devem ser selecionados cuidadosamente para que seja possível agregar uma grande quantidade de enzimas no suporte durante a imobilização (MATEO et al., 2007).

Para adsorção de enzimas, os suportes utilizados podem ser classificados de acordo com o material que o compõem, podendo ser orgânicos, como os polímeros sintéticos (álcool polivinílico, polietileno,

polipropileno, poliéster acrílico, monômeros de acrílico, e resinas trocadoras de íons); polissacarídeos (agarose, alginato de cálcio e quitina) e agregados enzima-lipídeos e inorgânicos (vidro, sílica-gel, terra diatomácea e alumina) (VITOLO, 2001).

Para que ocorra uma eficiente imobilização, o suporte deve apresentar características como grande superfície interna; grande quantidade de grupos reativos na sua superfície, sendo que estes grupos devem interagir com grupos posicionados na superfície da enzima; grupos reativos estáveis para permitir longos períodos de reação enzima-suporte; e fácil obtenção de uma superfície inerte depois da imobilização, através da destruição e bloqueio dos grupos reativos que sobraram no suporte sem afetar a enzima (MATEO et al., 2007; KOLLING, 2010). Poros maiores (>100nm) são necessários para que a enzima mantenha a sua eficiência independentemente do tamanho do poro. Em diâmetros de poro inferiores a este, a eficiência da enzima é altamente dependente do tamanho do poro graças a limitações na taxa de difusão dos substratos. Baixas quantidades de grupos reativos podem levar a enzima a diminuir sua atividade, pois a lipase tenta maximizar o contato com a área de superfície disponível e, portanto, pode sofrer alterações conformacionais importantes que conduzem a uma perda de atividade (BOSLEY, 1997).

Suportes hidrofóbicos são melhores quando comparados aos hidrofílicos. A atividade das enzimas imobilizadas no primeiro é maior, assim como a quantidade de enzima adsorvida. Os suportes hidrofílicos tendem a competir pela água durante as reações. Quando a lipase e o suporte são totalmente hidratados, os suportes hidrofílicos levam a um

excesso de água no ambiente de reação da enzima, favorecendo reações hidrolíticas (VILLENEUVE et al., 2000).

A imobilização deve ocorrer em condições que favoreçam a reação enzima-suporte, sendo que as variáveis críticas para este processo são: tempo de reação; pH, que dependendo do suporte e da enzima pode ser tanto neutro quanto alcalino; temperatura, sendo que temperaturas moderadamente altas favorecem a vibração da enzima e do suporte, aumentando as possibilidades de ligação; e presença de inibidores e outros protetores da proteína, a fim de impedir as perdas de atividade (MATEO et al., 2007; KOLLING, 2010).

A utilização de suportes porosos é vantajosa porque a enzima pode ser adsorvida no interior dos poros, desde que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. A grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima permite que ela fique protegida dos efeitos de turbulência externos (DALLAVECCHIA et al. 2004).

Suportes hidrofóbicos podem promover ativação e melhorar a atividade de lipases. Os suportes porosos com grande superfície interna ativada com grupamentos altamente hidrofóbicos poderiam ser reconhecidos por lipases, em nível molecular, como interface sólida (BASTIDA et al. 1998; MARTINI, 2012).

Diversos são os suportes que podem ser utilizados para imobilização de lipases com eficiência, por exemplo: poliestireno-divinilbenzeno microporoso para imobilizar lipase de *C. cylindraceae* (RUCKENSTEIN; WANG, 1993). Também para imobilizar *C. cylindraceae* lipase Tantrakulsiri, Jeyashoke, Krisanangkura (1997)

utilizaram cinza de casca de arroz. Wang et al (2007) utilizaram resina acrílica para imobilizar *Candida antarctica*. Lipase de *Pseudomonas cepacia* foi imobilizada por ligação cruzada em glutaraldeído por Kumari et al (2008). Du et al., (2004) e Wang et al. (2006), resina acrílica para imobilizar lipase produzida de *Candida antarctica*. Yagiz; Kazan; Akin (2007) fizeram uso de hidrocalcita e zeolita para imobilização de lipases.

O suporte polipropileno poroso (Accurel) tem sido usado por muitos grupos de pesquisa para imobilizar diferentes lipases utilizando o método de adsorção (GUPTA et al., 2005; SABBANI; HEDENSTROM; NORDIN, 2006). Accurel é um suporte ideal para imobilizar lipases, pois é hidrofóbico, macroporoso, de baixa densidade e com uma grande área superficial para adsorção, pois apresenta um pequeno tamanho de partícula (BALCAO; PAIVA; MALCATA, 1996; KOLLING et al, 2011). O suporte hidrofóbico

Accurel MP 1000[®] é um polipropileno em pó, de densidade de $1,992 \text{ g.cm}^{-3}$, área de superfície de $55.9855 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ de suporte, tamanho do poro menor que $1500 \text{ }\mu\text{m}$ fornecido pela Accurel Systems (Membrana GmbH, Obenburg, Germany). Kolling et al (2011) utilizaram Accurel MP 1000 para imobilização por adsorção de *Lactobacillus plantarum* e obtiveram bons resultados de atividade enzimática após a imobilização.

A sílica gel é um material extremamente poroso (até 99% para SiO_2), com poros ultrafinos ($<100 \text{ nm}$), com elevada área superficial específica ($500 \text{ a } 1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) e baixa condutividade térmica ($0,014 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$), devido a estas propriedades físico-químicas é considerada como

adequada para imobilizar biocatalisadores (NOVAK et al, 2003; KHARRAT et al., 2011). Kharrat et al, (2011) utilizando sílica gel para imobilizar lipases de *Rhizopus oryzae* observou alta eficiência de imobilização (95%) e potencial de reuso de 11 ciclos, sem diminuição de atividade catalítica. Novak et al, (2011), imobilizou *Candida rugosa* em Tetrametoxisilano por meio de encapsulação para produção de ésteres de ácido butírico utilizando condições supercríticas e obteve sucesso na imobilização e na manutenção da atividade das enzimas após a imobilização.

1.3.2. Alcoóis utilizados para a produção de ésteres de ácidos graxos

Os alcoóis de cadeia curta como metanol e etanol são os mais frequentemente utilizados para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos devido a seu preço e disponibilidade. Além destes, também podem ser utilizados como aceptores acila na produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos, metil acetato (DU et al., 2004), propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol (ANTCZAK et al., 2009), entre outros.

O metanol é o álcool mais estudado e predominantemente utilizado na reação de transesterificação em todo o mundo. O metanol é um álcool tóxico e de origem fóssil (derivado do petróleo) e cerca de 50% do metanol consumido no Brasil é importado. Ele provoca uma inibição enzimática grave e em comparação com outros alcoóis, o desempenho da enzima é tipicamente menor (SALIS *et al*, 2005). A

inativação deve-se à imiscibilidade do álcool com a água, pois a água da estrutura da lipase, que é necessária para as reações, pode ser retirada levando a menor atividade ou inativação (SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003). Várias soluções têm sido apontadas para superar a inativação enzimática pelo metanol. Entre elas a adição progressiva de metanol (CHEN, YING, LI, 2006; LU *et al*, 2007; SOUMANOU, BORNSHEUER, 2003), utilização de acetato de metila ou acetato de etila como receptor acila (DU *et al*, 2004; XU *et al* 2003) e uso de *tert*-butanol como solvente (AKOH *et al.*, 2007).

Uma alternativa interessante para o Brasil é a utilização do etanol obtido da cana-de-açúcar uma vez que o país é o maior produtor mundial do álcool 100% renovável. Além de garantir maior segurança na manipulação devido à sua menor toxicidade (DORS, 2011). No Brasil, apesar do decréscimo na produção e consequente aumento de preço, alguns grupos de pesquisa e pequenos produtores também utilizam o etanol para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos (PINTO *et al*, 2005).

Apesar de muitas pesquisas com etil ésteres de ácidos graxos já terem sido realizadas em diversas partes do mundo, todos os países que produzem metil e etil ésteres de ácidos graxos, o fazem utilizando metanol. Isso ocorre porque na maioria desses países a disponibilidade de etanol derivado de biomassa é bastante reduzida. Assim, entre etanol e metanol fósseis, evidentemente, escolhe-se o metanol por ser mais barato e mais reativo (SILVA; FREITAS, 2008). Na tabela 1 pode ser observado um comparativo entre as vantagens e desvantagens da

utilização do etanol ou metanol na obtenção de metil e etil ésteres de ácidos graxos.

Tabela 1 - Comparação entre as vantagens e desvantagens do uso do etanol e metanol na produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos.

Álcool	Vantagens	Desvantagens
Metanol	<ul style="list-style-type: none"> • O consumo de metanol no processo de transesterificação é cerca de 45% menor que o consumo do etanol anidro. • O preço do metanol é quase a metade do preço do etanol. • É mais reativo. • Para uma mesma taxa de conversão, o tempo de reação utilizando o metanol é menos da metade do tempo de quando se emprega o etanol. • Os equipamentos da planta operando pela rota metílica têm cerca de um quarto do volume dos equipamentos em comparação com a rota etílica, para uma mesma produtividade e qualidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Apesar de poder ser produzido a partir da biomassa, é tradicionalmente um produto fóssil. • É bastante tóxico. • Maior risco de incêndios. Chama invisível. • Transporte é controlado pela Polícia Federal, por se tratar de matéria-prima para extração de drogas. • A capacidade atual de produção brasileira de metanol só garantiria o estágio inicial de programa de âmbito nacional.
Etanol	<ul style="list-style-type: none"> • Produção alcooleira no Brasil já é consolidada. • Produz biodiesel com um maior índice de cetano e maior lubrificidade, se comparado ao biodiesel metílico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Os ésteres etílicos possuem maior afinidade com a glicerina, dificultando a separação. Possui azeotropia quando misturado em água, com isso sua desidratação requer

<ul style="list-style-type: none">•Se for feito a partir de biomassa produz um combustível 100% renovável.•Gera ainda mais economia de divisas.•Não é tóxico como o metanol.•Menor risco de incêndios	<p>maiores gastos energéticos e investimentos com equipamentos.</p> <ul style="list-style-type: none">•Os equipamentos da planta com rota metílica têm cerca de um quarto do volume dos equipamentos em comparação com a rota etílica, para uma mesma produtividade e qualidade.•Dependendo do preço da matéria-prima, o custo de produção de biodiesel etílico pode ser até 100% maior que o metílico.
--	--

Fonte: Adaptado de COSTA; DE OLIVEIRA, 2006.

1.3.3. Solventes

Segundo Royon *et al.*, (2007) os alcoóis de cadeia curta, como o metanol, possuem baixa solubilidade em óleo. Shimada *et al.*, (2002) observaram que esta imiscibilidade do álcool no óleo e também da enzima no mesmo, levam a uma inativação da enzima e consequente diminuição da formação de ésteres. A imiscibilidade dos dois substratos, ou seja, o metanol hidrofílico e o triacilglicerol hidrofóbico resulta na formação de uma interface conduzindo à resistência de transferência de massa. Outro problema é a forte polaridade do metanol, que tende a tirar a água do sítio ativo da enzima levando a desativação. A adição de um solvente orgânico no sistema reacional, conforme pode ser observado na figura 5, pode superar simultaneamente as duas limitações, aumentando

a solubilidade do óleo e metanol no solvente, e limitando a concentração de metanol em torno da enzima (FU; VASUDEVAM, 2009).

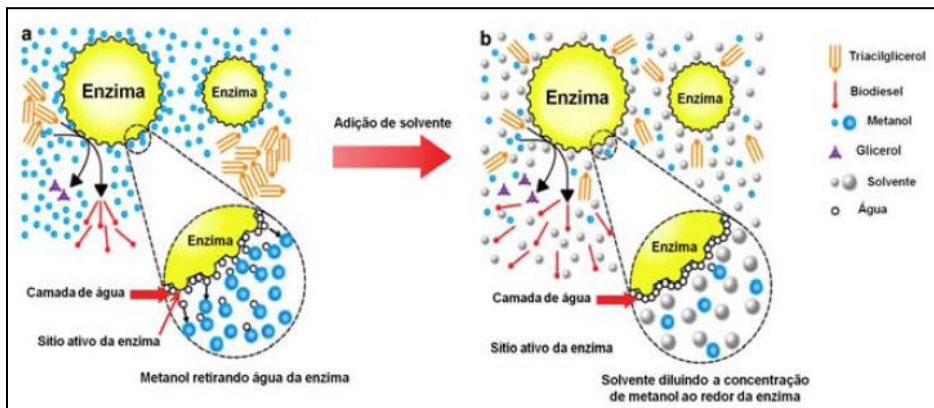


Figura 5 - Ambiente de reação na ausência e presença de solvente
Fonte: DORS, 2011

A produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos catalisada por lipase imobilizada geralmente é realizada em sistemas micro aquosos e o efeito negativo do metanol na atividade da lipase é significativamente reduzido usando algum solvente hidrofóbico como hexano, éter de petróleo ou *tert*-butanol no meio reacional (CHEN; DU; LIU, 2008; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; LI *et al.*, 2006; RAITA; CHAMPREDA; LAOSIRIPOJANA, 2010).

