

Jacqueline Rodrigues Pires da Silva

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE
GORDURA SUÍNA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Miller

Co-orientadores: Prof. Dr. Agenor Furigo
Junior

Dr. Lindomar Alberto Lerin

Florianópolis
2014

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

Silva, Jacqueline Rodrigues Pires da
Produção de ésteres etílicos a partir de gordura de suíno
/ Jacqueline Rodrigues Pires da Silva ; orientador, José
Miguel Muller - Florianópolis, SC, 2014.
82 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Gordura de suíno. . 3.
Etanol. 4. Lipozyme TL IM.. 5. Ésteres etílicos.. I. Muller,
José Miguel. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Dedico aos meus pais Pedro e Angela, e a minha
irmã Jessica pela dedicação, compreensão e pela
força que me deram para a realização de um
sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo em todos os momentos, por me dar direções para seguir quando eu tive dúvidas não me deixando desanimar. Por me dar saúde, sabedoria e força.

Aos meus pais Angela e Pedro, que fizeram de tudo para que eu estivesse aqui, que ao verem meu desânimo me incentivava dizendo que eu era capaz, lembrando que estarão sempre comigo. As minhas irmãs, Luciana, Lorena, Lilian e Jessica, em especial a Jessica que sempre esteve presente me falando calma que tudo ia da certo no final.

A minha prima Thereza Cristina, a minha amiga Brenda e Valéria que fizeram parecer que a distância entre o Tocantins e Santa Catarina não era grande.

Ao meu orientador José Miguel, e aos coorientadores Agenor e Lindomar que confiaram em mim, se dedicaram ao meu trabalho e à me repassar seus conhecimentos.

Aos meus amigos Angelise, Bianca, Claudia, Flávia, Giuliano, Helmut, Isadora, Laura, Luciana, Marla e Roberta.

Aos meus amigos e colegas do Engebio, Andréia, Denise, Gabrielli, Kelin, Kellen, Jean, Maria José, Rosana, Jonatha, Wiaslan. Em especial a Claudia, Daniela e Eliane que estiveram me passando toda a sua experiência de laboratório.

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram e se dedicaram a esse projeto, Alice, Nicole e Pedro.

A CAPES e PGEAL-UFSC pelo apoio financeiro e de infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma estiveram presente na minha caminhada.

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.”

Chico Xavier

RESUMO

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e esgotáveis, e causam danos ambientais, sendo estes, os motivos para a utilização de fontes alternativas de energia. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de ésteres etílicos por rota enzimática utilizando gordura de suíno e etanol como substratos e a enzima Lipozyme TL IM como catalisador. A produção dos ésteres etílicos foi realizada em modo batelada e foi estudada a cinética de reação durante 24 horas para determinar o tempo que seria utilizado nos planejamentos experimentais (18 h). A partir dos estudos preliminares foi realizado um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para 12 ensaios, 5 variáveis e 2 níveis, com triplicata do ponto central. As variáveis estudadas na produção enzimática de ésteres etílicos foram a temperatura de reação (50, 60 e 70 °C), a concentração de derivado enzimático (5-15 % m/m), a concentração de água (5-15 % m/m), o volume do solvente (4-12 mL) e a razão molar entre a gordura de suíno e o etanol (1:3-1:6). Depois de observadas as variáveis significativas e não significativas realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. A melhor conversão (82,35 %) foi obtida no experimento com razão molar gordura de suíno:etanol de 1:6, concentração de água de 5 % m/m e concentração de derivado enzimático de 15 % m/m. Finalmente, para verificar a melhor condição encontrada no planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado um estudo cinético nas temperaturas (35, 45 e 55 °C), concentração de água de 5 e 10 % m/m e concentração de derivado enzimático de 10 e 15 % m/m, e as melhores condições encontradas foi na temperatura de 45°C, na concentração de água de 5 % e na concentração de derivado enzimático de 15 % com uma conversão de 88,35 %. Diante disto, a produção enzimática de ésteres etílicos a partir da gordura suína mostrou um processo sustentável e com grande potencial para ser aplicado nas indústrias de biodiesel, sendo esta uma boa opção para a valorização deste subproduto da indústria suína.

Palavras-chave: Gordura de suíno. Etanol. Lipozyme TL IM. Ésteres etílicos.

ABSTRACT

Most of all energy consumed in the world comes from sources such as petroleum, coal and natural gas. Due to these sources are limited, exhaustible and have caused environmental damage, alternative energy sources are being studied and used. The present work aimed to evaluate the production of ethyl esters via enzymatic transesterification using swine fat and ethanol as substrates and the enzyme Lipozyme TL IM as catalyst. Esters were produced in batch mode and reaction kinetics was studied along 24 hours to determine the time to be used in the experimental designs (18 h). First, it was used a Plackett-Burman experimental design for 12 runs and 5 two-level variable, with triplicate of the center point. The variables assessed for the enzymatic production of ethyl esters were reaction temperature (from 50 to 70 °C), enzyme concentration derivative (from 5 to 15 wt%), water concentration (from 5 to 15 wt%), solvent volume (from 4 to 12 mL) and swine fat to ethanol molar ratio (from 1:3 to 1:6). Afterwards, with the significant factors, it was set a full factorial design 2^3 with triplicate of center points (summing 11 runs). The highest conversion (82.35 %) was obtained at 1:6 swine fat to ethanol molar ratio, 5 wt% water concentration and 15 wt% enzyme concentration derivative. Finally, to verify the optimal condition found, reaction kinetics were studied at temperatures of 35 °C, 45 °C e 55 °C, water concentrations of 5 and 10 wt% and enzyme concentration derivative of 10 and 15 wt%, and the best conditions were found at 45 °C at a water concentration of 5% and concentration of enzyme derived from 15% with a conversion of 88.35 wt%. From the results obtained it can be concluded that the enzymatic production of ethyl esters from swine fat showed great potential that can be explored by biodiesel industries, also, this usage of swine fat is a good alternative to improve its economic value.

Keywords: Swine fat. Ethanol. Lipozyme TL IM. Ethyl esters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção do biodiesel na União Europeia de 1998 – 2011.	27
Figura 2: Produção de biodiesel no mundo em 2011.	28
Figura 3: Evolução mensal da demanda compulsória, da produção e da capacidade nominal autorizada pela ANP no País.	29
Figura 4: Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.	31
Figura 5: Equação geral da transesterificação de um triglicerídeo... ..	32
Figura 6: Incubadora Shaker com agitação orbital utilizado para a produção de biodiesel com gordura de suíno.	43
Figura 7: Fluxograma de produção de éster etílico em escala laboratorial	44
Figura 8: Conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática de gordura suína, 10 % (m/m) de água, razão molar gordura suína e etanol de 1:6, 20 % (m/m) de derivado enzimático (Lipozyme TL IM) e 8 mL de hexano, na temperatura de 50°C e agitação de 180 rpm.	50
Figura 9: Diagrama de Pareto para a produção enzimática de ésteres etílicos utilizando a lipase Lipozyme TL IM e gordura suína, em diferentes concentrações de água (5 %, 10 % e 15 % m/m) concentração de derivado enzimático (5 %, 10 % e 15 % m/m), razão molar de 1:3, 1:6 e 1:9 de gordura suína: etanol, com a temperatura de (45 °C, 55 °C e 65 °C) e (4 mL, 8 mL e 12 mL) de solvente e em agitação de 180 rpm.	53
Figura 10: Diagrama de Pareto para a produção enzimática de ésteres etílicos utilizando a lipase Lipozyme TL IM e gordura suína, em diferentes concentrações de água (0 %, 2,5 % e 5 % m/m) concentração de derivado enzimático (15 %, 20 % e 25 % m/m), razão molar de 1:3, 1:4,5 e 1:6 de gordura suína: etanol, com a temperatura de 45 °C e 4 mL de solvente e em agitação de 180 rpm	57
Figura 11: Superfície de resposta para a produção enzimática de ésteres etílicos a partir da gordura suína em função da razão molar e concentração de derivado enzimático.....	59
Figura 12: Cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes temperaturas (35 °C, 45 °C e 55 °C). Mantendo fixos os parâmetros: concentração de enzima (15	

% m/m), concentração de água (5% m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e em rotação de 180 rpm. .61

Figura 13: Cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes concentrações de água (5% e 10%). Mantendo fixos os valores de: temperatura (45°C), concentração de enzima (15 % m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 ML de solvente e em agitação de 180 rpm.....63

Figura 14: Cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes concentrações de enzima (10 % e 15 %). Mantendo fixos os parâmetros: temperatura em 45 °C, a concentração de água de 5 % (m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e agitação de 180 rpm.....65

Figura 15: Cromatograma da cinética da transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM no tempo 18 horas no planejamento fatorial completo 2³, nas condições de 45 °C, 15 % m/m de concentração de derivado enzimático, 5 % m/m concentração de água, razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e em rotação de 180 rpm.81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da transesterificação enzimática.	33
Tabela 2: Avaliação do rendimento de ésteres metílicos e/ou etílicos a partir de gordura de suíno com diferentes enzimas.	37
Tabela 3: Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento dos experimentos para a conversão de gordura suína por transesterificação enzimática em solvente orgânico em shaker de agitação orbital.	46
Tabela 4: Matriz do planejamento de experimentos Placket-Burman (valores reais e codificados) com as respostas em termos de conversão de ésteres etílicos.	52
Tabela 5: Matriz do segundo planejamento de experimentos – fatorial completo 2^3 , para otimização da produção enzimática de ésteres etílico (valores reais e codificados) com as respostas em termos de conversão de éster etílico.	56
Tabela 6: ANOVA para validação do modelo matemático que descreve a produção de ésteres etílicos.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. – Acidez

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

CG – Cromatógrafo gasoso

C_{KOH} – Concentração de KOH da solução

FAEEs – Ésteres etílicos de ácidos graxos

FAMEs - Ésteres metílicos de ácidos graxos

IUN/g – Unidade de Interesterificação por grama

m - Massa da amostra (g)

m/m – Massa/massa

m^3 - Metro cúbico

MM_{AO} – Massa molar do ácido oleico (g/mol)

N – Normalidade do NaOH.

PNPB - Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

t – Tempo de reação

T_E – Teor de ésteres etílicos

UE – União Europeia

V - Volume gasto na titulação da amostra (L)

V_0 – Volume de NaOH gasto no tempo zero - branco

V_1 – Volume de NaOH gasto na amostra

V_a – Volume da alíquota

V_f – Volume final

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	24
1.1.1 Objetivo Geral.....	24
1.1.2 Objetivos Específicos.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	25
2.2 PRODUÇÃO SUÍNA.....	29
2.3 GORDURA DE SUÍNO.....	30
2.4 TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS.....	31
2.4.1 Transesterificação enzimática.....	32
2.5 LIPASE.....	33
2.5.1 Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	34
2.6 BIODIESEL DE GORDURA DE SUÍNO.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 MATERIAL.....	41
3.1.1 Substrato.....	41
3.1.2 Enzima.....	41
3.1.3 Reagentes.....	41
3.2 MÉTODOS.....	41
3.2.1 Caracterização da gordura de suíno.....	41
3.2.2 Produção enzimática de Éster Etfílico com a lipase Lipozyme TL IM... ..	42
3.2.3 Planejamento de experimentos.....	45
3.2.4 Avaliação da cinética reacional da síntese de éster etílico.....	46
3.2.5 Quantificação de ésteres etílicos por cromatografia gasosa.....	46
3.2.6 Análise estatística.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 ACIDEZ DA GORDURA SUÍNA.....	49

4.2	CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO REACIONAL.....	50
4.3	PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE GORDURA SUÍNA.....	51
4.4	PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	55
4.5	CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTER ETÍLICO A PARTIR DA GORDURA SUÍNA.....	60
4.5.1	Efeito da temperatura.....	60
4.5.2	Efeito da concentração de água.....	62
4.5.3	Efeito da concentração de derivado enzimático.....	64
5	CONCLUSÃO.....	67
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8	APÊNDICE A – CROMATOGRAMA.....	81

INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia consumida provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e esgotáveis, e causam danos ambientais, sendo estes, os motivos para a utilização de fontes alternativas de energia (MADER et al., 2008).

O biodiesel surge para substituir o diesel de petróleo já que se obtém de fonte renovável. De acordo com Lukovic et al. (2011), em 2005, a produção mundial estimada de biodiesel foi 2,92 milhões de toneladas, dos quais 87 % foram obtidos na UE (União Europeia) e, ainda mais importante, entre 2000 e 2005, a produção mundial aumentou três vezes. Já em 2011, o Brasil se tornou o quarto maior produtor mundial de biodiesel com 16 % do total produzido (BERGMANN et al., 2013). Em 2014, a produção total de biodiesel no Brasil está estimada em 2,946 milhões de toneladas, um aumento de 2 % em comparação ao ano de 2013 (USDA, 2013).

