

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Jacqueline Rodrigues Pires da Silva

**LIPASE NS40116 COMO BIOCATALISADOR NA
REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO E
HIDROESTERIFICAÇÃO DE GORDURA
ABDOMINAL DE FRANGO**

Florianópolis – SC
2018

Jacqueline Rodrigues Pires da Silva

**LIPASE NS40116 COMO BIOCATALISADOR NA REAÇÃO DE
TRANSESTERIFICAÇÃO E HIDROESTERIFICAÇÃO DE
GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos. Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Coorientadora: Prof. Dr^a. Débora de Oliveira

Coorientador: Dr. Lindomar Alberto Lerin

Florianópolis - SC
2018

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

Silva, Jacqueline Rodrigues Pires

Lipase NS40116 como biocatalisador na reação de transesterificação e hidroesterificação de gordura abdominal de frango / Jacqueline Rodrigues Pires Silva ; orientador, Jorge Luiz Ninow, coorientador, Débora de Oliveira, coorientador, Lindomar Alberto Lerin, 2018.

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

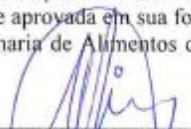
1. Engenharia de Alimentos. 2. Transesterificação enzimática. 3. Hidroesterificação enzimática. 4. Gordura abdominal de frango. 5. Lipase livre NS40116. I. Ninow, Jorge Luiz. II. de Oliveira, Débora. III. Lerin, Lindomar Alberto IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

**“LIPASE NS40116 COMO CATALISADOR NA REAÇÃO
DE TRANSESTERIFICAÇÃO E
HIDROESTEREFICAÇÃO”
DE GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO”**


Por

Jacqueline Rodrigues Pires da Silva

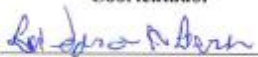
Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.




Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador



Profa. Dra. Débora de Oliveira
Coorientador



Dr. Lindomar Alberto Lerin
Coorientador




Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carneiro
Coordenador

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



Profa. Dra. Helen Treichel



Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski



Dr. Sidnei Emilio Bordignon Junior

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que o medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me amparar e me dar forças para continuar, mesmo nas horas que eu deixei de acreditar que era capaz.

Ao meu orientador, Jorge, e aos meus coorientadores, Débora e Lindomar, que me deram o apoio para seguir em um tema ao qual eu me identifiquei, por me orientarem sobre os melhores caminhos para continuar minha pesquisa, por me motivar a crescer, a estudar mais, a participar de congressos e a publicar artigos científicos. Ao professor Vladimir pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos Mara, Lindo, Daniela e Leandro pelo auxílio na condução dos experimentos, pelas longas horas de conversas e risadas e aos alunos de Iniciação Científica Artur e Felipe pela contribuição na realização dos ensaios laboratoriais, além da amizade e companheirismo.

Aos meus pais, que mesmo longe se fizeram presentes, me escutaram quando eu precisei e me aconselharam em cada escolha que precisei fazer. Eles que puxaram minha orelha e incentivaram, a todo o momento, para eu me dedicar a alcançar meus objetivos. À minha irmã Jessica, que de forma singela, me lembrava o significado da palavra Família.

Ao meu namorado Marcos que teve muita paciência, que me apoiou, obrigada por ser meu porto seguro.

Aos meus familiares, em especial meus primos Cristina, Priscila, Felipe que em um sorriso mostravam orgulho das minhas escolhas e que tudo valeria a pena.

Às minhas amigas Angelise, Bianca e Isadora pelas longas noites de conversas, risadas e de pequenas brigas que demonstraram o significado da palavra amor e amizade.

Às minhas amigas Luciana, Laura, Flávia, Marla, Paloma e Dona Nilzete pela amizade, companheirismo e pelas jantinhas.

Aos meus amigos de Araguaína que me incentivaram e me transmitiram suas experiências para que eu não cometesse os mesmos erros que eles já haviam cometido.

Aos meus amigos do mestrado e do doutorado, minha família aqui em Florianópolis, que me ajudaram, que estavam presentes de uma forma muito especial na realização desse trabalho.

A todos os colegas dos Laboratórios Engebio e Central de Análises que me acolheram, pelos lanches e confraternizações.

A Capes pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

RESUMO

O biodiesel enzimático, alternativo aos processos catalisados quimicamente, torna-se atrativo ao utilizar matérias-primas de baixo custo como a gordura abdominal de frango (GAB) juntamente com a aplicação das lipases livres que apresentam um menor valor de mercado, satisfatória velocidade de reação e mesmo a possibilidade de reuso. O objetivo do trabalho foi determinar as condições otimizadas afim de obter o maior teor de ésteres metílicos e etílicos a partir da gordura abdominal de frango utilizando a lipase livre NS 40116, em sistema livre de solvente, via transesterificação e hidroesterificação enzimática. Assim, foram realizados estudos cinéticos para investigar a reação de transesterificação metílica utilizando a lipase livre NS 40116 sem e com a presença de água, diferentes concentrações da enzima livre NS 40116 no meio reacional (0,1, 0,3 e 0,7%), diferentes temperaturas (30, 35 e 45 °C), diferentes razões molares (1:3, 1:4,5 e 1:6 gordura:metanol) e diferentes formas de adição do metanol (1, 3 e 6). No processo de transesterificação etílica utilizou-se a metodologia do planejamento Plackett-Burmann para avaliar o efeito das variáveis temperatura (°C), razão molar GAB:etanol, razão molar GAB:água, concentração enzimática (% m/m) e agitação (rpm) sobre a conversão do processo. O processo de hidroesterificação metílica utilizou o planejamento 2² e avaliou o efeito das variáveis: razão molar GAB:metanol e razão molar GAB:água. Um estudo cinético da reação de hidroesterificação enzimática via rota etílica também foi conduzido. A gordura abdominal de frango possui massa molar de 861,05 g.mol⁻¹, índice de acidez de 0,705 mg KOH.g⁻¹, e índice de peróxido de 2,32 mEq.10⁻³.g⁻¹. O caldo enzimático da lipase NS 40116 tem aproximadamente 50% de água livre, apresentando uma atividade hidrolítica de 5,36 U.mL⁻¹. Nas condições otimizadas da reação de transesterificação catalisada pela lipase NS 40116 a partir da gordura abdominal de frango obteve-se 76,85% de conversão em oito horas, sendo: 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% (m/m) de água, razão molar de 1:4,5 gordura:metanol adicionados em 3 frações iguais nas três primeiras horas, temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm. Em 24 horas a reação via transesterificação etílica conduziu a uma conversão em ésteres de 72,04%, enquanto na hidroesterificação metílica foi possível obter 89,04%. Na hidroesterificação etílica a presença ou ausência de água no hidrolisado influenciou o tempo nas reações de esterificação. A presença de água no hidrolisado permitiu a máxima obtenção do teor de ésteres etílico (59,30%) e em menor tempo de reação (4 horas). Na

