

Cecília Lenzi

RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS
DE BORRA DE SOJA

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

Orientadora: Prof. Dr. Débora de Oliveira.

Coorientadora: Dr. Mara Cristina Picoli Zenevich.

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor Biblioteca
Universitária da UFSC. Ficha de identificação da obra
elaborada pelo autor Biblioteca Universitária da UFSC.

Lenzi, Cecília RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS
DE BORRA DE SOJA / Cecília Lenzi ; orientadora, Débora de Oliveira ;
coorientador, Mara Cristina Picoli Zenevitz, coorientador, José Vladimir de
Oliveira. - Florianópolis, SC, 2017.

81 p.

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Biodiesel. 3. Lipases. 4. Borra de soja. I. de
Oliveira, Débora. II. Zenevitz, Mara Cristina Picoli. III. Oliveira, J. Vladimir.
IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. V. Título.

Cecília Lenzi

RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS DE BORRA DE SOJA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química

Florianópolis, 01 de junho de 2017.

Prof^ª. Dr. Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Débora de Oliveira, Dr.
Orientadora

Prof. José Vladimir de Oliveira, Dr.
Coorientador

Mara Cristina Picoli Zenevicz, Dr.
Coorientadora

Prof^ª. Alexandra Valério, Dr.

Prof. João Paulo Bender, Dr.

Lindomar A. Lerin, Dr.

Este trabalho é dedicado ao meu amor
e melhor amigo, César.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu amor, César, pelo apoio nesta empreitada. Sem você nada disso existiria.

A minha família, por acreditar na minha capacidade e ter me dado o suporte que eu precisei para me tornar engenheira.

À professora Débora e ao professor Vladimir, por me acolher e subsidiar a realização deste trabalho.

Ao professor Leonel, por me ter aberto as portas da UFSC.

À pós-doutoranda preferida, Mara, por todo apoio e ajuda concedidos.

À amiga Priscila, pela grande amizade e parceria infinita.

Aos amigos Tarcísio, Luís, Carlos, Ana Carolina, Édipo, Vódice, Michaela, Sarah e Márcia, pelo companheirismo e amizade sincera.

Ao casal Afrânio e Carol, pelos conselhos e amizade.

Ao amigo João pela inspiração, Koichi por todas as horas de filosofia e matemáticas ousadas e Melissa pelo carinho.

Aos ex-colegas Tiago e Francisco pelo apoio.

À UFSC, em especial ao Laboratório de Transferência de Massa pela infraestrutura.

À BRF S.A. Paranaguá/PR por ter cedido gentilmente a borra de soja.

À Novozymes® por ter cedido gentilmente as enzimas utilizadas.

Ao Sr. “Carlinhos” que construiu o agitador e à equipe do Labsolda, da Engenharia Mecânica – UFSC, por aperfeiçoá-lo.

Isso de se querer ser exatamente aquilo que a gente é ainda vai nos levar além.

(Paulo Leminski, 1987)

RESUMO

Visando atender ao compromisso firmado no Tratado de Quioto, o governo brasileiro iniciou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Para atender ao aumento na demanda deste combustível a produção aumentou em mais de dez vezes nos últimos 10 anos. A principal fonte oleaginosa é o óleo de soja. Para manter a competitividade do setor, outras matérias-primas têm sido avaliadas. Entre elas, as residuais, por apresentarem menor custo. O processamento de resíduos apresenta desafio devido a impossibilidade do emprego de processos convencionais já consolidados no mercado. Visando preencher esta importante lacuna, este trabalho avaliou a hidroesterificação enzimática da borra de soja com uso de lipases provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus*. Os testes foram realizados em duas etapas sequenciais: iniciando pela hidrólise da matéria-prima bruta seguida da esterificação dos ácidos graxos, ambas em reator tipo batelada. Na etapa de hidrólise a melhor condição encontrada, com maior produção de ácidos graxos livres, foi com o emprego de proporção mássica de água e borra de 0,25:1, teor de 0,2% (m/m borra) de catalisador enzimático NS-40116 (Novozymes®), agitação de 450 rpm e 45 °C, obtendo-se uma acidez final média de $25,47 \pm 3,24\%$ de desvio padrão. Sem a purificação da massa resultante da hidrólise, esta foi submetida a esterificação em reator de batelada e verificou-se a redução média da acidez em $72,85 \pm 3,09\%$, confirmando a capacidade da enzima em hidrolisar matéria graxa e esterificar os ácidos graxos livres formados, apresentando assim uma opção para se produzir ésteres de ácidos graxos a partir de uma matéria-prima residual com o uso de processo enzimático.

Palavras-chave: Biodiesel. Lipases. Borra de soja.

ABSTRACT

Aiming to attend to the commitment established in the Kyoto Protocol, Brazilian government established the National Program for the Production and Use of Biodiesel. To attend the increase in demand for this fuel, the production has improved more than tenfold in the last 10 years. The main oil source is soybean oil. In order to maintain the competitiveness of the sector, other raw materials have been evaluated. Among them, the residual ones, because they present a lower cost. Waste processing presents challenges due to the impossibility of using conventional processes already consolidated in the market. In order to fill this important gap, this work evaluated the enzymatic hydro esterification of soybean soap stock with the use of lipases from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. The tests were carried out in two sequential stages: starting with the crude soap stock hydrolysis followed by esterification of the fatty acids, both in a batch reactor. In the hydrolysis step, the best free fatty acid production was obtained using a water and soap stock weight ratio of 0.250:1, 0.2% (w/w) of the enzyme NS-40116 (Novozymes®), agitation of 450 rpm and 45 °C, obtaining an average final acidity of $25.47 \pm 3.24\%$. Without any purification of hydrolyzed soap stock, it was submitted to esterification in a batch reactor. The mean acid reduction was found to be $72.85 \pm 3.09\%$, confirming the enzyme's ability to hydrolyze grease matter and to esterify the free fatty acids, thus presenting an option to produce esters of fatty acids from a residual raw material using an enzymatic process.

Keywords: Biodiesel. Lipases. Soybean soap stock.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de biodiesel no Brasil (m ³).	29
Figura 2 – Produção anual de oleaginosas no Brasil.	30
Figura 3 – Reações de esterificação de ácidos graxos e transesterificação de triacilglicerídeos, com destaque ao grupo acila. ..	33
Figura 4 – Diagrama esquemático da produção de biodiesel convencional.	35
Figura 5 – Diagrama esquemático da produção de biodiesel enzimático.	37
Figura 6 – Produtos gerados no refino do óleo de soja.....	38
Figura 7 – Fluxograma simplificado do processo de refino de óleos vegetais.	39
Figura 8 – Estratificação dos produtos do processamento de óleo de soja no Brasil (1000 t/ano).	40
Figura 9 – Estrutura de um fosfolípido e região de ação das enzimas fosfolipases.....	46
Figura 10 – Estrutura da lipase não tratada de <i>Thermomyces lanuginosus</i> com uma resolução de 2,3 Å.....	48
Figura 11 – Diagrama esquemático dos equipamentos utilizados para a hidrólise.	57
Figura 12 – Vistas frontal, lateral e superior da haste agitadora.	58
Figura 13 – Ilustração do reator utilizado na esterificação.	61
Figura 14 – Cinética das reações de hidrólise com diferentes teores de água. Condições de processo: 24 h, 45 °C, agitação de 450 rpm, 0,1% (m/m borra) de Lecitase® Ultra e 0,5% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0®	65
Figura 15 – Cinética das reações de hidrólise com diferentes temperaturas. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 0,1% (m/m borra) de Lecitase® Ultra e 0,5% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0®	67
Figura 16 – Cinética das reações de hidrólise com diferente teor de Lecitase® Ultra em uso concomitante com a Eversa Transform 2.0®. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 45 °C e 0,5% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0®.....	68
Figura 17 – Cinética das reações de hidrólise com diferente teor de Lecitase® Ultra na ausência da Eversa Transform 2.0®. Condições de	

processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 45 °C..... 69

Figura 18 – Acidez máxima obtida variando o teor de Eversa Transform 2.0® 70

Figura 19 – Cinética das reações de hidrólise com teor entre 0,2 e 0,3% de Eversa Transform 2.0® . Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra), agitação de 450 rpm, 45 °C. 71

Figura 20 – Cinética das reações de hidrólise com teor entre 0,5 e 1,0% de Eversa Transform 2.0® . Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra), agitação de 450 rpm, 45 °C. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valor comercial das principais opções de matérias-primas para a produção de biodiesel (referência: estado de SP).	25
Tabela 2 – Progressão da adição de biodiesel ao diesel de petróleo para comercialização do combustível no Brasil.	28
Tabela 3 – Especificação exigida pela ANP para o Biodiesel produzido e comercializado no Brasil.	32
Tabela 4 – Classificação internacional de enzimas.	43
Tabela 5 – Caracterização da borra de soja.	63
Tabela 6 – Limites de presença de ácidos graxos livres no óleo de soja.	64
Tabela 7 – Acidez final da hidrólise e esterificação da borra de soja....	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	MOTIVAÇÃO.....	25
1.2	OBJETIVOS.....	26
1.2.1	Objetivo geral.....	26
1.2.2	Objetivos específicos.....	26
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	HISTÓRICO.....	27
2.2	BIODIESEL.....	31
2.2.1	Rotas sintéticas.....	33
2.2.2	Produção convencional: Catalisador químico.....	34
2.2.3	Produção alternativa: Catalisador enzimático.....	36
2.3	BORRA DE SOJA.....	37
2.3.1	Tratamento da borra.....	41
2.4	ENZIMAS.....	41
2.4.1	Processos enzimáticos.....	43
2.4.2	Lipases.....	44
2.4.3	Fosfolipases.....	45
2.4.4	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	46
2.4.4.1	Eversa Transform 2.0 [®]	47
2.4.4.2	Lecitase [®] Ultra.....	48
2.5	PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL.....	49
2.6	ESTADO DA ARTE.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1	CARACTERIZAÇÃO.....	53
3.1.1	Ácidos graxos totais e ácidos graxos oxidados.....	53
3.1.2	Ácidos graxos livres.....	54
3.1.3	Umidade.....	55
3.1.4	Cinzas.....	55
3.1.5	Matérias Insaponificáveis.....	55
3.1.6	Teor de Iodo.....	55
3.1.7	Índice de Saponificação.....	55
3.1.8	Índice de Acidez.....	56
3.1.9	pH.....	56
3.2	HIDRÓLISE.....	57
3.2.1	Quantidade de água.....	58
3.2.2	Temperatura.....	59
3.2.3	Quantidade de Lecitase [®] Ultra.....	59
3.2.4	Quantidade de Eversa Transform 2.0 [®]	59

3.3	ESTERIFICAÇÃO.....	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO.....	63
4.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	65
4.2.1	Teor de água.....	65
4.2.2	Temperatura.....	66
4.2.3	Teor de enzimas.....	67
4.2.3.1	Lecitase [®] Ultra.....	67
4.2.3.2	Eversa Transform 2.0 [®]	69
4.3	ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	72
5	CONCLUSÕES.....	73
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
7	REFERÊNCIAS.....	77

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS DA BORRA DE SOJA

Por quê?

- Biodiesel pode ser produzido através da esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de glicerídeos.
- A obtenção de ácidos graxos a partir de materiais residuais apresenta uma oportunidade de redução de custo do processo.

Quem já fez?

- Poucos trabalhos avaliam a utilização de enzimas para realizar as duas reações (hidrólise e esterificação).
- Destes, raros utilizam matéria-prima residual, estudando na sua maioria óleos vegetais degomados ou refinados.

Hipóteses?

- É possível hidrolisar a borra de soja com o uso de catalisador enzimático para a recuperação de ácidos graxos livres?
- É possível esterificar ácidos graxos livres com catalisador enzimático sem tratamento prévio da matéria-prima?

Métodos Experimentais

- Hidrólise enzimática em batelada com agitação mecânica.
- Esterificação enzimática em batelada com agitação orbital.

Resposta

- Determinar os parâmetros para a maior recuperação de ácidos graxos da borra de soja.
- Verificar a possibilidade de esterificação enzimática dos ácidos graxos.

1 INTRODUÇÃO

A década de 1990 ficou marcada pelo acirramento das discussões envolvendo questões ambientais, seguidas de acordos internacionais de colaboração com o objetivo de conciliar o desenvolvimento socioeconômico com a utilização sustentável dos recursos naturais.

Após uma série de eventos internacionais que culminaram com a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre a Mudança Climática na Eco-92, em 1997 foi lançado o Protocolo de Quioto, um tratado internacional com compromissos mais rígidos para a redução da emissão dos gases que agravam o efeito estufa para os países desenvolvidos e os que, à época, apresentavam economia em transição para o capitalismo (BRASIL, 2016)¹.

Na Eco-92, foi acordado que os países em desenvolvimento receberiam apoio financeiro e tecnológico para alcançarem outro modelo de desenvolvimento que fosse sustentável, especialmente com a redução do consumo de combustíveis fósseis (petróleo e carvão mineral). Com essa decisão, foi possível unir meio ambiente e desenvolvimento, superando os conflitos registrados nas reuniões anteriores patrocinadas pela ONU, como na Conferência de Estocolmo, em 1972 (BRASIL, 2012)².

Neste documento, reconhecem-se como gases de efeito estufa (GEE) o dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), hidrofluorcarbonos, perfluorcarbonos e hexafluoreto de enxofre, considerados, de acordo com a maioria das investigações científicas, como causa do aquecimento global (BRASIL, 2002)³.

Durante o primeiro período do compromisso, entre 2008-2012, trinta e sete países industrializados e a Comunidade Europeia comprometeram-se a reduzir as emissões de GEE em uma média de 5% em relação aos níveis de 1990. No segundo período de compromisso, as partes se comprometeram a reduzir as emissões de GEE em pelo menos 18% em relação aos níveis de 1990 no período de oito anos, entre 2013 e 2020. Cada país negociou a sua própria meta de redução de emissões

¹ Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/protocolo-de-quioto>>. Acesso em 11 de fevereiro de 2017.

² Disponível em: <<http://www.senado.gov.br/noticias/jornal/emdiscussao/rio20/a-rio20.aspx>>. Acesso em 11 de fevereiro de 2017.

³ Decreto Legislativo nº 144 de 2002. Disponível em: <www.camara.gov.br/sileg/integras/94585.pdf>. Acesso em 11 de fevereiro de 2017.

em função da sua visão sobre a capacidade de atingi-la no período considerado (BRASIL, 2016)¹.

O Brasil ratificou o documento em 23 de agosto de 2002, mediante aprovação do Decreto Legislativo nº 144 de 2002. Neste documento se comprometeu a implementar e/ou aprimorar políticas e medidas de acordo com suas circunstâncias nacionais, em especial:

(iv) A pesquisa, a promoção, o desenvolvimento e o aumento do uso de formas novas e renováveis de energia, de tecnologias de sequestro de dióxido de carbono e de tecnologias ambientalmente seguras, que sejam avançadas e inovadoras (...)
(BRASIL, 2010)⁴.