O *tert*-butanol favorece a metanólise e participa pouco como aceptor acila, graças ao impedimento estérico, pois possui três grupos metila laterais, quando comparado ao metanol, que possui um (FU, VASUDEVAN, 2009). Royon *et al* (2007) utilizando *tert*-butanol como

solvente observou que o mesmo dissolve tanto o metanol, quanto o glicerol proveniente das reações de catálise enzimática e não é um substrato para as lipases porque não age como álcool terciário, sendo portanto um excelente solvente. Por outro lado, Dors (2011) observou que o solvente *tert*-butanol é também reagente da reação enzimática, atuando como doador de grupos acil.

O *tert*-butanol, devido a sua polaridade moderada, é capaz de dissolver tanto o álcool quanto o glicerol de modo que os efeitos negativos dos alcoóis de cadeia curta sobre a atividade da enzima e do glicerol formado na reação possam ser eliminados, resultado em rendimentos de reação elevados e estabilidade das lipases (LI *et al*, 2006, ROYON *et al*, 2007, WANG *et al*, 2006). Dors (2011) constatou que o solvente *tert*-butanol, quando utilizado em reações com lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada, evita a separação de fases e não tem influência na velocidade específica de formação de ésteres, no entanto, aumenta o rendimento de ésteres etílicos.

A utilização de solventes orgânicos elimina a necessidade da adição gradual de alcoóis, mas na escolha da sua utilização deve-se considerar os dispendiosos passos de remoção e purificação do produto final do processo de produção (GOG *et al*, 2012). Seria tecnologicamente mais atrativo dispensar o uso de solventes orgânicos e realizar a reação enzimática apenas com a mistura dos materiais de partida. A volatilidade, inflamabilidade e toxicidade dos solventes

orgânicos podem prejudicar a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em escala industrial (ANTCZAK *et al.*, 2009).

1.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDO GRAXO

A produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos pode ser realizada utilizando-se lipases de diversos micro-organismos e em diferentes meios reacionais, nos quais o tipo e a concentração dos substratos e reagentes, assim como o tipo de enzima, vão influenciar diretamente no rendimento das reações. Na tabela 2 pode ser observado o uso de enzimas para produção de metil/etil ésteres de ácido graxo por diversos pesquisadores.

Entre os trabalhos apresentados na tabela 2, pode-se observar que as enzimas imobilizadas comercialmente (Novozym 435 e Lipozyme TL IM) apresentam-se como promissoras para a utilização na produção de metil e etil ésteres de ácido graxo a partir de óleos das mais diversas fontes (WANG *et al.*, 2006; DU; WANG; LIU., 2007; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; DIZGE, KESKINLER, 2008; TAMALAMPUDI *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ-MARTIN; OTERO, 2008). No entanto, os tempos de reação são diferenciados e para óleo de fritura foram necessário até 105 horas de reação para conversão (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007) considerado um tempo longo quando comparado às demais fontes oleaginosas utilizadas (HERNÁNDEZ-MARTIN; OTERO, 2008).

A lipase de *Candida rugosa* também tem sido utilizada para produção de metil e etil ésteres de ácido graxo embora não tenham sido encontrados na literatura trabalhos que utilizaram óleo residual de fritura como substrato, tampouco os suportes utilizados no presente trabalho (sílica e polipropileno) tenham sido relatados para utilização na produção de metil ou etil ésteres (NOVAK *et al*, 2003; MOREIRA *et al*, 2007; SHAO *et al*, 2008). Da mesma forma, sílica e polipropileno microporoso já foram utilizados como suportes para enzimas, inclusive para *Candida rugosa*. No entanto, outros objetivos finais tenham sido traçados e não a obtenção de metil ou etil ésteres (SABBANI; HEDENSTRÖM; NORDIN, 2006).

Tabela 2 - Trabalhos realizados com produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos utilizando enzimas imobilizadas

Lipase testada	Substrato	Condições otimizadas	Rendimento	Referência
Novozym 435	SODD	2 % (m/m) de enzima Novozym 435, 3% (m/m) de Lipozyme TL IM, 40 °C, 3,9:1 (razão molar metanol: óleo), e 150 rpm, 80% <i>terc</i> -butanol (em relação ao peso do óleo)	94% FAME após 24 h	Wang <i>et al.</i> , 2006
Novozym 435	Óleo de soja destilado e desodorizado	4 % (m/m) de enzima, 40 °C, 3:1 (razão molar metanol:óleo),	61% FAME após 12h	Du, Wang, Liu, 2007

Lipozyme TL IM imobilizada em hidrocalcita	Óleo de fritura	150 rpm, sem solvente 9,65g de óleo, 4% de enzima, temperatura ambiente, 1,4g de metanol (razão molar 4:1 metanol:óleo), 200 rpm	92,8 % FAME, após 105 h	Yagiz, Kazan Akin, 2007
Diversas lipases imobilizadas em Sílica-PVA	Óleo de palma	<i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em sílica-poli(vinil álcool), 12g de óleo, 40°C, 18:1 razão molar metanol:óleo, 150 rpm	90,98% FAEE, após 24 h	Moreira <i>et al</i> , 2007
Lipozyme TL imobilizada em poliuretano	Óleo de canola	430µm de enzima imobilizada, 20g de óleo, 40 °C, 180rpm, 3 adições de 1,47g de metanol, 0,1g de água	90% FAME após 24h	Dizge, Keskinler, 2008
Novozym 435	Óleo de pinhão manso	0,2g de enzima, 5g de óleo, 30 °C, 3:1 (razão molar metanol:óleo), 150rpm	75,1% FAME após 60h	Tamalanpudi <i>et al.</i> , 2008
Novozym 435	Óleo de girassol	50 % (m/m) de enzima (em relação ao peso do óleo), 25 °C, 6.5:1 (razão molar álcool/AG), 200 rpm, sem solvente	100% de FAEE e 85% FAME após 24h	Hernández-Martin, Oreto, 2008
<i>Candida</i>	Óleo de colza	45°C, 6% de	63,6% de	Shao <i>et al</i> , 2008

<i>rugosa</i> imobilizada em quitosana		água, 4:1 (razão molar metanol:óleo), 8% de enzima	FAME	
<i>Pseudomonas cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em sílica	Óleos de soja	0,33g e enzima, 20ml de óleo, 30°C	FAME após 72h	Ahn <i>et al</i> , 2011
CRL - <i>Candida rugosa</i> imobilizada em gel de ágar	Óleo de fritura	30-60 mg/0,4g, em gel de ágar, etanol, 35°C	50% após 96h	Costa Neto <i>et al</i> 2002

SODD = óleo de soja destilado e desodorizado

FAME = metil éster de ácido graxo

FAEE = etil éster de ácido graxo

CAPÍTULO 2

Produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos utilizando óleo residual de fritura em lipase imobilizada em sílica gel aminada ou polipropileno

Artigo aceito para publicação na Revista SODEBRÁS.

Produção enzimática de metil e etil ésteres de ácidos graxos utilizando óleo residual de fritura em lipase imobilizada em sílica gel aminada ou polipropileno

WEBER, J.; KOLLING, D. J.; ARISI, A. C. M.; BLOCK, J. M.

RESUMO

No presente trabalho foram estudados dois suportes (sílica e polipropileno) para a imobilização de lipase de *Candida rugosa* para a produção de biodiesel (ésteres metílicos e etílicos) a partir de rejeito de óleo de fritura. Diferentes concentrações de reagentes foram testadas em meios reacionais contendo *tert*-butanol, etanol ou methanol e óleo residual de fritura. O óleo residual de fritura apresentava as seguintes características físico-químicas: umidade 0,37%; índice de iodo 65,7g/100g; matéria insaponificável 0,29g/100g; índice de peróxidos 19,75 mequiv O₂/kg; ácidos graxos livres 1,26%; ponto de fumaça 137°C; extinção específica (232 nm e 270 nm) 71,69 e 3,68 respectivamente. Os principais ácidos graxos presentes no óleo foram o oleico (37,57%); linoleico (34,93%) e palmítico (19,62%). O óleo residual de fritura foi utilizado sem nenhum tratamento preliminar às reações enzimáticas e não causou interferência nas mesmas. A eficiência da imobilização enzimática foi de 87,84% para sílica e 92,51% para polipropileno Accurel MP1000 e em 2,97 e 6,27 mg de proteína/g, respectivamente. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições da reação e o melhor resultado obtido para esterificação enzimática (78% de etil ésteres) foi obtido na reação realizada utilizando-se sílica como suporte, a 40°C durante 12hs de

reação com etanol. O melhor resultado com a utilização de suporte Accurel MP1000 foi 49,8%, com utilização de metanol, a 30°C por 12 horas. Não são necessárias 24 horas de reação para que os melhores resultados sejam obtidos.

PALAVRAS CHAVE: lipase *Candida rugosa*, etil/metil ésteres de ácidos graxos, polipropileno Accurel MP1000, sílica, óleo residual de fritura.

ABSTRACT

In this study two supports (silica and polypropylene) were investigated for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* for the production of biodiesel (methyl and ethyl esters) based on waste frying oil. Different concentrations of reagents were tested in reaction media containing *tert*-butanol, ethanol or methanol and waste frying oil. The waste frying oil had the following physico-chemical characteristics: water content 0.37%; iodine value 65.7g/100g; unsaponifiable material 0.29g/100g; peroxide value 19.75 meq O₂/kg; free fatty acids 1.26%; smoke point 137°C; and specific extinction (232 nm and 270 nm) 71.69 and 3.68, respectively. The main fatty acids present in the oil were oleic (37.57%), linoleic (34.93%) and palmitic (19.62%). The efficiency of the enzymatic immobilization was 87.84% for silica and 92.51% for polypropylene Accurel MP1000, at 2.97 and 6.27 mg of protein/g, respectively. The best results for the enzymatic esterification (78% of ethyl esters) was obtained for the reaction carried out using silica as the support, at 40°C with 12 h of reaction with ethanol. The best result

using the support Accurel MP1000 was 49.8%, with the use of methanol at 30°C for 12 h. A reaction time of 24 h was not required to obtain the best results.

KEY WORDS: *Candida rugosa* lipase, ethyl/methyl esters of fatty acids, polypropylene Accurel MP1000, silica, waste cooking oil.

2.1. INTRODUÇÃO

Existe um interesse mundial crescente pela conservação dos recursos energéticos naturais não renováveis através do desenvolvimento de recursos energéticos alternativos e reciclagem de rejeitos. A procura por combustíveis renováveis tem aumentado muito nos últimos anos, seja devido à preocupação ecológica ou ao preço do petróleo (AKOH et al., 2007). De acordo com Pinto et al. (2005), a transesterificação química é o processo mais utilizado para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em larga escala, com características do diesel derivado de fóssil e sem formação de depósitos em motores. Entre as desvantagens da catálise química estão a dificuldade de recuperação do glicerol e sais de potássio e sódio, a necessidade de exclusão do catalisador químico e a natureza energética intensiva do processo (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HÁ et al., 2007). Uma alternativa para minimizar tais desvantagens seria a utilização de biocatalisadores para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos. Diversos estudos sugerem a transesterificação utilizando enzimas como catalisadores para produção de ésteres de ácidos graxos, utilizando como substratos as mais diversas fontes, tais como óleo de soja

(NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; DIZGE et al., 2009), arroz (LAI et al., 2005), milho (WANG; WU; ZONG, 2008), girassol (DIZGE et al., 2009) e óleo residual de fritura (DIZGE et al., 2009; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009).

Os rejeitos de óleos comestíveis usados em fritura são um sério problema ambiental e o seu descarte no esgoto doméstico causa grandes problemas de poluição. Uma maneira efetiva de reciclar os rejeitos de óleos usados em residências, restaurantes e indústrias é a sua utilização para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos (CHEN; ZONG; WU, 2005). Segundo Watanabe et al (2001); Li et al. (2006); Wang, Wu e Zong (2008); Dizge et al. (2009); Halim, Kamaruddin e Fernando (2009), a utilização de óleo residual de fritura para a produção de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos é uma alternativa promissora para a diminuição dos problemas ambientais causados pelos rejeitos de óleo de fritura e também para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos.