ausência de água notou-se a inatividade da lipase com consequente redução na produção de ésteres etílicos (12% em 24 horas). O uso da GAB e da lipase livre NS40116 na produção de ésteres de ácidos graxos mostrou respostas satisfatórias com potencial para aplicação industrial.

Palavras-chave: Transesterificação enzimática. Hidroesterificação enzimática. Resíduo. Gordura abdominal de frango. Lipase livre NS 40116. Metanol. Etanol.

ABSTRACT

Enzymatic biodiesel, as an alternative biodiesel obtained by chemical route and alternative to petroleum fuel, becomes attractive by using low-cost raw materials such as abdominal chicken fat (GAB) and a low-cost free enzyme, satisfactory reaction speed and even the possibility of reuse. In this sense, the main goal of this work was to optimize enzymatic biodiesel synthesis in order to obtain highest methyl and ethyl esters content from abdominal chicken fat by using free NS 40116 lipase as a catalyst in a solvent-free system enzymatic transesterification and hydroesterification. With this purpose, kinetics studies were carried out to investigate the reaction of methyl transesterification associated with NS 40116 enzyme without and with the presence of water, by evaluating NS 40116 enzyme concentration (0.1, 0.3 and 0.7%), temperature (30, 35 and 45 °C), molar ratio GAB to methanol (1: 3, 1: 4.5 and 1: 6) and different forms additions of methanol (1, 3 and 6 shots). In order to evaluate the variables, temperature (°C), molar ratio GAB to ethanol, molar ratio GAB to water, enzymatic concentration (% m/m), and agitation (rpm). The methyl hydroesterification process used the 2² planning and evaluated the effect of the variables: molar ratio GAB to methanol and molar ratio GAB to water. A kinetic study of the hydroesterification reaction via ethanol route was also conducted. Abdominal chicken fat was characterized through molar mass (861.05 g.mol⁻¹), acid (0.705 mg KOH.g⁻¹), and peroxide index (2.32 mEq.10⁻³.g⁻¹). The lipase enzyme broth NS 40116 has approximately 50% of free water presenting a hydrolytic activity of 5.36 U.mL⁻¹. Under optimized conditions of enzymatic transesterification reaction catalyzed by NS 40116 using abdominal chicken fat, 76.85% of conversion was obtained in eight hours, under conditions of 0.3% (w/w) NS 40116 lipase, 2% (w/w) water, 1:4.5 molar ratio GAB to methanol added in 3 shots at 30°C and 250 rpm. In 24 hours the reaction via ethyl transesterification gave 72.04% of esters, while the methyl hydroesterification was possible to obtain 89.04%. In the case of ethyl hydroesterification, the presence or absence of water in the hydrolysate influenced the time in the esterification reactions. The presence of water in the hydrolysate allowed the highest ethyl ester content (59.30%) and the lowest reaction time (4 hours). And without the presence of water, the inactivity of the lipase was observed, with a consequent reduction in the production of ethyl esters (12% in 24 hours). The use of GAB and free lipase in the production of

fatty acid esters showed satisfactory responses with potential for industrial application.

Keywords: Enzymatic transesterification. Enzymatic hydroesterification. Residue. Abdominal chicken fat. Enzymatic biodiesel. NS 40116 enzyme. Methanol. Ethanol. Experiment planning

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção mundial de carne de frango nos anos de 2016, 2017 e uma previsão do ano de 2018.	31
Figura 2 - Rendimento da gordura abdominal de frango.	34
Figura 3 - Produção mundial de biodiesel no ano de 2016.	38
Figura 4 - Evolução anual da produção de biodiesel, da demanda compulsória de biodiesel e da capacidade autorizada pela ANP.....	39
Figura 5 - Produção por região brasileira de biodiesel em 2017.	40
Figura 6 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel na região Sul em 2017.....	41
Figura 7 – Reação de transesterificação.	44
Figura 8 - Esquema de produção de éteres de ácidos graxos através da reação de hidroesterificação.	46
Figura 9 – Reação de hidrólise do triglicérido.	47
Figura 10 - Representação da reação de esterificação.....	48
Figura 11 – Processo de obtenção da gordura abdominal de frango.	58
Figura 12 – Fluxograma geral das reações de transesterificação para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos.	64
Figura 13 – Fluxograma da reação de hidroesterificação.....	68
Figura 14 - Cinética enzimática para avaliar o comportamento da lipase NS 40116 na presença ou não de água em reações de transesterificação. Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 1:3 razão molar gordura:metanol à 35 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.	73
Figura 15 – Reações enzimáticas centrifugadas para produção de ésteres metílicos a partir de óleo de soja, nas condições de 0,3% (m/m) da lipase livre NS 40116, razão molar de 1:3 óleo:metanol, à 35 °C, agitação de 250 rpm em sistema livre de solvente por 24 horas. (a) reação com adição de 2% de água, (b) reação sem adição de água. .	74
Figura 16 - Cinética enzimática de transesterificação para comparar diferentes concentrações de enzima NS 40116. Condições experimentais de 2% de água (m/m), 1:3 razão molar óleo:metanol à 35 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.....	75
Figura 17 - Cinética enzimática de transesterificação para avaliar diferentes temperaturas). Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% de água (m/m), 1:3 razão molar	