Visando atender ao compromisso firmado em 2003 foi instituído um Grupo de Trabalho Interministerial encarregado de apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de biodiesel como fonte alternativa de energia. Este grupo elaborou um relatório que deu embasamento para se estabelecer o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) como ação estratégica e prioritária para o Brasil (BRASIL, 2017)⁵.

Este programa, iniciado em 2005, visa a implantação sustentável da produção de biodiesel, tanto técnica como economicamente, promovendo inclusão social, garantindo preços competitivos, qualidade e suprimento e ainda produzir o biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas e em regiões diversas (BRASIL, 2017)⁶.

O marco regulatório que autoriza o uso comercial do biodiesel no Brasil considera a diversidade de oleaginosas disponíveis no País, a garantia do suprimento e da qualidade e a competitividade frente aos demais combustíveis. As regras permitem a produção a partir de diferentes oleaginosas e rotas tecnológicas, possibilitando a participação do agronegócio e da agricultura familiar (BRASIL, 2017)⁷.

⁴ Protocolo de Quioto. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0012/12425.pdf>. Acesso em 11 de fevereiro de 2017.

⁵ Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/historico.html>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

⁶ Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/objetivos_diretrizes.html>. Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

⁷ Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/marco_regulatorio.html>. Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

A regulamentação é feita pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), que é responsável pela regulação e fiscalização do novo produto, criando a Figura do produtor de biodiesel, estabelecendo as especificações do combustível e estruturando a cadeia de comercialização. Também foram revisadas 18 resoluções que tratam sobre combustíveis líquidos, nas quais foi agora incluído o biodiesel (BRASIL, 2017)⁷.

1.1 MOTIVAÇÃO

A indústria do biodiesel enfrenta agora o desafio de produzir a partir de matérias-primas com baixo valor de mercado para poder manter sua competitividade. Neste aspecto, a utilização de resíduos oleosos de naturezas diversas constituem um avanço na viabilização da produção de biodiesel.

Além de oferecer a diminuição notável de descartes industriais, valoriza e aumenta a receita para o fortalecimento da indústria. A Tabela 1 mostra os valores de venda de óleos refinados e resíduos oleosos que podem ser utilizados para a produção do biodiesel.

Tabela 1 – Valor comercial das principais opções de matérias-primas para a produção de biodiesel (referência: estado de SP).

Óleo/Gordura	Período	R\$/t	Fonte
Borra de soja	Mar/17	350,00	BRF S.A. ^A
Borra de soja (acidulada)	Mar/17	1.600,00	MF Rural ^B
Óleo de Soja (bruto)	Mar/17	2.050,00	MF Rural ^B
Óleo de Soja (degomado)	Mar/17	2.250,00	MF Rural ^B
Óleo de Soja (fritura)	Mar/17	1.500,00	MF Rural ^B
Sebo bovino (bruto)	Mar/17	2.250,00	Biomercado ^C

^A Comunicação pessoal.

^B Compra/venda on-line. Disponível em <www.mfrural.com>. Acesso em 28 de março de 2017.

^C Cotação on-line. Disponível em <www.biomercado.com.br/cotacoes.php>. Acesso em 28 de março de 2017.

A economicidade é um fator não apenas importante, mas determinante. Considerando o uso do óleo de soja degomado produzido no estado de São Paulo apresentado na Tabela 1 acima como matéria-

prima, aproximando sua massa específica para 930 kg/m^3 , o preço por m^3 do óleo é de aproximadamente R\$ 2.100,00.

O resultado do 53º Leilão de Biodiesel da ANP (BRASIL, 2017)⁸ homologou a compra de 620.284 m^3 de biodiesel com selo e especificado a uma média de R\$ 2.300 por m^3 (uma redução de quase 20 % se comparado ao 52º Leilão de Biodiesel da ANP, em que a média foi de R\$ 2.810 por m^3). Para o estado de São Paulo, a média de preço neste último leilão foi de R\$ 2.430 por m^3 .

Ou seja, a produção de biodiesel nos moldes atuais se mostra uma atividade pouco lucrativa, exigindo esforços para atuar nas suas variáveis de maneira a viabilizar este mercado. Assim, considerando a necessidade do Brasil em cumprir o acordo de redução das emissões atmosféricas mantendo a competitividade econômica da produção de combustíveis, as intenções deste trabalho serão descritas a seguir.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Propor uma alternativa ao método convencional de produção de biodiesel a partir de óleos refinados ao substituí-los por um dos resíduos do refino do óleo de soja (borra de soja). Pretende ainda apresentar o uso de enzimas para catalisar as reações envolvidas em substituição aos catalisadores inorgânicos comumente utilizados, minimizando a geração de resíduos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização da borra de soja.
- Analisar a cinética da hidrólise alterando o valor das variáveis de processo selecionadas.
- Determinar as melhores condições para a reação de hidrólise enzimática da borra de soja.
- Investigar a possibilidade de produção de ésteres de ácidos graxos via enzimática.

⁸ **53º Leilão de Biodiesel. 23/02/2017 - Homologação - L53 - Leilão Público N.º 001/2017-ANP.** Disponível em:

<<http://www.anp.gov.br/wwwanp/distribuicao-e-revenda/leiloes-de-biodiesel/leiloes-de-biodiesel-interna/leiloes-com-entregas-em-2017>>. Acesso em 08 de março de 2017.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo oferece ao leitor um panorama dos assuntos envolvidos neste trabalho, descrevendo conceitos importantes sobre o biodiesel, suas vantagens, as possíveis vias de síntese para sua produção e detalhes dos sistemas empregados para este fim.

Em seguida, discorre-se sobre o processamento da soja, o refino do óleo obtido e seus subprodutos, as características da borra de soja e seu uso. Por fim, comenta-se sobre o uso das enzimas, detalhando as enzimas utilizadas neste trabalho, NS-40116 e Lecitase[®] Ultra (Novozymes[®]).

2.1 HISTÓRICO

A mistura do biodiesel ao diesel de petróleo no Brasil teve início em 2004 em caráter experimental (teor máximo de 2%). Entre 2005 e 2007 a comercialização passou a ser voluntária. A obrigatoriedade da adição veio com o artigo 2º da Lei nº 11.097/2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional (BRASIL, 2016)⁹.

Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) até 2015 com o percentual de 7%. A Lei nº 13.263/2016 alterou a Lei nº 13.033/2014, determinando um cronograma de aumento do teor de biodiesel a partir de 2017. A progressão dos limites pode ser visualizada na Tabela 2 (BRASIL, 2016)⁸.

Atualmente, a legislação brasileira prevê a mistura de biodiesel ao diesel de petróleo em proporção de 8% para comercialização geral (BRASIL, 2016)⁸, de no máximo 20% em frotas cativas, 30% para uso agrícola e ferroviário e de até 100% em uso experimental (BRASIL, 2015), fortalecendo e justificando a produção do biocombustível no país.

O uso do biodiesel permite economia com importação de petróleo e óleo diesel e também reduz a poluição ambiental através da captura de CO₂ atmosférico durante o crescimento das oleaginosas. Desde o início do PNPB até 2015, o Brasil produziu 21,3 milhões de m³ de biodiesel, o

⁹ Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

que reduziu a importação de diesel em um montante de aproximadamente US\$ 13,8 bilhões, contribuindo positivamente para a Balança Comercial Brasileira (BRASIL, 2017)¹⁰.

Tabela 2 – Progressão da adição de biodiesel ao diesel de petróleo para comercialização do combustível no Brasil.

Período	Limite
Até 2007	2% (Facultativo)
A partir de janeiro de 2008	2% (Obrigatório)
A partir de julho de 2008	3%
A partir de julho de 2009	4%
A partir de janeiro de 2010	5%
A partir de agosto de 2014	6%
A partir de novembro de 2014	7%
A partir de março de 2017	8%
A partir de março de 2018	9%
A partir de março de 2019	10%

Fonte: Adaptado de ANP (BRASIL, 2016)⁸

Para suprir esta necessidade, a produção nacional vem sendo realizada com o uso de oleaginosas comestíveis, fato que vem levando à valorização dos seus óleos e conseqüente redução na diferença entre o preço de venda do óleo vegetal e do biodiesel, dificultando a viabilização econômica da sua produção. A Figura 1 mostra a evolução da produção de biodiesel no Brasil desde o início do PNPB.

De acordo com a ANP, atualmente o óleo de soja é a principal matéria prima da produção de biodiesel no Brasil (cerca de 70 a 80% da produção). Em segundo lugar está o sebo bovino, que vem sendo utilizado em cerca de 15 a 20% da produção, seguido do óleo de algodão (3 a 5%). Outros materiais graxos participam residualmente (FARIA et al., 2010).

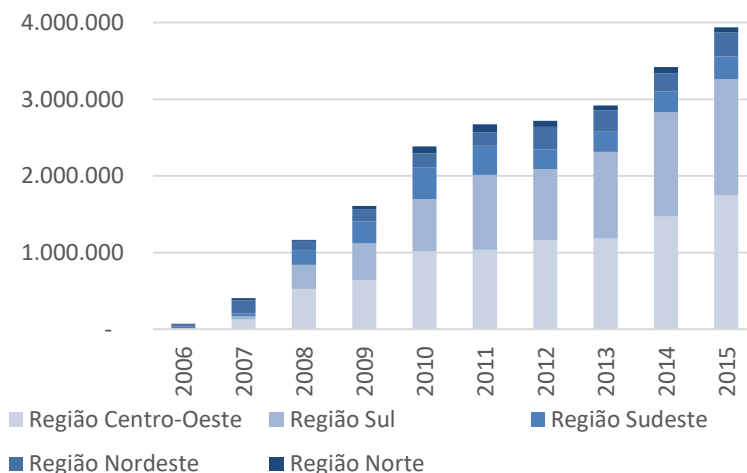
Sendo o Brasil um dos maiores produtores de oleaginosas do mundo e sabendo que a agropecuária foi responsável por cerca de 23 %

¹⁰ Adaptado. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro em 2015 (BRASIL, 2015)¹¹, parece óbvio o investimento na geração de energia a partir dos seus produtos e resíduos.

Em 2015 a produção brasileira de soja foi de 96.994.000 toneladas sendo que 56% foi exportada e 42% foi processada. Seu processamento produziu 30.765.000 toneladas de farelo, 8.074.000 toneladas de óleo e, portanto, 1.716.000 toneladas de resíduos (ABIOVE, 2017)¹².

Figura 1 – Produção de biodiesel no Brasil (m³).



Fonte: Adaptado de ANP (BRASIL, 2016)¹³.

Diversos resíduos agropecuários podem ser utilizados para a produção de combustíveis. Dentre eles destaca-se o sebo resultante do

¹¹ Disponível em: <<http://www2.planalto.gov.br/noticias/2015/06/responsavel-por-23-do-pib-plano-safra-impulsiona-agropecuaria>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

¹² **Estatística Mensal do Complexo Soja**. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

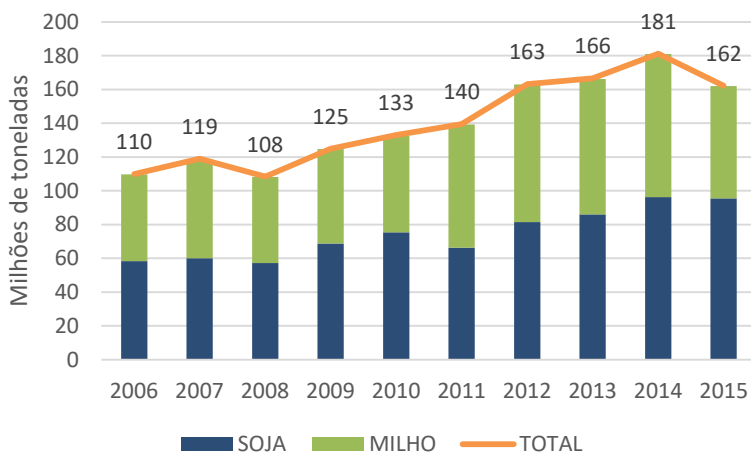
¹³ **Tabela 4.10 – Produção de biodiesel (B100), segundo grandes regiões e unidades da Federação – 2006-2015**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/anuario-estatistico/2441-anuario-estatistico-2016>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

abate de animais (PEREIRA et al., 2012) e resíduos do refino de óleos vegetais (PILOTO-RODRÍGUEZ et al., 2014), bem como óleo usado de fritura (VIOLA et al., 2012), gorduras extraídas no tratamento de esgoto (TU et al., 2016) e qualquer outra matéria oleosa.

Dentre eles está a borra de soja, objeto de estudo deste trabalho. Ela é formada em uma das etapas de refino do óleo e representa a maior porção de resíduos deste processo. A partir da adição de uma solução alcalina, os ácidos graxos livres são convertidos em sabões e removidos por centrifugação. Ela é uma emulsão oleosa alcalina constituída por água, fosfatídeos, triglicerídeos e outros compostos em menor quantidade como sais de sódio, matéria insaponificável e outros produtos de degradação do óleo (FRÉ; RECH; MARCÍLIO, 2013).

A utilização de processos inorgânicos para a conversão da matéria graxa em ésteres, apesar de apresentar um alto rendimento (cerca de 99%) possui limitações que podem vir a encarecer o processo quando analisado globalmente. Neste sentido, com a aplicação de processos enzimáticos para a produção de biodiesel (éster de ácido graxo) algumas das desvantagens podem ser eliminadas sendo, portanto, uma alternativa promissora (SZCZESNA ANTCZAK et al., 2009).

Figura 2 – Produção anual de oleaginosas no Brasil.



Fonte: Adaptado de Conab. Disponível em <www.conab.gov.br>. Acesso em 28 de março de 2017.

Esta reação é realizada pelas lipases, que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres a partir de glicerídeos e ácidos graxos de cadeia longa.

Apesar da ocorrência abundante, somente as microbianas possuem interesse industrial. Vários microrganismos são capazes de produzir lipases, incluindo bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

2.2 BIODIESEL

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, define-se biodiesel como:

“Combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico da ANP” (BRASIL, 2014)¹⁴.

Uma importante vantagem do biodiesel é que, se comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, ele pode reduzir em até 78% as emissões líquidas de dióxido de carbono quando considerando a reabsorção efetuada pelo cultivo de oleaginosas. Também pode reduzir em 90% a emissão de particulados e praticamente elimina a emissão de sulfurados (HOLANDA, 2004).

Além disso, o uso desse biocombustível reduz a emissão de enxofre em 20%, de anidrido carbônico em 9,8%, de hidrocarbonetos não-queimados em 35%, de material não-particulado em 55%, dos gases causadores do efeito estufa em 78 a 100% (BIODIESELBR, 2006)¹⁵.