A utilização de biocatalisador para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos apresenta grande potencial em relação aos métodos químicos, uma vez que nenhuma operação complexa é necessária para recuperação do glicerol ou para eliminação de catalisador. Enzimas do tipo lipases já têm sido utilizadas em escala laboratorial para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em forma livre ou imobilizada em diferentes materiais como cerâmicas e sílica (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HA et al., 2007; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009).

Os inconvenientes atuais para a esterificação enzimática para produção de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos são o alto custo

da enzima comercial, e sua curta vida útil (WANG; WU; ZONG, 2008), além da possível inativação pelo metanol e pelo glicerol produzidos na reação (LI et al, 2006). A imobilização apresenta-se como uma alternativa para evitar a inativação, uma vez que o agente imobilizante protege a enzima do solvente desnaturante, melhora a estabilidade térmica, facilita a separação da enzima no meio reacional, permite a reutilização da enzima, aumenta a solubilidade do substrato e diminui custos de produção (MATEO, et al., 2007; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HUANG et al., 2010; LEE; LIN; MOU, 2009; KHARRAT et al., 2011; YÜCEL et al., 2011).

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um material determinado, sendo que os métodos de imobilização podem ser divididos em dois grandes grupos: a encapsulação, que pode ser em matriz ou em membrana polimérica; ou a ligação, que pode ser covalente ou por adsorção física ou iônica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A natureza do suporte é muito importante para a eficiência da imobilização. O polipropileno hidrofóbico (Accurel MP1000) é um suporte que adsorve diferentes lipases através de fortes interações multipontuais entre a enzima e o suporte (SALIS et al, 2008; SABBANI et al; 2006; MONTERO et al, 1993). A sílica gel é um material extremamente poroso com elevadas áreas superficiais específicas que tem sido utilizada para a imobilização de lipases (NOVAK et al 2003; KHARRAT et al, 2011; AHN et al 2011).

No presente trabalho estudou-se a imobilização de lipase de *Candida rugosa* realizada em dois suportes (sílica e polipropileno) para

produção de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos a partir de óleo de rejeito de fritura. Diferentes concentrações de reagentes foram testadas em meios reacionais contendo terc-butanol, etanol ou metanol.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Materiais

2.2.1.1. Matéria-prima

Óleo de fritura doado por uma rede de restaurantes *fast food* foi armazenado sob congelamento (-20°C) durante a pesquisa.

Reagentes químicos: etanol absoluto (99.5° GL), metanol (99.8%) e *terc*-butanol (99.5%) ambos de grau analítico. *Terc*-butanol foi utilizado como solvente. Os suportes utilizados para imobilização foram: sílica gel aminada e polipropileno microporoso (Accurel MP 1000).

2.2.1.2 Solução de lipase

Lipase comercial solúvel do tipo VII de *Candida rugosa* (L1754 – Sigma) foi utilizada. A atividade da enzima foi ≥ 700 U.I./mg . A solução de enzima foi preparada dissolvendo 2 mg de extrato de enzima em 1 mL de 50 mM tampão fosfato, pH 8,0.

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Caracterização do óleo residual de fritura

O óleo residual de fritura foi caracterizado utilizando a metodologia oficial da *American Oil Chemist's Society* (AOCS) que inclui umidade determinada por Karl Fischer (Ca 2e-84), ponto de fumaça (Cc 9a-48), índice de iodo (Cd1-25), matéria insaponificável (Ca 6a-40), valor de peróxidos (Cd 8b-90), ácidos graxos livres (Ca 5a-40), extinção específica (Ch 5-91); composição de ácidos graxos (Ce 1-62). A composição de ácidos graxos do óleo residual de fritura foi determinada por cromatografia gasosa. O óleo foi saponificado em solução de KOH metanólico e esterificado em solução metanólica de H₂SO₄ (Hartman & Lago, 1973). Os ésteres metílicos de ácido graxo (FAME) foram analisados utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu Co (Kyoto, Japan) modelo GC-2010AF, equipado com uma coluna capilar FAMEWAX (30 m x 0,25 mm x 0,1 µm) com detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C. Depois da injeção (1 µl, *split* 80:1) a temperatura da coluna foi mantida a 150 °C por 1 min, então aumentada para 240 °C a 4°C min⁻¹ e mantida nesta temperatura por 6 min. O padrão de ésteres metílicos foi corrido nas mesmas condições e os tempos de retenção obtidos foram utilizados para identificar os ácidos graxos. Os ácidos graxos foram expressos como porcentagem do total de ácidos graxos presentes no padrão.

2.2.2.2. Imobilização da lipase em suporte de sílica ativada

A imobilização da lipase de *Candida rugosa* em sílica gel aminada foi realizada conforme metodologia descrita por Kumari *et al* (2008). A solução foi preparada por refluxo de 5 g de sílica gel em 25 mL de etanolamina (20 min a 50°C e 190 min a 30°C). Posteriormente, a sílica gel foi lavada duas vezes com 60 mL de acetona e seca com ar. A sílica gel foi então ativada utilizando 25 mL 4% (m/v) de glutaraldeído em 50 mM tampão fosfato pH 8,0 com agitação branda a 4°C por 2h. A sílica gel ativada foi primeiramente lavada com 50 mM tampão fosfato pH 8,0 e então com 50 mM tampão fosfato pH 6,5, para que ficasse livre de glutaraldeído.

Para a imobilização, 3 mL de solução de lipase em 50 mM tampão fosfato (pH 8,0) foi misturado com 0,1 mL de Tween 80 e agitado (120 rpm) por 5 min a 24°C, seguido da adição de 0,2g de sílica gel ativada. Posteriormente, 12 mL de acetona gelada foram adicionados e a mistura foi agitada por 30 min a 4°C. A lipase imobilizada em sílica foi filtrada, lavada com 3 mL de acetona gelada, seca em ar e armazenada a 4°C até o momento do uso (KUMARI *et al.*, 2008).

2.2.2.3. Imobilização da lipase em polipropileno

A imobilização em polipropileno foi realizada de acordo com Kolling *et al* (2011). Primeiramente, 0,1 g de Accurel MP 1000 foi tratado com 250 µL de etanol, então foi adicionado 3 mL de solução de lipase em 50 mM de tampão fosfato (pH 8,0), seguido da incubação a

24°C por 18h sob agitação (120rpm). Posteriormente, a lipase imobilizada em polipropileno foi lavada com água, incubada a 30°C por 6 h e armazenada a 4°C.

2.2.2.4. Ensaio de atividade da lipase

Uma solução estoque de 100 mmol/l de p-nitrofenil palmitato (pNPC₁₆) foi preparada em isopropanol e misturada com 50 mM tampão Tris-HCl (pH 8,0), goma arábica 0,1% e Triton X-100 0,4% para obter o tampão da reação contendo 1 mmol/l pNPC₁₆. Para iniciar a reação, 30 mg de suporte contendo a enzima imobilizada foi misturada com 3 ml de tampão da reação a 40 °C por 30 min sob agitação (100 rpm). Para parar a reação, 750 µl de 100 mmol/l Na₂CO₃ foi adicionado e a enzima imobilizada foi separada por centrifugação (5 min, 24 °C). A atividade da enzima foi determinada por quantificação de p-nitrofenol a 410 nm em espectrofotômetro (HITACHI U2910). O branco consistia de tampão da reação contendo o suporte processado sob as mesmas condições.

2.2.2.5. Determinação da eficiência da imobilização e quantificação da proteína aderida ao suporte

Para determinação da eficiência da imobilização foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Ef (\%) = (Co - Cf) \times 100/Co$$

Na qual:

Ef (%): eficiência da imobilização

Co (mg/mL): concentração de proteína inicial (na solução inicial, antes de imobilizar)

Cf (mg/mL): concentração de proteína final (após a imobilização)

Para a quantificação de proteína aderida ao suporte, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$PtI \text{ (mg/g)} = [(Co - Cf) \times Vi] / PS$$

PtI (mg/g): miligrama de proteína imobilizada em cada 1 grama de suporte

Vi (mL): volume da solução de proteína utilizada para imobilização

PS (g): massa do suporte utilizada para imobilização

Em ambos os cálculos, a concentração de proteína inicial e final foi determinada de acordo com Bradford (1976).

2.2.2.6. Desenho experimental fatorial e otimização de parâmetros

A concentração de lipase (1,4% a 5,6% em relação à massa do óleo), concentração de álcool (concentração molar óleo : metanol variando entre 1:6,6 e 1:1,8) e concentração de terc-butanol (12 a 138%

relativo à massa do óleo) foram escolhidos como variáveis independentes, e a produção de etil e metil ésteres como variáveis dependentes. Para este estudo um conjunto de 18 experimentos foi realizado seguindo o experimento fatorial 2^3 (cf. tabela 1).

Tabela 1 - Níveis de variação experimental das variáveis independentes

Variáveis	Símbolo codificado	Níveis de variação				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Enzima (g)	X1	0,14	0,225	0,35	0,475	0,56
Álcool (g)	X2	13,2	20	30	40	46,8
Terc-butanol (g)	X3	1,2	3,75	7,5	11,25	13,8

Os 18 experimentos do desenho fatorial foram repetidos 8 vezes cada (chamados experimento A, B, C, D E, F, ou G) em diferentes dias (cf. tabela 2), e em cada dia de experimento a lipase comercial imobilizada (lipase tipe VII de *Candida rugosa*) foi mantida constante, assim como uma das temperatura praticadas (30 ou 40°C), o tipo de álcool (metanol ou etanol) e o tipo de suporte (polipropileno ou sílica).

Tabela 2 - Condições experimentais de suporte, álcool e temperatura mantidas constantes nos 18 dias de análise para cada experimento realizado (de A a H)

Experimento	Suporte	Álcool	Temperatura
A	Polipropileno	Metanol	30
B	Polipropileno	Metanol	40
C	Polipropileno	Etanol	30
D	Polipropileno	Etanol	40
E	Sílica	Metanol	30
F	Sílica	Metanol	40
G	Sílica	Etanol	30
H	Sílica	Etanol	40

2.2.2.7. Produção enzimática de metil e etil ésteres

As enzimas imobilizadas foram usadas para produção de metil e etil ésteres por transesterificação a partir de óleo residual de fritura, metanol ou etanol. Metil e etil ésteres foram produzidos em frascos de 50 mL com tampa de rosca em agitador orbital (New Brunswick) (200 rpm) a 30°C ou 40°C por 24h, após 12hs de reação o agitador era desligado por 1 min e 500 µl de amostra era removida e congelada, então o agitador era religado. Após 24 h de reação a amostra foi separada da enzima por gravimetria e congelada. No momento das análises cromatográficas as amostras eram descongeladas, o álcool evaporado com nitrogênio, água e hexano eram adicionados e procedia-se uma centrifugação para separação da camada superior que após pesagem era adicionada de metil heptadecanoato, utilizado como padrão

interno para análises cromatográficas (EN14103). As condições reacionais foram otimizadas pela metodologia de superfície de resposta (RSM) (cf. tabela 1).

Uma vez que o experimento foi realizado, foi montado um modelo de segunda ordem com o objetivo de correlacionar a variável resposta (conversão em metil ou etil ésteres) com as variáveis independentes ($p < 0,05$).

Um cromatógrafo a gás Shimatzu (Kyoto, Japan) modelo GC-2010AF equipado com detector por ionização em chama (FID) e uma coluna capilar (RTX-5, 60 m de comprimento x 0,25 mm ID x 0,25 μm de espessura) foram utilizados para as análises. As temperaturas do injetor e detector foram estabelecidas em 310 e 305 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 160 $^{\circ}\text{C}$ por 0,5 min, a mesma foi aquecida até 295 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e mantida nesta por 0,5 min. O volume de injeção foi de 1 μL . A identificação de metil e etil ésteres de ácido graxo foi baseada no padrão de ácidos graxos Supelco 37 Component FAME Mix. A determinação de metil e etil ésteres foi realizada de acordo com a *European standard test method of* EN 14103. A mesma norma foi utilizada para cálculo da conversão das reações, utilizando-se a área total dos picos obtidos por cromatografia gasosa, a área do padrão interno e o peso molecular do óleo e dos ésteres.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Identidade e qualidade de óleo residual de fritura

As características físico-químicas do óleo residual de fritura utilizado como substrato para a reação de transesterificação podem ser observadas na tabela 3. De acordo com os resultados obtidos o óleo apresentou um teor de umidade de 0,37%. Este teor de umidade foi superior ao teor reportado por Yuan *et al.* (2008) de 0,062% de umidade em óleo residual de colza para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos por transesterificação enzimática. Segundo Dizge e Keskinler (2008) a atividade das lipases depende a interface óleo-água e com o aumento na concentração de água, aumenta também a tendência do óleo e da enzima formarem gotas e consequentemente aumenta a área interfacial para a ação da enzima. Noureddini; Gao; Philkana (2005) afirmam que existe um conteúdo de água mínimo necessário para ativar a enzima e que há também um conteúdo ideal (0,5g para reações com metanol e 0,3g para reações com etanol), que permite o mínimo de reações de hidrólise e o máximo de atividade enzimática para reações de transesterificação. Dizge e Keskinler (2008) observaram uma diminuição no conteúdo de metil ésteres em reações com mais de 0,5% de água utilizando óleo de canola como substrato.