gordura:metanol, agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.	77
Figura 18 - Cinética enzimática de transesterificação para comparar diferentes razões molares gordura: metanol (1:3, 1:4,5 e 1:6). Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% de água (m/m), à 30 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.....	78
Figura 19 - Cinética enzimática de transesterificação para comparar adições fracionadas de metanol (1, 3 e 6 adições) durante as 6 primeiras horas. Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% de água (m/m), 1:4,5 razão molar gordura:metanol à 30 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.	80
Figura 20 - Diagrama de Pareto para a produção de ésteres etílicos utilizando o resíduo GAB e a lipase livre NS 40116, em diferentes temperaturas (35-55 °C), razão molar gordura:etanol (1:3-1:6), razão molar gordura:água (1:0,5-1:1,5), concentração enzimática (0,1-0,5 % (m/m)) e agitação (150-250 rpm).	84
Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta - Efeito da razão molar gordura:água e temperatura em função do teor de ésteres etílicos (% m/m) para reação de transesterificação da gordura abdominal de frango.....	86
Figura 22 - Estudo cinético da reação de transesterificação enzimática. Condições experimentais: razão molar de 1:5,5 gordura para água, razão molar de 1:3 gordura para etanol e agitação de 150 rpm (a) diferentes temperaturas, (b) diferentes concentrações enzimáticas.	87
Figura 23 – Cinética de hidrólise da gordura abdominal de frango catalisada pela lipase NS 40116. Condições experimentais: 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 4% de água, à 35 °C; agitação de 250 rpm.	89
Figura 24 - Diagrama de Pareto para a produção de ésteres metílicos utilizando o resíduo GAB e a lipase livre NS 40116 em diferentes razões molares gordura: água (1:2.5-1:4.5) e em diferentes razões molares gordura: metanol (1:3-1:5).	92
Figura 25 - Curva de contorno - Efeito da razão molar gordura:metanol e razão molar gordura:água para a produção de ésteres metílicos (% m/m) a partir da gordura abdominal de frango, em temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	94

Figura 26 - Estudo cinético de hidroesterificação enzimática em diferentes concentrações enzimáticas. Condições experimentais: razão molar de 1:2,5 gordura para água, razão molar de 1:3 gordura para metanol, 30 °C, 250 rpm, em sistema livre de solvente.	95
Figura 27 - Hidroesterificação utilizando etanol como substrato. Condições experimentais: razão molar de 1:5,5 (m/m de gordura) gordura para água razão molar gordura para etanol de 1:3 (m/m de gordura) adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas, 25 °C, 150 rpm.(a) diferentes concentrações enzimática (0,1-0,5% (m/m)) (b)Reação de esterificação com/sem a adição de água (água quando adicionada, razão molar de 1:5,5 (m/m de gordura) gordura: água).	96
Figura 28 – Cromatograma da cinética de hidroesterificação enzimática da gordura abdominal de frango. Condições experimentais de 0,3% (m/m) da lipase NS 40116, 2% de água (m/m), 1:3,5 razão molar óleo:metanol à 35 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de composição centesimal da carne de frango.	33
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos da gordura abdominal (% do total de ácidos graxos) de frangos de corte.	34
Tabela 3 – Resíduos gerados no processamento de aves.	35
Tabela 4 – Reações de transesterificação utilizando lipase livre e em modo batelada.	45
Tabela 5 - Comparação das reações de transesterificação e hidroesterificação pela via química e enzimática.	49
Tabela 6 – Hidroesterificação que utilizaram em pelo menos uma etapa (hidrólise e/ou esterificação) enzimas livres e em batelada.	51
Tabela 7 – Variáveis independentes da matriz do planejamento dos experimentos para a obtenção de ésteres etílicos a partir da gordura abdominal de frango e etanol por transesterificação enzimática utilizando a lipase NS 40116 em sistema livre de solvente orgânico.	67
Tabela 8 - Estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento dos experimentos para a obtenção de ésteres metílicos a partir do resíduo da gordura abdominal de frango utilizando como catalisador a lipase livre NS40116.	69
Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango. ...	71
Tabela 10 – Análises do teor de água livre contida no caldo enzimático da lipase NS 40116.	72
Tabela 11 - Matriz do planejamento Plackett-Burman (valores reais e codificados) para a produção de ésteres etílicos (% m/m).	82
Tabela 12 - Matriz do planejamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² (valores reais e codificados) para a produção de ésteres etílicos (% m/m). Condições experimentais de 0,5%(m/m) da lipase livre NS 40116, razão molar de 1:3 gordura para etanol e 150 rpm.	85
Tabela 13 - Matriz do planejamento fatorial completo 2 ² (DCC) com ensaios em duplicata e triplicata do ponto central da reação de hidroesterificação (valores reais e codificados) com as respostas em termos de teor de ésteres metílicos. Condições experimentais: Concentração enzimática de 0,3% (m/m em relação ao substrato) da lipase livre NS 40116, o metanol foi adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas, à 30 °C e agitação de 250 rpm, com tempo reacional de 2 h de hidrólise e 4 horas de esterificação.	91
Tabela 14 - Análise de Variância (ANOVA) para modelo matemático linear que descreve a produção de ésteres metílicos.	93
Tabela 15 - Resumo geral dos resultados obtidos nas reações de transesterificação e hidroesterificação em 24 horas.	98