As reações de transesterificação e esterificação de matéria graxa podem ser realizadas através de diversas rotas sintéticas, a saber: homogênea ou heterogênea; básica, ácida ou enzimática. A catálise homogênea básica é a mais utilizada atualmente, apresenta alto rendimento com baixo tempo de reação, porém é sensível à presença de água e ácidos graxos livres, além de produzir grande quantidade de glicerina. A catálise ácida é mais utilizada como um pré-tratamento da matéria prima quando ela possui alto teor de ácidos graxos livres (óleo

¹⁴ **Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014 (DOU 26/08/2014).**

Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/rodada-legislacao/qualidade>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

¹⁵ Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/destaques/2005/combustivel-renovavel.htm>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

de fritura, óleos brutos, resíduos do refino de óleo vegetal), antes de submetê-la à catálise básica. Apresenta baixo rendimento e ocorre mais lentamente (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

Independentemente do método de produção, as entidades envolvidas desde a produção até a comercialização final ficam obrigadas a garantir a qualidade do biodiesel a ser consumido no Brasil. Devem também emitir documentação legal que comprove os resultados das análises físico-químicas a que o biodiesel é submetido, visando atender aos limites estabelecidos na Resolução ANP n° 45, de 25/08/2014 (BRASIL, 2014)¹⁴, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Especificação exigida pela ANP para o Biodiesel produzido e comercializado no Brasil.

CARACTERÍSTICAS	UNIDADE	LIMITE
Aspecto	-	Límpido e isento de impurezas
Massa específica a 20 °C	kg/m ³	850 a 900
Viscosidade cinemática a 40 °C	mm ² /s	3,0 a 6,0
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0
Contaminação total, máx.	mg/kg	24
Ponto de fulgor, mín.	°C	100
Teor de éster, mín.	% massa	96,5
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020
Enxofre total, máx.	mg/kg	10
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5
Fósforo, máx.	mg/kg	10
Corrosividade ao cobre, 3 h a 50 °C, máx.	-	1
Número de cetano	-	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	5 a 14
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02
Glicerol total, máx.	% massa	0,25
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7

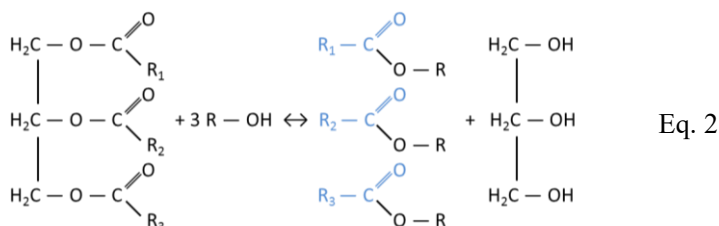
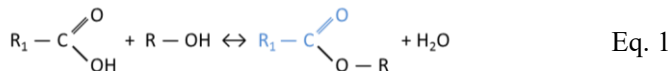
Tabela 3 – Especificação exigida pela ANP para o Biodiesel produzido e comercializado no Brasil.

CARACTERÍSTICAS	UNIDADE	LIMITE
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Metanol e/ou etanol, máx.	% massa	0,20
Índice de iodo, máx.	g/100g	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.	H	6

2.2.1 Rotas sintéticas

Duas reações conduzem à produção de ésteres de ácidos graxos: a esterificação (Equação 1 – Figura 3) e a transesterificação (Equação 2 – Figura 3). Ambas necessitam da presença de um álcali de cadeia curta e um catalisador (PRICE et al., 2016).

Figura 3 – Reações de esterificação de ácidos graxos e transesterificação de triacilglicerídeos, com destaque ao grupo acila.



Fonte: Adaptado de Price et al. (2016).

A transesterificação de glicerídeos é uma reação com muitos passos: as ligações de ésteres que conectam os ácidos graxos no triacilglicerídeo (TAG) são rompidas uma por vez, convertendo-o em diacilglicerídeo (DAG), monoacilglicerídeo (MAG) e finalmente no glicerol. Cada passo libera um alquil-éster (biodiesel) ou um ácido graxo livre (AGL), a depender do receptor de acila:álcool ou água, respectivamente (TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

A transesterificação é uma reação reversível, sendo necessária a operação com excesso de álcool para deslocar o equilíbrio da reação para a produção de biodiesel. Um catalisador é necessário para acelerar a reação, sendo convencionalmente utilizados catalisadores inorgânicos básicos (KOH ou NaOH). Deve-se utilizar álcoois com cadeia de até quatro carbonos, sendo o metanol e o etanol os mais recomendados. O mais utilizado é o metanol, porém o etanol vem ganhando popularidade pela sua natureza renovável e menor toxicidade quando comparado ao metanol (HOLANDA, 2004).

A esterificação é um dos passos de um processo multi-etapas: primeiramente a matéria-prima é convertida em ácidos graxos e então esterificada. A conversão em ácidos graxos pode se dar por meio de uma acidificação inorgânica (ácido sulfúrico) ou por hidrólise enzimática.

Neste sentido, uma opção proposta recentemente é a hidroesterificação, onde primeiramente os triacilglicerídeos são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol. Os AGL são então convertidos em ésteres e água através na adição de álcool no meio reacional (SOARES et al., 2013).

Uma vantagem da hidroesterificação frente à transesterificação é a produção de glicerina sem contato com o álcool, o que valoriza este produto. Outra vantagem é a possibilidade de utilização de matérias-primas de baixo valor agregado, com alto teor de AGL e água, elevando o atrativo econômico deste processo (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011).

A seguir será discutido o sistema de produção convencional, através da catálise homogênea básica sem pré-tratamento ácido. Em seguida, será apresentado o sistema proposto por este trabalho, a catálise homogênea enzimática.

2.2.2 Produção convencional: Catalisador químico

A produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras acontece em um complexo sistema reacional que incorpora ambas as reações de esterificação de ácidos graxos e transesterificação de triacilglicerídeos, mostradas na Figura 3.

Este processo requer um pré-tratamento da matéria-prima bruta pois é sensível à presença de água e ácidos graxos livres, dificultando o alto grau de conversão desejado. Tem o inconveniente de gerar glicerina de baixo valor e alto volume de efluentes (CESARINI et al., 2015).

A produção comercial de biodiesel depende muito da matéria-prima a ser utilizada. O uso de óleo vegetal refinado aumenta o custo do

processo. No processo convencional, com uso de hidróxido de sódio ou potássio como catalisador, há necessidade de lavagem dos produtos para remoção de resíduos, destacando-se em volume a glicerina e em dificuldade, os traços de sódio e potássio residuais. Estes passos de tratamento encarecem o processo em larga escala, devido à elevada quantidade de água necessária para a lavagem e o consequente tratamento destes efluentes, adicionado ao custo geral do processo (SEMWAL et al., 2011).

A Figura 4 ilustra o processo convencional de produção de biodiesel, onde os quadros em vermelho representam os insumos, os quadros azuis representam os processos, os alaranjados são os produtos e verdes os resíduos gerados. O álcool recuperado retorna ao processo misturado à carga fresca de álcool.

Figura 4 – Diagrama esquemático da produção de biodiesel convencional.



Fonte: Adaptado de Holanda (2014).

Conforme mencionado na Tabela 1, há uma valorização evidente e justificada das matérias-primas refinadas (óleo de soja, girassol, milho etc.). Levando-se em consideração o seu custo, parece óbvio deslocar esforços para o aproveitamento dos resíduos industriais na produção do biodiesel. Porém, como já foi mencionado, a catálise homogênea básica não é viável em sistemas com alto teor de contaminantes (água, ácidos graxos livres etc.).

2.2.3 Produção alternativa: Catalisador enzimático

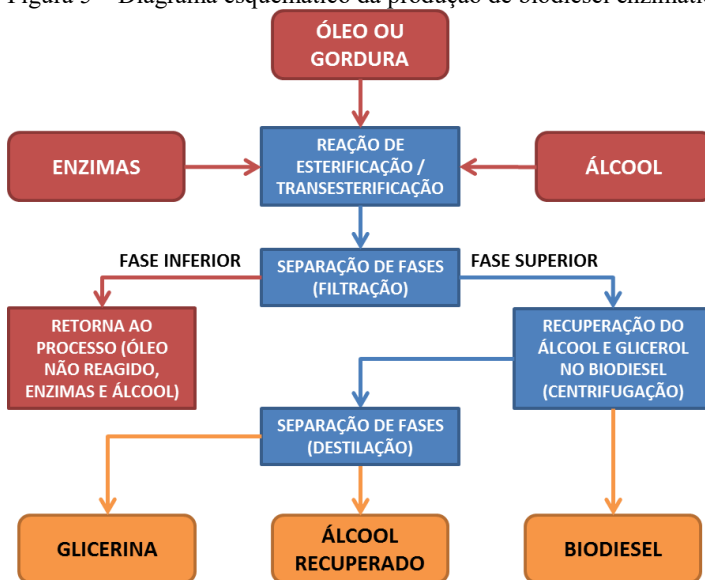
Para minimizar os custos do processo, muitas empresas estão migrando para o uso de enzimas como substituintes dos catalisadores inorgânicos, pois elas permitem o uso de matérias-primas alternativas, tais como resíduos oleosos. Algumas enzimas além de esterificar ácidos graxos livres também transesterificam acilglicérides contidos nos óleos residuais (PRICE et al., 2016).

Ao contrário do processo alcalino, o enzimático não produz sabões e esterifica os AGL e transesterifica os TAG, DAG e MAG em um único passo sem a necessidade de lavagem posterior. Assim, as enzimas apresentam uma interessante perspectiva para a indústria pela redução de custos. Nestes processos ocorrem as reações de hidrólise da matéria graxa e de esterificação dos ácidos graxos livres a depender do substrato presente no meio reacional (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Este mecanismo está em conformidade com o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi a medida que cada produto é liberado entre a adição dos substratos. Simplificações como a cinética de Michaelis-Menten podem ser aplicadas para ajustar dados experimentais (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

As enzimas podem ser apresentadas na sua forma livre ou imobilizada. O objetivo da imobilização é de conferir estabilidade à enzima e permitir seu reuso. As lipases de *Thermomyces lanuginosus* são bastante estáveis, mesmo na sua forma livre (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Assim, a imobilização não é obrigatória, apenas uma forma de melhorar sua estabilidade frente à necessidade de reuso. A escolha entre a forma de apresentação da enzima deve considerar, além dos aspectos técnicos, a economicidade do processo.

Figura 5 – Diagrama esquemático da produção de biodiesel enzimático.



Fonte: Adaptado de Fjerbaek, Christensen e Norddahl (2009).

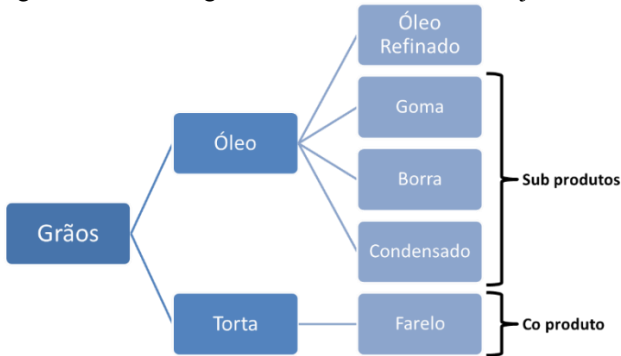
Devido à especificidade enzimática, a matéria-prima a ser utilizada não precisa passar por um pré-tratamento e o produto gerado também necessitará de menos etapas de recuperação. A Figura 5 mostra como seria o processo ideal para a produção de biodiesel via enzimática.

Para cada matéria-prima deve-se realizar um estudo completo de viabilidade técnica e econômica, visto que suas peculiaridades irão influenciar nas etapas de processo necessárias para atingir o rendimento desejado e a especificação necessária dos produtos, em especial o biodiesel.

2.3 BORRA DE SOJA

O processamento de óleos vegetais brutos tem como objetivo melhorar sua aparência, odor e sabor através da remoção de diversas substâncias como proteínas, ácidos graxos livres e ácidos graxos oxidados, corantes, substâncias voláteis, sais, silicatos entre outras. Este tratamento gera três subprodutos principais: a goma, a borra e o condensado, conforme ilustra a Figura 6 (MANDARINO; ROESSING, 2001).

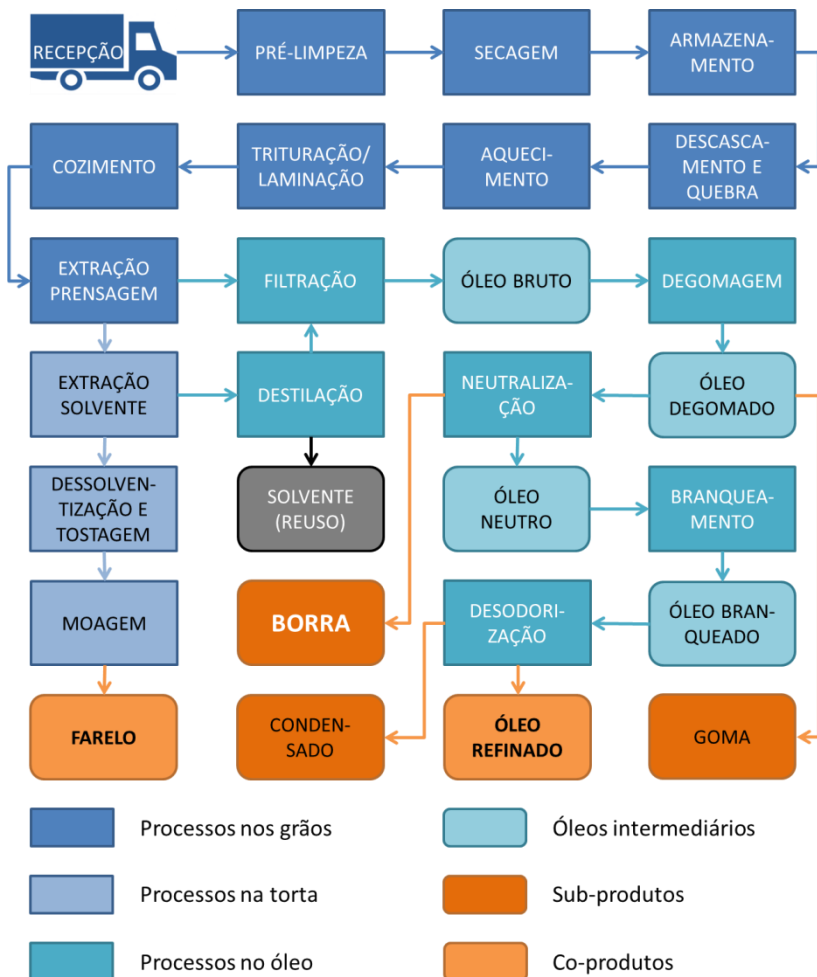
Figura 6 – Produtos gerados no refino do óleo de soja.



Fonte: Adaptado de Da Fré (2009).

Como pode ser visto na Figura 7, os grãos da soja devidamente acondicionados (com controle de temperatura e umidade) são primeiramente limpos, descascados, aquecidos e triturados para aumentar o rendimento da extração do óleo (remoção de contaminantes, redução da viscosidade e aumento da área de contato). Após este tratamento inicial, os flocos de soja são aquecidos com uso de vapor para o rompimento das paredes celulares, facilitando ainda mais a extração do óleo (MANDARINO; ROESSING, 2001).

Figura 7 – Fluxograma simplificado do processo de refino de óleos vegetais.



Fonte: Adaptado de Da Fré (2009) e Mandarino e Roessing (2001).