O índice de peróxidos (19,75 mEq/Kg), o teor de ácidos graxos livres (1,26%) e o ponto de fumaça (137°C) determinados indicam elevado grau de alteração no óleo residual de fritura utilizado. Estas alterações são esperadas para este tipo de óleo, que é descartado por ser inapropriado para o preparo de alimentos. O óleo residual de fritura não deve ser utilizado quando o teor de ácidos graxos livres ultrapassam 0,9% (BRASIL, 2004). Yuan *et al.* (2008) recomenda que o teor de ácidos graxos livres para produção de metil e etil ésteres de ácidos

graxos com catálise química alcalina deve ser inferior a 2% e que o óleo deve ser pré-tratado para que o valor de acidez seja diminuído.

Tabela 3 - Caracterização físico-química do óleo de fritura utilizado para a produção de ésteres metílicos e etílicos.

Parâmetro	Resultado \pm desvio padrão
Umidade %	0,37 \pm 0,003
Índice de iodo (g/100g)	65,77 \pm 0,36
Matéria Insaponificável (g/100g)	0,29 \pm 0,16
Índice de Peróxido (mEq/Kg)	19,75 \pm 1,01
Ácidos Graxos Livres (%)	1,26 \pm 0,04
Ponto de fumaça, (°C)	137 \pm 3,33
Extinção específica (232 nm)	72,69 \pm 2,22
Extinção específica (270 nm)	3,68 \pm 0,61
Ácidos graxos (%)	
C14:0	0,56 \pm 0,01
C16:0	19,62 \pm 0,18
C16:1	0,38 \pm 0,01
C18:0	4,80 \pm 0,08
C18:1n9t	0,54 \pm 0,01
C18:1	37,57 \pm 0,25
C18:2n6t	0,50 \pm 0,05
C18:2	34,93 \pm 0,1
C18:3	0,34 \pm 0,01
C20:0	0,28 \pm 0,01
C20:1	0,17 \pm 0,01
C22:0	0,31 \pm 0,01

De acordo com os resultados obtidos para o perfil de ácidos graxos o óleo apresentou 37,6% de ácido oleico; 34,9% de ácido linoleico e 19,6% de ácido palmítico. Estes resultados indicam que o óleo é composto de uma mistura de óleo de algodão e palma. O óleo de algodão possui entre 21,4 e 26,4 % de ácido palmítico; 14,7 e 21,7% de ácido oleico e 46,7 e 58,3 % de ácido linoleico. O óleo de palma apresenta entre 40 e 48% de ácido palmítico, 36-44% de ácido oleico e 6,5-12% de ácido linoleico.

2.3.2. Imobilização em sílica e polipropileno (Accurel MP1000)

A eficiência da imobilização da lipase de *Candida rugosa* em polipropileno e sílica foi determinada através do ensaio de atividade da lipase e os resultados obtidos podem ser observados na tabela 4. De acordo com os resultados obtidos 87,8% da enzima foi imobilizada em sílica (2,97 mg de enzima/g de suporte) e, 92,5% em Accurel MP1000 (6,27 mg de enzima imobilizada/g de suporte). Gao *et al.* (2009) reportaram eficiência de imobilização de 7,36 mg de enzima por grama de suporte para lipase de *C. rugosa* imobilizada em sílica gel. Kharat *et al.* (2011) reportaram conversões de imobilização de lipase de *Rhizopus oryzae* em sílica gel de 95%. Dizge *et al* (2009) obtiveram 85% de eficiência de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em uma nova matriz microporosa polimérica em pó. Kolling *et al* (2011) imobilizaram uma esterase recombinante a partir de *Lactobacillus plantarum* em Accurel MP1000 e obtiveram 83% de eficiência de imobilização (12,4mg de proteína/g de suporte). Como as características

da enzima, área superficial do suporte, partícula e tamanho do poro parecem apresentar um importante papel no processo de adsorção, uma grande variação de resultados pode ser obtida (Almeida *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Eficiência, quantidade de proteína e atividade da lipase após a imobilização de lipase de *Candida rugosa* em dois suportes

	Eficiência (%)	Quantidade proteína (mg/g)	Atividade da lipase (U/g)
Sílica gel			
aminada	87,84	2,97	7,0
Accurel			
MP1000	92,51	6,27	36,4

2.3.3. Produção enzimática de ésteres metílicos e etílicos

Os melhores resultados obtidos para cada uma das 8 análises de superfície de resposta foram compilados na tabela 5. De acordo com os resultados obtidos a produção de ésteres utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica gel e Accurel MP1000 variou de 12 a 78,6%. A maior conversão em ésteres (78,6%) foi observada utilizando sílica como suporte, com etanol, temperatura de 40°C, após 12 horas de reação (Figura 1). Uma conversão de 49,8% em ésteres foi observada com a utilização de Accurel MP1000 como suporte para lipase de *Candida*, metanol e temperatura de 30°C por 12 h (Figura 2).

Tabela 5: Conversão em ésteres metílicos e etílico a partir do óleo de fritura com diferentes suportes, polipropileno ou sílica e diferentes condições de reação utilizadas.

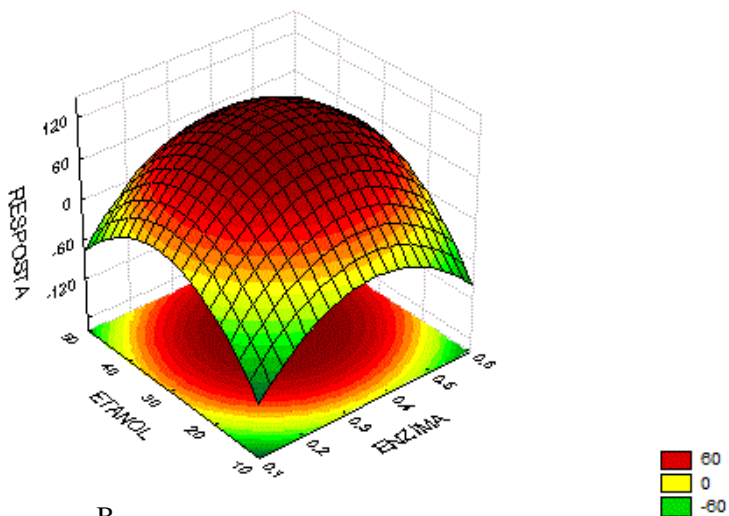
Condições de reação							
Álcool	Suporte enzimático	Temperatura (°C)	Tempo reação (h)	Enzima (g)	Álcool (g)	Solvente (g)	Conversão em ésteres (%)
metanol	polipropileno	30	12	0,475	20	3,75	49,8
metanol	polipropileno	30	24	0,225	40	3,75	32,3
metanol	polipropileno	40	12	0,225	40	3,75	48,8
metanol	polipropileno	40	24	0,225	40	3,75	40,6
etanol	polipropileno	30	12	0,225	20	3,75	27,0
etanol	polipropileno	30	24	0,475	40	3,75	12,0
etanol	polipropileno	40	12	0,225	20	3,75	20,8
etanol	polipropileno	40	24	0,225	20	3,75	35,3
metanol	sílica	30	12	0,225	40	11,25	36,0
metanol	sílica	30	24	0,225	20	11,25	19,8
metanol	sílica	40	12	0,475	40	11,25	38,7
metanol	sílica	40	24	0,35	30	13,8	40,1
etanol	sílica	30	12	0,475	40	3,75	17,0
etanol	sílica	30	24	0,475	20	11,25	27,0
etanol	sílica	40	12	0,475	40	11,25	78,6
etanol	sílica	40	24	0,475	20	11,25	21,9

As figuras 1 e 2 mostram que as superfícies de respostas obtidas foram similares e o teor de etil e metil ésteres aumenta nas concentrações iniciais de reagentes até o valor ótimo e decresce após tê-lo alcançado. Tongboriboon; Cheirsilp; H-Kittikun (2010) imobilizaram *Candida rugosa* em polipropileno microporoso Accurel EP-100 e apresentaram conversão menor que 10% de etil ésteres após 12 horas de reação a 45°C para esterificação de óleo de palma e sem a utilização de solventes. De acordo com os autores a enzima foi inativada pelo etanol. Alcoóis de cadeia curta em excesso, tais como metanol, podem inativar a lipase definitivamente (Dizge; Keskinler, 2008), possivelmente devido ao contato entre lipase e metanol insolúvel, existente no meio na forma de gotas no óleo (Du *et al*, 2004). Tal fato não foi observado no presente trabalho nas reações com etanol, possivelmente devido à presença do solvente *terc*-butanol.

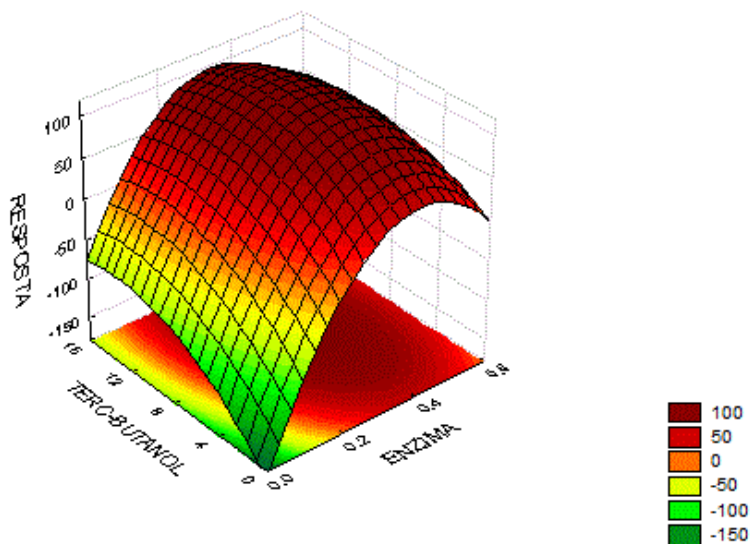
A utilização de solvente melhora a transferência de massa em reações com biocatalisadores uma vez que soluciona o problema da baixa solubilidade dos substratos no meio reacional, com isso diminui o tempo de reações e as possíveis inativações causadas por reagentes, como o metanol ou etanol (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005). Royon *et al* (2007) observaram que o *terc*-butanol não é substrato para lipases, particularmente a *Candida antarctica* lipase. Já Fu e Vasudevam (2009) testaram seis alcoóis superiores (1-propanol, isopropanol, 1-butanol, isobutanol, *terc*-butanol e iso-amilálcool) e segundo estes autores os alcoóis não serviram só como solventes, mas também como aceptores de

grupos acil na reação de alcoólise de triacilgliceróis. Dors (2011) também observou que *tert*-butanol serviu como acceptor acil nas reações de transesterificação enzimática de óleo de palma.