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	OBJETIVOS	29
1.1.1	Objetivos específicos	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	PRODUÇÃO DA CARNE DE FRANGO.....	31
2.2	CARNE DE FRANGO	32
2.3	BIODIESEL.....	35
2.3.1	Programas de Incentivo à produção de biodiesel no Brasil	36
2.4	PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	38
2.5	ENZIMAS.....	41
2.5.1	Lipase	41
2.6	TIPOS DE REAÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDO GRAXO	43
2.6.1	Transesterificação	43
2.6.2	Hidroesterificação	46
2.7	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	55
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	MATERIAL.....	57
3.1.1	Matéria-prima	57
3.1.2	Enzima	58
3.1.3	Reagentes	58
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO	59
3.2.1	Perfil de ácidos graxos	59
3.2.2	Índice de acidez	59
3.2.3	Índice de peróxido	60
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS 40116.....	61
3.3.1	Quantificação do teor de água do caldo enzimático da lipase NS 40116	61

3.3.2	Atividade hidrolítica da lipase NS 40116.....	62
3.4	HIDRÓLISE DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO CATALISADA PELA LIPASE NS 40116.....	63
3.5	SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS	63
3.5.1	Estudo cinético da reação de transesterificação enzimática na produção de ésteres metílicos.....	63
3.5.2	Otimização da reação de transesterificação enzimática para a produção de ésteres etílicos	66
3.5.3	Hidroesterificação enzimática	68
3.6	QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES PRODUZIDOS	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	CARACTERÍSTICAS DA MATÉRIA-PRIMA	71
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO DA LIPASE NS 40116.....	72
4.3	ESTUDOS CINÉTICOS DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍlicos DE ÁCIDOS GRAXOS	72
4.4	OTIMIZAÇÃO da TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO ETANOL COMO SUBSTRATO	81
4.5	HIDRÓLISE DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO CATALISADA PELA LIPASE NS 40116.....	88
4.6	HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O METANOL	90
4.7	ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO O ETANOL COMO SUBTRATO	95
4.8	RESUMO GERAL DOS RESULTADOS	98
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
8	APÊNDICE A	117
9	APÊNDICE B.....	119

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

LIPASE NS40116 COMO CATALISADOR NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO E HIDROESTERIFICAÇÃO DE GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO

Por quê?

- Produzir uma energia renovável empregando resíduos industriais como substrato;
- Reduzir os custos do processo ao utilizar matéria-prima e enzima de baixo custo;
- Investigar o potencial da lipase NS 40116 para a produção do biodiesel.

Quem já fez?

- Não constam na literatura trabalhos que realizem a hidroesterificação enzimática simultaneamente;
- Existem poucos trabalhos na literatura que utilizam gordura abdominal de frango como substrato para produção de biodiesel;
- Não há relatos de trabalhos de hidroesterificação enzimática a partir de gordura abdominal de frango utilizando a lipase NS 40116 em sua forma livre e imobilizada.

Hipóteses

- A lipase pode ser inativada pelo álcool?
- A lipase tem capacidade de hidroesterificação e/ou transesterificação?
- Qual a interferência do glicerol?

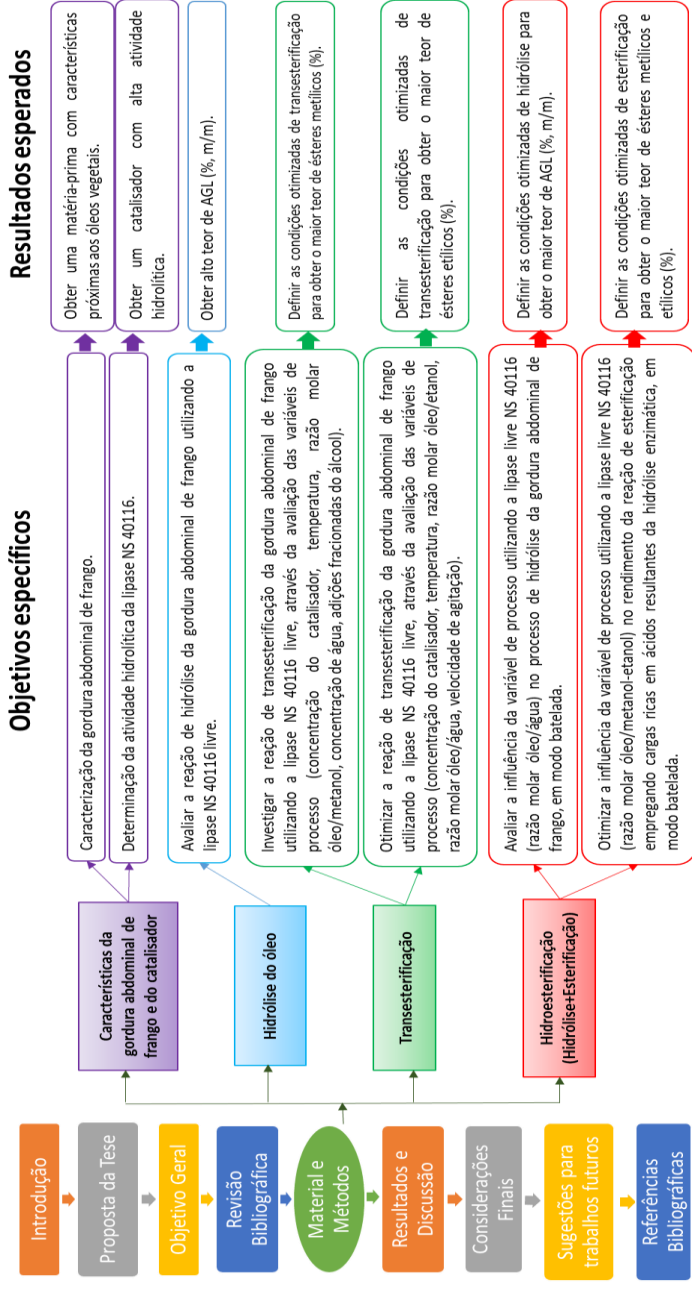
Métodos experimentais

- Método de caracterização da matéria-prima (perfil de ácidos graxos, acidez e índice de peróxido);
- Método de atividade de hidrólise e esterificação da lipase;
- Cinética de transesterificação, em modo batelada;
- Otimização das condições de processo para a reação de hidroesterificação;
- Cinética de hidrólise (batelada) e esterificação (batelada);
- Quantificação dos ésteres por cromatografia gasosa.
- Determinar as características da gordura abdominal de frango;

Resposta

- Determinar a atividade hidrolítica da lipase;
- Determinar as condições experimentais que correspondam ao maior teor de ésteres metílicos e etílicos em reação de transesterificação e em reação de hidroesterificação em dois passos.