Seguindo o fluxograma da Figura 7, os flocos são submetidos a uma prensagem mecânica com remoção parcial do óleo. A torta formada é submetida a uma extração com solvente orgânico para complementar a extração. A mistura óleo-solvente é separada através de uma destilação, o óleo é misturado ao removido na prensa e o solvente recuperado é reutilizado no processo. O óleo bruto é filtrado para remoção de

impurezas e enviado ao refino. A torta passa por um processo para remoção do solvente, é tostada e moída para produzir o farelo. O óleo bruto é submetido à degomagem, processo no qual se adiciona água ou solução aquosa de ácido fosfórico (85%) para remoção da goma (composta por 60% de fosfatídeos, 38% de óleo e 2% de umidade) (MANDARINO; ROESSING, 2001).

É durante a fase de neutralização que a borra de soja é gerada, com a formação de sabões devido à adição de hidróxido de sódio ou carbonato de cálcio ao óleo. Os sabões e a maioria do material não oleoso presentes no sistema são separados do óleo por centrifugação. Assim, a borra é um material complexo e heterogêneo, composta por água, sais de ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolípidios, matéria insaponificável e produtos de degradação. Tem aspecto pastoso a firme e pode ser instável em altas temperaturas. Quando bruta, contém de 35 a 50% de ácidos graxos totais. Quando refinada pode chegar de 85 a 95%, viabilizando sua reutilização como matéria-prima. Seu valor comercial é determinado pelo teor de ácidos graxos totais (DA FRÉ, 2009).

Figura 8 – Estratificação dos produtos do processamento de óleo de soja no Brasil (1000 t/ano).



Fonte: Adaptado de Abiove (2016)¹⁶.

Após a neutralização, o óleo passa por mais dois processos de remoção de impurezas: branqueamento (somente quando necessário, haja visto que os processos de degomagem e neutralização também removem pigmentos) e finalmente a desodorização para remoção de

substâncias odoríferas como aldeídos e cetonas (MANDARINO; ROESSING, 2001).

Estima-se que em média, o processamento de grãos de soja resulta em 76% de farelo, 20% de óleo e 4% de resíduos, conforme indicado no gráfico da Figura 8 (ABIOVE, 2016)¹⁶.

2.3.1 Tratamento da borra

Para o aumento do seu valor comercial, a borra é submetida a um tratamento que consiste inicialmente na adição de uma solução aquosa alcalina (hidróxido de sódio) para a saponificação do óleo neutro presente. Concomitantemente ocorre a hidrólise dos fosfolípidios, o que facilita a separação das fases oleosa e aquosa no final do tratamento. Em seguida, a borra é aquecida e tratada com um ácido inorgânico (ácido sulfúrico ou clorídrico) para a conversão dos sabões em ácidos graxos. A separação das fases é feita por centrifugação (processo contínuo) ou decantação (processo em batelada). Com este pré-tratamento a borra é convertida em uma mistura de ácidos graxos e usualmente utilizada como fonte de gordura em rações animais, como coletora de apatita na mineração e para a produção de biodiesel (DA FRÉ, 2009).

No processo descrito neste trabalho não será realizado o pré-tratamento conforme descrito pois o objetivo é propor um processo totalmente enzimático, uma vez que é alto o custo da utilização de ácidos no processo, pois envolve, além do custo do próprio insumo, o investimento para que os equipamentos atendam às especificações para operar com materiais corrosivos e o aumento do risco operacional.

2.4 ENZIMAS

Enzimas têm peso molecular variando de 5.000 a 5.000.000 Da, e pertencem ao grupo das proteínas. A característica comum das proteínas é que são polipeptídeos: sua estrutura é composta por uma sequência linear de 100 a 1.000 α -aminoácidos conectados por ligações de amida. Existem 20 unidades estruturais de α -aminoácidos e cada uma possui dois isômeros, uma vez que possuem carbono quiral. As proteínas são

¹⁶ Associação Brasileira Indústrias Óleos Vegetais. **Estatística Mensal do Complexo Soja**. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

constituídas apenas do isômero L uma vez que isômeros D são raramente encontrados em sistemas biológicos. Esta sequência de α -aminoácidos na cadeia peptídica é de fundamental importância pois lhe confere sua forma única, estável e tridimensional, e ainda sua atividade catalítica (BUGG, 2004).

Enzimas possuem excelente poder catalisador, muitas vezes maior do que os catalisadores inorgânicos ou sintéticos. São altamente específicas em relação ao substrato que sintetizam, aceleram enormemente as reações químicas, operando em condições amenas de temperatura, pressão e pH. São a chave dos processos biológicos, agindo em sequências organizadas e catalisando centenas de reações que degradam moléculas, conservam ou transformam energia química, ou ainda produzem macromoléculas a partir de simples precursores (NELSON; COX, 2008).

Como elas se conectam com o substrato através de uma seletiva ligação no sítio ativo quiral, são capazes de distinguir as alterações mais sutis na estrutura do substrato e também a diferença entre regioisômeros e enantiômeros. As enzimas realizam suas reações com uma precisão quase perfeita: são capazes de selecionar um local único de ação dentro do substrato e realizar a reação enzimática estereoespecificamente (BUGG, 2004).

Nelson e Cox (2008) também definem que a atividade catalítica das enzimas depende da integridade da sua conformação. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em suas subunidades, sua atividade é perdida. Elas podem demandar a presença de substâncias chamadas cofatores para sua ativação, que podem ser íons inorgânicos, complexos orgânicos ou moléculas metal-orgânicas chamadas coenzimas.

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam. Cada enzima recebe um código composto por quatro algarismos e um nome sistemático que identifica a reação que ela catalisa. A maioria delas possui o sufixo “ase” no nome do substrato ou da descrição da sua atividade. Devido à sua enorme variedade foi adotado um sistema de nomenclatura e classificação que as divide em seis classes, cada uma com suas respectivas subclasses, baseado no tipo de reação que promovem. A parte inicial desta classificação é apresentada na Tabela 4 (NELSON; COX, 2008).

Tabela 4 – Classificação internacional de enzimas.

Classe	Nome	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)
2	Transferases	Transferência de grupos
3	Hidrolases	Transferência de grupos funcionais para a água (hidrólise)
4	Liases	Adição de grupos em ligações duplas ou remoção de grupos e formação de ligações duplas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro das moléculas para produzir formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas a clivagem de cofatores

Fonte: Nelson e Cox (2008)

Há uma certa resistência ao uso de processos enzimáticos devido ao alto custo das enzimas frente aos catalisadores inorgânicos. Ver-se-á a seguir que esse inconveniente pode ser minimizado quando se analisa o processo do ponto de vista global, contemplando a energia gasta em todas as etapas do processo, o material a partir do qual os equipamentos serão fabricados, além do que já foi mencionado e deve ser salientado: a redução do número de etapas de pré-tratamento da matéria-prima e etapas posteriores ao processamento dos produtos.

2.4.1 Processos enzimáticos

Processos enzimáticos requerem menos energia, são altamente seletivos, gerando produtos com alto grau de pureza, necessitando, consequentemente, de menos operações de tratamento de reagentes e produtos. Um dos desafios consiste em atenuar os efeitos de inibição e desativação da enzima pelo substrato. No caso da produção de biodiesel, tendo o álcool um efeito desnaturador da enzima, sugere-se que seja alimentado aos poucos, ao longo do curso da reação (PRICE et al., 2014).

Para a produção de biodiesel, as lipases devem ser não-estereoespecíficas para que convertam todo TAG, DAG e MAG em AGL e devem esterificar simultaneamente os AGL. Estas lipases são majoritariamente obtidas por fungos e bactérias e seus parâmetros

ótimos de uso dependem da formulação que as deu origem. Em geral, as enzimas podem alcançar conversões de até 90% em temperaturas de 30 a 50 °C com o tempo de reação variando de 9 a 90 h. Além da sua origem, fatores como atividade de água, temperatura, apresentação da enzima (livre ou imobilizada), substratos e suas proporções molares influenciam o rendimento e duração da reação e o tempo de vida útil da enzima (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Muitas lipases têm sido estudadas, melhoradas e testadas para a produção de biodiesel. Em geral, utiliza-se lipases imobilizadas, porém, novos estudos indicam que o uso de preparações de lipases livres tem se mostrado economicamente mais eficiente, reduzindo o custo das preparações enzimáticas, o que torna o processo ainda mais competitivo com relação ao processo convencional (CESARINI et al., 2015).

Assim, para o processamento de resíduos, recomenda-se o uso de lipases na forma livre, em uma formulação líquida, por ser mais barata, mesmo quando utilizada uma única vez. Ou seja, nos casos em que se prevê uma queda considerável na atividade enzimática, o uso de uma formulação líquida de lipase livre afeta muito menos a economicidade do processo (PRICE et al., 2016).

A adição de solventes orgânicos garante boa solubilidade dos substratos, mantendo a atividade enzimática e, conseqüentemente, aumentando a taxa de conversão. O álcool presente no meio reacional da produção de biodiesel, além de possuir baixa solubilidade em óleos, tem alta ação desnaturadora de enzima, necessitando, portanto, da presença de solventes no meio (SZCZESNA ANTCZAK et al., 2009).

2.4.2 Lipases

Lipases (triacilglicerol acilidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas comumente encontradas na natureza, de considerável significância fisiológica e potencial industrial. Elas catalisam a hidrólise de triacilglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, mas não hidrolisam outros substratos dissolvidos no meio. Elas têm sido utilizadas com sucesso na síntese de ésteres pela esterificação de ácidos graxos com diversas finalidades, também na indústria alimentícia e farmacêutica, entre outras (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As lipases podem ser obtidas de tecidos vegetais, animais ou microrganismos através da fermentação de fungos e bactérias (SZCZESNA ANTCZAK et al., 2009).

Uma característica importante da lipase é ser ativada na presença de interfaces hidrofóbicas, como na adição de solventes imiscíveis. A

estrutura tridimensional da lipase é rearranjada expondo ambos o sítio ativo e sua superfície hidrofóbica, permitindo assim a interação com a interface hidrofóbica, conferindo funcionalidade à enzima. Lipases podem conduzir a transesterificação de diversas matérias-primas, mesmo na presença de impurezas ácidas, como ácidos graxos frequentemente presentes em óleos refinados, brutos e residuais (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Paralelamente à transesterificação dos triacilglicerídeos, a lipase também catalisa a esterificação dos ácidos graxos livres com álcool para formação de biodiesel convertendo diversos substratos durante o curso da reação. Esta habilidade das lipases de catalisar diferentes reações varia entre as enzimas (TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

A especificidade de uma lipase se refere à sua regioesletividade e também ao comprimento da cadeia de ácido graxo, ou seja, consiste na sua capacidade de distinguir as características estruturais das cadeias acil. Como lipases com regioespecificidade restrita não devem ser utilizadas para produção de biodiesel, a maioria das lipases utilizadas para este fim exibem bastante especificidade e regioesletividade com relação ao substrato. A regioesletividade das lipases pode ser afetada por vários fatores ainda desconhecidos, porém é sabido que depende da estrutura dos substituintes R_1 , R_2 e R_3 das moléculas de triacilglicerídeos (SZCZESNA ANTCZAK et al., 2009).

2.4.3 Fosfolipases

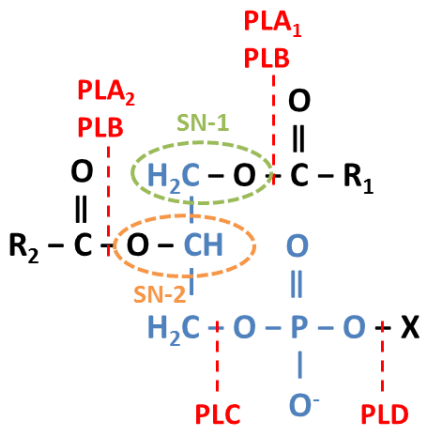
Fosfolipases (E.C. 3.1.1.32) são enzimas que catalisam a clivagem de fosfolipídios. Algumas são específicas quanto ao substrato outras possuem a habilidade de catalisar também a clivagem de moléculas lipídicas. Fosfolipídios são estruturas complexas, resultado da combinação de vários grupos polares e cadeias de ácidos graxos, sendo típico encontrar ácidos graxos saturados na posição sn-1 e insaturados na posição sn-2 (BAMJI-MIRZA; YAO, 2017)¹⁷.

Quanto à ligação onde ocorre a clivagem, as fosfolipases são divididas em quatro grupos, a saber: as fosfolipases A hidrolisam um dos grupos acila dos fosfolipídios (A1 na posição sn-1 e A2 na posição sn-2) formando um ácido graxo e um lisofosfolipídio. As fosfolipases B hidrolisam os dois grupos acila (posição sn-1 e sn-2). As fosfolipases

¹⁷ **BAMJI-MIRZA, M.; YAO, Z. Phospholipases.** Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=39190>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2017.

tipo C quebram a ligação glicerol-fosfato enquanto as do tipo D removem o grupo polar X. A Figura 9 ilustra a ação das fosfolipases (BAMJI-MIRZA; YAO, 2017)¹⁷.

Figura 9 – Estrutura de um fosfolípido e região de ação das enzimas fosfolipases.



Fonte: Bamji-Mirza, Yao (2017).

2.4.4 *Thermomyces lanuginosus*

É um fungo termofílico de ocorrência global, descoberto por Tsiklinskaya em 1899, devido ao seu auto aquecimento em resíduos orgânicos. Seu crescimento ocorre em temperaturas entre 20 e 60 °C, sendo a 50 °C a temperatura ótima, e pH ótimo de 6,5. Ele pode se desenvolver em pastagens secas ou inundadas, solo argiloso e em sedimentos aquáticos, porém é mais comum ser obtido em substratos orgânicos como os colmos, raízes e folhas (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003).

Como é um fungo não celulolítico, ele provavelmente se desenvolve juntamente a fungos celulolíticos utilizando os açúcares gerados pelas enzimas destes fungos e também os utilizando como fonte de nitrogênio devido à sua liberação de aminoácidos. Na ausência de fungos celulolíticos ele pode se associar ao *Mucor pusillus* pois ambos utilizam fontes simples de carbono. É unicelular e se reproduz assexuadamente, apresentando crescimento rápido de suas colônias, alcançando de 2,5 a 5,0 cm em 2 dias em uma temperatura de 45 a 50 °C (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003).

Por ser termofílico, as enzimas por ele geradas são mais estáveis termicamente. Duas enzimas produzidas por este fungo, que foram utilizadas neste trabalho, serão apresentadas a seguir.

2.4.4.1 Eversa Transform 2.0[®]

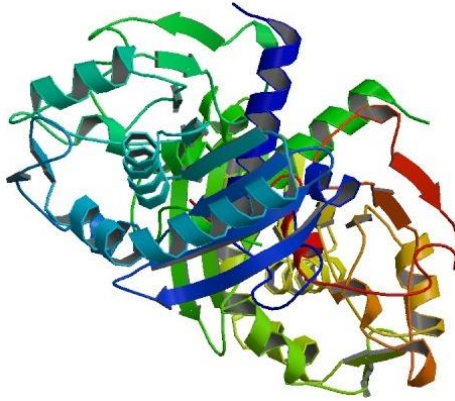
Também conhecida como lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) ou ainda NS-40116, é uma das enzimas mais estudadas dentre as lipases. A maioria dos estudos conduzidos se concentra na utilização de óleos residuais naturais para a determinação do melhor produtor de enzimas em substratos específicos (PRATHUMPAI et al., 2004).