O governo europeu garante incentivo fiscal aos produtores, promove leis específicas para o produto, visando a melhoria das condições ambientais através da utilização de fontes de energia mais limpas. A tributação dos combustíveis de petróleo na Europa, inclusive do óleo diesel mineral, é extremamente alta, garantindo a competitividade do biodiesel no mercado (BRASILBR, 2013).

Os óleos utilizados para a produção do biodiesel são: de matérias primas como soja, canola, algodão, girassol entre outros, óleo vegetal residual, gordura animal, algas e entre outros.

A produção do biodiesel pode ser por via química e enzimática. Para Oliveira et al. (2010) o processo de transesterificação enzimática, embora mais lenta que a catálise básica, ocorre em condições brandas, na via química requer altas temperaturas para se conseguir uma boa velocidade de reação (CASTRO et al., 2004). A principal barreira à implantação do sistema enzimático é o alto preço da enzima e a instabilidade de lipases em solventes orgânicos polares. Apesar das barreiras citadas a utilização das enzimas tem como vantagens: a reutilização em mais de uma batelada quando elas são imobilizadas e a redução de poluentes ao final do processo sendo considerada uma tecnologia limpa.

O uso de enzimas imobilizadas e de baixo custo, como por exemplo, a lipase comercial Lipozyme TL IM, faz com que o produto final da reação tenha viabilidade comercial (BASRI et al., 2013).

Devido ao aumento da demanda mundial por derivados de petróleo houve questionamentos sobre os impactos ambientais que a extração dessa matéria prima causa e, o petróleo quando se transforma em diesel para abastecer os motores de alguns veículos emitem gases que causam o aumento do efeito estufa (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014), com isso surgiram diversas pesquisas buscando fontes de energias limpas e renováveis. Dentro deste contexto o uso de matérias-primas não convencionais como a gordura de suíno se destaca por ser comercialmente rentável, e por colaborar com as indústrias a dar um destino aos seus resíduos sem afetar o meio ambiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção de ésteres etílicos utilizando gordura de suíno e etanol como substratos e a Lipozyme TL IM como catalisador, em sistema utilizando solvente orgânico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar as condições reacionais para obtenção de ésteres etílicos utilizando lipase Lipozyme TL IM;
- Avaliar as variáveis do processo: tempo, temperatura, massa do derivado enzimático, concentração de substratos, água e volume de solvente na produção de ésteres etílicos;
- Realizar o estudo da cinética da produção de ésteres etílicos na condição de maior conversão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

No ano de 1900, Rudolf Diesel desenvolveu um motor movido a óleo vegetal, mas, porém o petróleo com o seu baixo custo e grande disponibilidade continuou sendo a principal fonte de energia, fazendo com que as pesquisas com biodiesel não evoluíssem (SHAY, 1993).

No Brasil, a primeira referência ao uso de óleos vegetais como combustível foi em 1920, onde muitas universidades começaram a investir em pesquisas com óleo *in natura* misturado ao diesel como combustível. Em 1973, a crise de petróleo impactou a economia global fazendo com que retomassem a pesquisa com combustíveis renováveis, pois o Brasil importava 80% do petróleo. Nos anos seguintes, com o fim da crise do petróleo, o diesel se tornou mais barato e as pesquisas sobre biodiesel deixaram de ser prioridade (BERGMANN et al., 2013).

No ano de 2003, veio o decreto nº 2003/02/07 que criou a Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (CEIB), coordenada pela Casa Civil da Presidência da República e também pelo Grupo Gestor, coordenado pelo Ministério de Minas e Energia, sendo formada para estabelecer as bases para o Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel (PNPB), criado em dezembro de 2004 e é atualmente o mais importante programa de políticas públicas do governo brasileiro sobre biodiesel (BERGMANN et al., 2013).

O PNPB define biodiesel como um combustível derivado de biomassa que pode ser utilizado em motores de combustão interna com ignição por compressão. Como tal, o biodiesel surgiu para substituir o diesel, parcial ou totalmente, o PNPB pretende reduzir a dependência do Brasil na importação de diesel de petróleo e buscar novas fontes de energia renovável (POUSA; SANTOS e SUAREZ, 2007).

A lei 11.097/2005 tornou obrigatório o uso de 2% de biodiesel no diesel (B2). Devido à pressão exercida pelas indústrias de biodiesel que aumentam a cada dia sua capacidade de produção, o governo observou a necessidade de aumentar a quantidade de biodiesel no combustível, atualmente o Brasil está usando o diesel B5. Além da adição obrigatória de biodiesel ao diesel, a lei 11.097/2005 também propôs a inclusão dos agricultores familiares de regiões menos favorecidas do país criando o financiamento subsidiado e o "Selo Combustível Social" (SFS) (CÉSAR; BATALHA, 2010).

Grandes áreas disponíveis para a agricultura e incentivos governamentais podem levar o Brasil a se tornar um produtor de

biodiesel ainda mais importante. No entanto, o maior desafio para o futuro é fazer com que o biodiesel seja competitivo com o diesel. Assim, as tecnologias estão sendo desenvolvidas para melhorar a produção de biodiesel no Brasil (BERGMANN et al., 2013).

De acordo com Shin et al. (2012), o biodiesel tem atraído atenção devido ao aumento do preço do petróleo e redução da emissão de gases poluentes. O biodiesel consiste em ésteres, metílicos ou etílicos, de ácidos graxos (FAMES ou FAEEs), e pode ser produzido a partir de muitas matérias-primas distintas, incluindo óleos vegetais (soja, canola, girassol, palma, caroço de algodão, mamona, derivados de babaçu entre outros), gorduras animais, óleos usados em frituras e até matérias graxas de alta acidez (KNOTHE et al., 2006). Outra matéria-prima que pode ser utilizada são as microalgas, entretanto o processo de biodiesel com essa matéria-prima se torna mais caro do que utilizar óleos vegetais, devido à extração do óleo da microalga ter baixo rendimento (SINGH et al., 2014).

Comercialmente, a utilização de óleos vegetais refinados não é economicamente viável devido à quase 70% do custo ser atribuído à matéria-prima. A utilização dos óleos vegetais também gera a preocupação de que alguns deles são fontes de alimentação (KIAKALAEIEHA; AMINA; MAZAHARI, 2013).

Na Europa a utilização dos óleos vegetais reciclados e da gordura animal como matéria-prima para o biodiesel não são tão difundidas como o uso dos óleos vegetais, no entanto, esse cenário vem se modificando, pois são matérias-primas alternativas mais baratas (USDA, 2013).

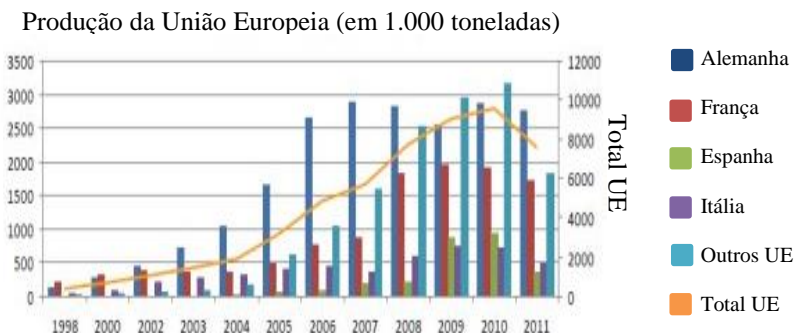
Na União Europeia o óleo de canola é a principal matéria-prima do biodiesel sendo responsável por dois terços da produção total. Enquanto, o uso do óleo de soja e palma é limitado pela norma EN 14214; pois o biodiesel à base de soja ultrapassa o teor de iodo prescrito pela norma tornando o biodiesel susceptível a oxidação, já o biodiesel de óleo de palma supostamente não fornece estabilidade suficiente durante o inverno do norte da Europa. No entanto, com a mistura das três matérias-primas óleo de canola, óleo de soja e óleo de palma permite obter-se um biodiesel de boa qualidade (USDA, 2013).

A UE apresentou um aumento na capacidade de produção nos anos de 2006 a 2009 chegando a 360 %, já em 2011 o aumento foi relativamente pequeno, 6 %, e nos anos de 2013 e 2014 a capacidade de produção deverá manter-se estável (USDA, 2013).

Segundo a European Biodiesel Board – EBB (2013), a produção total de biodiesel da UE em 2010 foi de mais de 9,5 milhões de

toneladas, um aumento de 5,5 % em relação ao ano de 2009. Em 2011, a produção total da UE diminuiu 10,06 % comparado ao ano de 2010. Destacando-se Alemanha, França, Espanha e Itália como maiores produtores da União Europeia (Figura 1), a Alemanha foi a maior produtora com 2,8 milhões de toneladas de biodiesel.

Figura 1: Produção do biodiesel na União Europeia de 1998 – 2011.

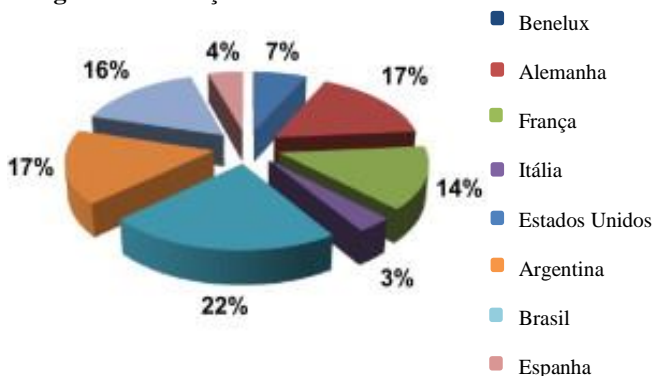


Fonte: European Biodiesel Board, 2013.

A Alemanha foi a pioneira na Europa se destacando como grande produtora de biodiesel devido ao apoio dado pelo Governo, com a reforma da Política Agrícola Comum (PAC) da União Europeia, que permitiu que as culturas deixassem de ser somente para a produção de alimentos e rações, mas também para os combustíveis. O governo investiu recursos a fim de diminuir a dependência do petróleo e também impulsionar a utilização de energia sustentável (KAUAP; SELBMANN, 2013).

Em 2010, o Brasil tornou-se o segundo maior produtor de biodiesel com uma produção de 2,4 milhões de m³, permanecendo atrás da Alemanha, a maior produtora mundial de biodiesel (BERGMANN et al., 2013).

Em 2011, o Brasil produziu 2,6 milhões de m³, apesar do aumento na produção o país foi superado pelos Estados Unidos, Alemanha e Argentina. O Brasil estar entre os maiores produtores mundiais é parte do resultado dos incentivos realizados em pesquisa, aos programas governamentais, e também aos incentivos na produção do biodiesel (BERGMANN et al., 2013). A Figura 2 apresenta a produção mundial no ano de 2011.

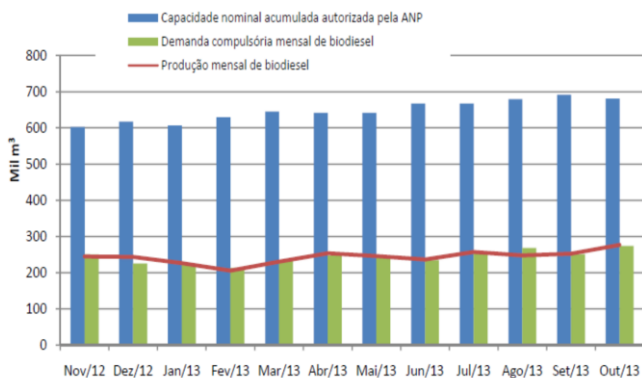
Figura 2: Produção de biodiesel no mundo em 2011.

Fonte: Bergmann et al. (2013).

No ano de 2012, o Brasil produziu 2,71 milhões de m³ de biodiesel. Os estados: Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso e Bahia eram os quatro maiores produtores brasileiros de biodiesel. O estado do Rio Grande do Sul produziu 806 mil m³, o estado de Goiás produziu 600 mil m³, o estado de Mato Grosso produziu 474 mil m³ e o estado da Bahia produziu 231 mil m³. Os quatro estados produziram juntos 2,11 milhões de m³ de biodiesel, o que representa 77,85 % do volume total da produção brasileira (ANP, 2012).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, no mês de outubro de 2013, lançou no boletim mensal que o Brasil possui 67 plantas produtoras de biodiesel com capacidade total autorizada de 22.619,06 m³/dia. A Figura 3 apresenta a diferença entre a capacidade que as empresas têm de produzir, a demanda compulsória e a produção do biodiesel, em que é possível perceber que o que dita à produção é a demanda compulsória a qual o governo obriga a utilização de 5% de biodiesel no diesel.