ORGANOGRAMA DA TESE



1 INTRODUÇÃO

No final do século XIX, o engenheiro mecânico Rudolf Christian Karl Diesel desenvolveu o primeiro motor a “diesel” do mundo, um motor a pistão abastecido com óleo de amendoim. Após patentear o motor desenvolvido, Diesel apresentou sua pesquisa na Exposição de Paris em 1900 (SHAY,1993). A pesquisa de Diesel que no primeiro instante mostrou-se promissora, atenuou-se devido às vantagens do diesel; ao longo do século XX, o biodiesel atraiu a atenção de pesquisadores devido a sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis uma vez que estes emitem gases que agravam o efeito estufa. Problemáticas que envolvem o petróleo, como o esgotamento de sua reserva, a instabilidade do preço e a instabilidade política que algumas regiões produtoras vivem são fatores que incentivam a pesquisa de novas fontes de energia sustentável (CÉSAR; BATALHA, 2008; ROSSET et al., 2011).

Nesse contexto, o interesse na produção do biodiesel aumentou por ser um combustível sustentável e biodegradável, o qual é considerado uma energia alternativa, advindo de fontes renováveis (WIDYAN; SHHYOUKH, 2002) como: óleos vegetais (soja, algodão), óleos vegetais residuais, gorduras animais (bovinos, suínos e frangos), algas, dentre outros (SARANTOPOULOS et al., 2014). Além das vantagens apresentadas acima, a produção do biodiesel gera novos empregos na sua cadeia produtiva enfatizando a sua importância social na comunidade, principalmente as relacionadas com a agropecuária.

Os incentivos à produção de biodiesel com as políticas governamentais implementadas no Brasil, aliados ao surgimento das matérias-primas de baixo custo, e da demanda pelo biodiesel aumenta a perspectiva de crescimento do setor com o passar do tempo (BERGMANN et al., 2013).

Matérias-primas advindas de gorduras animais de baixa qualidade, de baixo custo e em abundância, como os resíduos de óleos vegetais e as gorduras animais, ganham destaque pois são responsáveis por reduzir o custo total de produção do biodiesel já que são duas ou três vezes mais baratas quando comparadas com os óleos vegetais refinados (SHIN et al., 2012), conseguindo agregar valor à sua cadeia produtiva, e também à redução da poluição ambiental.

A gordura abdominal de frango, considerada um subproduto da indústria de alimentos e muitas vezes tratada como um resíduo, é uma matéria-prima que se assemelha com os óleos vegetais por ser composta

principalmente pelos ácidos graxos insaturados linoleico e oleico (CHIU; GIOIELLE, 2002).

Uma alternativa para a produção do biodiesel é pela via enzimática, pouco utilizada nas indústrias devido ao elevado custo do processo e à instabilidade de lipases em solventes orgânicos. Apesar das barreiras citadas, a utilização das enzimas apresenta como vantagens a possibilidade de reutilização em mais de um ciclo e a redução de poluentes ao final do processo, sendo considerada uma energia limpa (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

As lipases são enzimas de grande interesse industrial pelo seu alto potencial biotecnológico, destacam-se por sua versatilidade ao catalisar reações de hidrólise, transesterificação, hidroesterificação, esterificação, interesterificação, entre outras (SÁNCHEZ et al., 1996). Empregadas em processos biotecnológicos são responsáveis por atuar na interface óleo água, uma vez que os substratos são caracteristicamente insolúveis em água (NAVARRO; BRACE, 1997). As lipases podem estar na forma livre ou imobilizadas. O uso de lipases livres se mostra atraente pois apresenta um menor custo e maior velocidade de reação quando comparada com lipases imobilizadas (REN et al., 2011).

A lipase NS 40116 é um caldo enzimático obtido a partir do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* modificado geneticamente, ainda não disponível para comercialização, e apresentada aos pesquisadores como uma enzima específica para matérias-primas de alto teor de ácidos graxos livres (AGL), a qual mantém sua atividade na presença de água.

Para a produção de biodiesel comumente utiliza-se a reação de transesterificação, ou seja, quando um óleo (vegetal, animal ou resíduo) reage com um álcool, produzindo éster e glicerol. (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007; GUAN; KUSAKABLE; SAKURAI, 2009). A hidroesterificação, por exemplo, é um importante processo para a produção do biodiesel, tendo como vantagem a utilização de matérias-primas de alto teor de ácidos graxos e umidade. Ela engloba a reação de hidrólise do óleo vegetal/animal seguida da reação de esterificação. Esta é responsável por produzir ésteres metílicos/etílicos que utiliza como substrato os ácidos graxos gerados na reação de hidrólise e um álcool de cadeia curta (MACHADO et al., 2015; AGUIEIRAS et al., 2104; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011).

Tendo como base o exposto acima, um dos grandes desafios na era dos biocombustíveis é tornar a produção do biodiesel enzimático técnica e economicamente viável. A utilização de uma matéria-prima de baixo custo como a gordura abdominal de frango, associado com a utilização de

tecnologias enzimáticas, específicas para matérias-primas de alto teor de ácidos graxos livres, demonstra potencial de crescimento da produção de biodiesel enzimático, apresentando uma importante contribuição à área.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral determinar as condições otimizadas para obter o maior teor de ésteres metílicos e etílicos a partir da gordura abdominal de frango utilizando a lipase livre NS 40116, em sistema livre de solvente, via reação de transesterificação e hidroesterificação.