Consiste em uma enzima de cadeia peptídica única com 269 aminoácidos, compreendendo oito β -camadas cercadas por cinco α -hélices interconectando com três ligações disulfeto (C22-C268, C36-C41, C104-C107). Esta organização é comum em proteínas da família α/β -hidrolase. Ela também possui um sítio de glicolisação na posição Asn33 que desempenha um papel importante na formação de micelas (SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2014). Sua “tampa” é uma superfície móvel α -helicoidal constituída de aminoácidos 86-93 que cobre o sítio ativo. Sugere-se que a ativação do sítio ativo é controlada por meio de resíduos catiônicos ao redor da tampa (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A TLL é uma enzima bastante estável e sua imobilização pode vir a reduzir sua atividade. Devido à flexibilidade do seu sítio ativo, ela é muito sensível a diversos fatores, tais como modificações nas condições experimentais e estratégias de imobilização, podendo sofrer alterações nas propriedades (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

É amplamente utilizada para hidrólise de lipídeos, modificação de triacilglicerídeos e síntese de diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos. Pode ser aplicada na produção de biodiesel tanto como na síntese de pesticidas, medicamentos e alimentos (GONÇALVES et al, 2016).

Figura 10 – Estrutura da lipase não tratada de *Thermomyces lanuginosus* com uma resolução de 2,3 Å.



Fonte: Kumar et al. (2015).

2.4.4.2 Lecitase[®] Ultra

É uma enzima éster-carboxílico hidrolase (MISHRA et al., 2009) muito interessante do ponto de vista comercial pois apresenta propriedades tanto de lipase quanto de fosfolipase A1 no mesmo sítio ativo. É obtida artificialmente através da fusão da TLL e genes fosfolipasas (terminal-C) de *Fusarium oxysporum*, que são clonados e expressos em estirpes fúngicas relevantes (GONÇALVES et al., 2016).

Através de intensos estudos sobre a ligação da lipase às interfaces lipídeo-água, revelou-se um papel importante do terminal-C na influência da atividade enzimática e especificidade quanto aos substratos (XIN et al., 2017).

A Lecitase[®] Ultra combina então a estabilidade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e a atividade da enzima de *Fusarium oxysporum*. É uma hidrolase de ésteres carboxílicos e atua sobre fosfolípidios e triacilglicerídeos (WANG et al., 2010).

A preparação comercial da Lecitase[®] Ultra consiste basicamente de uma solução aquosa da proteína (que tem peso molecular de 35 KD) a uma concentração de 65 mg/mL. Sais monovalentes (LiCl, NaCl e KCl) não afetam a sua atividade até uma concentração de 0,5 mol/L, porém acima deste valor ela perde atividade até ser desnaturada em concentrações acima de 1 mol/L. Já íons metálicos como Ca²⁺ e Mg²⁺ aumentam a atividade enzimática quando em baixa concentração (25 mmol/L de CaCl₂ triplica a atividade e 10 mmol/L de MgSO₄ dobra

a atividade). Ela se mantém estável até uma temperatura de 50 °C, perdendo atividade em sistemas acima de 60 °C (MISHRA et al., 2009).

2.5 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL

Devido às suas vantagens frente ao processo convencional, muitos grupos de pesquisa estão voltando sua atenção ao uso de enzimas como catalisadores na síntese de ésteres de ácidos graxos. Seja utilizando substratos refinados ou brutos, as enzimas têm se mostrado eficientes, como citado a seguir.

Uma variação de lipase de *Thermomyces lanuginosus* obtida através da fusão com *Aspergillus oryzae* (Lipopan™ 50 BG – Novozymes®) foi analisada para a produção de biodiesel de segunda geração utilizando óleo de girassol e etanol. Foi possível obter conversão de 70% em 1 h de reação quando conduzida a 20 °C, pH altamente alcalino (acima de 12) e razão óleo:etanol acima de 3:1 (VERDUGO et al., 2011).

Uma outra variação de TLL, (Lipozyme® TL IM – Novozymes®) desta vez imobilizada, também foi analisada para produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol. Esta se mostrou sensível a alta concentração de álcool e foi inativada com a adição de mais de 1,5 mol deste, que foi então adicionado em três etapas. Foi atingida conversão de 98% em 12 h de reação quando conduzida a 40 °C, agitação de 150 rpm, e 10% de enzima (m/m) (XU et al., 2004).

Uma ampla comparação de substratos foi realizada com o uso da Lipozyme® TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) e Novozym® 435 (*Candida antarctica* B), ambas da Novozymes®. A perda de atividade enzimática foi maior com o uso de metanol do que com etanol, e a da Lipozyme® TL IM é maior do que da Novozym® 435. A Novozym® 435 requer maior quantidade de álcool e de enzima (% m/m) e seu tempo de reação é maior para a mesma conversão que a Lipozyme® TL IM. Não foi obtida completa conversão com o uso da Lipozyme® TL IM e uma vez que a Novozym® 435 manteve 85% de sua atividade mesmo após nove bateladas, esta foi recomendada pelos autores (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008).

Utilizando como substrato o óleo de soja desodorizado e etanol, três enzimas imobilizadas foram comparadas: Lipozyme® RM-IM, Lipozyme® TL-IM, and Novozym® 435, todas da Novozymes®. Este trabalho também recomenda o uso da Novozym® 435, que obteve 83,5%

de conversão com apenas 90 min de reação, 3% (m/m borra) de enzima e adição em duas etapas do etanol a 50 °C (SOUZA et al., 2009).

A hidroesterificação do óleo de soja com o uso da lipase de *Thermomyces lanuginosus* para a etapa de hidrólise seguida da esterificação em ácido nióbbico suportado obteve melhor resultado quando para a hidrólise foi utilizado 2,3% (v/v) de enzima, 50% (v/v) de óleo de soja, em água destilada a 60 °C em um tempo de 48 h de reação. Para a esterificação, verificou-se melhor resultado em uma razão AGL:metanol de 1:3, concentração de 20% (m/m AGL) de catalisador, 200 °C após 1 h de reação (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011).

Outra estratégia para a aplicação da hidroesterificação pode ser observada na produção de biodiesel a partir da hidrólise em condições subcríticas seguida da esterificação em leito fixo contendo fermentado sólido com atividade de lipase. Este fermentado é produzido a partir do cultivo de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Em um sistema sem solventes, foi possível atingir 92% de conversão em 31 h de reação a 50 °C. A atividade enzimática foi mantida por 5 ciclos nestas condições (84% de conversão de AGL em ésteres no quinto ciclo) e por 6 ciclos a 60 °C. O grupo destaca a vantagem de operação contínua (SOARES et al., 2013).

O uso de uma combinação de enzimas (lipases e fosfolipases) permite o uso de matérias-primas brutas, realizando a degomagem e a transesterificação em um único passo. Utilizando óleo de soja bruto, preparação líquida da lipase Callera Trans[®] L (Novozymes[®]), as fosfolipases Lecitase[®] Ultra (Novozymes[®]) e Purifine[®] (Verenium), a liso-fosfolipase LLPL-2 (Novozymes[®]) foi possível determinar a condição ótima e então testá-las em outras matérias-primas (CESARINI et al., 2014).

2.6 ESTADO DA ARTE

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o uso da borra de soja (HAAS, 2005; WANG et al., 2007; GUO; XIU; LIANG, 2012; FRÉ; RECH; MARCÍLIO, 2013; SOARES et al., 2013) ou o uso da lipase *Thermomyces lanuginosus* na hidrólise e esterificação de matéria graxa (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011; VERDUGO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2016), porém pouco se estudou sobre a eficácia do uso desta lipase na hidrólise da borra de soja. Recentemente, um trabalho foi publicado unindo os dois assuntos (PRICE et al., 2016) porém a maioria dos trabalhos de aplicação industrial de lipases na produção de biodiesel se concentram

em matérias-primas mais refinadas (DU et al., 2004; BAJAJ et al., 2010; VERDUGO et al., 2011; CESARINI et al., 2014; PRICE et al., 2014; TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

Observa-se que a grande maioria dos trabalhos utiliza matérias-primas que passaram por processamento prévio. Baseado na revisão bibliográfica analisada e apresentada verifica-se uma oportunidade inquestionável de utilização de resíduos industriais. A borra de soja, que atualmente é utilizada para produção de insumos de baixo valor comercial pode ser transformada em combustível, aumentando significativamente a margem de lucro do produtor.

Para tal, considerando aplicar o processo no Brasil e procurando reforçar o caráter renovável e de uso de matéria-prima de baixo custo, propõe-se que a produção de biodiesel a partir de resíduo do refino de óleos vegetais tenha como matéria-prima a borra produzida a partir do óleo de soja devido a produção abundante no país.

Para minimizar os custos de operação, é proposto também que o processo seja realizado via enzimática, pois o processo pode ser conduzido em condições brandas e com possibilidade de eliminação de etapas de tratamento de reagentes e produtos. Além disso, recomenda-se o uso de enzimas livres em preparação líquida, uma vez que o custo de imobilização versus sua real efetividade neste caso não compensa o investimento.

Não se pode afirmar se tratar de um trabalho completamente pioneiro, porém o uso de lipase em solução livre para a hidrólise da borra de soja e posterior esterificação dos ácidos graxos obtidos na primeira fase não foi ainda plenamente investigado e possui pouco material para comparações e consultas.

Assim, este trabalho pretende avaliar uma importante lacuna: uso de processo totalmente enzimático a partir de substrato residual. Cumpre mencionar que, apesar da inquestionável relevância da proposta, nenhum trabalho foi encontrado na literatura acerca deste tema específico, mostrando a originalidade do mesmo e os desafios a serem transpostos para a exequibilidade do que foi proposto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho, de acordo com os objetivos anteriormente elencados.

A borra de soja foi gentilmente cedida pela BRF S.A. Paranaguá/PR e as enzimas foram gentilmente doadas pela Novozymes[®].

Inicialmente, a borra foi caracterizada através dos seguintes ensaios:

- Ácidos graxos totais,
- Ácidos graxos oxidados,
- Ácidos graxos livres,
- Umidade,
- Cinzas,
- Matéria insaponificável,
- Teor de iodo,
- Índice de saponificação,
- Índice de acidez,
- pH.

Em seguida a borra foi submetida à hidrólise enzimática em uma série de diferentes condições, com o objetivo de desenhar a melhor estratégia para a máxima obtenção de ácidos graxos, para então finalmente ser esterificada em reação enzimática para a produção de biodiesel.

3.1 CARACTERIZAÇÃO

Uma amostra de 100 g foi homogeneizada por agitação mecânica e submetida às análises que seguem.

3.1.1 Ácidos graxos totais e ácidos graxos oxidados

Esta análise seguiu a norma AOCS G 3-53 da American Oil Chemists' Society (1997). Para determinar a quantidade total de ácidos graxos na amostra, no estado neutro ou saponificado e também matérias insaponificáveis. Na análise dos ácidos graxos oxidados constam os solúveis em dietil-éter e insolúveis em éter de petróleo. Esta análise é

aplicável em borras brutas ou aciduladas, com exceção às oriundas de coco, palma e similares.

Uma amostra de 8 g da borra homogeneizada foi retirada e submetida à rotina descrita na norma: saponificada com a adição de solução alcoólica de hidróxido de potássio em meio aquecido por 30 min. Posteriormente foi submetida à extração líquido-líquido pela adição de água destilada. A mistura foi neutralizada com a adição de solução de ácido clorídrico que pode ser verificada pelo uso de indicador (laranja de metila). Foi deixada resfriar e submetida a nova extração líquido-líquido com adição de éter de petróleo. A fase etérea foi transferida para um funil de separação para a determinação dos ácidos graxos totais e a fase aquosa foi reservada para a determinação dos ácidos graxos. A primeira foi diluída em éter de petróleo e filtrada. A segunda foi diluída em dietiléter e filtrada. Os filtros (previamente tarados) foram secos em estufa e resfriados em dessecador até apresentarem massa constante.

A porcentagem de ácidos graxos totais foi calculada pela Equação 3 e de ácidos graxos oxidados pela Equação 4, onde M_1 é a massa de ácidos graxos totais da fase etérea (g), M_2 é a massa de ácidos graxos oxidados da fase aquosa (g) e M é a massa da amostra (g).

$$\text{AGT (\%)} = \frac{M_1}{M} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

$$\text{AGO (\%)} = \frac{M_2}{M} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4}$$

3.1.2 Ácidos graxos livres

Esta análise seguiu a norma AOCS Ca 5a-40 da American Oil Chemists' Society (1997). Para determinar a quantidade de ácidos graxos livres na amostra e é aplicável a qualquer material graxo (óleos vegetais brutos e refinados, óleos marinhos e gordura animal).

Uma amostra de 7 g da borra homogeneizada foi retirada e submetida à rotina descrita na norma: diluição em álcool etílico 95% neutralizado (adição de 4 gotas de solução de fenolftaleína 1% em etanol e adição da solução titulante de KOH até ponto de viragem) e titulação com solução aquosa de hidróxido de potássio 0,25 N. A coloração deve persistir por 30 s.

A porcentagem de ácidos graxos livres como oleico foi calculada pela Equação 5, onde V é o volume de solução de KOH consumido na titulação (mL), M é a molaridade da solução (mol/L) e m é a massa da amostra (g).

$$\text{AGL (\%)} = \frac{V \cdot M \cdot 28,2}{m} \quad \text{Eq. 5}$$

3.1.3 Umidade

Esta análise seguiu a norma AOCS Ca 2c-35 da American Oil Chemists' Society (1997). Para determinar a quantidade de água livre e outras substâncias voláteis na amostra e é aplicável a qualquer matéria graxa de origem vegetal ou animal, com exceção aos óleos desidratados ou da família do coco ou ainda a gorduras que sofreram adição de monoglicerídeos.

Uma amostra de 5 g da borra homogeneizada foi retirada e submetida à rotina descrita na norma: foi pesada em uma cápsula de alumínio tarada e seca em estufa por 30 min, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. O procedimento foi repetido até massa constante.

A porcentagem de umidade foi calculada pela Equação 6, onde M_1 é a diferença entre a massa inicial e final e M é a massa inicial.

$$U (\%) = \frac{M_1}{M} \cdot 100 \quad \text{Eq. 6}$$

3.1.4 Cinzas

Esta análise foi realizada pelo laboratório da empresa BIOQuímica (Coroados-SP), seguindo o método interno LBQ-006.

3.1.5 Matérias Insaponificáveis

Esta análise foi realizada pelo laboratório Labtec (Hortolândia-SP), seguindo o método interno pro-mtd 5.04-0835.