Figura 3: Evolução mensal da demanda compulsória, da produção e da capacidade nominal autorizada pela ANP no País.



Fonte: ANP, 2013.

2.2 PRODUÇÃO SUÍNA

De acordo com a FAO (2014), a produção mundial de suínos no ano de 1990 era de 856 milhões de cabeças, e no ano de 2010 a produção suína apresentou um aumento de 13% com um total de 966 milhões de cabeças.

A China, os 27 Países Membros da União Europeia (UE-27), os Estados Unidos e o Brasil são os quatro maiores produtores mundiais, produzindo no ano de 2013, 53,8 mil toneladas, 22,4 mil toneladas, 10,5 mil toneladas e 3,37 mil toneladas, respectivamente (ABIPECS, 2013).

Em 2014, a China tem a previsão de aumentar a produção suína em quase 2%, sendo considerado um aumento pequeno, mas satisfatório devido aos problemas com abastecimento de suprimentos para a produção dos suínos, e com suínos aparecendo mortos no rio Huangpu em Xangai (USDA, 2013).

A produção suína na União Europeia, no ano de 2013, manteve-se estável, porém deve apresentar uma melhoria devido a baixa dos preços dos alimentos e também ao aumento do preço das carcaças (USDA, 2013).

No Brasil, em 2012, produziu 3,33 mil toneladas de carne suína, 3,05% a mais que o ano de 2011. Apesar do aumento do preço do milho e da soja, principais fontes da ração suína, o país ampliou a produção a

fim de elevar a exportação da carne para abastecer o mercado internacional, e conseguir manter o equilíbrio da balança comercial (USDA, 2012).

Os Estados que se destacaram no Brasil no ano de 2012 na produção suína foram Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná. Neste mesmo ano, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína - ABIPECS (2012) o estado de Santa Catarina apresentou uma produção industrial de 805,5 mil toneladas destacando-se dos demais.

2.3 GORDURA DE SUÍNO

A utilização de uma matéria-prima de baixo custo e em abundância ganhou atenção devido à redução total dos custos de produção do biodiesel. Os resíduos de óleos de cozinha e gorduras animais são matérias-primas atraentes porque são duas ou três vezes mais baratas do que os óleos vegetais refinados e estão disponíveis em abundância para atender a demanda de mercado para a produção de biodiesel (SHIN et al., 2012).

As gorduras animais que antes eram destinadas à graxaria para a produção de ração têm sido destinadas a outros processos, como por exemplo, produção de sabão e biodiesel. (NGO et al., 2008).

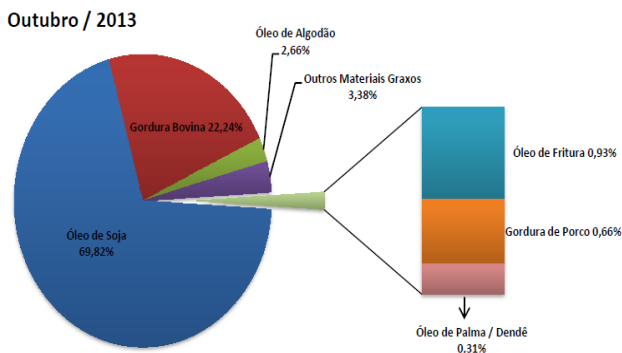
A banha de porco tem por definição, de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (1962), decreto nº 1.255:

Art. 278 Entende-se por banha, genericamente, o produto obtido pela fusão de tecidos adiposos frescos de suínos ou de matérias-primas outras como definido neste Regulamento.

§1º - É proibido no fabrico da banha o emprego de ossos da cabeça, órgãos das cavidades torácicas e abdominal, de gorduras rançosas ou com outros defeitos, de restos de produtos tratados por via úmida, de amídalas, de pálpebras, de gorduras de raspagem, de retenção nas "piletas" ou semelhantes, sendo proibido também, o aproveitamento de carcaças e partes de carcaças condenadas pela Inspeção Federal. Os tecidos adiposos devem estar razoavelmente isentos de tecidos musculares e de sangue.

De acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, no mês de outubro de 2013 a matéria-prima mais utilizada para a produção do biodiesel foi o óleo de soja, onde a região Centro-Oeste se destaca das demais com 79,57 %. A Figura 4 apresenta o perfil nacional das matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel e é possível observar uma grande utilização do óleo de soja e da gordura bovina.

Figura 4: Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.



Fonte: ANP, 2013.

O estado de Santa Catarina se destaca no cenário brasileiro pela produção de carne suína o que favorece pesquisas com a matéria-prima e seus resíduos a fim de impulsionar e conhecer formas de tornar a produção mais rentável. No mês de outubro de 2012, somente a região sul apresentou produção de biodiesel com a gordura de suíno 1,28 %, e no mesmo período do ano de 2013 a região sul apresentou uma produção de 2,11 %, mostrando crescimento da utilização dessa matéria prima para produção de biodiesel (ANP, 2013).

2.4 TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

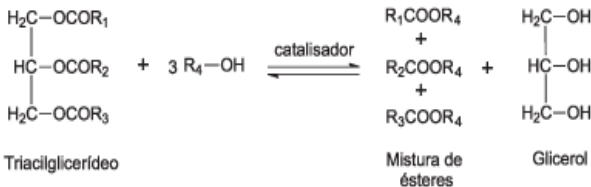
A produção de biodiesel ocorre através da transesterificação, ou seja, quando um óleo (vegetal, animal ou resíduo) reage com um álcool, formando éster e glicerol. A reação de transesterificação pode acontecer por via química (ácida ou alcalina), via enzimática (enzima – lipases) ou supercrítica (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007; GUAN et al., 2009).

A transesterificação ocorre de forma estequiométrica numa relação molar de três moles de álcool para um mole de triglicerídeos. O equilíbrio do processo é deslocado para a formação do produto utilizando álcool em excesso ou pela remoção contínua do produto. Os álcoois, metanol e etanol, são mais utilizados na produção de ésteres, pois são álcoois de cadeia curta, polares, e de baixo custo (ME; HANNA, 1999; HELWANI et al., 2009).

Atualmente, o metanol é o álcool mais utilizado na produção do biodiesel devido ao baixo custo e por suas propriedades físicas e químicas, entretanto o metanol tem alto risco de explosão quando está na forma de vapor uma vez que ele tem baixo ponto de ebulição (LEUNG; WU, LEUNG, 2010).

O etanol em comparação com o metanol é um álcool mais caro, mas tem como vantagens a baixa toxicidade, uma capacidade de dissolução muito superior nos óleos vegetais e diminui a emissão de gases de escape (incluindo óxidos de azoto, de CO₂ e a densidade da fumaça) (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011). Na Figura 5 é apresentada a equação geral da transesterificação de um triglicerídeo.

Figura 5: Equação geral da transesterificação de um triglicerídeo.



Fonte: SCHUCHARDT et al., 1998.

2.4.1 Transesterificação enzimática

A transesterificação utilizando enzimas como catalisadores surgiu a fim de substituir e minimizar os problemas ambientais causados pelos catalisadores químicos.

As enzimas, mais precisamente as lipases, a fim de tornar o processo rentável são imobilizadas em suportes para obter uma melhor estabilidade no processo e manter altos rendimentos na reutilização (ARANSIOLA et al., 2013). A Tabela 1 apresenta as vantagens e desvantagens da transesterificação enzimática.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da transesterificação enzimática.

Vantagens	Desvantagens
Baixo gasto de energia;	Alto preço das enzimas;
Reação ocorre na presença de ácidos graxos livres e de água;	Alta concentração de álcool pode inativar as enzima;
Reutilização das enzimas, quando na forma imobilizada;	Tempo de reação longo.
Condições brandas de temperatura, pH e pressão;	
Fácil purificação;	
Tecnologia limpa;	
Alto rendimento;	
Baixa quantidade de álcool utilizada;	
Não há formação de sabão no sistema.	

2.5 LIPASE

As lipases (triacilglicerol hidrolases éster, EC 3.1.1.3) são enzimas que têm como função a ativação interfacial (BORSCHUEUR, 2002) na qual se catalisa a quebra de gorduras e óleos, na interface do substrato insolúvel e da fase aquosa, resultando em ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. A reação de hidrólise de triacilgliceróis é reversível podendo forçar a lipase a catalisar o glicerol e os ácidos graxos livres, isso ocorre quando a atividade de água é reduzida (LIE, MOLIN, 1991; VILLENEUVE et al., 2000).

A produção da lipase acontece através de células de mamíferos, de plantas e mais comumente através dos microrganismos (YAHYA;

ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998), que excretam as lipases para ajudar na digestão de óleos e gorduras (MACRAE, 1983).

Na produção de lipase, o período de incubação varia geralmente de algumas horas a vários dias dependendo do organismo e método de produção. As espécies de fungos são cultivadas em fermentação em estado sólido, e as bactérias e leveduras são geralmente produzidas em fermentação submersa (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

As lipases são classificadas de acordo com a sua especificidade em três tipos: o primeiro é o grupo não específico onde a lipase quebra o triglicerídeo em qualquer posição formando tanto o glicerol quanto o ácido graxo, de forma aleatória; o segundo grupo, é de lipases 1,3 específicas que catalisam a liberação dos ácidos graxos das posições sn-1 e sn-3 do triglicerídeo; e o terceiro grupo de lipases catalisa a liberação de um tipo específico de ácido graxo a partir de moléculas de glicerídeos (MACRAE, 1983).

A utilização das lipases em processos industriais se dá pelo fato delas serem estáveis, ativas em solventes orgânicos, atuarem em ampla faixa de pH, não requerem cofatores, possuem elevada especificidade. Para a aplicação industrial têm sido utilizadas lipases de origem fúngica, pois a maioria não é nociva à saúde humana (SCHMIDT et al., 2004; MESSIAS et al., 2011). Elas podem ser aplicadas em síntese de: emulsionantes, tensoativos, biopolímeros, ésteres aromáticos; e atualmente vem atraindo pesquisas na aplicação na produção de biodiesel (LAI et al., 2012).

2.5.1 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus*, na forma comercial e imobilizada em sílica através da adsorção iônica é conhecida como Lipozyme TL IM, é uma lipase específica na posição 1,3 da gordura onde a migração acil deve ocorrer durante o processo de produção de biodiesel (WANG; WU; ZONG, 2008) (MALEKI; AROUA; SULAIMAN, 2013)

De acordo com a ficha técnica da Novozymes (2005) a enzima é produzida por fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, onde o microrganismo doador de gene que expressa a produção de lipase é o *Thermomyces lanuginosus*. A Lipozyme TL IM é um produto granulado, seco, marrom-claro, com uma atividade declarada de 250 IUN/g, com tamanho de partícula de 0,3-1,0 mm (ARAGÃO et al., 2009).

Thermomyces lanuginosa ou lipase TLL é a enzima responsável pela atividade lipolítica que tem aplicações industriais importantes. Em meios aquosos a enzima é muito estável, sendo ativa em pH 7,0-11,0, mantendo a atividade razoavelmente bem a 55-60 °C embora o temperatura recomendada para aplicações seja entre 30 e 40 °C (FERNANDES et al., 2004).

Atualmente, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* é utilizada para obter produtos como concentrados de ácidos graxos livres por hidrólise seletiva de diferentes óleos e gorduras, biodiesel, lipídeos estruturados, ésteres aromatizantes, formulação de detergentes, resolução de misturas racêmicas, degradação de polímeros e no pré-tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos (Fernández-Lafuente, R.; Mendes, et. al.; Mendes, et. al. (2010, 2011, 2012 apud MENDES, 2013, p.245).

2.6 BIODIESEL DE GORDURA DE SUÍNO

De acordo com Freitas et al. (2004), foram analisadas 668 carcaças de suínos onde a média de rendimentos de carne contida na carcaça foi de 49,49%, o rendimento de carcaça foi de 81,31 % e rendimento de gordura e pele de 27,38 %, onde os valores foram semelhantes aos reportados na literatura Latorre et al. (2003) encontraram um valor máximo de rendimento de carcaça de 78,7 %, o Centro de Assistência Gerencial de Santa Catarina (CEAG/SC) et al. (1975) reportou que suínos destinados ao abate tinham um rendimento de gordura e pele de 29,6 %. Assim, o rendimento de gordura e pele de um suíno é capaz de produzir, em média, 8,42 % de gordura (BARROS; JARDINE, 2007).

A qualidade da gordura de suíno está relacionada com as partes do porco a partir do qual são originárias. A gordura de suíno é composta por ácidos graxos saturados (40-45%), tal como o ácido palmítico - C16:0 (25%) e ácido esteárico - C18:0 (15%) e de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido oleico – C18:1 (40-45%), contendo também quantidade significativa de ácido linoleico – C18:2 (10-15%) (LEONARDIS et al., 2007).