A



B



C

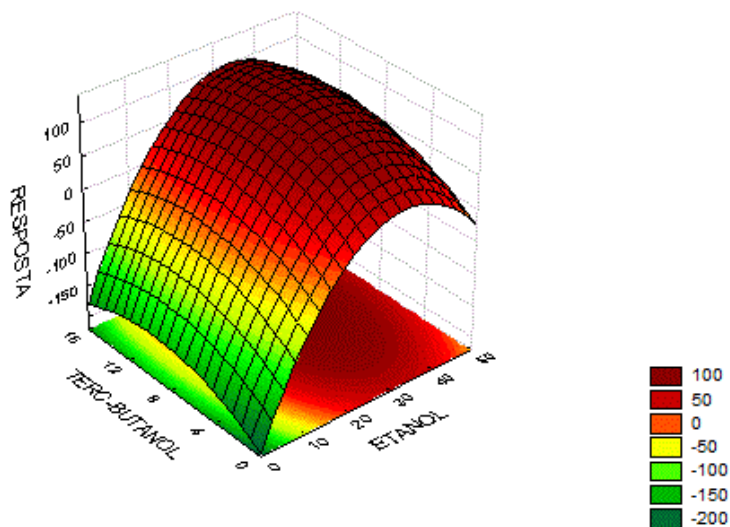
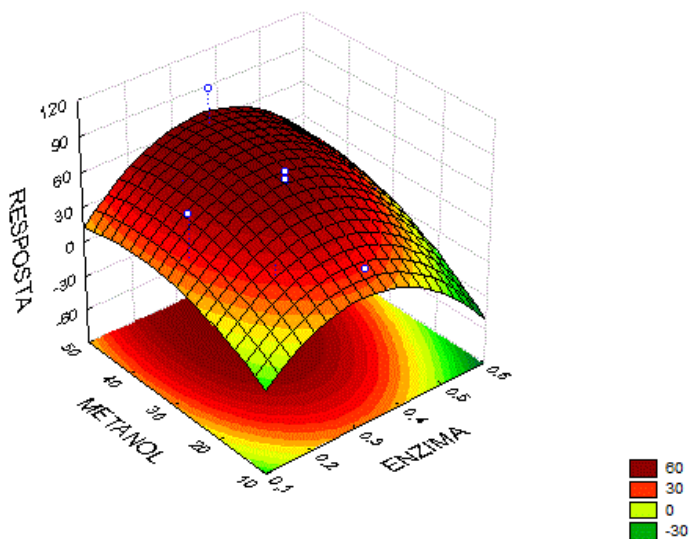
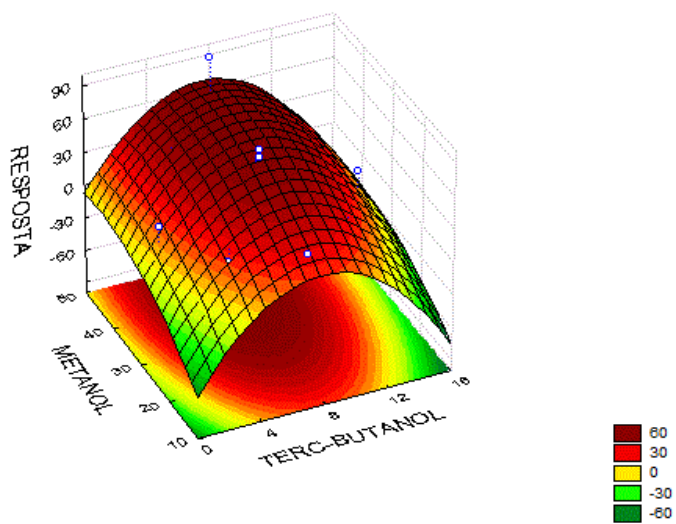


Figura 1 - Superfície de resposta referente à conversão de etil ésteres em função de etanol e concentração de enzima imobilizada em sílica (A), concentração de etanol e terc-butanol (B) e concentração de terc-butanol e etanol (C), à temperatura de 40°C por 12hs.

A



B



C

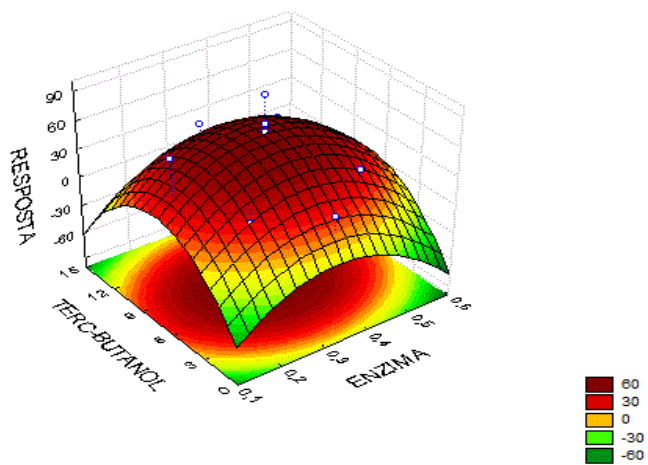


Figura 1 - Superfície de resposta referente à conversão de metil ésteres em função de metanol e concentração de enzima (A), concentração de metanol e *tert*-butanol (B) e concentração de *tert*-butanol e enzima em polipropileno (C), em temperatura de 40°C por 24hs.

Conforme pode ser observado nas figuras 1(B e C) e 2 (B e C), na medida em que a concentração de *tert*-butanol aumenta, a conversão em ésteres também aumenta nas concentrações de etanol e enzima estudadas, sugerindo que não há inibição da atividade enzimática pelo etanol. Esta relação positiva entre o solvente, álcool e enzima também foi observada por Wang *et al* (2006) que utilizou Lipozyme TL IM (de *Thermomyces lanuginosa*) e Novozym 435 (de *Candida antarctica*) para reações de metanólise com SODD (óleo de soja destilado e desodorizado) e observou que com o *tert*-butanol a enzima manteve sua atividade inalterada durante as 12 horas de experimento. O glicerol livre que é um produto da reação de transesterificação e também pode ser um interferente no rendimento das reações, uma vez que pode depositar-se na superfície das enzimas e causar diminuição da formação de metil ésteres após 12 horas de reação (Hernández-Martín e Otero, 2008).

No presente trabalho, pode-se observar que os valores médios de conversão para as reações com os dois diferentes tipos de suporte utilizados no presente trabalho (polipropileno e sílica) foram semelhantes, 33,3% e 34,9%, respectivamente, sugerindo que o tipo de suporte não tenha interferido positivamente na conversão das reações, exceto quando a sílica foi utilizada combinada com etanol a 40°C.

De acordo com Dizge *et al.* (2009) a natureza do suporte pode interferir no sucesso das reações de transesterificação. Diversos estudos

descrevem a produção de ésteres utilizando lipases de diferentes fontes e imobilizadas em diferentes suportes com conversões consideravelmente variáveis (80% e 30%) (Kharrat *et al* 2011). Salis *et al* (2008) utilizando polipropileno macroporoso para imobilizar lipases de *Aspergillus Níger*, *P. cepacia*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, entre outros, obteve diferentes resultados para cada microrganismo diferente. No referido trabalho, *P. fluorescens*, rendeu 58 mol% após 22h de reação e *P. cepacia* 37 mol%. Os mesmos autores observaram que *Candida rugosa* lipase não apresenta nenhuma atividade de metanólise a 40°C com a proporção de metanol:óleo de 8:1. Uma explicação parcial deve-se à atividade hidrolítica de lipases imobilizadas (Salis *et al*; 2008). Kharrat *et al* (2011) utilizando *R. oryzae* imobilizada com sílica aerogel observou uma conversão de esterificação de 80%, sintetizando butil oleato a partir de ácido oleico e butanol (proporção molar de 1:1, após 8 horas de reação). Moreira *et al* (2007) obtiveram conversões de 40 a 50% de ésteres etílicos utilizando lipases obtidas de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescence* imobilizadas em um suporte híbrido de polisiloxano-poli-(vinil álcool).

2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização da metodologia de superfície de resposta, foi possível estimar as melhores condições reacionais para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos embora os valores encontrados estejam abaixo dos esperados. As conversões em metil e etil ésteres variaram de 12 a 78,6%, sendo que o melhor resultado obtido para

esterificação enzimática (78% de etil ésteres) foi obtido na reação realizada utilizando-se sílica gel aminada como suporte, a 40°C durante 12hs de reação com etanol. O melhor resultado com a utilização de suporte Accurel MP1000 foi 49,8%, com utilização de metanol, a 30°C por 12 horas, sendo que em todas as reações não foram necessárias 24 horas de reação para que os melhores resultados sejam obtidos.

CAPÍTULO 3

Utilização do óleo residual de fritura para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos a partir de lipases imobilizadas comerciais

Artigo aceito para publicação na revista Sodebrás

Utilização do óleo residual de fritura para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos a partir de lipases imobilizadas comerciais

WEBER, J.; KOLLING, D. J.; ARISI, A. C. M.; BLOCK, J. M.

RESUMO

No presente estudo duas enzimas imobilizadas comerciais (Novozym 435 e Lipozyme TL IM) foram avaliadas para a produção de biodiesel (metil e etil ésteres de ácido graxo) utilizando óleo residual de fritura. Diferentes concentrações de reagentes foram testadas em meios reacionais contendo *tert*-butanol, etanol ou metanol e óleo residual de fritura. A maior taxa de conversão para a esterificação enzimática (100% de metil ésteres) foi obtido para a reação utilizando Lipozyme TL IM como biocatalisador, a 50°C com 16 horas de reação em meio contendo metanol. A reação utilizando a enzima Novozym 435 em meio contendo metanol a 30°C por 16 h resultou em uma conversão de 99,8% de metil ésteres. Estes resultados demonstram que ambas as enzimas foram apropriadas para a produção de metil utilizando óleo residual de fritura, um resíduo ambiental. E a melhor condição reacional, nas condições estudadas, foi obtida com Lipozyme TL IM.

PALAVRAS-CHAVE: transesterificação enzimática, óleo residual de fritura, Novozym 435, Lipozyme TL IM, metil/etil ésteres.

ABSTRACT

In this study two immobilized enzymes (Novozym 435 e Lipozyme TL IM) were investigated for the production of biodiesel (methyl and ethyl esters) using waste frying oil. Different concentrations of reagents were tested in reaction media containing *tert*-butanol, ethanol or methanol and waste frying oil. The best results for the enzymatic esterification (100% of methyl esters) was obtained for the reaction carried out using Lipozyme TL IM as biocatalyst, at 50 °C with 16 h of reaction with methanol. The best result using the support Novozym 435 was 99,8% with the use of methanol at 30 °C for 16 h. These results illustrate that both enzymes were appropriate for the production of methyl and ethyl esters using waste frying oil, an ambient residue. And the best, in the conditions studied, is Lipozyme TL IM.

KEY-WORDS: enzyme transesterification, waste cooking oil, Novozym 435, Lipozyme TL IM, methyl/ethyl esters.

3.1. INTRODUÇÃO

O óleo diesel é um derivado da destilação do petróleo bruto usado como combustível nos motores a diesel e é constituído principalmente por hidrocarbonetos. No Brasil há predominância do transporte rodoviário, tanto de passageiros quanto de carga e por esta razão o óleo diesel é o derivado de petróleo mais consumido no país. O volume de

óleo diesel vendido em 2009 representou 41% do volume total de derivados de petróleo (BRASIL, 2009).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver energia de forma alternativa, que não utilizem fontes não renováveis, como é o caso do petróleo. Entre as alternativas estudadas para a substituição do diesel os ésteres de óleos vegetais são uma excelente alternativa uma vez que não demandam qualquer modificação nos motores, possuem elevado rendimento energético e reduzem a poluição do ar e a dependência do petróleo (KNOTHE *et al.*, 2005).

A utilização dos rejeitos de óleo de fritura para produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos apresenta-se como uma alternativa para reciclagem deste contaminante ambiental (MOURA *et al.*, 2006; BHATTI *et al.*, 2008; CHUNG, KIM, LEE, 2009; FELTES *et al.*, 2009). No Brasil, parte do óleo utilizado em frituras é destinada à fabricação de sabões e, em menor escala à produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos (COSTA NETO *et al.*, 2000). A maior parte deste tipo de resíduo é descartada na rede de esgotos causando problemas no tratamento da água e diminuindo a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) o que leva a alterações no ecossistema aquático (BARROS *et al.*, 2008).

A transesterificação química utilizando catalisadores ácidos ou básicos é o processo mais utilizado para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em larga escala uma vez que o processo resulta em rendimento elevado em pouco tempo de reação (PINTO *et al.* 2005). No entanto, a rota química convencional tem diversas desvantagens como o elevado consumo de energia, dificuldades de recuperação do

glicerol, a necessidade de remoção dos catalisadores e a necessidade de tratamento dos resíduos. Além disso, os ácidos graxos livres formados e presença de água no óleo interferem negativamente na reação (AL-ZUHAIR, 2005). Existe um grande interesse na utilização de lipases como biocatalisadores para converter óleos vegetais e gorduras em ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos. As enzimas são mais eficientes, altamente seletivas, necessitam de menor consumo de energia (as reações podem ser conduzidas em temperatura ambiente) e produzem menor quantidade de resíduos, sendo desta forma, consideradas mais adequadas do ponto de vista ambiental (PARK; MORI, 2005). Além disso, as lipases toleram certa quantidade de água presente no óleo e aumentam o rendimento das reações por evitar a formação de sabões (DIZGE *et al.*, 2009). No entanto, muitas lipases apresentam baixa estabilidade, baixa atividade ou seletividade e seu custo ainda limita a utilização em larga escala das lipases nativas (TAN *et al.*, 2010).