3.1.6 Teor de Iodo

Esta análise foi realizada pelo laboratório da empresa BIOQuímica (Coroados-SP), seguindo o método interno LBQ-022.

3.1.7 Índice de Saponificação

Esta análise foi realizada pelo laboratório da empresa BIOQuímica (Coroados-SP), seguindo o método interno LBQ-004.

3.1.8 Índice de Acidez

Esta análise seguiu a norma AOCS Cd 3d-63 da American Oil Chemists' Society (2003). Para determinar a quantidade de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os ácidos livres por grama de amostra. Em materiais que não possuem outros ácidos livres além dos graxos, o índice pode ser convertido através de um fator adequado ao percentual de ácidos graxos livres. É aplicável a qualquer material graxo (óleos vegetais brutos e refinados, óleos marinhos e gordura animal) e seus derivados.

Uma amostra de 0,5 g da borra homogeneizada foi retirada e submetida à rotina descrita na norma: foi dissolvida em uma mistura de álcool isopropílico e tolueno (1:1 v/v) previamente neutralizada (adição de 4 gotas de solução de fenolftaleína 1% em isopropanol e adição da solução titulante de KOH até ponto de viragem) e titulada com solução aquosa de hidróxido de potássio 0,1 N. A coloração deve persistir por 30 s.

O índice de acidez foi calculado pela Equação 7, onde V é o volume de álcali utilizado na titulação (mL), M é a molaridade da solução (mol/L), m é a massa da amostra (g) e 56,1 é o peso molecular do hidróxido de potássio (g/mol).

$$IA \text{ (mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{amostra}}) = \frac{V \cdot M \cdot 56,1}{m} \quad \text{Eq. 7}$$

3.1.9 pH

Esta análise seguiu a norma AOCS G 7-56 da American Oil Chemists' Society (1997). Para determinar a alcalinidade da amostra através da medida do pH do extrato aquoso da borra. É aplicável a todos os tipos de borra de óleos vegetais.

Uma amostra de 50 g da borra homogeneizada foi retirada e submetida à rotina descrita na norma: foi diluída em 50 mL de água aquecida (70 a 80 °C) e aquecida até 95 °C. Por segurança são utilizadas pérolas de vidro e a temperatura é acompanhada por um termômetro. Quando atingida a temperatura de 95 °C remove-se o sistema do aquecimento e com o resfriamento até a temperatura ambiente ocorre a separação em duas fases. Transferiu-se a fase aquosa e foi determinado o pH com o uso de um medido de pH previamente calibrado.

Esta medida foi realizada em triplicata e o pH foi então calculado pela média das medidas.

3.2 HIDRÓLISE

A etapa de hidrólise teve como objetivo obter ácidos graxos a partir de sais de ácido e de glicerídeos presentes na borra de soja. É um pré-tratamento realizado visando facilitar a etapa de esterificação e aumentar o seu rendimento. Devido a consistência da borra (baixa fluidez) foi necessário conduzir a hidrólise utilizando agitação mecânica. A borra não exposta a tratamento químico ou físico anterior a hidrólise.

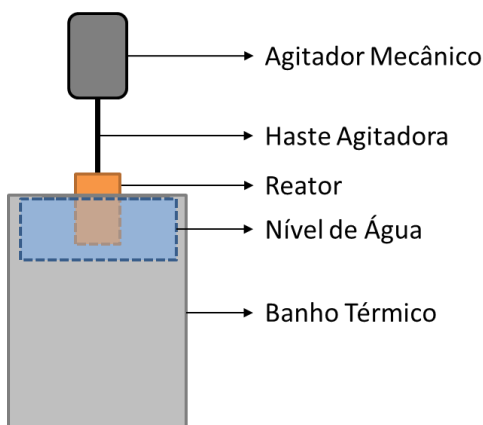
Para sua realização foi utilizado um conjunto de equipamentos como listado a seguir e exibido na Figura 11:

- Agitador mecânico: Fabricante IKA, modelo RW 20 Digital;
- Banho térmico: Fabricante UNIQUE, modelo USC-2500;

Haste agitadora tipo âncora com adaptação lateral para melhorar o grau de agitação (

- Figura 12);
- Reator: Frascos de vidro sem chicanas e com tampa metálica, com capacidade para 150 mL (6 cm de diâmetro, 9 cm de altura).

Figura 11 – Diagrama esquemático dos equipamentos utilizados para a hidrólise.

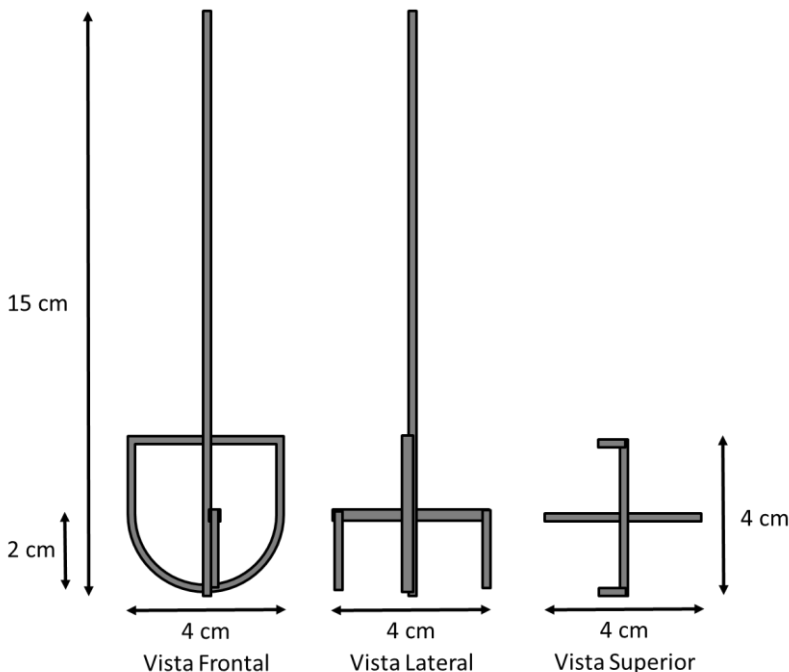


Fonte: Autora.

Uma amostra de 50 g de borra foi aquecida no banho térmico por 5 min e agitação de 450 rpm na temperatura de cada experimento. Em seguida, foi adicionada uma solução aquosa de enzimas livres na concentração desejada a cada experimento e a partir deste momento foi

declarada iniciada a reação. Após 15 min foi retirada uma amostra do meio reacional para determinação da acidez inicial. Foram coletadas amostras no tempo de 2, 4, 6 e 24 h para acompanhamento da acidez.

Figura 12 – Vistas frontal, lateral e superior da haste agitadora.



Fonte: Autora.

Os intervalos de valores das variáveis foram determinados a partir de trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa e outros testes preliminares. Optou-se por seguir uma sequência de variação dos parâmetros devido a resultados de experimentos prévios e experiência do grupo de pesquisa. Foi fixado o tempo de reação de 24 h, elencadas variáveis a serem manipuladas e analisada sua influência na conversão final dos glicérides em ácidos graxos, a saber:

3.2.1 Quantidade de água

Fixando a temperatura em 45 °C, agitação em 450 rpm, 0,1 % (m/m borra) de Lecitase® Ultra e 0,5 % (m/m borra) de Eversa

Transform 2.0[®], foram testadas três proporções mássicas de água/borra: 0,125/1, 0,250/1 e 0,375/1. A melhor condição foi repetida para confirmação e fixada para os próximos testes.

3.2.2 Temperatura

Foram testadas três temperaturas: 40, 45 e 50 °C com o uso de 0,1% (m/m borra) de Lecitase Ultra e 0,5 % (m/m borra) de Eversa Transform 2.0[®] e agitação de 450 rpm. Foi feita duplicata da melhor condição para confirmação e fixada para os próximos testes.

3.2.3 Quantidade de Lecitase[®] Ultra

Foi utilizada uma preparação líquida da Lecitase[®] Ultra livre, fornecida pela Novozymes[®]. Seu uso tem como objetivo auxiliar na quebra da emulsão e facilitar a separação dos ácidos graxos.

A partir do melhor resultado dos experimentos anteriores, variou-se então a quantidade de cada enzima. Iniciando pela Lecitase, juntamente com 0,50% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0[®] foi testado teor de 1,00% (m/m borra), 0,75% (m/m borra) e 0,50% (m/m borra), 0,075% (m/m borra) e 0,00% (m/m borra).

Para analisar o comportamento da enzima isolada Lecitase[®] Ultra, sem a adição de Eversa Transform 2.0[®] foi testado teor de 0,25% (m/m borra), 0,50% (m/m borra), 0,75% (m/m borra) e 1,00% (m/m borra), todas com agitação de 450 rpm.

3.2.4 Quantidade de Eversa Transform 2.0[®]

Foi utilizada uma preparação líquida da Eversa Transform 2.0[®] livre, fornecida pela Novozymes[®].

A partir do melhor resultado foi variada então a quantidade da enzima: 0,20% (m/m borra), 0,25% (m/m borra), 0,30% (m/m borra), 0,50% (m/m borra), 0,75% (m/m borra) e 1,00% (m/m borra) com agitação de 450 rpm.

A acidez foi determinada por titulação conforme descrito no item 3.1.2 e calculada pela Equação 8, onde V é o volume de álcali utilizado na titulação (mL), M é a molaridade da solução (mol/L), m é a massa da amostra (g) e F é o fator de diluição, utilizado para descontar a massa de água adicionada à reação. O fator F não é utilizado no cálculo da acidez de 24 h devido à perda de água por evaporação.

$$\text{AGL (\%)} = \frac{V \cdot M \cdot 28,2}{m \cdot F} \quad \text{Eq. 8}$$

3.3 ESTERIFICAÇÃO

A esterificação tem como objetivo a conversão dos ácidos graxos obtidos na hidrólise em ésteres. Para sua realização foi utilizado um conjunto de equipamentos como listado a seguir:

- Agitador oscilatório orbital: Fabricante New Brunswick Scientific, modelo Excella E25 – Incubator Shaker Series;
- Reator: Frascos Erlenmeyer aletados com capacidade para 250 mL com rolha de vinil;
- Reagentes: Metanol PA, fabricante Vetec;

Foi utilizada uma preparação líquida da Eversa Transform 2.0[®] livre, fornecida pela Novozymes[®].

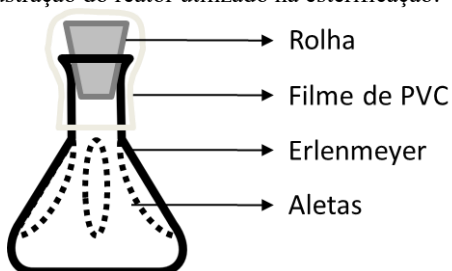
Por medidas de segurança e para evitar as perdas de metanol por evaporação, o reator foi vedado com rolha e filme de PVC, conforme ilustrado na Figura 13.

Foram selecionadas duas condições com os melhores resultados da hidrólise para avaliar a esterificação. A melhor condição de temperatura da hidrólise foi replicada para a esterificação por se tratar da mesma enzima. A quantidade de enzima adicionada na esterificação foi variada em: 0,00% (m/m borra), 0,10% (m/m borra), 0,15% (m/m borra) e 0,20% (m/m borra).

A massa resultante da hidrólise foi quantificada e inserida no reator. Em seguida uma nova quantidade de enzima foi adicionada à borra hidrolisada, variando a cada experimento conforme exposto anteriormente. Iniciou-se a agitação (260 a 275 rpm). O volume de álcool foi calculado com razão molar 2:1 com relação à massa total de borra hidrolisada utilizando como referência o peso molecular do ácido oleico (282 g/mol) e dividido em 8 etapas de adição, incorporadas no sistema de hora em hora, iniciando 1 h após a adição da enzima.

Após 24 h de reação (contados a partir da adição da enzima), foi medida a acidez final por titulação conforme descrito no item 3.1.2 e calculada pela Equação 8, onde V é o volume de álcali utilizado na titulação (mL), N é a normalidade da solução, M é a massa da amostra (g) e F é o fator de diluição, utilizado para descontar a massa de metanol adicionada à reação.

Figura 13 – Ilustração do reator utilizado na esterificação.



Fonte: Autora.

Foi medida apenas a acidez final das duas etapas (hidrólise e esterificação) deste ensaio devido à adição fracionada de álcool e foi calculada a conversão como a porção de ácidos graxos que foram convertidos em éster, mostrado na Equação 9.

$$\text{Conv} = \frac{\text{Acidez Final Hidrólise} - \text{Acidez Final Esterificação}}{\text{Acidez Final Hidrólise}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 9}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na caracterização da borra de soja e nas etapas de hidrólise e esterificação enzimática.

4.1 CARACTERIZAÇÃO

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises realizadas. A borra foi utilizada tal como recebida, sem ser exposta a tratamento prévio, portanto, apresentando as propriedades apresentadas abaixo.

Tabela 5 – Caracterização da borra de soja.

PROPRIEDADE	RESULTADO
Ácidos Graxos Totais (g/100 g)	37,94
Ácidos Graxos Oxidados (g/100 g)	0,33
Ácidos Graxos Livres (g/100 g)	6,97 ± 0,05
Umidade (%)	43,30 ± 0,28
Cinzas (%) ^A	23,45
Matéria Insaponificável (g/100g) ^B	0,67
Índice de Iodo (mg I ₂ /100g) ^A	61,54
Índice de Saponificação (mg KOH/g borra) ^A	45,20
Índice de Acidez (mg KOH/g borra)	13,94 ± 0,09
pH inicial	9,34 ± 0,02

^A Realizada pelo laboratório da empresa BIOQuímica (Coroados-SP)

^B Realizada pelo laboratório Labtec (Hortolândia-SP)

Pela medida dos ácidos graxos totais pode-se determinar o potencial de obtenção de ácidos graxos e assim o máximo rendimento da hidrólise. De acordo com os resultados observou-se conversão de 37,94% da massa da borra de soja em ácidos graxos estando de acordo com a literatura, que prevê uma média de 35 a 50% de ácidos graxos em borras de refino (DA FRÉ, 2009).

A medida de ácidos graxos oxidados indica a presença de cadeias insaturadas que levam à oxidação durante o armazenamento (POYARKOVA et al., 2012). Pelo resultado obtido (0,33%) verifica-se baixa degradação da borra de soja. Em conjunto com o baixo teor de matéria insaponificável verificou-se a alta qualidade da matéria-prima utilizada na realização deste estudo (baixo teor de oxidação).

A Tabela 6 fornece as características de qualidade do óleo para sua comercialização, em relação à presença de ácidos graxos livres.

Considerando que a borra de soja é produzida a partir do óleo degomado é natural a presença de ácidos graxos livres, porém em uma quantidade relativamente baixa.

Tabela 6 – Limites de presença de ácidos graxos livres no óleo de soja.

Óleo Tipo ¹⁸	Bruto Único	Degomado			Refinado	
		1	2	3	1	2
Limite (%)	2,00	0,50	1,00	1,50	0,03	0,06

Fonte: Da Fré, 2009.