A aplicação de gorduras animais na produção de biodiesel apresenta como desvantagem aos óleos vegetais uma maior quantidade de ácidos graxos saturados causando problemas de entupimento de filtro a frio (CFPP – Cold filter plugging point) (BERRIOS et al., 2009). Por outro lado, o alto grau de saturação tem como vantagens um alto poder

calorífico, significando um aumento na potência e um menor consumo do biodiesel; e um alto número de cetanos, que geram um menor atraso na ignição, e melhoram a qualidade da combustão com isso tem-se uma menor emissão de gases (KUMAR et al., 2005) (BERRIOS et al., 2009).

A Tabela 2 apresenta diferentes rendimentos obtidos na produção de ésteres metílicos e/ou etílicos utilizando a mesma matéria prima, a gordura de suíno.

Tabela 2: Avaliação do rendimento de ésteres metílicos e/ou etílicos a partir de gordura de suíno com diferentes enzimas.

Gordura	Substrato		Enzima	Teor de ésteres	Razão Molar (Gordura/Álcool)	Autor
	Solvente	Álcool				
Gordura de suíno	n-hexano	Metanol	<i>Candida</i> sp. 99-125	87,4%, 30h, 40°C	1:3	LU et al., 2007
Gordura de suíno	Sistema livre de solvente	Metanol	<i>Cândida antarctica</i> (Chirazyme L-2)	74%, 72h, 30°C	1:1	LEE; FOGLIA; CHANG, 2002

Cont. Tabela 2:

Gordura de suíno	Terc-butanol	Metanol	<i>C. antarctica</i> (Novozym 435) com <i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	97,2%, 20h, 50°C	1:5,12 (mol/mol)	HUANG; ZHENG; YAN, 2010
------------------	--------------	---------	--	---------------------	------------------	-------------------------------

De acordo com Lu et al. (2007) foi obtido um rendimento de 87,4 %, com a razão molar de 1:3 (gordura de suíno: metanol) adicionados ao sistema no tempo 0, 10 e 20 horas, a fim de evitar que o metanol inibisse a enzima. Lee, Foglia e Chang (2002) também adicionaram o metanol em três etapas, com a razão molar de 1:1 (gordura de suíno: metanol) nos tempos 0, 24 e 48 horas para evitar que o álcool inibisse a enzima, entretanto foi utilizado somente 10 % da enzima e em um sistema isento de solvente.

Huang; Zheng; Yan (2010) utilizaram duas lipases imobilizadas com diferentes especificidades, Novozym 435 (não específica) e Lipozyme TL IM (1,3-específica). A adição da Lipozyme TL IM foi com intuito de reduzir custo da produção de biodiesel já que a Novozym 435 representa maior dispêndio.

A utilização do metanol nas reações de transesterificação diminui a viscosidade, reduz os custos porque consome menos energia quando comparado com outros álcoois, por exemplo, o etanol. Entretanto, o uso do etanol produz o biodiesel com ponto de névoa mais baixo e com um menor ponto de fluidez, melhorando a partida do motor em baixas temperaturas. Além disso, a molécula de etanol por apresentar um átomo de carbono a mais quando comparado ao metanol é capaz de aumentar ligeiramente o poder calorífico e o número de cetanos (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Substrato

Para a produção de biodiesel foi utilizado como matéria-prima a gordura de suíno refinada comercial da marca Seara Alimentos. De acordo com Lu et al. (2007) a gordura de suíno apresenta uma massa molar de 868,5 (g/mol).

3.1.2 Enzima

Foi utilizada a lipase comercial Lipozyme TL IM, produzida a partir do microrganismo *Thermomyces lanuginosu*, imobilizada em sílica e apresentando especificidade na posição 1,3 do triglicérido. A enzima foi gentilmente cedida pela Novozymes.

3.1.3 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes/solventes:

Hexano (Lafan, 99,5%)

Diclorometano (Vetec, 99,5%)

Álcool Etilico (Dinâmica, 99,5%)

Salicilato de metila (Dinâmica, 99%)

Acetona P.A. (Lafan, 99,5%)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da gordura de suíno

3.2.1.1 Acidez da gordura de suíno

A determinação da acidez (A) dos óleos foi realizada segundo metodologia AOCS Cd 3d – 63. Primeiramente pesou-se 5g de óleo, inteiramente líquido, em um erlemeyer de 250 mL, após o óleo foi dissolvido em uma solução neutralizada de 50 mL de etanol: éter etílico (1:1 v/v). Foi adicionado 2 mL do indicador (solução de fenoftaleína 1% em etanol 95%) e titulou-se com solução padronizada de KOH 0,1M. As

análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como acidez em ácido oleico, calculado pela Equação 1:

$$A (\%) = \frac{MM_{AO} * V * C_{KOH}}{m} * 100 \quad (1)$$

Onde:

A – Acidez (% de ácido oleico);

MM_{AO} – Massa molar do ácido oleico (282,4 g/mol);

V - Volume gasto na titulação da amostra (L);

C_{KOH} – Concentração de KOH da solução (mol/ L);

m - Massa da amostra (g).

3.2.2 Produção enzimática de Éster Etilico com a lipase Lipozyme TL IM

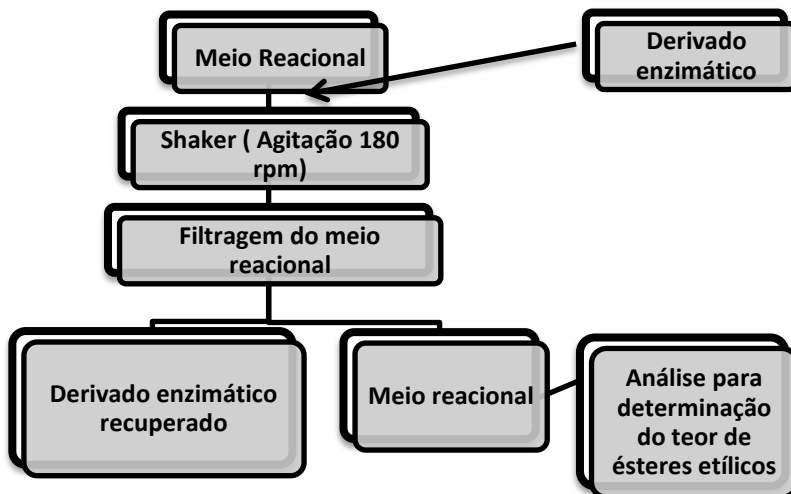
3.2.2.1 Cinética enzimática prévia de produção de ésteres etílicos

Os experimentos foram realizados a partir das condições ótimas do estudo de LU et al. (2007), onde os autores utilizaram a mesma matéria-prima. O processo de etanólise foi realizado em Erlenmeyer de 50 mL, incubado no shaker (MARCONI, modelo MA 410 EFT) a 50°C e 180 rpm (Figura 6). As condições experimentais realizadas foram 1g de gordura de suíno de massa molar de 868,5 g/mol, 20 % de massa de derivado enzimático, 10 % de água, 1:6 molar de etanol e 8 mL de hexano, durante os tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 e 24 horas. A Figura 7 apresenta o fluxograma geral da produção de éster etílico em escala laboratorial.

Figura 6: Incubadora Shaker com agitação orbital utilizado para a produção de biodiesel com gordura de suíno.



Figura 7: Fluxograma de produção de éster etílico em escala laborator



3.2.2.2 Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo consumo do ácido oleico e etanol com razão molar ácido: álcool de 1:1, na temperatura de 40 °C, a 160 rpm. A reação foi iniciada pela adição de 0,1g de derivado enzimático ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital por 50 minutos. Alíquotas de 150 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no tempo zero e ao final da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico (adaptado de OLIVEIRA et al., 2006).

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,01 mol/L. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido oleico por minuto, nas condições experimentais.

A atividade enzimática foi calculada utilizando a seguinte equação (Equação 2):

$$A = \frac{(V_0 - V_1) * C_{\text{NaOH}} * V_f}{t * m * V_a} \quad (2)$$

Onde:

A – Atividade enzimática (U/g);

V_0 – Volume de NaOH gasto no tempo zero - branco;

V_1 – Volume de NaOH gasto na amostra;

V_f – Volume da final do meio reacional ($5 \cdot 10^{-3}$ L);

V_a – Volume da amostra ($1,5 \cdot 10^{-4}$ L);

t – Tempo de reação (50 minutos);

m – Massa do derivado enzimático utilizado (0,1 g);

C_{NaOH} – Concentração de NaOH na solução (mol/ L).

3.2.2.3 Recuperação das lipases após a reação

Para recuperar o derivado enzimático ao final de cada reação, o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração, utilizando o papel de filtro. Em seguida, realizaram-se duas lavagens com 10 mL de hexano e filtrou-se a vácuo a suspensão obtida. Este procedimento é uma adaptação do método desenvolvido por Castro e Anderson (1995), que utiliza heptano. Após secou-se o derivado enzimático em estufa a 40 °C durante quatro horas, o mesmo foi mantido em dessecador por 24 horas. Após este período, a atividade da enzima foi determinada para verificar possíveis perdas durante a reação e torná-la apta para a reutilização.

A medida de atividade foi realizada no início e ao final das reações com o derivado enzimático recuperado (OLIVEIRA et al., 2006a).

3.2.3 Planejamento de experimentos

Baseado em Lu et al. (2007) e com o objetivo de determinar as condições experimentais que correspondam ao máximo teor em ésteres etílicos, as seguintes variáveis foram avaliadas: temperatura, concentração de derivado enzimático, concentração de água, volume do solvente e razão molar entre gordura suína e etanol.

Os níveis e as variáveis tiveram sua influência analisados através de dois planejamentos de experimentos Plackett-Burman e fatorial completo (2^3), com a triplicata do ponto central, mostrados na Tabela 3 utilizando o programa STATISTICA 7.0.

Os experimentos foram realizados em shaker com agitação orbital de 180 rpm, com tempo de reação de 18 horas, utilizando hexano como solvente.

Tabela 3: Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento dos experimentos para a conversão de gordura suína por transesterificação enzimática em solvente orgânico em shaker de agitação orbital.

Variáveis	Níveis		
	1º Planejamento de experimentos		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	50	60	70
Concentração de derivado enzimático (% m/m)	5	10	15
Concentração de Água (% m/m)	5	10	15
Volume do Solvente (mL)	4	8	12
Razão Molar*	1:3	1:6	1:9
	2º Planejamento de experimentos		
Concentração de derivado enzimático (% m/m)	15	20	25
Concentração de Água (% m/m)	0	2,5	5
Razão Molar*	1:3	1:4,5	1:6

*Gordura de suíno/Etanol

3.2.4 Avaliação da cinética reacional da síntese de éster etílico

A partir da análise dos resultados obtidos nos planejamentos de experimentos, uma avaliação cinética da reação foi realizada variando a concentração do derivado enzimático em 10 e 15% em massa (com base na quantidade total de substratos – gordura suína e etanol), a temperatura em 35, 45 e 55 °C e a quantidade de água (5 e 10 %, em massa). As amostras foram retiradas do sistema periodicamente até 24 horas.

3.2.5 Quantificação de ésteres etílicos por cromatografia gasosa

Após a coleta das amostras no modo de produção em batelada, realizou-se a evaporação do álcool etílico não reagido e do hexano

utilizado para lavar a enzima, em um evaporador rotativo IKA HB 10 Basic na temperatura de 60 °C, por 20 minutos ou até a amostra apresentar um volume constante.

Para a quantificação de ésteres de ácidos graxos as amostras foram previamente preparadas, pesando-se 0,250 g das mesmas em um balão volumétrico de 10 mL completando o volume até o menisco do mesmo com diclorometano. Após, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e adicionou 50 µL do padrão interno salicilato de metila na concentração de 5 g/L e completava-se o volume com diclorometano.

A solução foi então injetada (1 µL) em um cromatógrafo gasoso (CG) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. A temperatura inicial da coluna foi 120 °C permanecendo por 1 minuto, seguido pelo aquecimento de 15 °C/min até 180 °C permanecendo por 2 minutos, e novamente aquecendo 5 °C/min até 250 °C permanecendo assim por mais 2 minutos. Ar sintético e nitrogênio eram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250 °C e a taxa de split de 1:50. Possibilitando a determinação do teor de ésteres etílicos da reação, cujos cálculos estão descritos abaixo.