A imobilização apresenta-se como alternativa para aumentar a estabilidade e a eficiência das enzimas para a produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos uma vez que o composto usado na imobilização pode proteger a enzima do solvente desnaturante, melhora a estabilidade térmica, facilita a separação da enzima no meio reacional, permite a reutilização da enzima, aumenta a solubilidade do substrato e diminui custos de produção (MATEO, *et al.*, 2007; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; HUANG *et al.*, 2010; LEE; LIN; MOU, 2009; KHARRAT *et al.*, 2011; YÜCEL *et al.*, 2011).. Entre as lipases imobilizadas disponíveis comercialmente estão a Lipozyme TL IM (proveniente de *Thermomyces*

lanuginosus, imobilizada em resina acrílica e com especificidade de posição 1-3) e, a Novozym 435 (proveniente de *Candida antarctica*, imobilizada em resina macroporosa e sem especificidade de posição) (NOVOZYMES, 2010).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi otimizar o método enzimático de obtenção de etil e metil ésteres de ácidos graxos utilizando óleo de fritura como matéria-prima.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Materiais

Matéria-prima: óleo de fritura doado por uma rede de restaurantes *fast food* do comércio local. O óleo foi utilizado nas reações sem tratamento prévio e suas características físico-químicas foram reportadas por Weber *et al*, (2013).

Reagentes químicos: etanol absoluto (99,5 %), metanol (99,8%) e *terc*-butanol (99,5%) de grau analítico.

Catalisadores: lipases comerciais imobilizadas Novozym®435 e Lipozyme® TL IM, gentilmente doadas pela empresa Novozymes.

3.2.2. MÉTODOS

3.2.2.1. Desenho experimental e otimização de parâmetros

Para este estudo foi utilizado um fatorial 2^4 com 28 experimentos (tabelas 1 e 2). As condições de reação foram otimizadas pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) (cf. tabela 1).

Tabela 1 - Fatores experimentais e níveis das variáveis independentes utilizados

Variáveis	Símbolo codificado	Níveis dos fatores				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Enzima (g)	<i>X1</i>	0,1	0,225	0,35	0,475	0,6
Álcool (concentração molar óleo:álcool)	<i>X2</i>	10	20	30	40	50
Terc-butanol (g)	<i>X3</i>	0	3,75	7,5	11,25	15
Temperatura (°C)	<i>X4</i>	30	40	50	60	70

Cada desenho experimental foi repetido 4 vezes, 2 experimentos conduzidos simultaneamente utilizando diferentes enzimas (Novozym 435 e Lipozyme TL IM) em 2 reatores com metanol, e em seguida os experimentos foram repetidos com etanol.

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial de composto central para produção de metil e etil ésteres de ácido graxo a partir de óleo residual de fritura

	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X3</i>	<i>X4</i>
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1

3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

X1= enzima ; X2= álcool ; X3= terc-butanol; X4= temperatura

3.2.2.2. Condições experimentais

As reações foram realizadas com 10g de óleo de fritura; concentrações de lipase entre 1% a 6% em relação à massa do óleo; concentração molar de óleo:metanol e óleo:etanol de 1:1 e 1:5; concentração de solvente de 0 a 150% em relação ao peso do óleo e, temperatura 30 a 70 °C.

3.2.2.3. Produção enzimática de metil e etil ésteres

As reações para a produção de metil e etil ésteres foram conduzidas em reator encamisado de 250 mL acoplado a condensador e a banho de água com aquecimento e mantido sob agitação magnética contínua (200 rpm) por 24 h. Após 8 h de reação o sistema foi desligado por 1 minuto e 500 µL de amostra foram removidos e congelados, imediatamente após a coleta a agitação foi religada. Após 24 horas de reação a amostra foi separada da enzima por gravimetria e congelada.

3.2.2.4. Determinação dos metil e etil ésteres de ácidos graxos produzidos

A determinação de metil e etil ésteres foi realizada de acordo com a *European standard test method of* EN 14103 utilizando um cromatógrafo a gás Shimatzu (Kyoto, Japan) modelo GC-2010AF

equipado com detector por ionização em chama (FID) e uma coluna capilar (RTX-5, 60 m de comprimento x 0,25 mm ID x 0,25 μm de espessura). As temperaturas do injetor e detector foram estabelecidas em 310 e 305 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 160 $^{\circ}\text{C}$ por 0,50 min, a mesma foi aquecida até 295 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e mantida nesta por 0,5 min. O volume de injeção foi de 1 μL . A identificação de metil e etil ésteres de ácido graxo foi baseada no padrão de ácidos graxos Supelco 37 Component FAME Mix. Metil heptadecanoato foi utilizado como padrão interno. A normativa EN 14103 foi utilizada para cálculo da conversão das reações, utilizando-se a área total dos picos obtidos por cromatografia gasosa, a área do padrão interno e o peso molecular do óleo e dos ésteres.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. Otimização do processo de metanólise e etanólise pela metodologia de superfície de resposta

A matriz do planejamento fatorial de composto central para produção de metil e etil ésteres de ácido graxo pode ser encontrado na tabela 2. Os resultados experimentais do planejamento fatorial composto central foram aplicados na equação polinomial (eq. 1). A probabilidade *p-value* é baixa (0,000137), indicando a significância do modelo previamente especificado de acordo com a análise de variância (ANOVA). A partir da ANOVA pode-se observar que o modelo

polinomial quadrático foi altamente significativo ($p < 0,0001$) e suficiente para representar a relação entre a variável resposta e as variáveis independentes.

A partir dos 28 experimentos realizados os melhores resultados foram selecionados e as condições de reação e respectivas conversões podem ser observados na tabela 3. A reação utilizando Lipozyme TL IM (3,5% relativo à massa de óleo), metanol (1:5 razão óleo:metanol), *terc*-butanol (75% em relação à massa do óleo), 50°C e tempo de 16 horas apresentou uma conversão em ésteres metílicos de 100%. A escolha da condição reacional ideal levou em consideração o menor tempo de reação, pois tal parâmetro é importante na definição do custo operacional da produção de metil e etil ésteres de ácidos graxos em escala industrial.

Tabela 3 – Conversão máxima em ésteres metílicos e etílicos a partir do óleo residual para diferentes condições de reação utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme TL IM em 10g de óleo.

Condições de reação					Conversão em ésteres (%)
Álcool	Tipo de enzima comercial imobilizada	Solvente <i>terc</i>-butanol (g)	Temperatura (°C)	Tempo de reação (horas)	
metanol	Novozym 435	11,25	60	8	87,73
		3,75	40	16	41,36
		11,25	40	24	99,86
etanol	Novozym 435	11,25	40	8	99,45
		15	50	16	91,74
		3,75	40	24	99,66
metanol	Lipozyme TL IM	3,75	60	8	42,28
		7,5	50	16	100,99
		7,5	50	24	100,02
etanol	Lipozyme TL IM	7,5	50	8	75,07
		3,75	40	16	71,81
		11,25	60	24	58,93

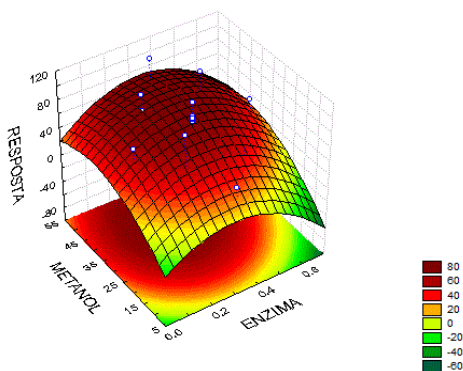
Os resultados para as análises de superfície de resposta que representam os efeitos interativos na forma de gráficos são apresentados na figura 1. A figura 1A apresenta a resposta para a interação dos fatores concentração de metanol e de Lipozyme TL IM. Na figura 1A pode ser observado, como era esperado, que a conversão de metil ésteres aumentou com o aumento da concentração de metanol até um valor máximo (razão molar óleo:metanol, 1:5) e, quando este valor é superado, ocorre uma diminuição na conversão. Shaw *et al* (2008) utilizando variações de concentração de Novozym 435, metanol, óleo de soja e *tert*-butanol, observou que a razão molar ideal para maiores taxas de conversão nas condições estudadas é de, no mínimo, 1:4 de óleo:metanol.

Na figura 1B pode ser observada a resposta para a interação dos fatores concentração de *tert*-butanol e catalisador. A plotagem da superfície de resposta em 3D indica que a produção de metil ésteres aumenta quando a concentração de metanol aumenta, chegando a uma conversão máxima com 75% do teor de *tert*-butanol em relação ao volume do óleo. Concentrações de solvente superiores a 75% provocaram uma diminuição na conversão das reações indicando que nestas condições pode ter ocorrido uma diluição dos substratos (WANG *et al*, 2008). De acordo com Fu e Vasudevam (2009) os solventes como o *tert*-butanol aumentam a solubilidade do óleo e do metanol no solvente da mesma forma que limitam a concentração de metanol em torno da enzima.

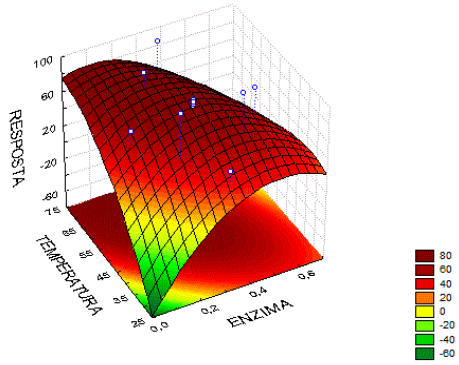
Na figura 1C podem ser observadas as respostas obtidas com a interação das variáveis temperatura e concentração de catalisador.

Embora nenhuma das duas variáveis tenha sido estatisticamente significativa para a conversão das reações é possível observar que com o aumento da temperatura e da concentração de enzima ocorre um aumento na conversão de metil ésteres e que a maior conversão (80% de metil ésteres) ocorre com 3,5% de catalisador em relação à massa de óleo e a 50 °C. Após esta temperatura pode ser observada uma diminuição na conversão das reações. A conversão de metil ésteres em temperaturas superiores a 50°C pode levar à diminuição na conversão por desativação térmica da enzima (SOUZA *et al*, 2009). Embora temperaturas muito baixas possam causar baixas conversões, como foi observado por Hernández-Martín & Otero (2008), que verificaram que a conversão realizada pela Lipozyme TL IM não é completa (taxa de conversão de até 84%) com 7 horas de reação a 25°C e que não há aumento na conversão das reações com o passar do tempo independentemente da condição reacional, sugerindo que a temperatura seja inferior à ideal para a enzima.

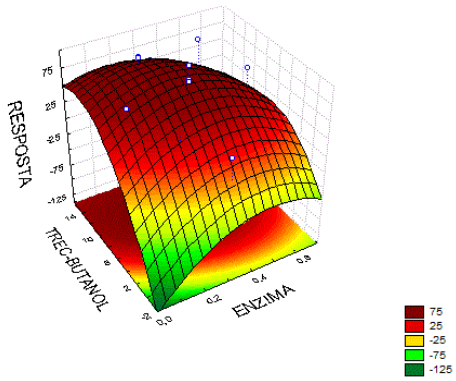
A



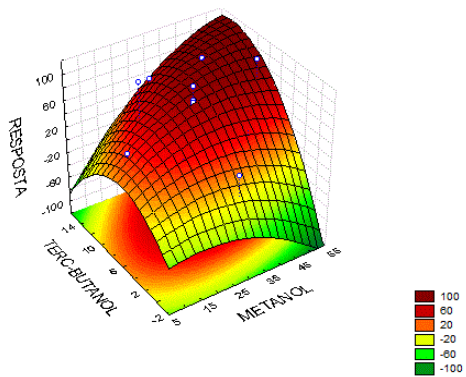
B



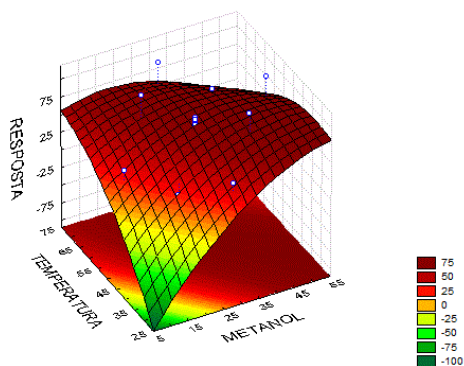
C



D



E



F

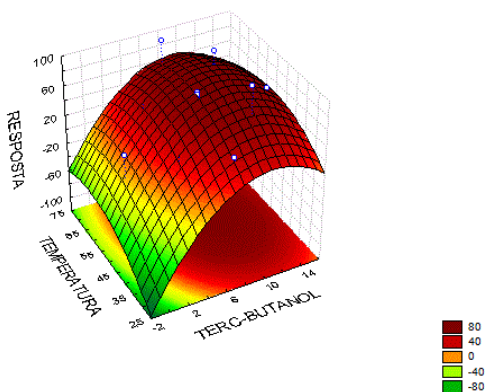


Figura 1. Superfícies de resposta da conversão em metil ésteres em função da concentração de metanol e enzima (A), *terc*-butanol e enzima (B), temperatura e enzima (C), *terc*-butanol e metanol (D), temperatura e metanol (E) e temperatura e *terc*-butanol (F) utilizando Lipozyme TL IM, a 50°C por 16 horas.