O valor encontrado de ácidos graxos livres de 6,97% informa a acidez inicial da matéria-prima antes de submetê-la à hidrólise. Este valor subsidia uma comparação com o teor de ácidos graxos livres nas reações de hidrólise e esterificação.

O grau de umidade encontrado de 43,30% está em conformidade com os dados de trabalhos realizados com esta matéria-prima (WANG et al., 2007; FRÉ; RECH; MARCÍLIO, 2013). Um aspecto positivo da presença de água na borra é que esta facilita seu transporte por bombeamento, uma vez que na temperatura ambiente a borra apresenta alta viscosidade e consistência firme.

O alto teor de cinzas presentes nesta borra (23,45%) indica a presença de matéria inorgânica e implica na necessidade de operações de *downstream* para separação deste resíduo e seu devido tratamento.

O teor de iodo avalia o grau de insaturação dos ácidos graxos presentes na amostra. O alto valor encontrado está de acordo com o esperado devido à borra ser um resíduo do refino do óleo de soja, que é rico em ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico.

Para determinar o total de matéria graxa presente na borra é medido o índice de saponificação. O resultado obtido confirma a alta concentração de matéria graxa na matéria-prima.

Para verificar o grau de deterioração da amostra é medido o índice de acidez. O resultado obtido confirma o baixo grau de deterioração que a borra apresenta (pouco rançoso).

Finalmente, a medida de pH confirma a alcalinidade da borra, sendo seu resultado coerente com o processo de neutralização de onde a borra foi produzida no refino do óleo de soja.

¹⁸ Classificação de acordo com a qualidade do óleo comercializado.

4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A preparação líquida contendo as enzimas foi adicionada à borra dissolvidas em água destilada. A borra foi aquecida antes da adição da solução enzimática até a temperatura estipulada para o experimento.

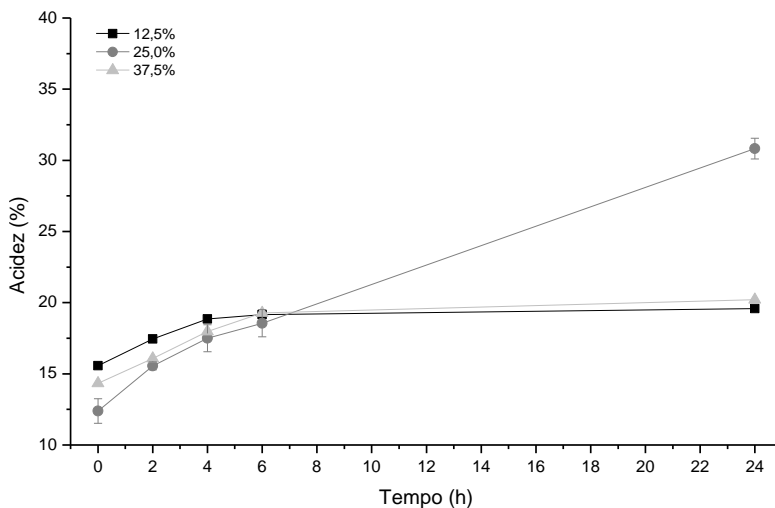
Serão apresentados a seguir os resultados do estudo de cada variável citada anteriormente.

4.2.1 Teor de água

A presença de água auxilia a enzima a atingir sua conformação ativa, uma vez que as lipases necessitam de interfaces hidrofóbicas para rearranjar sua estrutura tridimensional e expor seu sítio ativo. Porém a presença de água além do necessário pode diminuir a sua vida útil.

Foram analisadas as proporções de 0,125/1; 0,250/1 e 0,375/1 (m água/m borra). O resultado apresentado na Figura 14 indica uma forte tendência de melhores resultados quando utilizada a proporção de 0,250/1 (m água/m borra), onde a acidez é aproximadamente 35% maior.

Figura 14 – Cinética das reações de hidrólise com diferentes teores de água. Condições de processo: 24 h, 45 °C, agitação de 450 rpm, 0,1% (m/m borra) de Lecitase® Ultra e 0,5% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0®.



Pela cinética apresentada na Figura 14 verificou-se que há estagnação dos valores de acidez após 4 h de reação nas condições de 0,125/1 e 0,375/1 (m água/m borra).

Quando utilizada água e borra na proporção de 0,125/1 (m água/m borra) havia pouco excesso de água para manter o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise. Já quando utilizado 0,375/1 (m água/m borra), em se tratando de enzimas hidrofílicas, o excesso de água pode ter aumentado a diluição do meio diminuindo sua disponibilidade na interface óleo/água e prejudicado o contato dos substratos com o sítio ativo das enzimas ou ainda as desativando.

4.2.2 Temperatura

De acordo com a literatura, a Eversa Transform 2.0[®] mantém sua estabilidade até uma temperatura de 70 °C (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003) sendo desativada a 74 °C (MOGENSEN; SEHGAL; OTZEN, 2005), tendo maior atividade no intervalo de 20 a 50 °C (GONÇALVES et al., 2016).

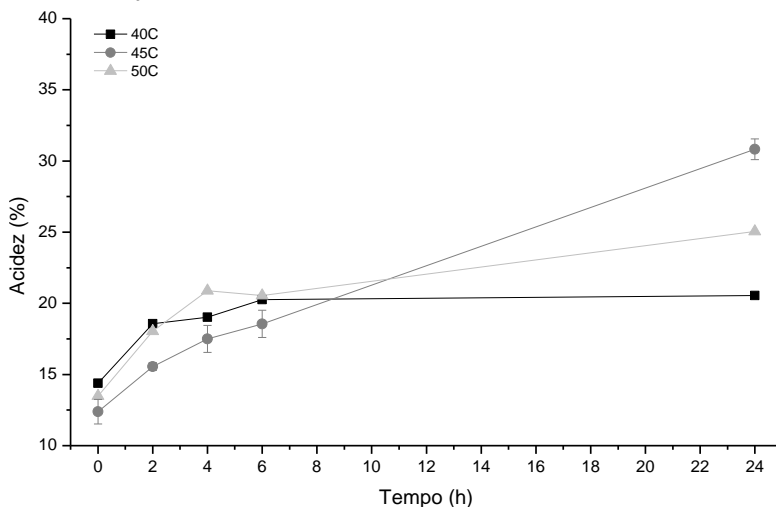
A Lecitase[®] Ultra por sua vez mantém sua estabilidade até 50 °C e é desativada a 60 °C (MISHRA et al., 2009). Sendo uma enzima derivada da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, as duas apresentam semelhante intervalo de temperatura ótima.

Com base em trabalhos do grupo de pesquisa, dimensionou-se o intervalo de estudo entre 40 e 50 °C com intervalo de 5 °C. O resultado apresentado na Figura 15 indica tendência de melhor rendimento quando a reação é conduzida a 45 °C.

A diferença entre os três resultados pode indicar que a 40 °C as enzimas não estão na sua melhor conformação espacial e a 50 °C elas podem estar iniciando o processo de desativação. Sabe-se que uma preparação de enzimas livres tende a apresentar uma temperatura ótima menor que as imobilizadas pois a sua ligação com o suporte aumenta sua estabilidade reduzindo o efeito térmico da desativação (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

A Figura 15 exhibe o aumento da acidez ao longo da reação. Nota-se que com 6 h de reação a 40 °C já foi praticamente atingida a mesma acidez que ao final das 24 h.

Figura 15 – Cinética das reações de hidrólise com diferentes temperaturas. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 0,1% (m/m borra) de Lecitase[®] Ultra e 0,5% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0[®].



4.2.3 Teor de enzimas

Para os ensaios apresentados anteriormente, fixou-se teor de 0,1% de Lecitase[®] Ultra e 0,5% de Eversa Transform 2.0[®]. Com os resultados de quantidade de água e temperatura ideais obtidos, fixou-se o teor de água em 0,250/1 (m água/m borra) e temperatura em 45 °C, e então variou-se o teor das enzimas estudadas.

4.2.3.1 Lecitase[®] Ultra

Para verificar a efetividade do uso concomitante de Lecitase[®] Ultra e Eversa Transform 2.0[®], foi estabelecido o intervalo de 0 a 1% de enzima (m/m borra). Nota-se que a tendência é de maiores rendimentos ao se diminuir o teor de Lecitase.

Quando a Lecitase[®] Ultra foi utilizada isolada no meio, ou seja, sem a adição da Eversa Transform 2.0[®], verificou-se resultados próximos aos apresentados em teores mais altos de Lecitase na mistura (acidez máxima obtida entre 20 e 25%).

Acredita-se que a Lecitase auxilie no processo de quebra da emulsão e extração de ácido graxos dos fosfolipídios, sendo necessário

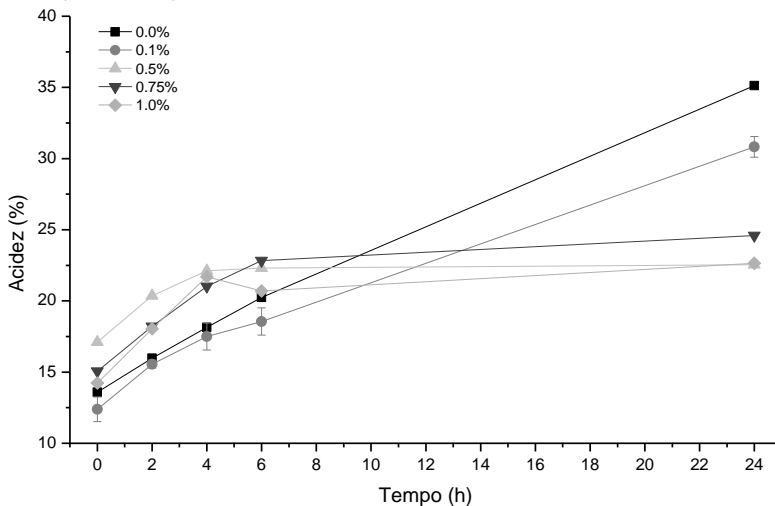
então um estudo mais aprofundado da interação das duas enzimas a fim de otimizar seu uso (concomitante versus sequencial).

Pela cinética exposta nas

Figura 16 e Figura 17 a seguir, verificou-se que quando utilizado teor de 1% da enzima a acidez máxima é atingida em 4 h de reação, sendo posteriormente reduzida. Um estudo adicional da interação das enzimas poderá explicar mais detalhadamente o efeito observado.

Analisando a Figura 16 pode-se concluir que a adição da Lecitase[®] Ultra não contribuiu como se esperava, uma vez que a acidez final do ensaio em que não houve adição da mesma teve resultado superior aos demais. Assim, a partir deste resultado seu uso foi descontinuado.

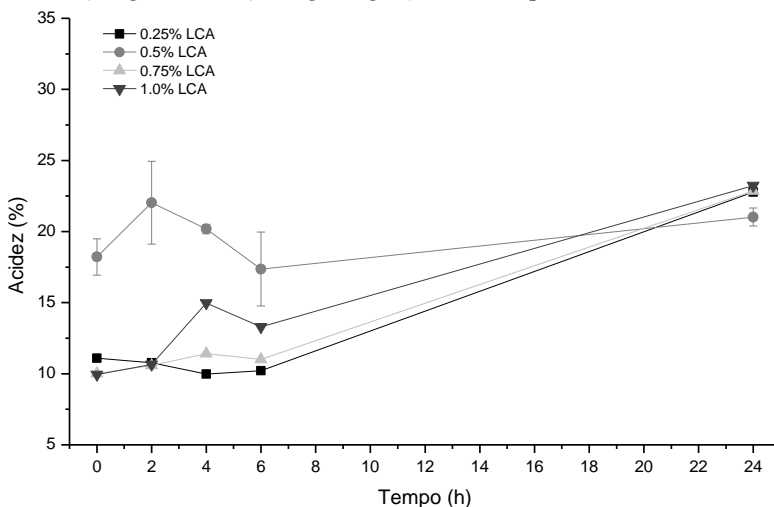
Figura 16 – Cinética das reações de hidrólise com diferente teor de Lecitase[®] Ultra em uso concomitante com a Eversa Transform 2.0[®]. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 45 °C e 0,5% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0[®].



Quando a reação foi conduzida com a Lecitase[®] Ultra sem a Eversa Transform 2.0[®] (Figura 17) notou-se que com teor de 0,50% (m/m borra) a conversão máxima foi atingida com 6 h de reação e permaneceu constante até completado o tempo de 24 h. O comportamento da cinética com a adição de 0,25 e 0,75% (m/m borra) de Lecitase[®] Ultra se mostrou semelhante. Pode-se atribuir esse resultado a erros experimentais inerentes ao processo de titulação.

É possível destacar que em ambos os casos de uso da Lecitase um maior teor da enzima no meio não produziu melhor resultado no tempo fixado de 24 h de reação.

Figura 17 – Cinética das reações de hidrólise com diferente teor de Lecitase® Ultra na ausência da Eversa Transform 2.0®. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 45 °C.



4.2.3.2 Eversa Transform 2.0®

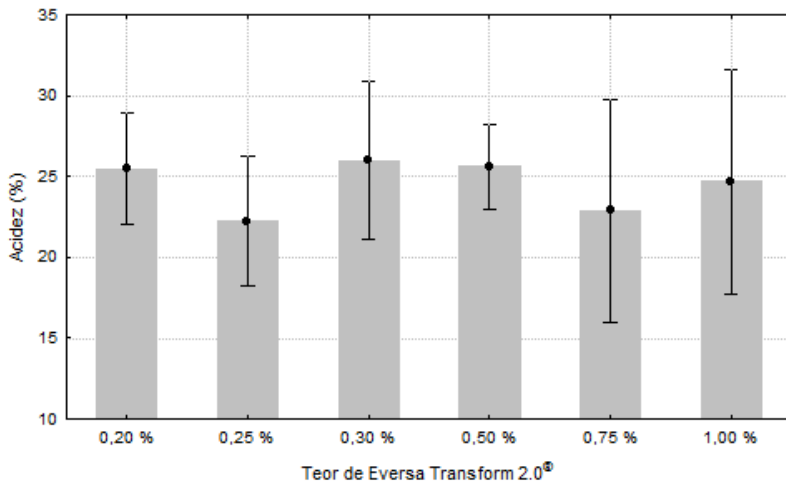
Uma vez descartado o uso concomitante da Lecitase, foram realizados ensaios variando o teor da enzima Eversa Transform 2.0®. Com os resultados obtidos nos ensaios anteriores, eliminou-se então a adição da Lecitase® Ultra, e fixou-se o teor de água em 0,250/1 (m água/m borra) de água e a temperatura em 45 °C.

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos nos ensaios variando o teor da Eversa Transform 2.0®. Os maiores valores de acidez final foram obtidos quando utilizado 0,2% (m/m borra) de enzima. Valores semelhantes foram encontrados em outras condições, porém, considerando a economicidade do processo (menor quantidade de enzimas), verificou-se vantagem com a utilização de baixo teor de enzimas para a obtenção do mesmo rendimento médio.

Uma futura análise econômica pode afirmar se o uso de maior quantidade de enzima se mostra vantajoso pois, a acidez final da reação com 1,00% (m/m borra) é pouco diferente (3% menor) do encontrado

com 0,20% (m/m borra) e em menor tempo (verifica-se uma estagnação a partir de 6 h na Figura 20), porém utiliza 5 vezes mais massa de enzima.