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a gordura abdominal de frango;
- Avaliar a reação de hidrólise da gordura abdominal de frango utilizando a lipase NS 40116 livre;
- Investigar a transesterificação da gordura abdominal de frango utilizando a lipase NS 40116 livre para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos, através da avaliação das variáveis de processo (concentração do catalisador, temperatura, razão molar óleo/metanol, efeito da concentração de água, efeito de adições fracionadas do álcool);
- Otimizar a hidroesterificação da gordura abdominal de frango utilizando a lipase livre NS 40116 para a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos, através da avaliação das variáveis de processo (concentração do catalisador, temperatura, razão molar óleo/etanol, razão molar óleo/água, velocidade de agitação);
- Otimizar a reação de hidroesterificação da gordura abdominal de frango utilizando a lipase livre NS40116 para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos, por meio da avaliação das variáveis de processo (razão molar óleo/metanol, razão molar óleo/água);
- Avaliar a reação de hidroesterificação da gordura abdominal de frango utilizando a lipase livre NS40116 para a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos em diferentes concentrações enzimáticas.
- Avaliar a influência da água no hidrolisado nas reações de esterificação sem o glicerol, produto da reação de hidrólise.

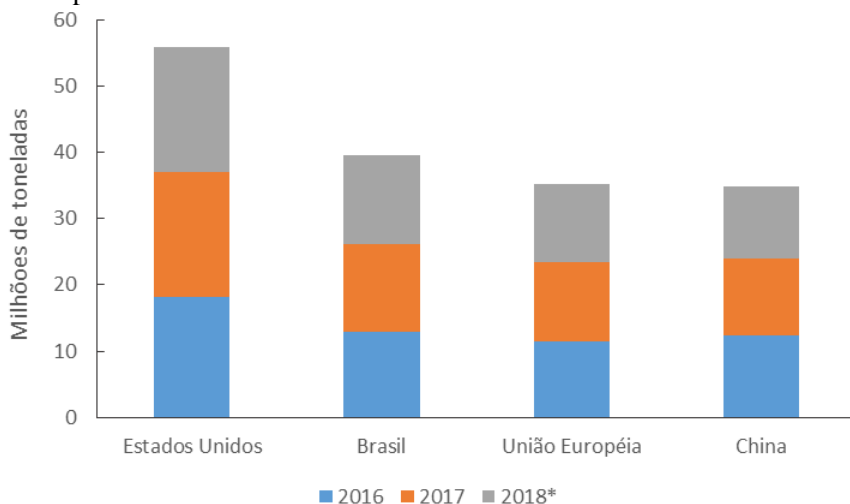
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresentará uma breve revisão sobre os aspectos gerais da matéria-prima utilizada (gordura abdominal de frango), envolvendo o cenário mundial da produção da carne de frango. Além disso, mostrará uma revisão ao que se refere a produção de biodiesel, iniciando-se pela definição do biocombustível, a inserção deste no mundo, principalmente à produção de biodiesel. Por fim, será explanado sobre enzimas e sua inserção no sistema de produção de biodiesel por transesterificação e hidroesterificação.

2.1 PRODUÇÃO DA CARNE DE FRANGO

A produção mundial da carne de frango, no ano de 2017 foi de 90,72 milhões de toneladas, esse valor indica um aumento de 1,68 % em relação ao ano de 2016. Em 2017, os Estados Unidos produziram 18,696 milhões de toneladas e se mantiveram como maior produtor mundial, seguido do Brasil, da União Europeia e da China (USDA, 2018). O Brasil como segundo maior produtor da carne de frango (13,15 milhões de toneladas) superou a União Europeia e a China em 9,96 e 11,79 %, respectivamente (Figura 1) no ano de 2017 (USDA, 2018).

Figura 1 - Produção mundial de carne de frango nos anos de 2016, 2017 e uma previsão do ano de 2018.



Fonte: Adaptado do USDA, 2018. *Valor estimado.

No mesmo ano de 2017, o Brasil foi considerado o maior exportador de carne de frango com 3,85 milhões de toneladas de carne de frango e estima-se que em 2018 esse valor supere 4,15 milhões de toneladas. Os estados que se destacaram na exportação da carne de frango foram Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo (EMBRAPA, 2017).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015) o aumento da produção de frangos se deve à qualidade, à sanidade e ao preço dos produtos, que são advindos de investimentos no setor quanto às novas tecnologias, aos novos equipamentos, às dietas balanceadas, ao melhoramento genético para o crescimento rápido do animal, à eficiência alimentar e ao rendimento da carne de frango.

2.2 CARNE DE FRANGO

A carne de frango quando comparada com a carne suína e a carne bovina é considerada mais saudável por conter baixo teor de lipídeos e uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados (LEESON et al., 1999; BONOLI et al., 2007). A Tabela 1 mostra a composição centesimal da carne de frango. Entretanto, a carne de frango é a segunda mais consumida, sendo a carne de porco a primeira. De acordo com a USDA (2018), o consumo mundial da carne de frango no ano de 2018 deverá apresentar um aumento de 0,57%, em relação ao ano de 2017 (88,56 milhões de toneladas). Os países que lideram o ranking de consumo da carne de frango são os Estados Unidos (15,64 milhões de toneladas), a China (11,47 milhões de toneladas), a União Europeia (11,23 milhões de toneladas) e o Brasil (9,31 milhões de toneladas).

Tabela 1 – Tabela de composição centesimal da carne de frango.

Umidade	66,5 %
Valor energético	226 Kcal = 947 KJ
Carboidratos	0,0 g
Proteínas	16,4 g
Lipídeos	17,3 g
Colesterol	85 mg
Fibra alimentar	Não se aplica
Cinza	0,7 g
Cálcio	6 mg
Sódio	63 mg

Fonte: TACO, 2011.