O cálculo do teor de ésteres etílicos da amostra era obtido através da equação abaixo, com base na EN 14103 (2003):

$$T_E = \left(\frac{\sum A - A_{PI}}{A_{PI}} * \frac{C_{PI}}{C_a} \right) * 100 \quad (3)$$

Onde:

T_E – Teor de ésteres etílicos na amostra (% m/m);

$\sum A$ - Somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14 a C24) e do padrão interno (C8:0);

A_{PI} - Área do padrão interno (C8:0 – Salicilato de metila);

C_{PI} - Concentração do Padrão Interno (Salicilato de metila) na amostra injetada (mg/L);

C_a - Concentração da amostra diluída em diclorometano (mg/L);

3.2.6 Análise estatística

A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e otimização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos durante a realização deste trabalho. Serão discutidos os resultados sobre os efeitos das variáveis do processo, temperatura, concentração de enzima, concentração de água, volume de solvente e razão molar, utilizando a otimização da conversão do processo com a técnica de planejamento experimental. Cabe salientar que até o presente momento não foram encontrados na literatura trabalhos relacionados à produção enzimática de ésteres produzidos com etanol e utilizando a gordura suína como substrato.

4.1 ACIDEZ DA GORDURA SUÍNA

A acidez da gordura de suíno foi determinada a fim de analisar o estado de conservação da gordura suína utilizada como matéria-prima. Esta é definida como a quantidade de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama da amostra que é representada em porcentagem equivalente ao ácido oleico, para uso geral em óleos e gorduras. A acidez encontrada para a gordura suína utilizada neste trabalho foi de 0,27 % (g ácido oleico/100 g).

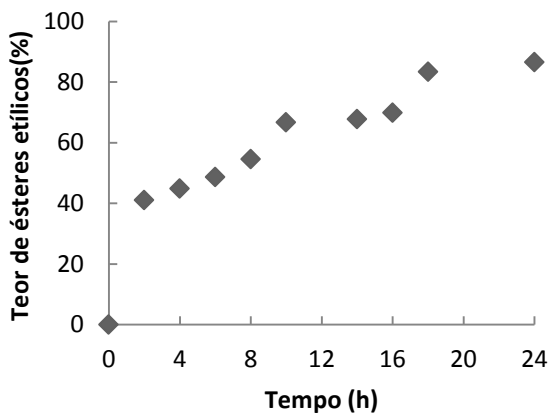
Conforme o resultado obtido a amostra de gordura suína refinada comercial da marca Seara Alimentos encontra-se apta ao uso aplicado em biocombustíveis, garantindo assim, a qualidade aos ésteres etílicos produzidos a partir dessa matéria-prima.

De acordo com Ramos et al. (2003) a alta acidez pode degradar componentes do motor uma vez que a característica da matéria-prima utilizada é transferidas para o biocombustível tornando-o inadequado para uso direto em motores à diesel. Embora não exista uma legislação que exija um padrão de identidade e de qualidade de gorduras animais, podemos considerar a legislação brasileira para óleos, gorduras e creme vegetal, a Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, que tem como exigência para óleos e gorduras vegetais refinados um teor de acidez menor que 0,3 % ácido oleico/100g; uma vez que buscamos a substituição dos óleos vegetais por uma matéria prima com características similares.

4.2 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO REACIONAL

Foi realizado um estudo preliminar para se determinar o tempo para execução dos experimentos, a fim de obter um alto teor de éster etílico. Para tanto, foi realizada uma cinética utilizando como base o estudo de Lu et al. (2007), pois os autores utilizaram matéria-prima semelhante. Os experimentos foram realizados em Erlenmayer de 50 mL com tampa de silicone, contendo 1 g de gordura suína, 10 % (m/m) de água, razão molar de 1:6 gordura suína: etanol, 20 % (m/m) derivado enzimático (Lipozyme TL IM) e 8 mL de hexano. A cinética foi realizada em batelada, com amostragem destrutiva, em shaker com agitação orbital a 180 rpm e temperatura de 50 °C. Os resultados da cinética da transesterificação enzimática de gordura suína estão apresentados na Figura 8.

Figura 8: Conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática de gordura suína, 10 % (m/m) de água, razão molar gordura suína e etanol de 1:6, 20 % (m/m) de derivado enzimático (Lipozyme TL IM) e 8 mL de hexano, na temperatura de 50°C e agitação de 180 rpm.



De acordo com a Figura 8, no tempo de 2 horas foi observada uma conversão de 41,04 % e após 8 horas houve um aumento de 25,61 %. Os resultados, ainda mostraram altas conversões em ésteres etílicos de 83,37 % em 18 horas e 86,46 % em 24 horas de reação. A partir

destes resultados, para as próximas etapas do trabalho, o tempo de reação foi fixado em 18 horas, uma vez que em 18 e 24 horas de reação tiveram altos teores de ésteres etílicos e uma pequena diferença entre si (3,09 %).

Em estudo da produção de ésteres metílicos, utilizando a lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125, Lu et al. (2007) obtiveram na primeira hora 15,80 % de ésteres metílicos, após 10 horas 29,07 % e 87,40 % após 30 horas de reação, nas condições experimentais ótimas e com agitação de 180 rpm no shaker. Lee, Foglia e Chang (2002) estudaram o teor de ésteres metílicos com a adição fracionada do metanol, 1 mol a cada 24 horas (razão molar 1:3 – gordura suína/metanol), nas primeiras 24 horas obtiveram uma conversão de 24 %, com 48 horas 56 % e ao final de 72 horas obtiveram uma conversão de 74 %, utilizando como biocatalisador a lipase imobilizada de *Candida antarctica* (Chirazyme L-2).

4.3 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE GORDURA SUÍNA

A partir dos estudos preliminares foi realizado um planejamento de experimentos utilizando o modelo proposto por Plackett-Burman, com 12 ensaios, com triplicata do ponto central. Para avaliar o efeito das variáveis: temperatura, concentração de enzima, concentração de água, volume do solvente e da razão molar na produção enzimática de éster etílico, tendo como catalisador a enzima Lipozyme TL IM, o tempo de reação (18 h) e a agitação (180 rpm) foram mantidos constantes em todos os ensaios. A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento de experimentos com valores reais e codificados e as respostas em termos de teor de ésteres etílicos, em 18 horas.

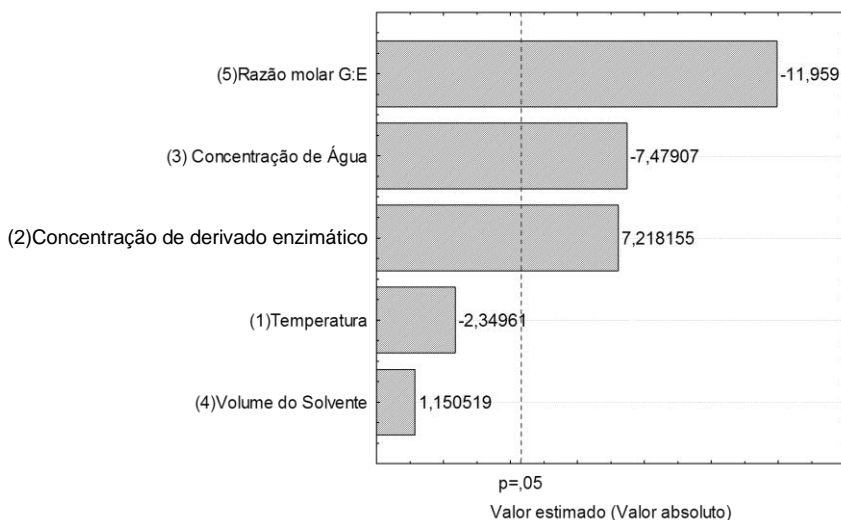
Tabela 4: Matriz do planejamento de experimentos Placket-Burman (valores reais e codificados) com as respostas em termos de conversão de ésteres etílicos.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de derivado enzimático (% m/m)	Concentração de água (% m/m)	Volume de Solvente (mL)	Razão Molar*	Teor de ésteres etílicos (%)
1	1 (65)	-1 (5)	1 (15)	-1 (4)	-1(1:3)	36,60
2	1 (65)	1 (15)	-1 (5)	1 (12)	-1(1:3)	16,74
3	-1 (45)	1 (15)	1 (15)	-1 (4)	1(1:9)	0
4	1 (65)	-1 (5)	1 (15)	1 (12)	-1(1:3)	3,06
5	1 (65)	1 (15)	-1 (5)	1 (12)	1(1:9)	47,79
6	1 (65)	1 (15)	1 (15)	-1 (4)	1(1:9)	3,90
7	-1 (45)	1 (15)	1 (15)	1 (12)	-1(1:3)	31,33
8	-1 (45)	-1 (5)	1 (15)	1 (12)	1(1:9)	14,72
9	-1 (45)	-1 (5)	-1 (5)	1 (12)	1(1:9)	7,06
10	1 (65)	-1 (5)	-1 (5)	-1 (4)	1(1:9)	0
11	-1 (45)	1 (15)	-1 (5)	-1 (4)	-1(1:3)	42,08
12	-1 (45)	-1 (5)	-1 (5)	-1 (4)	-1(1:3)	29,11
13	0 (55)	0 (10)	0 (10)	0 (8)	0(1:6)	38,21
14	0 (55)	0 (10)	0 (10)	0 (8)	0(1:6)	36,11
15	0 (55)	0 (10)	0 (10)	0 (8)	0(1:6)	34,05

*Gordura suína:Etanol

Na Tabela 4, pode-se verificar que os teores etílicos mais elevados foram obtidas nos ensaios 5 (47,79%) e 11 (42,08), correspondendo à máxima concentração de derivado enzimático (15 %) e a mínima concentração de água (5 %). Os resultados da Tabela 4 foram tratados estatisticamente e a Figura 9 demonstra os efeitos das variáveis sobre a conversão de ésteres.

Figura 9: Diagrama de Pareto para a produção enzimática de ésteres etílicos utilizando a lipase Lipozyme TL IM e gordura suína, em diferentes concentrações de água (5 %, 10 % e 15 % m/m) concentração de derivado enzimático (5 %, 10 % e 15 % m/m), razão molar de 1:3, 1:6 e 1:9 de gordura suína: etanol, com a temperatura de (45 °C, 55 °C e 65 °C) e (4 mL, 8 mL e 12 mL) de solvente e em agitação de 180 rpm.



De acordo com a Figura 9 pode-se verificar no diagrama de Pareto, que a razão molar entre a gordura suína e o etanol e a concentração de água apresentaram efeitos significativos negativos. Enquanto que a concentração de derivado enzimático apresentou efeito significativo positivo. Por outro lado, a temperatura e volume de solvente não apresentaram efeitos significativos no teor de ésteres etílicos para o tempo de 18 horas.

A razão molar na reação é uma variável importante e crítica, porque a relação de álcool para óleo na transesterificação enzimática tem sido utilizada em excesso para forçar o equilíbrio da mesma para a formação do produto, uma vez que a reação é reversível. Porém o mesmo álcool utilizado para deslocar o equilíbrio da reação pode diminuir ou até mesmo inibir a atividade da enzima (LI et al., 2012). O metanol, álcool comumente usado, consegue reter as moléculas de água contidas na superfície da enzima, assim, afeta a conformação nativa e diminuir a atividade; o etanol é menos hidrofílico que o metanol, ou seja, tem um menor efeito de inibição da atividade da lipase (NASARUDDIN; ALAM; JAMI, 2014)

De acordo com Jiang et al. (2014) a razão molar do álcool para óleo é um dos parâmetros mais importantes na produção do biodiesel, sendo necessário para se obter altas conversões não só a razão molar como a combinação da propriedade do óleo e o tipo da lipase.

Li et al. (2012) estudaram a imobilização da lipase *Rhizopus oryzae* (ROL) em resina macroporosas e resina de troca aniônica, e aplicaram na produção de biodiesel. Diferentes razões molares foram testadas, 1:3 – 1:6, para o óleo de semente de *Pistacia chinensis* BGE e metanol, e concluíram que se obteve um maior rendimento na razão molar de 1:5 nos dois tipos de suporte.

Matassoli et al. (2009) estudaram diferentes razões molares de óleo de palma/ etanol, utilizando a lipase imobilizada comercial Lipozyme TL IM, as reações foram conduzidas a 40°C durante 4 horas. Onde no valor mínimo (1:3) houve um rendimento 15,3 % de ésteres etílicos, e nos valores de 1:6 e 1:9 o rendimento diminuiu 10,6 % e 4,7 %, respectivamente.

A quantidade de água na reação influencia o equilíbrio entre a enzima e o substrato, bem como na área interfacial da fase polar e não polar. Mas uma alta quantidade de água pode influenciar negativamente, pois elas podem causar flexibilidade das enzimas atuando na estrutura secundária e terciária (WHITELEY; LEE, 2014).

Para Garlapati et al. (2013) a produção de ésteres metílicos não foi influenciado pela adição de água até 20 % (v/v), o rendimento final foi de 91,5 % obtida depois de um tempo de reação de 36 h a 34 °C, na presença da lipase imobilizada *Rhizopus oryzae* 3562.