Na figura 1D pode ser observado que o aumento da concentração de *terc*-butanol em conjunto com um aumento na concentração de

metanol leva a um aumento significativo na conversão das reações. Tal fato pode ser explicado pelo efeito de diluição que o solvente *tert*-butanol causa no meio reacional, diminuindo o contato da enzima com o metanol em excesso evitando desta forma a inativação que poderia ser causada pelo mesmo (FU; VASUDEVAM, 2009).

A resposta para interação dos fatores temperatura e concentração de metanol está representada na figura 1E e, na figura 1F a resposta para a interação dos fatores temperatura e solvente *tert*-butanol. As superfícies de resposta em 3D indicam que a produção de metil ésteres aumenta quando as concentrações de metanol e da temperatura aumentam, da mesma forma que a taxa de conversão aumenta quando a concentração de *tert*-butanol é elevada. No entanto, um mínimo de solvente (20% em relação à massa de óleo) é necessário para que o efeito da temperatura seja observado sobre uma maior taxa de conversão da reação. As maiores taxas de conversão são observadas na temperatura de 50°C (100%) quando relacionados com concentração de álcool, catalisador e solvente, como pode ser observado nas figuras 1C, 1E e 1F, respectivamente. Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Wang *et al* (2008) utilizando Lipozyme TL IM para produzir metil e etil ésteres de ácidos graxos de óleo residual. Wang *et al* (2008) obtiveram as melhores conversões de 93,7% após 16 horas de reação a 35°C. Os autores observaram que a concentração de enzima e de *tert*-butanol foi significativa para a maior conversão das reações.

3.3.2. Efeito do tempo sobre a conversão média das reações de metanólise e etanólise.

As conversões médias em ésteres foram obtidos após 28 reações com cada uma das 4 condições reacionais (Lipozyme TL IM e Novozym 435 com etanol e metanol). Para as reações com Lipozyme TL IM houve uma diminuição na taxa de conversão média das reações com o passar do tempo, com a utilização de etanol (de 40,6% com 8 horas de reação para 38,9% com 16 horas e, 20,3% com 24 horas de reação). Quando metanol foi utilizado, houve um aumento na conversão média nas primeiras 16 horas de reação (de 11,5% com 8 horas de reação para 48,6% com 16 horas de reação) e uma diminuição na conversão após 24 horas de reação (26,9%).

Para os experimentos com a enzima Novozym 435 a maior taxa de conversão média foi observada quando o etanol foi utilizado (42,86% com 8 horas de reação, 44,27% com 16 horas de reação e 50,64% com 24 horas de reação). Com metanol foi observado uma diminuição significativa na concentração média de metil ésteres após 16 horas de reação (40,9% com 8 horas de reação; 17,8% com 16 horas e 39,5% com 24 horas). O tempo exerce papel importante quando se considera o contato da enzima com etanol / metanol (SHIMADA *et al*, 1999). Du *et al* (2004) observaram uma conversão menor de reações com maior quantidade de metanol e reportam a inativação da Novozym 435 já por 1 equivalente molar de metanol no meio reacional. Wang *et al* (2008) observaram a inativação de Lipozyme TL IM em reações de metanólise de óleo de milho.

Quando o etanol foi utilizado houve um aumento na conversão em ésteres nas reações com Novozym 435 e uma diminuição foi observada quando se utilizou Lipozyme TL IM. Estes resultados estão de acordo com o observado por Hernández-Martin & Otero (2008). De acordo com os autores as enzimas Novozym 435 e Lipozyme TL IM reagem de forma diferenciada na presença de etanol, sendo que a primeira apresenta um crescimento na conversão das reações na medida em que a concentração molar de etanol é aumentada e a segunda, uma diminuição. A Novozym 435 é caracterizada como mais robusta do que a Lipozyme TL IM na presença de alcoóis de baixo peso molecular o que facilita sua habilidade de catalisar reações por um tempo maior sem desativação (HERNÁNDEZ-MARTIN; OTERO, 2008).

Alcoóis de cadeia curta em excesso, tais como metanol e etanol, podem inativar a lipase definitivamente (DIZGE; KESKINLER, 2008). Possivelmente, devido ao contato entre lipase e metanol insolúvel existente no meio na forma de gotas no óleo (DU *et al*, 2004; SHIMADA *et al*, 2002), a produção de glicerol como subproduto das reações ou a agregação enzimática (WANG *et al*, 2008). O grau de inativação que o álcool exerce sobre a enzima é inversamente proporcional ao número de carbonos da cadeia (CHEN; WU, 2003). Dentre as alternativas para diminuir o efeito inibitório do álcool sobre as enzimas imobilizadas podem-se utilizar solventes, como o *terc*-butanol, utilizado no presente trabalho e cujos efeitos positivos já foram relatados; a adição do álcool em etapas sequenciais; e a modificação do receptor acila (SHIMADA *et al*, 2002).

3.4. CONSIDERAÇÕES

Este estudo demonstra que a metodologia de superfície de resposta foi um método adequado para otimizar as condições reacionais a fim de aprimorar a produção de metil e etil ésteres de ácido graxo produzidos com óleo residual de fritura. A conversão em ésteres etílicos e metílicos variam de 41 a 100 %, com o melhor resultado (100% de metil ésteres) obtido na reação conduzida com Lipozyme TL IM. Sob a temperatura de 40 °C foram necessárias 16 h de reação de transesterificação para que a conversão máxima fosse obtida. A razão óleo:metanol de 1:5 e a utilização de *tert*-butanol como solvente (75% em relação à massa do óleo de fritura) foram importantes para o aumento na produção de metil ésteres. Os resultados obtidos indicaram a viabilidade técnica de produção de metil e etil ésteres de ácido graxo a partir de óleo residual de fritura sem tratamento prévio.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível a produção de metil e etil ésteres de ácido graxo a partir de óleo de fritura de descarte sem nenhum tratamento prévio, apesar dos altos valores de peróxidos, ponto de fumaça e ácidos graxos livres presentes.

A metodologia de superfície de resposta mostrou ser uma ferramenta adequada para a otimização de processos de produção de metil e etil ésteres.

A melhor conversão observada para reações com *Candida rugosa* foi de 78% a 40°C e em reação por 12h e, de 49,8% a 30°C por 12h quando a mesma foi imobilizada em sílica e polipropileno (Accurel MP 1000), respectivamente.

Para as enzimas comerciais provenientes de *Candida antarctica* (Novozym 435) imobilizada em resina macroporosa e *Termomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) imobilizada em resina acrílica, as conversões observadas foram de 99,86%, com 112,5% de solvente em relação à massa de óleo, 40°C e 24h de reação e, de 100% com 75% de solvente, 50°C e 16h de reação, respectivamente.

A utilização de solvente *tert*-butanol foi necessária para a obtenção de conversão satisfatórias nas reações de alcoólise nas condições experimentais estudadas.

5. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

A partir da execução desta pesquisa e das considerações delineadas anteriormente, pode-se sugerir, para a continuidade deste trabalho:

1. Avaliar a desSORÇÃO da lipase de *Candida rugosa* dos suportes sílica gel aminada e polipropileno.

2. Realizar ensaio de atividade com a enzima livre para possíveis avaliações de perda de atividade após imobilização.

3. Avaliar o rendimento de glicerina produzido após a transesterificação dos ácidos graxos

4. Caracterizar os metil e etil ésteres de ácidos graxos produzido após a transesterificação.

5. Avaliar se o terc-butanol serve como substrato para as enzimas utilizadas.

6. Avaliar a capacidade de reuso das enzimas imobilizadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1. CAPÍTULO 1

AHN, K.W.; YE, H.S.; CHUN, W.H.; RAH, H.; KIM, S.-G. Yield and component distribution of biodiesel by methanolysis of soybean oil with lipase-immobilized mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Material**, v. 142, p. 37-44, 2011.

AKOH, C.C.; SWANSON, B.G. Base-catalysed transesterification of vegetables oils. **J. Food Process. Preserv.** v.12, p.139-149.1988.

AKOH, C.; CHANG, S.-W.; LEE, G.-C.; SHAW, J.-F. Enzymatic approach to biodiesel production. **J. Agric. Food Chem.** V. 55, p.8995-9005. 2007.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**. v. 343, p.177-183, 1999.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microbial Technology**. v. 18, p. 392-416, 1996.

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

BENDINI, A.; CERRETANI, L.; VECCHI, S.; CARRASCO-PANCORBO, A.; LERCKER, G. Protective effects of extra-virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper

ions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, p.4880–4887, 2006.

BOSKOU, D. Frying fats. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. (Eds.), *Chemical Functional Properties of Food Lipids*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 320–338. 2003.

BOSLEY, J. Turning lipases into industrial biocatalysts. **Biochemistry Society Transactions**. v. 25, p. 174-178, 1997

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**. v. 86. n. 16, p. 2596-2602. 2007.

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

_____. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - **Resolução nº 42**, de 24 de novembro de 2004.

_____. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - **LEI nº 11.097**, de 13 de janeiro de 2005.

_____. Agência Nacional do Petróleo - **Boletim mensal de Biodiesel**. Brasília: out. 2012.

_____. **Decreto nº 76.593** de 14 de novembro de 1975.

_____. Ministério de Minas e Energia. **Matriz energética nacional e mundial**. 2012

_____. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares**, 2008-2009.

CARVALHO, P. O. CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D. A., *et al.* Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos Poliinsaturados. **Química Nova**. v.26, n.1, p.75-80, 2003.

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

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. H. Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 423-429, 2008.

CHEN, G.; YING, M.; LI, W. Enzymatic conversion of waste-cooking oils into alternative fuelbiodiesel. **Appl Biochem Biotechnol**, v.132, p.911-921, 2006.

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

COSTA, B. J.; DE OLIVEIRA, S. M. M. **Dossiê Técnico - Produção de biodiesel.** Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar. 2006.

CVENGROS, J.; CVENGROSOVA, Z. Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. **Biomass Bioenergy**, v. 27, p. 173-181, 2004.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. .G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, vol. 27, n.4, p. 623-630, 2004.

DE CASTRO, H.F; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modification of oils and fats by biotransformation. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**. v.100, p. 1983–1991, 2009.

DOBARGANES, M.C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **European Journal of Lipid Science and Technology** 102, 521–528. 2000.

DORS, G. **Etanolise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel em sistema contínuo.** (Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis – SC, 2011. p. 197.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with diferente acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**.v.30, p. 125-129, 2004.

FELTES, M. M. C.; DORS, G.; SANTOS, A. F.; FURIGO JR., A.; NINOW, J. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel via ethanolysis of chicken fat from processing by-products. **New Biotechnology**, v. 25, p. S277-S277, 2009.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.14, n.6, p.669–677, 2010.

FIRESTONE, D. Worldwide regulation of frying fats and oils. **Information** 4, 1366–1371. 1993.

FU, B. Y.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009.

GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 1995.

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

GUPTA, N.; RATHI, P.; SINGH, R.; GOSWAMI, V. K.; GUPTA, R. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 67, p. 648-653, 2005.

HA, S.H.; LAN, M.N.; LEE, S.H.; WANG, S.M.; KOO, Y.M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enz Microbiol Technol**, v.41, p.480-483. 2007.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and microbial technology**.v. 39, p. 235-251, 2006.

HERNÁNDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p.277-286. 2008.

HUANG, G. H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 16, 396-403. 1998.