A qualidade da carne, o teor de gordura abdominal do frango e o perfil de ácidos graxos dessa gordura (Tabela 2) estão diretamente ligados à composição da dieta do frango, a idade ótima de abate, ao cruzamento genético das raças de frango de corte e ao sexo, uma vez que as fêmeas possuem mais gordura abdominal do que os machos (RYMER; GIVENS, 2005); os produtores de frangos de corte através das características citadas acima buscam o crescimento rápido das aves e com baixa quantidade de gordura abdominal.

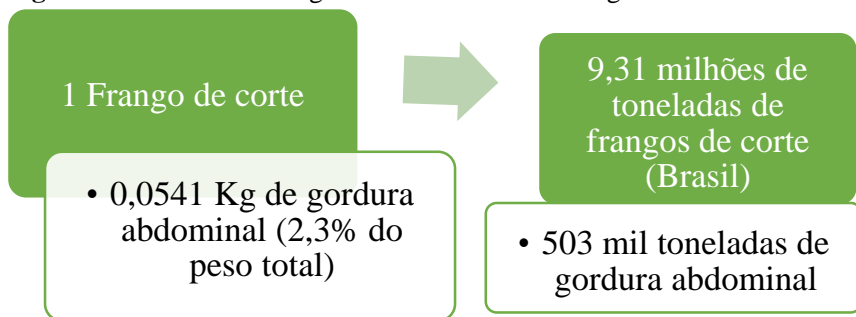
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos da gordura abdominal (% do total de ácidos graxos) de frangos de corte.

Ácidos Graxos	(%)
C14:0 – mirístico	0,6
C16:0 – palmítico	24,7
C16:1 – palmitoléico	7,1
C18:0 – esteárico	6,0
C18:1 – oléico	43,4
C18:2 – linoléico	17,2
C18:3 – linolênico	1,0

Fonte: Adaptado de CHIU; GIOIELLI; GRIMALDI, 2008.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (1996) os frangos de corte são abatidos aos 42 dias de idade quando atingem o peso aproximado de 2,35 Kg, com conversão alimentar de 1,84 Kg, a gordura abdominal corresponde a 2,0 a 2,5% do peso total da carcaça. A Figura 2 mostra um comparativo sobre a quantidade de gordura abdominal de apenas um frango com o quanto isso representa, em quantidade de gordura abdominal, na produção de frangos, no Brasil, em 2015, supondo 2,3% de gordura abdominal (valor intermediário ao citado na literatura Gioielli e Chiu (2002)).

Figura 2 - Rendimento da gordura abdominal de frango.



A gordura abdominal de frango é composta principalmente pelos ácidos graxos: palmítico, linoleico e oleico, e por possuir em sua composição mais de 50% de ácidos graxos insaturados, a gordura é semissólida à temperatura ambiente (20-25 °C). A gordura abdominal é

considerada um subproduto na indústria de alimentos, sendo usado principalmente como ingrediente de rações e de embutidos, bem como em caldos desidratados, em pós para sopa e patês e também para produção de biocombustíveis, como por exemplo, o biodiesel. Nos abatedouros pequenos essa mesma gordura abdominal de frango é descartada juntamente com as vísceras não comestíveis, penas, sangue, ossos quebrados entre outros, sendo tratados como resíduo. Os resíduos gerados totalizam 30% do peso da ave viva, e a gordura do frango (pele, gordura abdominal de frango) é responsável por 11,3% (Tabela 3) (CHIU; GIOIELLE, 2002; GIOIELLI; CHIU, 2002; GOMES et al., 2006).

Não foram encontrados trabalhos de produção de biodiesel enzimático a partir da gordura abdominal de frango. Entretanto, Zanetti (2012) investigou a produção de biodiesel a partir da gordura abdominal de frango utilizando a catálise básica. Para esse método de produção a matéria-prima mostrou-se viável uma vez que não foi necessário o seu pré-tratamento e atendeu aos padrões exigidos pela Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustível (ANP).

Tabela 3 – Resíduos gerados no processamento de aves.

Partes	%
Sangue	2,4
Penas	6,3
Vísceras não comestíveis	7,3
Gordura	11,3
Quebra (ossos, resíduos e rejeitos)	2,7

Fonte: Adaptado de GOMES et al., 2006.

2.3 BIODIESEL

O biodiesel é definido como éster alquilo de ácido graxo obtido a partir de óleos comestíveis (óleo de soja, óleo de girassol, óleo de semente de algodão e óleo de canola), não comestíveis (óleo de farelo de arroz, óleo de pinhão manso, óleo de microalgas), gorduras animais (banha de porco, sebo, gordura de frango) e óleos residuais (WIDYAN; SHHYOUKH, 2002). As matérias-primas mais utilizadas para a produção do biodiesel são os óleos comestíveis, estes são responsáveis por cerca de 70% do custo total, considerado o fator limitante. A utilização de óleos residuais e gorduras animais são uma alternativa para essa problemática.

Os óleos e gorduras não podem ser utilizados como biocombustíveis, pois são de 10 a 17 vezes mais viscosos que o diesel, causando danos aos motores. Para alcançar uma viscosidade próxima ao do diesel é necessário a conversão química do óleo ou gordura por esterificação ou transesterificação. A transesterificação, principalmente alcalina, é o processo mais utilizado industrialmente, outros métodos catalíticos tais como o ácido, enzimático, ou supercrítico estão sendo estudados (DEMIRBAS, 2007; KISS; DIMIAN; ROTHENBERG, 2006).

O uso do biodiesel é responsável pela redução da dependência energética do petróleo, gera emprego e renda no campo, e reduz a emissão de gases poluentes. Este biocombustível é seguro de usar, manusear e transportar devido ao seu alto ponto de inflamação; e ainda, possui um alto poder lubrificante consequentemente o aumento da vida útil do motor (ANASTOPOULOS et al., 2001; DUBÉ; TREMBLAY; LIU, 2007).