De acordo com Calero et al. (2014) nos seus estudos pôde-se comprovar que a quantidade de água adicionada a reação promoveu a redução na conversão de ésteres etílicos. Foram testadas diversas concentrações da quantidade da lipase Lipozyme RM IM, variando de 0,1 a

1 % (m/m) em relação a massa óleo de girassol, sendo realizados na condições ótimas (agitador magnético 300 rpm , 40 °C, razão molar 12:3,5 mL (v/v) óleo de girassol: etanol), obtendo máxima conversão com 0,5 % (m/m) da lipase em relação a massa do óleo de girassol. Assim, obtém-se um aumento linear nos valores de conversão da reação com o aumento da quantidade Lipozyme RM IM até o valor máximo de 0,5 % (m/m), acima deste valor há um decréscimo lento na conversão. Esta diminuição pode ser causada pela aglomeração dos polímeros em que as lipases são imobilizadas, diminuindo assim a área de transferência de massa diminuindo a conversão.

Lu et al., 2007 estudaram o efeito de diferentes concentrações de lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125 na metanólise. Os resultados mostraram que o teor de ésteres metílicos aumentou rapidamente quando a quantidade de lipase adicionada a reação foi de 20 % (m/m). Ao adicionar uma concentração de derivado enzimático de 30 % (m/m) a produção de éster manteve-se quase que constante, ou seja, não havia evidência que acima de 20 % influenciaria no rendimento uma vez que o sítio ativo da lipase já estava saturado em relação a quantidade de substrato.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³

Após a determinação das variáveis significativas realizou-se um planejamento de experimentos – fatorial completo 2³, com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos, a fim de otimizar e verificar a influência das variáveis razão molar, concentração de água e concentração de derivado enzimático.

Tabela 5: Matriz do segundo planejamento de experimentos – fatorial completo 2³, para otimização da produção enzimática de ésteres etílico (valores reais e codificados) com as respostas em termos de conversão de éster etílico.

Ensaio	Razão molar*	Concentração de Água (% m/m)	Concentração de Enzima (% mm)	Teor de ésteres etílicos (%)	Conversão Predita (%)	EPR(%) ¹	
						$\frac{Y_{EXP} - Y_{mod\ el}}{Y_{exp}}$	100
1	-1 (1:3)	-1 (0)	-1 (15)	36,2	32,36	10,60	
2	1 (1:6)	-1 (0)	-1 (15)	69,57	74,24	-6,71	
3	-1 (1:3)	1 (5)	-1 (15)	36,43	41,12	-12,87	
4	1 (1:6)	1 (5)	-1 (15)	82,35	78,48	4,69	
5	-1 (1:3)	-1 (0)	1 (25)	36,59	41,28	-12,81	
6	1 (1:6)	-1 (0)	1 (25)	70,12	66,24	5,53	
7	-1 (1:3)	1 (5)	1 (25)	34,97	31,12	11,01	
8	1 (1:6)	1 (5)	1 (25)	46,86	51,56	-10,02	
9	0(1:4,5)	0 (2,5)	0 (20)	56,72	52,05	0,11	
10	0(1:4,5)	0 (2,5)	0 (20)	52,11	52,05	0,11	
11	0(1:4,5)	0 (2,5)	0 (20)	50,72	52,05	-2,62	

* Gordura Suína:Etanol.

¹EPR = Desvio padrão relativo.

Os resultados obtidos no segundo planejamento de experimentos também foram analisados estatisticamente e permitiram a construção de um modelo empírico codificado para a conversão de ésteres etílicos em função da razão molar dos substratos, concentração de água e concentração de enzima. O modelo empírico resultante foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentado na Tabela 6. O valor de coeficiente de correlação (R) e o F-teste calculado e tabelado para a regressão mostrou que o modelo (Equação 1) foi capaz de representar bem os dados experimentais de conversão de ésteres etílicos no intervalo dos fatores investigados e permitiu a construção da superfície de resposta apresentadas na Figura 11. Isso implica em uma representação satisfatória do processo pelo modelo empírico, conforme ilustrado pela conversão predita (coluna 6 da Tabela 5) e o erro padrão (EPR) (coluna 7 da Tabela 5).

A Figura 10 mostra o diagrama de pareto para a produção enzimática de ésteres etílicos utilizando a lipase Lipozyme TL IM e gordura suína, podendo observar que somente a razão molar obteve um efeito significativo positivo.

Figura 10: Diagrama de Pareto para a produção enzimática de ésteres etílicos utilizando a lipase Lipozyme TL IM e gordura suína, em diferentes concentrações de água (0 %, 2,5 % e 5 % m/m) concentração de derivado enzimático (15 %, 20 % e 25 % m/m), razão molar de 1:3, 1:4,5 e 1:6 de gordura suína: etanol, com a temperatura de 45 °C e 4 mL de solvente e em agitação de 180 rpm

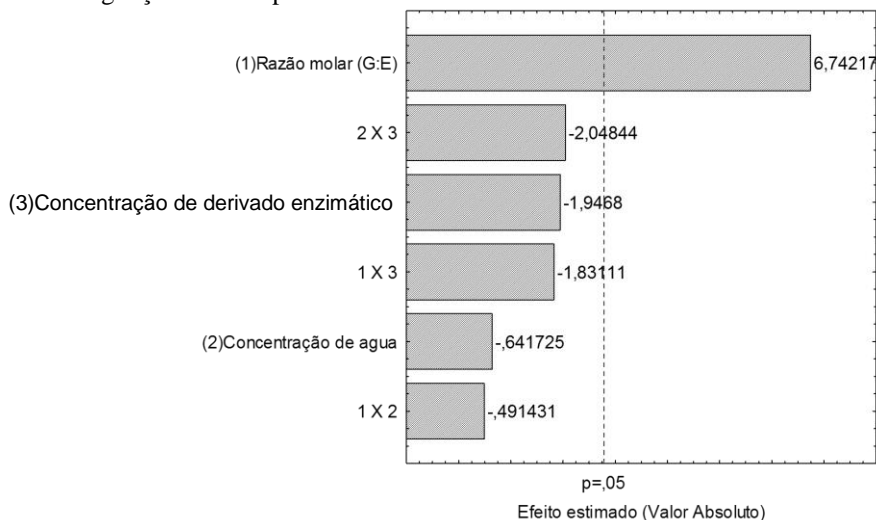


Tabela 6: ANOVA para validação do modelo matemático que descreve a produção de ésteres etílicos.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	P-valor
Regressão	2456,95	6	409,49	9,57	0,0025
Resíduo	171,07	4	42,76		
Total	2628,02				

R = 0,93 F_{tabelado 0,95; 6;4} = 6,16

$$T_E = 52,05 + 15,58 * RM \quad (4)$$

Onde:

T_E - Teor de ésteres etílicos (%)

RM - Razão molar entre a gordura suína e o etanol

De acordo com a Equação 4, pode-se observar que a variável razão molar apresentou um efeito positivo significativo ($p < 0,05$). A concentração de água, concentração de enzima e as interações entre estas variáveis apresentaram um efeito negativo sobre a conversão de ésteres etílicos. Os maiores valores de excesso de etanol parecem promover um melhor sistema de reação. Como exemplo, no ensaio 4 (Tabela5) conversão de 82,35 % foi obtido em 18 horas de reação (razão molar de gordura suína e etanol de 1:6).

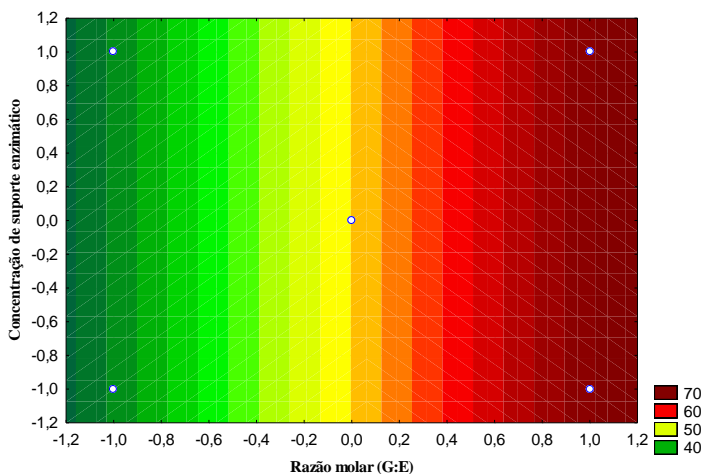
Liu et al. (2012) obtiveram um teor de ésteres metílicos de 70 % em 12 horas de reação nas condições ótimas de estudo, em temperatura ambiente, agitação de 200 rpm, 300 U/mL da lipase imobilizada-HMP, 10 % m/m de concentração de água e a razão molar de 4:1 de metanol e óleo (azeite).

Charpe e Rathod (2011) estudaram a produção de ésteres metílicos a partir do óleo de fritura do óleo de girassol utilizando a enzima de

Pseudomonas fluorescens, que dentre as enzimas estudadas proporcionou a maior conversão. Os autores obtiveram nas condições ótimas uma temperatura de 45 ° C, com uma concentração de enzima de 5 % e uma razão molar de 3:1 de metanol: óleo, a fim de evitar um efeito inibitório, a adição de metanol, foi realizada em três etapas. E após 24 horas o teor de ésteres etílicos encontrado foi de 63,84%.

O modelo codificado representado pela Equação 1, validado pela análise de variância, foi usado para gerar a superfície de resposta para a produção enzimática de ésteres etílicos a partir da gordura suína em função razão molar e da concentração de derivado enzimático, a qual está apresentada na Figura 11.

Figura 11: Superfície de resposta para a produção enzimática de ésteres etílicos a partir da gordura suína em função da razão molar e concentração de derivado enzimático.



A partir da Figura 11 pode-se observar que um aumento na variável razão molar pode conduzir a um aumento no teor de ésteres etílicos, observando que 82,35 % foi obtido no experimento com maior razão molar (1:6) e concentração de água (5%) e menor concentração de enzima (15%).

4.5 CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTER ETÍLICO A PARTIR DA GORDURA SUÍNA

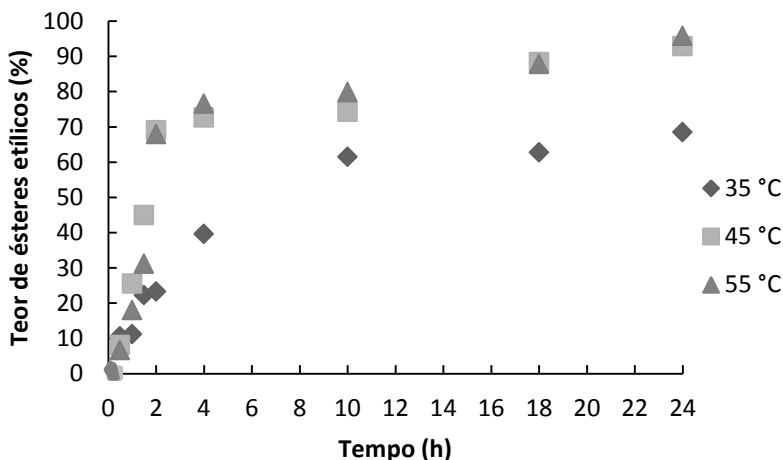
Visando avaliar o efeito da temperatura, concentração de água e concentração de derivado enzimático foi investigada sua influência sobre a produção enzimática de éster etílico para aperfeiçoar o comportamento da melhor condição identificada no planejamento fatorial completo 2^3 .

4.5.1 Efeito da temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura sobre o teor de ésteres etílicos foram utilizadas temperaturas (35 °C, 45 °C e 55 °C) para avaliar a melhor condição identificada no planejamento fatorial completo 2^3 bem como demonstrar que menor temperatura (35 °C) pode não obter alto teor de ésteres etílicos, uma vez que a temperatura está relacionada com a atividade da enzima.

Na cinética foram mantidos fixos: a concentração de enzima de 15 % (m/m) de substratos, a concentração de água de 5% (m/m) de substrato, razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e agitação de 180 rpm, tornando possível a construção de curvas experimentais de conversão versus o tempo de reação. A Figura 12 apresenta a cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes temperaturas (35 °C, 45 °C e 55 °C).

Figura 12: Cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes temperaturas (35 °C, 45 °C e 55 °C). Mantendo fixos os parâmetros: concentração de enzima (15 % m/m), concentração de água (5% m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e em rotação de 180 rpm.



De acordo com a Figura 12 é possível notar que na temperatura de 35 °C as conversões foram menores do que nas temperaturas de 45 °C e 55 °C, alcançando a maior conversão no tempo de 24 horas com 68,44 %. Nas temperaturas de 45 °C e 55 °C nos pontos de 0,5; 2; 10; 18 e 24 h apresentaram pequenas variações entre si, de no máximo 3 %; tendo em 24 horas alcançado uma conversão de 92,84 % (45 °C) e 95,80 % (55 °C) mostrando que os resultados estão de acordo com os valores obtidos no planejamento de experimentos.