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

JEGANNATHAN, K.R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase – a

critical review. **Critical Review Biotechnology**. v. 28, p. 253-264, 2008.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFI, S.; do REGO, A. M. B.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. In press. 2008.

KHARRAT, N.; ALI, Y.B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.-T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v.46, p.1083-1089, 2011.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KOLLING, D.J. **Caracterização bioquímica de duas lipases mutantes de *Staphylococcus xylosus* e de uma esterase de *Lactobacillus plantarum* imobilizada em polipropileno**. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2010.

KOLLING, D. J.; SUGUINO, W. A.; BROD, F. C. A.; ARISI, A. C. M. Immobilization of a Recombinant Esterase from *Lactobacillus plantarum* on Polypropylene Accurel MP1000. **Appl Biochem Biotechnol**. v.163, p.304–312, 2011.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; KUMAR, G. V.; BANERJEE, R. Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free immobilized lipases on cross silica gel. **Bioprocess biosyst Eng**. v. 31, p. 291-298, 2008.

LAI, C. C.; ZULLAIKAH, S.; VALI, S.R.; JU, Y.H. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. **J Chem Technol Biotechnol**.v.80, n.3, p.331–337, 2005.

LEE, C. H.; LIN, T. S.; MOU, C. Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**. v. 4, p. 165-179, 2009.

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

LI, W.; DU, W., LIU, D., YAO, Y. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and *tert*-butanol system. **Biochemical Engineering Journal**.v.41, p.111-115, 2008.

LU, J.; NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida sp.* 99 e 125. **Process Biochem.** v. 42, p.1367-70, 2007.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable sustainable energy rev.** v.11, p.1300-1311, 2007.

MARTINI, V.P. **Caracterização molecular e bioquímica de novas lipases obtidas por prospecção metagenômica com aplicação em biocatálise.** (Tese). Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2012.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ -LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques (Review). **Enzyme and Microbial Technology.** v. 40, p.1451- 1463, 2007.

MEHER, L. C; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews,** v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MITTELBACH, M.; ENZELSBERGER, H. Transesterification of heated rapeseed oil for extending diesel fuel. **Journal of the American Oil Chemists' Society.**v.76, n.5, p.545-550, 1999.

MOREIRA, A.B.R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with

ethano usin lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, p.3689-3694, 2007.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1723, p. 282-291, 2005.

NOVAK, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V.; KNEZ, Z. Silica aerogels as support for lipase catalysed esterifications at sub- and supercritical conditions. **J. Supercrit Fluids**.v.27, p.169-178, 2003.

NOVOZYMES. **Ficha de informação de produto: Novozym 435**. Novozymes, p.2p. 2010.

_____. **Novozym 435, carrier and enzyme leakage studies**. Novozymes, p.3p. 2010a.

_____. **Ficha de informação de produto: Lipozyme TL IM**. Novozymes, p.5p. 2010b.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresour Technol**. v.96, n.7, p.769-777. 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p.119 – 131, 1999.

PARK, E. Y.; MORI, M. Kinetic study of esterification of rapessed oil contained in waste activated bleaching earth using *Candida rugosa* lipase in organic solvent system. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v.37, p.95-100, 2005.

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

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. Biodiesel: an overview. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, n.6B, p.1313-1330,2005.

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

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

ROUSTAN, J.L.; CHU, A.R.; MOULIN, G.; BIGEY, F. A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: expression and characterization of the recombinant enzyme. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.68, p.203-212, 2005.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**. v.98, p.648-653, 2007.

RUCKENSTEIN, E., WANG, X. A novel support for the immobilization of lipase and the effects of the details of its preparation on the hydrolysis of triacylglycerides. **Biotechnology Techniques**. v. 7, p. 117-122, 1993.

SABBANI, S.; HEDENSTROM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size immobilising support material Accurel. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 42, p. 1-9, 2006.

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

n.104. p.24-25, 2011.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 54. p. 19-26, 2008.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. v. 52, p. 1-18, 2003.

SHAO, P.; MENG, X.; HE, J.; SUN, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 283-289, 2008.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B. Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India. **Fuel**, v. 87, n. 8-9, p. 1740-1742, 2008.

SHIMADA, Y.; WATANABA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. v.17, p. 133-142, 2002.

SHU, ZHENG-YU; JIANG, HUAN; LIN, RUI-FENG; JIANG, YONG-MEI; LIN, LIN; HUANG, JIAN-ZHONG. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 1-8, 2010.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o onus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 843-851, 2008.

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; ZANIN, G.N.; MORAES, F.F. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n.79, p. 745-758, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p. 656-660, 2003.

SUNTHITIKAWINSAKUL, A.; SANGATITH, N. Study on the quantitative fatty acids correlation of fried vegetable oil for biodiesel with heating value. **Procedia Engineering**, v.32, p. 219-224, 2012.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.185-189, 2008.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**.v.28, p.628–634, 2010.

TANTRAKULSIRI, J.; JEYASHOKE, N.; KRISANANGKURA, K. Utilization of rice hull ash as a support material for immobilization of *Candida cylindraceae* lipase, **Journal of American Oil Chemistry Society**.v.74, p. 173-175.

TOMAZEVIC, A. V.; SILER-MARINKOVIC. Methanolysis of used frying oil. **Fuel Processing Technology**, v. 81.p.1-6, 2003.

TOTANI, N.; BURENJARGAL, M.; YAWATA, M.; OJIRI, Y. Chemical properties and cytotoxicity of thermally oxidized oil. **Journal of Oleo Science**, v.57, p.153–160. 2008.

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.9, p.113-148, 2000.

VITOLLO, M., Imobilização de enzimas, In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. SCHIMIDELL, W., (eds), *Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v. 3, pp. 391-404, 2001.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with

absorbent present in *tert*-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.43, p.29–32, 2006.

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

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

WILLSON, R. M.; WIESMAN, Z.; BRENNER, A. Analyzing alternative bio-waste feedstocks for potential biodiesel production using time domain (TD)-NMR. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1881-1888, 2010.

WUST, E. **Estudo da viabilidade técnico científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. (Mestrado). Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau. 113 pp. 2004.

XU, Y. Y.; DU, W.; LIU, D. H.; ZHENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnollogy Letters** v.25, p.1239-41, 2003.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A.N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chem. Eng. Journal** v.134, p.262-267, 2007.

YUAN X.; LIU, J.; ZENG, G.; SHI, J.; TONG, J.; HUANG, G. Optimization of conversion of waste rapessed oil with high FFA to biodiesel using response surface methodology. **Renewable Energy**. v.33, p.1678-1684, 2008.

YÜCEL, Y.; DEMIR, C.; DIZGE, N.; KESKINLER, B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola

oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v.35, p.1496-1501, 2011.

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

6.2 CAPÍTULO 2

AHN, K.W.; YE, H.S.; CHUN, W.H.; RAH, H.; KIM, S.-G. Yield and component distribution of biodiesel by methanolysis of soybean oil with lipase-immobilized mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Material**, v. 142, p. 37-44, 2011.

ALMEIDA, R.V.; BRANCO, R.V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C.S.; ALQUERES, S.M.C.; MARTINS, O.B.; ANTUNES, O.A.C; FREIRE, D.M.G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous Polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 531–537, 2008.

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

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Informe Técnico N.11, 5 de Outubro, 2004.

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

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 8, p. 559-564, 2005.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v.100, p. 1983-1991, 2009.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1274-1278, 2008.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D. Lipase-catalyzed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.38, p. 103-106, 2003.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 125-129, 2004.

FU, B. Y.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009.

GAO, S.; WANG, Y.; WANG, T.; LUO, G.; DAI, Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v. 100, p.996-999, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Liposyme TL IM. **Bioresource Technology**, v.99, p. 277-286, 2008.

KHARRAT, N.; ALI, Y.B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.-T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p.1083-1089, 2011.

KOLLING, D. J.; SUGUINO, W.A.; BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Immobilization of a recombinant esterase from *Lactobacillus plantarum*

on polypropylene Accurel MP1000. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 163, p.304-312, 2011.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; KUMAR, G. V.; BANERJEE, R. Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free immobilized lipases on cross silica gel. **Bioprocess biosyst Eng**, v. 31, p. 291-298, 2008.

MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M.; LANDETA, L.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J.M.; RENOBALLES, M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, v.15, p.239, 1993.

MOREIRA, A.B.R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of pal oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

NOVAK, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V.; KNEZ, Z. Silica aerogels as supports for lipase catalyzed esterifications at sub- and supercritical conditions. **The Journal of supercritical fluids**, v. 27, p. 169-178, 2003.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p.648-653, 2007.

SABBANI, S.; HEDENSTROM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size immobilizing support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 1-9, 2006.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward

biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 54, p.19-26, 2008.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 52-59, 2010.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorized distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, 29-32, 2006.

YUAN, X.; LIU, J.; ZENG, G.; SHI, J.; TONG, J.; HUANG, G. Optimization of conversion of waste rapeseed oil with high FFA to biodiesel using response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 33, p. 1678–1684, 2008.

6.3 CAPÍTULO 3

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel from lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetic study. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 5, p. 1442-1448, 2005.

BARROS, A. A.C.; WUST, E.; MEIER, H.F. Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, vol. 13, n. 3, p. 255-262, 2008.

BHATTI, H. N.; HANIF, M. A.; QASIM, M.; REHMAN, A. U. Biodiesel production from waste tallow. **Fuel**, v. 87, n. 13-14, p. 2961-2966, 2008.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v. 86, n. 16, p. 2596-2602, 2007.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo (ANP). **Dados estatísticos mensais**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=14685> acesso em 04 de março de 2010.

CHEN, J. W.; WU, W. T. Regeneration of immobilized *Candida* Antarctica lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioenergy**, v.95, p. 466-469, 2003.

CHUNG, K. H.; KIM, J.; LEE, K. Y. Biodiesel production by transesterification of duck tallow with methanol on alkali catalysts. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, n. 1, p. 155-158, 2009.

COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresour Technology**, v. 100, p. 1983-1991, 2009.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1274-1278, 2008.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 125-129, 2004.

EN/ISO 14105 – European Committee for Standardization/International Organization for Standardization.

FELTES, M. M. C.; DORS, G.; SANTOS, A. F.; FURIGO JR., A.; NINOW, J. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel via ethanolysis of chicken fat from processing by-products. **New Biotechnology**, v. 25, p. S277-S277, 2009.

FU, B. Y.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277-286, 2008.

HUANG, G. H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, G. Biodiesel production by microalga biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

KHARRAT, N.; ALI, Y.B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.-T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p.1083-1089, 2011.

KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. **The Biodiesel Handbook**. Peorla: AOCS Press. 2005.

LEE, C. H.; LIN, T. S.; MOU, C. Y. Mesoporus materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**, v. 4, p. 165-179, 2009.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude na acidified rapessed oils biodiesel production in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1481-1485, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques (Review). **Enzyme Microbiology Technology**, v. 40, p. 1451- 1463, 2007.

MOURA, J. M. L. N.; GONCALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; SOARES, M. D.; RIBEIRO, A. P. B. Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos w-3. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 956-959, 2006.

NOVOZYMES. **Ficha de informação de produto: Novozym 435.**
Novozymes, p. 2. 2010.

PARK, E. Y.; MORI, M. Kinetic study of esterification of rapessed oil contained in waste activated bleaching earth using *Candida rugosa* lipase in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme**, v.37, p. 95-100, 2005.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: an overview. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 6B, p.1313-1330, 2005.

SHAW, J. F.; CHANG, S. W.; LIN, S. C.; WU, T. T.; JU, H. Y.; AKOH, C. C.; CHANG, R. H.; SHIEH, C. J. Continuous Enzymatic Synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 840-844, 2008.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida Antarctica* lipase. **Journal of American Oil Chemistry Society**, p. 789-793, 1999.

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: Enzyme**, v. 17, p.133-142, 2002.

SOUZA, M. S.; AGUIEIRAS, E. C. G.; SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 154, p. 253-267, 2009.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

WANG, Y., WU, H., ZONG, M.H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response

surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7232-7237, 2008.

WEBER, J.; KOLLING, D.J.; ARISI, A.C.M.; BLOCK, J.M. Enzymatic production of methyl/ethyl esters from frying oil using lipase immobilized in silica and polypropylene. **Revista SODEBRAS**, 2013. NO PRELO.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A.N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemistry Engeneering Journal**, v. 134, p. 262-267, 2007.

YÜCEL, Y.; DEMIR, C.; DIZGE, N.; KESKINLER, B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 1496-1501, 2011.