Figura 18 – Acidez máxima obtida variando o teor de Eversa Transform 2.0®.



Assim, são apresentadas a seguir, nas Figura 19 e Figura 20 as curvas de cinética das reações mencionadas na Figura 18.

Notou-se que a adição de maior massa de enzima não aumentou a conversão dos TAG em AGL. Porém quando utilizado teor de 1,00% da enzima Eversa Transform 2.0® verificou-se que entre 6 e 24 h de reação a acidez tem pouca variação, indicando uma possível vantagem frente ao uso de 0,20% da enzima devido à redução do tempo de cada batelada. Uma análise econômica considerando todo o processo poderá confirmar qual das alternativas se mostra mais viável.

Assim, com base nos resultados deste trabalho, em um tempo de reação de 24 h, recomenda-se as seguintes condições para a hidrólise:

- Água adicionada na razão de 0,250/1 (m água/m borra)
- Agitação de 450 rpm
- Temperatura de 45 °C
- Adição de 0,20% (m/m borra) de Eversa Transform 2.0®.

Figura 19 – Cinética das reações de hidrólise com teor entre 0,2 e 0,3% de Eversa Transform 2.0[®]. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra), agitação de 450 rpm, 45 °C.

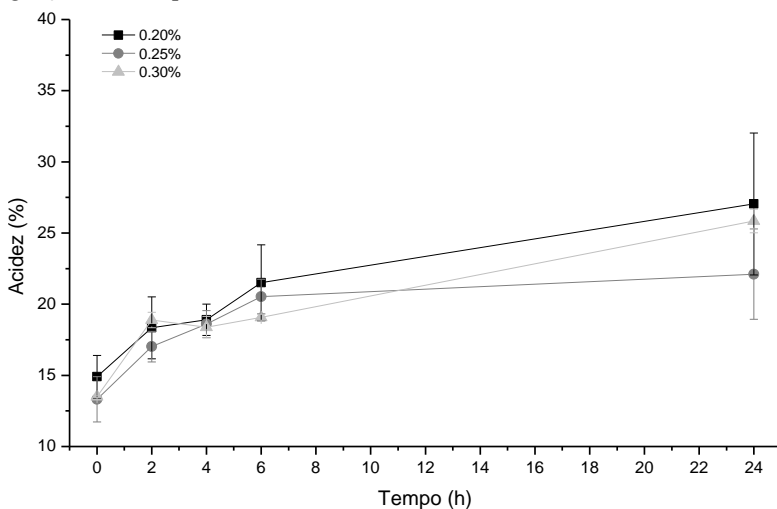
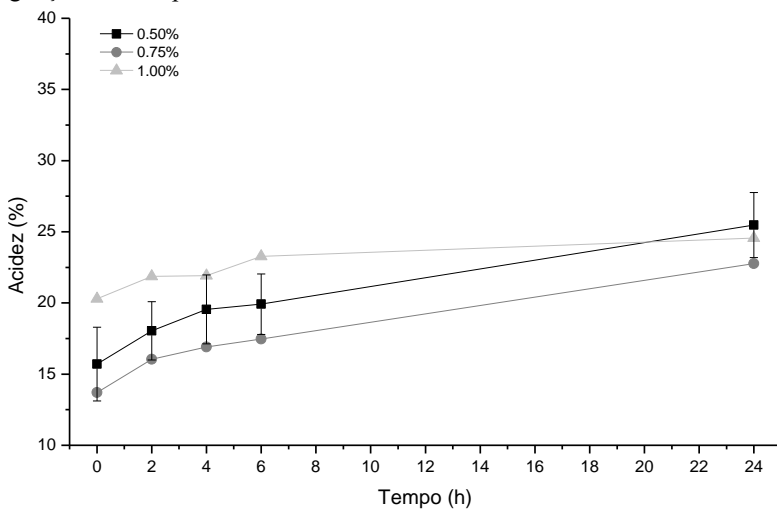


Figura 20 – Cinética das reações de hidrólise com teor entre 0,5 e 1,0% de Eversa Transform 2.0[®]. Condições de processo: 24 h, 0,250/1 (m água/m borra), agitação de 450 rpm, 45 °C.



4.3 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Também para a esterificação o tempo de reação foi fixo em 24 h, o álcool foi adicionado em oito doses horárias, iniciada 1 h após a adição de enzima, para evitar a desativação da mesma. O número de parcelas em que o metanol foi adicionado foi determinado a partir de trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa.

Em adição à condição de hidrólise recomendada no item 4.2 (0,250/1 (m água/m borra) de água, agitação de 450 rpm, 45 °C e 0,2% (m/m borra) da enzima Eversa Transform 2.0[®]), realizou-se testes de hidrólise também com 0,5% (m/m borra) da enzima Eversa Transform 2.0[®] para comparação de resultados.

A

Tabela 7 apresenta o teor de enzimas utilizados tanto na hidrólise quanto na esterificação para cada conjunto de ensaio e seus respectivos resultados de acidez final. A conversão da reação de esterificação, calculada pela Equação 9 é apresentado na última coluna.

Tabela 7 – Acidez final da hidrólise e esterificação da borra de soja

Teor Ev.Trans 2.0 Hidrólise	Teor Ev.Trans 2.0 Esterificação	Acidez Final Hidrólise (g/100g borra)	Acidez Final Esterificação (g/100g borra)	Conversão (%)
0,20	0,00	19,26	6,50	66,25
0,20	0,10	17,50	4,80	72,57
0,20	0,15	18,00	4,91	72,72
0,20	0,20	20,75	6,30	69,64
0,50	0,00	23,19	5,24	77,40
0,50	0,10	22,66	5,74	74,68
0,50	0,15	24,47	6,34	74,09
0,50	0,20	24,20	6,00	75,21

Verifica-se pelos valores de acidez após a esterificação que além de esterificar todo o ácido produzido pela hidrólise também foi possível esterificar parte do ácido graxo livre presente na borra de soja original (acidez final da esterificação foi menor do que o teor de ácidos graxos livres apresentado na Tabela 5, de $6,97 \pm 0,05$ g/100g borra).

Pela redução dos valores de acidez do final da hidrólise para o final da esterificação em todas as condições apresentadas na Tabela 7, pode-se afirmar que a enzima promove a esterificação dos ácidos graxos na presença do metanol. A conversão média de aproximadamente 72,85

$\pm 3,09\%$ pode ser considerado satisfatório quando considerado o caráter preliminar deste estudo.

5 CONCLUSÕES

Através do estudo da cinética de reação foi possível comprovar o aumento gradual da acidez resultante da conversão dos glicerídeos em ácidos graxos comprovando a atividade enzimática no substrato analisado.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios apresentados no capítulo anterior pode-se concluir que as melhores condições de operação para a hidrólise de borra de soja com o uso da enzima Eversa Transform 2.0[®] referem-se a um teor de água de 0,25/1 (m água/m borra de soja), temperatura de 45 °C e teor de enzima Eversa Transform 2.0[®] de 0,2% (m/m borra de soja).

Com os dados obtidos nos ensaios de esterificação verificou-se a redução da acidez devido a conversão dos ácidos graxos em ésteres, comprovando a eficiência da enzima Eversa Transform 2.0[®] na esterificação dos mesmos e demonstrando assim que é possível seu uso na produção de ésteres de ácidos graxos a partir de matérias-primas residuais.

Assim, o objetivo deste trabalho de se verificar a possibilidade da produção enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de matéria-prima residual foi alcançado com êxito, porém algumas recomendações para trabalhos futuros podem ser feitas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Existem diversos fatores a serem otimizados, além de possíveis tratamentos prévios à hidrólise da matéria-prima e/ou à esterificação que podem vir a promover um aumento da eficiência deste processo proposto.

Uma análise mais aprofundada da atuação das enzimas neste substrato se mostra importante para melhor conhecimento do processo. Uma investigação do efeito do álcool no meio reacional e da utilização de etanol podem vir a contribuir com o avanço da técnica empregada visando a total independência do petróleo e firmando esta opção como uma alternativa totalmente renovável.

Verifica-se a necessidade de realizar estudo de *scale-up* para viabilizar a aplicação industrial da proposta deste trabalho. Também é interessante analisar a contribuição de uma fosfolipase no processo (recomenda-se o uso da Lecitase[®] Ultra).

Acredita-se que seja necessária uma análise mais elaborada da esterificação para recomendação das condições ótimas para sua condução. Se possível também efetuar estudo de *scale-up*.

Finalmente, é imprescindível um estudo de viabilidade técnica e econômica abrangendo todas as etapas (upstream, downstream, utilidades etc.) para posicionar este processo como uma opção válida e rentável no mercado do biodiesel.

7 REFERÊNCIAS

- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9–14, 2010.
- BUGG, T. **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry: second edition**. 2nd. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. d'Avila; SILVA, P. R. da; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.
- CESARINI, S.; HALLER, R. F.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 29, 2014.
- CESARINI, S.; JAVIER PASTOR, F. I.; NIELSEN, P. M.; DIAZ, P. Moving towards a competitive fully enzymatic biodiesel process. **Sustainability (Switzerland)**, v. 7, n. 6, p. 7884–7903, 2015.
- DA FRÉ, N. C. Obtenção de Ácidos Graxos a Partir da Acidulação de Borra de Neutralização de Óleo de Soja. p. 112, 2009.
- DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.
- DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3–4, p. 125–129, 2004.
- FARIA, I. D.; PEIXOTO, M.; MORAIS, P. de; SOUZA, R. B. L. de. A Utilização de Óleo Vegetal Refinado como Combustível - Aspectos Legais, Técnicos, Econômicos, Ambientais e Tributários. **Centro de Estudos da Consultoria do Senado**, p. 64, 2010.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.
- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298–1315, 2009.

FRÉ, N. C. Da; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Otimização do processo de obtenção de ácidos graxos a partir da borra do refinamento do óleo de soja, subproduto das indústrias de refino de óleo e biodiesel. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–328, 2013.

GONÇALVES, K. M.; JUNIOR, I. I.; PAPADIMITRIOU, V.; ZOUMPANIOTI, M.; LEAL, I. C. R.; DE SOUZA, R. O. M. A.; CORDEIRO, Y.; XENAKIS, A. Nanoencapsulated Lecitase Ultra and *Thermomyces lanuginosus* Lipase, a Comparative Structural Study. **Langmuir**, v. 32, n. 26, p. 6746–6756, 2016.

GUO, F.; XIU, Z. L.; LIANG, Z. X. Synthesis of biodiesel from acidified soybean soapstock using a lignin-derived carbonaceous catalyst. **Applied Energy**, v. 98, p. 47–52, 2012.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: Vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1087–1096, 2005.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277–286, 2008.

HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. 1. ed. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 2004.

KUMAR, M.; MUKHERJEE, J.; SINHA, M.; KAUR, P.; SHARMA, S.; GUPTA, M. .; SINGH, T. P. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Sustain Chem Process**, 2015.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. Tecnologia para Produção de Óleo de Soja: Descrição das Etapas, Equipamentos, Produtos e Subprodutos. **Documentos 171**, p. 100, 2001.

MISHRA, M. K.; KUMARAGURU, T.; SHEELU, G.; FADNAVIS, N. W. Lipase activity of Lecitase Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 24, p. 2854–2860, 2009.

MOGENSEN, J. E.; SEHGAL, P.; OTZEN, D. E. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1719–1730, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 5th. ed. New York, USA: W. H. Freeman Company, 2004.

PEREIRA, R. G.; PIAMBA TULCAN, O. E.; FELLOWS, C. E.; DE JESUS LAMEIRA, V.; GONALVES QUELHAS, O. L.; ELIAS DE AGUIAR, M.; SANTO FILHO, D. M. D. E. Sustainability and mitigation of greenhouse gases using ethyl beef tallow biodiesel in energy generation. **Journal of Cleaner Production**, v. 29–30, n. 7, p. 269–276, 2012.

PILOTO-RODRÍGUEZ, R.; MELO, E. A.; GOYOS-PÉREZ, L.; VERHELST, S. Conversion of by-products from the vegetable oil industry into biodiesel and its use in internal combustion engines: A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 287–301, 2014.

POYARKOVA, T. N.; PROKOF'EV, Y. I.; KUDRINA, G. V.; TARASOVA, A. V.; SOTNIKOVA, E. V. Influence of temperature, pH, and time of base hydrolysis on variation of the fatty acid composition of soapstock. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 85, n. 9, p. 1399–1403, 2012.

PRATHUMPAI, W.; FLITTER, S. J.; MCINTYRE, M.; NIELSEN, J. Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 714–719, 2004.

PRICE, J.; NORDBLAD, M.; MARTEL, H. H.; CHRABAS, B.; WANG, H.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 8, p. 1719–1728, 2016.

PRICE, J.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M.; HUUSOM, J. K. Fed-batch feeding strategies for enzymatic biodiesel production. **IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)**, v. 19, p. 6204–6209, 2014.

SEMWAL, S.; ARORA, A. K.; BADONI, R. P.; TULI, D. K. Biodiesel production using heterogeneous catalysts. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2151–2161, 2011.

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

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: Properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–16, 2003.

SKJOLD-JØRGENSEN, J.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; BJERRUM, M. J. Altering the activation mechanism in *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Biochemistry**, v. 53, n. 25, p. 4152–4160, 2014.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SOUZA, M. S.; AGUIEIRAS, E. C. G.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 154, n. 1–3, p. 253–267, 2009.

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

TOFTGAARD PEDERSEN, A.; NORDBLAD, M.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

TU, Q.; WANG, J.; LU, M.; BROUGHAM, A.; LU, T. A solvent-free approach to extract the lipid fraction from sewer grease for biodiesel production. **Waste Management**, v. 54, p. 126–130, 2016.

VERDUGO, C.; LUNA, D.; POSADILLO, A.; SANCHO, E. D.; RODRÍGUEZ, S.; BAUTISTA, F.; LUQUE, R.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 107–112, 2011.

VIOLA, E.; BLASI, A.; VALERIO, V.; GUIDI, I.; ZIMBARDI, F.; BRACCIO, G.; GIORDANO, G. Biodiesel from fried vegetable oils via transesterification by heterogeneous catalysis. **Catalysis Today**, v. 179, n. 1, p. 185–190, 2012.

WANG, Y.; ZHAO, M.; SONG, K.; WANG, L.; TANG, S.; RILEY, W. W. Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra). **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1066–1072, 2010.

WANG, Z. M.; LEE, J. S.; PARK, J. Y.; WU, C. Z.; YUAN, Z. H. Novel biodiesel production technology from soybean soapstock. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 6, p. 1027–1030, 2007.

XIN, R.; KHAN, F. I.; ZHAO, Z.; ZHANG, Z.; YANG, B.; WANG, Y. A comparative study on kinetics and substrate specificities of Phospholipase A1 with *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 149–154, 2017.

XU, Y.; DU, W.; ZENG, J.; LIU, D. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 1, p. 45–48, 2004.