O que permite determinar a temperatura de 45 °C como sendo a temperatura ótima para todo o processo, uma vez que a temperatura de 55 °C obteve resultados semelhantes, porém uma temperatura mais elevada indica maior custo do processo.

Dizge e Keskinler (2008) investigaram o efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da lipase imobilizada *Thermomyces lanuginosus* na produção de éster metílico de óleo de canola utilizando como álcool, o metanol. Foi estudado o efeito da temperatura no intervalo de 30°C a 70°C. Nas temperaturas acima de 50°C, a enzima perdeu de forma drástica sua atividade, sendo observada uma diminuição na produção de éster metílico.

A temperatura de 40 °C foi considerada como a temperatura ótima para a produção de biodiesel apresentando uma conversão de 85,8 % em ésteres metílicos.

Li; Zong e Wu (2009) avaliaram o efeito da temperatura na reação sobre a produção de ésteres metílicos a partir do óleo usado, pois a temperatura tem um efeito significativo sobre a atividade e estabilidade do biocatalizador e também sobre o equilíbrio termodinâmico da reação, assim, foi investigada a faixa de temperatura de 25°C a 55°C, em 24 horas. Para aumentar o rendimento de todas as reações foi realizada a remoção da água do óleo. A temperatura considerada ótima da reação foi de 35 °C, sob condições otimizadas, com um rendimento de 80,1 %. O aumento da temperatura acima de 35 °C causou uma queda no rendimento de ésteres metílicos, essa queda pôde ser explicada pela inativação da lipase em temperaturas elevadas.

Nie, et al. (2006) estudaram o efeito da temperatura da reação, 27°C a 50°C, na transesterificação enzimática com a lipase *Candida* sp. 99-125 a partir de óleo de soja. E verificou-se que as temperaturas mais altas podem diminuir o tempo de conversão, mas que ao mesmo tempo podem conduzir a uma desnaturação da enzima. O melhor rendimento foi observado a 40°C tanto no tempo de reação de 30 horas quanto no tempo de reação de 60 horas, para as temperaturas mais baixas, os melhores resultados podem ser obtidos se o tempo de reação é aumentado para 60 horas. Nas temperaturas de reação superiores a 40°C foi observada uma diminuição do teor de ésteres.

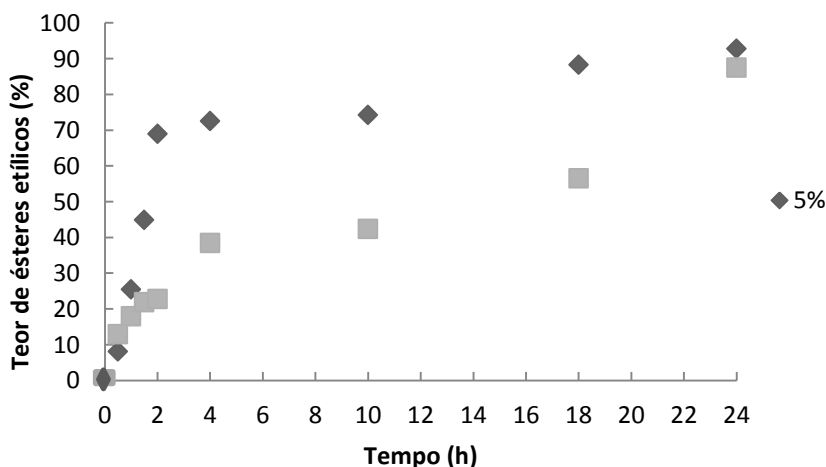
Noureddini; Gao e Philkana (2005) pesquisaram sobre o efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da lipase PS (*Pseudomonas cepacia*) imobilizada na transesterificação do óleo de soja com metanol e etanol. As reações foram realizadas na condição otimizada. As temperaturas variaram de 25 °C a 60 °C. A temperatura ótima nos dois processos foi de 35 °C. A transesterificação com metanol formou 65 % de ésteres metílicos; a transesterificação utilizando etanol obteve uma conversão de 62 %, em uma hora de reação. À medida que a temperatura da reação foi aumentada, foi observado um decréscimo na produção de ésteres metílicos e etílicos.

4.5.2 Efeito da concentração de água

Para avaliar o efeito da concentração de água sobre o teor de ésteres etílicos, foram mantidos fixos: a temperatura em 45 °C, a concentração de derivado enzimático de 15 % (m/m), a razão molar de 1:6 de gordura

suína:etanol, 4 mL de solvente e agitação de 180 rpm, tornando possível a construção de curvas experimentais do teor de ésteres etílicos versus o tempo de reação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes concentrações de água (5% e 10%).

Figura 13: Cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes concentrações de água (5% e 10%). Mantendo fixos os valores de: temperatura (45°C), concentração de enzima (15 % m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 ML de solvente e em agitação de 180 rpm.



De acordo com a Figura 13 observa-se que após 30 minutos de reação a concentração de água de 5 e 10 % obteve-se conversões de triglicerídeos em ésteres etílicos de 8,11 e 12,96 %, respectivamente.

Ainda na Figura 13 é possível observar que a menor concentração de água (5 %) apresentou uma maior conversão a partir de uma hora de reação quando comparado com a concentração de água de 10 %. Visto que em 18 horas a concentração de água de 5 % apresentou uma conversão de 88,35 % e em 24 horas uma conversão de 92,84 %. Com a concentração de água de 10 %, em 18 horas e em 24 h foram convertidos 56,57 e 87,55 % de triglicerídeos em ésteres etílicos. Podendo-se concluir que uma menor concentração de água na transesterificação aumenta a conversão em ésteres etílicos.

Nie et al., (2006) estudaram o efeito da concentração de água na metanólise no óleo de soja, utilizando a enzima imobilizada *Candida* sp.

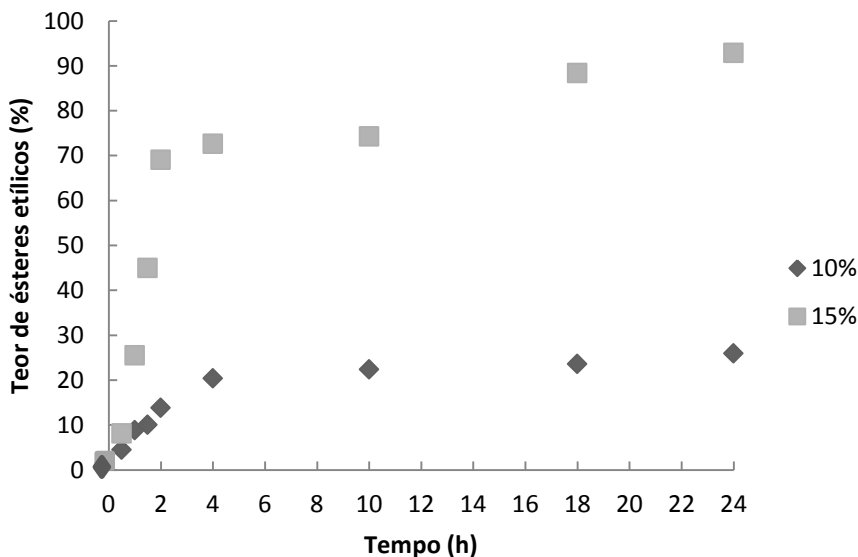
99-125, aonde o teor de água variou de 0% a 40% (m/m) de óleo de salada. A produção de éster metílico aumentou com o aumento da concentração de água até essa atingir um aumento entre 10 % e 15 %, acima dessa concentração houve uma diminuição na conversão. Observou-se que quando foram adicionados 10 % de água na reação, a transesterificação do óleo foi mais rápida do que comparado com a concentração de 0 % de água. Isto significa que a hidrólise foi favorecida neste tipo de reação pois ao final da hidrólise o ácido graxo livre se transformou em ésteres metílicos.

Noureddini; Gao e Philkana (2005) estudaram o efeito da concentração de água de 0,5 a 20 %, as reações foram realizadas de acordo com a condição otimizada da reação. Os resultados indicam que a atividade da enzima é baixa em pequenas concentrações de água, pois é necessária uma quantidade mínima de água para ativar a enzima, uma vez que ativação da enzima envolve a reestruturação do sítio ativo através de mudanças conformacionais da molécula de lipase, sendo necessária a presença da interface água-óleo. Com o aumento da adição de água, houve um aumento considerável na produção de ésteres que mostra o aumento na atividade da enzima com o aumento da área da interface água - óleo, sendo considerada como concentração ótima, 5 % de água.

4.5.3 Efeito da concentração de derivado enzimático

Para avaliar o efeito da concentração de enzima sobre a conversão de ésteres etílicos, foram mantidos fixos: temperatura em 45 °C, a concentração de água de 5 % (m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e agitação de 180 rpm, tornando possível a construção de curvas experimentais de conversão versus o tempo de reação. A Figura 14 apresenta a cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes concentrações de enzima (10 % e 15 %).

Figura 14: Cinética de transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM em diferentes concentrações de enzima (10 % e 15 %). Mantendo fixos os parâmetros: temperatura em 45 °C, a concentração de água de 5 % (m/m), razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e agitação de 180 rpm.



De acordo com a Figura 14 observa-se que na concentração de enzima de 10 % a conversão inicial foi de 4,51 % no tempo de 30 minutos e a maior conversão aconteceu no tempo de 24 horas com 25,96 % de ésteres etílicos.

Através da Figura 14 é possível observar que a concentração de enzima de 15 % apresentou maiores conversões em todos os tempos da cinética em comparação a concentração de enzima de 10 %, podendo destacar partir de uma hora de reação obtendo uma conversão de 25,51 %. Em 2 horas apresentou uma alta conversão, 69,04 %, e em mais oito horas de reação, no tempo de 10 horas, houve uma pequena diferença em relação ao tempo de 2 horas, apresentando uma conversão de 74,26 % em ésteres etílicos. Importante destacar os tempos de 18 horas e 24 horas que apresentaram conversões satisfatórias, 88,35 % e 92,84 % de ésteres

etílicos, respectivamente, podendo-se concluir que a concentração de enzima ótima é 15 % (m/m) conversão em ésteres etílicos, ou seja, o efeito de concentração de enzima é positivo, aonde essa maior capacidade de concentração de enzima gera um o número de sítios ativos acessível ao substrato aumentando o rendimento.

Lu et al. (2007) investigaram o efeito de diferentes concentrações de lipase imobilizada *Candida sp.* 99-125 na metanólise, a conversão aumentou rapidamente quando a quantidade de lipase foi aumentada para 20 % (m/m); acima da concentração de 20 % houve um pequeno aumento na produção, entretanto levou-se um maior tempo. Uma maior quantidade de lipases ativas no meio reacional e uma maior área de contato entre a lipase e os substratos, ocasionam maiores conversões de ésteres etílicos. Quando se utilizou uma quantidade de lipase superior a 20 % (m/m) na gordura suína, não foi observado a influência desse aumento na conversão.

5 CONCLUSÃO

Dessa forma conclui-se que no estudo cinético preliminar, no tempo de 18 horas, obteve-se um teor de ésteres etílicos de 83,37 %, próximo ao valor obtido em 24 horas, o que torna viável realizar os experimentos em 18 horas.

Tem-se como conclusão para o primeiro planejamento, Planck-Burman, que a temperatura e volume do solvente não foram significativos, sendo considerados, a menor temperatura 45°C e o menor volume de solvente 4 mL, no tempo de 18 horas. Os parâmetros significativos demonstraram que a razão molar de 1:3, concentração de água de 5 % e 15% de enzima obtiveram as maiores conversões.

Para o segundo planejamento tem-se que a melhor condição para síntese de ésteres etílicos (82,35%) foi relativa à uma razão molar de gordura suína e etanol de 1:6, 5% (m/m) de água e 15% (m/m) da enzima imobilizada Lipozyme TL IM, 4 mL de hexano, 45°C, 180 rpm em 18 horas de reação.

Os efeitos da temperatura, concentração de água e concentração de derivado enzimático, realizados após os planejamentos confirmaram as melhores condições encontradas nos mesmos bem como os efeitos que eram ou não significativos dentro da faixa estudada.

A utilização da enzima Lipozyme TL IM neste estudo indica uma economia no processo pois se trata de uma enzima de baixo custo, além de ser imobilizada esta pode ser reutilizada em mais de um processo. Outra vantagem econômica do estudo foi o tempo de processo relativamente baixo.

A produção enzimática de ésteres etílicos a partir da gordura suína se mostrou um processo sustentável e com grande potencial para ser aplicado nas indústrias de biodiesel, sendo esta uma boa opção para a valorização dessa matéria prima da indústria suína.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, a fim de dar continuidade e complementar os estudos, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Reuso do derivado enzimático.
- Avaliar a produção enzimática de ésteres etílicos em modo batelada alimentada e contínuo.
- Avaliar a utilização de outras lipases para a produção de ésteres etílicos.
- Realizar as reações em outros meios não convencionais, por exemplo, banho de ultrassom e em sistema supercrítico.
- Utilizar como matéria-prima o resíduo da gordura suína.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Boletim mensal do Biodiesel. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=68994&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&ca&chebust=1386182442418>. Acesso em: 05/12/2013.

ANP, AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO; Portaria Nº 255, de 15 de setembro de 2003; Especificação para o biodiesel puro a ser adicionado ao óleo diesel automotivo. Disponível em: http://perkinelmer.com.br/downloads/biodiesel/ANP%20Portaria%20255_2003.pdf. Acesso em: 20 de fevereiro de 2014.

ARAGÃO, V. C. et al. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2268-2272, 2009.

ARANSIOLA, E. F.; OJUMU, T. V.; OYEKOLA, O. O.; MADZIMBAMUTO, T. F.; IKHU-OMOREGBE, D. I. O. A review of current technology for biodiesel production: state of the art. **Biomass and Bioenergy**, in press, 2013.

ARYEE, A. N. A.; SIMPSON, B. K.; CUE, R. I; PHILLIP, L. E. Enzymatic transesterification of fats and oils from animal discards to fatty acid ethyl esters for potential fuel use. **Biomass and bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4149-4157, 2011.

Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, ABIPECS. Mercado Interno de Carne Suína. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/producao/Producao_2012.pdf. Acesso em: 09/09/2013.

Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, ABIPECS. Países que se destinam a carne suína. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-externo/destinos/dados-anuais/JULHO_13_PRINCIPAIS_DESTINOS.pdf. Acesso em: 09/09/2013.

BARBOSA, A. M. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

BARROS, S. BRAZIL Biofuels Annual – Annual Report 2013. **USDA**, gain report number: BR13005, 2013. BARROS, T. D.; JARDINE, J. G. Gordural animal. AGEITEC- Agência Embrapa de Informação Tecnológica / EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1om7kf02wyiv802hvm3jholyoom.html>. Acesso em: 21/02/2014.

BASRI, M.; KASSIM, M.A.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Optimization and kinetic study on the synthesis of palm oil ester using Lipozyme TL IM. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 85-86, p. 214-219, 2013.

BERGMANN, J. C. et al. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.

BERRIOS, M.; GUTIÉRREZ, M. C.; MARTÍN, M.A.; MARTÍN, A. Application of the factorial design of experiments to biodiesel production from lard. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1447-1451, 2009.

BORNSHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, 73-81, 2002.

BRASIL, L., DECRETOS. Resolução RDC n. 270 de 22 de setembro de 2005. Disponível em: < www.anvisa.gov.br >. Acesso em: 25 de março de 2014.

CALERO, J.; VERDUGO, C.; LUNA, D.; SANCHO, E. D.; LUNA, C.; POSADILLO, A.; BAUTISTA, F. M.; ROMERO, A. A. Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, na immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel – like biofuel, which avoid glycerol production through the monoglyceride formation. **New Biotechnology**, in press, 2014.

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, n. 8, p. 4031-4039, 2010.

CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Management*, v. 31, n.1, p. 85-90, 2011.

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

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

DU, W.; XU, Y.Y., LIU, D. H., LI, Z. B. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL – catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, issues 1-6, December 2005, Pages 68-71.

European Biodiesel Board – EBB. Produção de biodiesel na Europa. Disponível em: <http://www.ebb-eu.org/stats.php> . Acesso em 03 de janeiro de 2013.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/ Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FLACH, B. EU-27 - Livestock and Products Semi-Annual, Supply tightens, prices surge. **USDA**, gain report number :NL3005, 2013.

FLACH, B.; BENDZ, K.; KRAUTGARTNER, R.; LIEBERZ, S. EU Biofuels anual 2013. **USDA**, gain report number : NL3034, 2013.

Food and Agriculture Organization, FAO. Produção suína mundial. Disponível em: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html#. Acesso em: 06/02/2014.

FREITAS, R. T. F.; GONÇALVES, T. M.; OLIVEIRA, A. I. G.; FERREIRA, D. F. Avaliação de carcaças de suínos da Raça Large White utilizando medidas Convencionais. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.2037-2043, 2004.

GARLAPATI, V. K.; KANT, R; KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; DAS, P.; BANEJEE, R. Lipase mediated transesterification of *Simarouba glauca* oil: A new feedstock for biodiesel production. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, 2013.

GUAN, G.; KUSAKABLE, K.; SAKURAI, N. Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalysts in the presence of dimethyl ether. **Fuel**, v. 88, n. 1, p. 81-86, 2009.

HELWANI, Z.; OTHMAN, M. R.; AZIZ, N.; FERNANDO, W. J. N.; KIM, J. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502 – 1514, 2009.

HUANG, Y.; ZHENG, H; YAN, Y. Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 160, n. 2, p. 504-515, 2010.

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

KAUP, F.; SELBMANN, K. The seesaw of Germany's biofuel policy – Tracing the evolution to its current state. **Energy Policy**, v. 62, p. 513-521, 2013.

KIAKALAEIHA, A. T.; AMINA, N. A. S.; MAZAHARI, H. A review on novel process of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy** v. 104, p. 683-710, 2013.

KNOTHE, G. et al. Manual de biodiesel. **São Paulo: Edgard Blucher**, p. 9, 2006.

KUMAR, M. S.; KERIHUEL, A.; BELLETTRE, J.; TAZEROUT, M. Experimental investigations on the use of preheated animal fat as fuel in a compression ignition engine. **Renewable Energy**, v. 30, n. 9, p. 1443-1456, 2005.

LAI, J-Q.; HU, Z-L.; SHELDON, R. A.; YANG, Z. Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2058-2063, 2012.

LATORRE, M. A.; LÁZARO, R.; GRACIA, M. I.; NIETO, M.; MATEOS, G. G. Effect of sex and terminal sire genotype on performance, carcass characteristics, and meat quality of pigs slaughtered at 117 kg body weight. **Meat Science**, v. 65, n. 4, p. 1369-1377, 2003.

LEE, K. T.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 191-195, 2002.

LEONARDIS, A. D.; MACCIOLA, V.; LEMBO, G.; ARETINI, A.; NAG, A. Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mil wastewater. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 998-1004, 2007.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LI, N. W.; ZONG, M. H.; WU, H. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 685-688, 2009.

LI, X.; HE, X. Y.; , Z. L.; WANG, Y. D.; WANG, C. Y. SHI, H.; WANG, F. Enzymatic production of biodiesel from *Pistacia chinensis bge* sees oil using immobilized lipase. **Fuel**, v. 92, n.1, p. 89-93, 2012.

LIE, E; MOLIN, G. Hydrolysis and Esterification with Immobilized Lipase on Hydrophobic and Hydrophilic Zeolites. **J . Chem. Tech. Biotechnol**, v. 50, p. 549-553, 1991.

LIU, C. H.; HUANG, C. C.; WEN, Y. W.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, v. 100, p. 41-46, 2012.

LU, J. et al. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp.99-125. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1367-1370, 2007.

LUKOVIC, N.; JUGOVIC, Z. K.; BEZDRADICA, D. Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives. **Alternative Fuel**, 2011. ISBN: 978-953-307-372-9.

MACRAE, A. R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **JAACS**, v. 60, p. 291-294, 1983.

MADER, F.; CELIN, M. M.; MAZIUM, M. S.; SCHNEIDER, R. C. S.; MACAGNAN, M. T.; CORBELLINI, V. A. Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de lipase em hidrogel. **TECNO-LÓGICA**, Santa Cruz do Sul, v.12, n.2, p.56-64, jun./dez. 2008.

MALEKI, E.; AROUA, M. K.; SULAIMAN, N. M. N. Improved yield of solvent free enzymatic methanolysis of palm and jatropha oils blended with castor oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 905-909, 2013.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MATASSOLI, A. F. L; CORRÊA, I. N. S.; PORTILHO, M. F.; VELOSO, C. O; LANGONE, M. A. P. Enzymatic Synthesis of Biodiesel via Alcoholysis of Palm Oil. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 155, p. 347-355, 2009.

ME, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**, vol. 70, n.1, p. 1 – 15, 1999.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, Q. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, Vol. 36, No. 2, 245-251, 2013.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E.; DEKKER, R. F. H.; MOEIN, P.; GHOREISHI, S. M. Biodiesel synthesis from waste vegetable oil via transesterification reaction in supercritical metanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 76, p. 24-31, 2013.

NASARUDDIN, R. R.; ALAM, M. Z.; JAMI, M. S. Evolution of solvent system for the enzymatic synthesis of ethanol based biodiesel from sludge palm oil (SPO). **Bioresource Technology**, v. 154, p. 156-161, 2014.

NGO, H. L. et al. Efficient Two-Step Synthesis of Biodiesel from Greases. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 626-634, 2008.

NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 142-147, 2006.

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

Novozyme A / S, de Lipozyme® TL IM, Bagsvaerd – Dinamarca, 2005.

OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Production and characterization of Lipase produced by *Fusarium SP*. And this application of biodiesel. 2010

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A.G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V.; FREIRE, D.M.G. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 117-123, 2006.

POUSA, G. P.A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, p. 5393–5398, 2007. Produção de biodiesel ainda é muito concentrada. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/03/02/producao-de-biodiesel-no-pais-ainda-e-muito-concentrada>. Acesso em: 23 de setembro de 2012.

Produção do biodiesel. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>. Acesso em: 24 de setembro de 2012.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELMEN, H. M. Biodiesel, um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 31, p. 26-37, 2003.

RIISPOA, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 1.255, de 25 de junho de 1962. Disponível em: <http://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/103771/decreto-1255-62#>. Acesso em: 08 de outubro de 2013.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolsis of soybean oil with immobilized lipase from *candida antarctica* and ¹h nmr and gc quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1-2, p. 136-142, 2011.

SCHMIDT, M.; BAUMANN, M.; HENKE, E.; BESSLER, M. K.; BORNSCHEUER, U. T. Directed evolution of lipases and esterases. **Methods in Enzymology**, v. 388, p. 199-207, 2004.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transterification of vegetable oils: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998. ISSN 0103-5053.

SCOTT, R. R.; JIANPING, Z. China - Peoples Republic of Livestock and Products Annual. **USDA**, gain report number : 13048, 2013.

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

SHIN, H-Y.; LEE, S-H.; RYU, J-H.; BAE, S-Y. Biodiesel production from waste lard using supercritical metanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 134-138, 2012.

SINGH, B. et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216-245, 2014.

SILVA, C. S. P.; STENICO, M. E. S.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F.; RÓS, P. C. M. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (Cyanobacteriom) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, v. 3, p 1-7, 2014.

SILVA, J. F. BRAZIL Livestock and Products Annual – Annual Livestock 2013. **USDA**, gain report number: BR0914, 2013.

SILVA, J. F. BRAZIL Livestock and Products Annual – Annual Report Livestock 2013. **USDA**, gain report number: BR0819, 2012.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.

TAN, K. T.; GUI, M. M.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Na optimized study of metanol and etanol in supercritical alcohol technology for biodiesel production. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 53,n. 1-3, p. 82-87, 2010.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipase for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM – Catalyzed methanolysis using response surfasse methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 77232-7237, 2008.

WHITELEY, C. G.; LEE, D. J. Enzymes for energy. Structural computational analysis, substrate association and product dissociation from the thermophilic esterase of *alicyclobacillus acidocaldarius*: Implications in biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 156-168, 2013.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438–450, 1998.

YOU, Q.; YIN, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Biodiesel production from *Jatropha* oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* on modified attapulgite. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 202-207, 2013.

YUN, H.; WANG, M.; FENG, W.; TAN, T. Process simulation and energy optimization of the enzyme-catalyzed biodiesel production. **Energy**, vol. 54, p. 84-96, 2013.

8 APÊNDICE A – CROMATOGRAMA

Neste apêndice é apresentado, para exemplificação, um cromatograma obtido no decorrer do estudo. A Figura 15 corresponde ao cromatograma da cinética da transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM no tempo 18 horas no planejamento fatorial completo 2^3 .

Figura 15: Cromatograma da cinética da transesterificação da gordura suína com etanol e com a Lipozyme TL IM no tempo 18 horas no planejamento fatorial completo 2^3 , nas condições de 45 °C,; 15 % m/m de concentração de derivado enzimático, 5 % m/m concentração de água, razão molar de 1:6 de gordura suína: etanol, 4 mL de solvente e em rotação de 180 rpm.