As problemáticas do biodiesel podem variar conforme a matéria-prima utilizada para a produção do biodiesel possuindo relação direta com os custos de produção, bem como os problemas com o motor ao longo do tempo (AGARWAL, 2007; DEMIRBAS, 2007, QUINTELLA et al., 2007).

2.3.1 Programas de Incentivo à produção de biodiesel no Brasil

Durante a década de 1940 o Brasil começou a exploração de novas energias a partir de óleos e gorduras em motores de combustão interna a fim de diminuir os impactos causados pela Segunda Guerra Mundial. As crises internacionais do petróleo na década de 1970 e 1990, tiveram um grande impacto na economia mundial e, consequentemente, na economia brasileira. Nesse contexto, a preocupação com a disponibilidade, com o custo dos derivados de petróleo e com a consciência ambiental, estimularam a necessidade de investigar fontes alternativas de energia (CÉSAR BATALHA, 2010).

Na década de 1970, foi lançado no Brasil os programas Proálcool e Prodiésel para superar esses períodos de crise. Em 1980, o programa de Produção de Óleos Vegetais para fins Energéticos - PROÓLEO, foi criado pela Comissão Nacional de Energia (CNE) e estabelecida pela Resolução nº 7 de 22 de outubro de 1980. O principal objetivo dessa Resolução era adicionar 30% (v/v) de óleos vegetais ou de derivados no diesel, ou seja, substituir parcialmente o diesel visando a longo prazo uma

substituição completa. O programa foi abandonado, em 1986, após a queda dos preços do petróleo (CÉSAR; BATALHA, 2010; ITURRA, 2003).

Data-se que a partir do ano 2000 o governo brasileiro mostrou um novo interesse no tema sobre combustíveis renováveis por meio de iniciativas como a Rede de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (PROBIODIESEL), estabelecido pela portaria nº 702 de 30.12.02, o Programa de Biomassa Energética em Assentamentos do INCRA na Amazônia (PROBIOAMAZON), instituído pela Portaria Interministerial de 11.0.2001, e o Termo de Cooperação Técnica para implantação do projeto-piloto de exploração da cultura do dendê no assentamento de Reforma Agrária Tarumã-Mirim (Manaus-AM), em 2001 (ITURRA, 2003).

O governo brasileiro criou iniciativas de incentivo à produção de biodiesel através da implementação do Programa Nacional Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), o qual tem como objetivo promover o uso e a produção de biodiesel de forma sustentável com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, por meio da geração de emprego e renda.

O PNPB é responsável por incentivar os pequenos agricultores (agricultura familiar) a produzirem matérias-primas para a produção de biodiesel, através de linhas especiais de crédito, assistência técnica para a produção, bem como a venda das matérias-primas. E os produtores de biodiesel que compram essa matéria-prima recebem o “Selo Social” um certificado emitido pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), com o Selo Social é possível obter benefícios fiscais do Governo Federal, como a redução de impostos e linhas de créditos com baixas taxas e participações em leilões de compra e venda de biodiesel (MATTEI, 2008).

Por meio da Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 o Governo Federal introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira, a lei que nos seus três primeiros anos estabeleceu a adição obrigatória de 2% (v/v) de biodiesel ao diesel (B2) e após esse período o percentual mínimo obrigatório foi fixado em 5% (v/v) de adição de biodiesel ao diesel (B5). Esta lei foi revogada pela lei 13.033 de 2014.

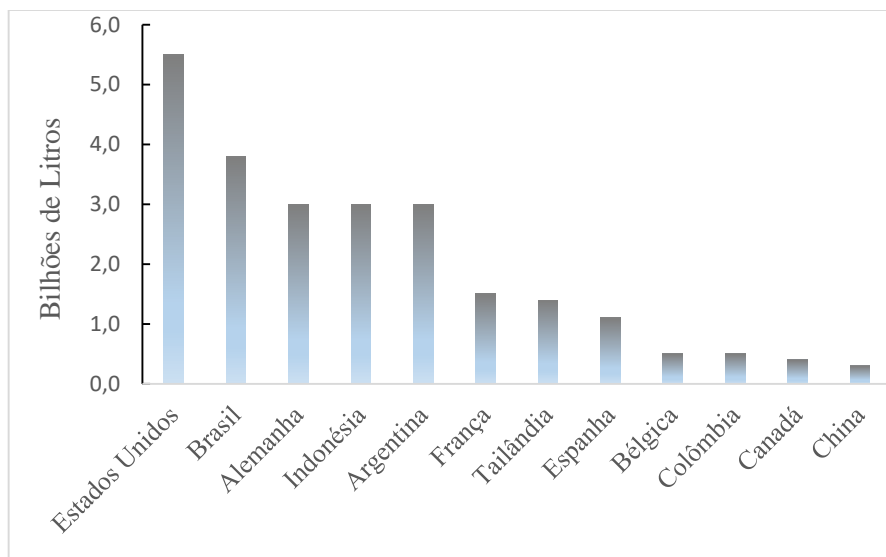
A Lei nº 13.033 de 24 de setembro de 2014 tornou obrigatória a adição de 7% (v/v) de biodiesel ao diesel (B7) a partir do dia 1 de novembro de 2014. Esta mesma lei ainda aborda sobre as matérias-primas utilizadas no biodiesel a qual estas devem ser preferencialmente produzidas pela agricultura familiar. E conforme a Lei nº 13.623/2016

torna-se obrigatória a adição de 8 % (v/v) de biodiesel ao diesel até março de 2017. O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) antecipou em 1 ano (março de 2018) a autorização da mistura de 10% de biodiesel (B10) ao diesel mineral afim de trazer benefícios na economia, no meio ambiente e para reforçar a força do Brasil no mercado de biocombustíveis.

2.4 PRODUÇÃO DE BODIESEL

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial com 5,5 bilhões de litros de biodiesel, seguido do Brasil com 3,8 bilhões de litros de biodiesel, e os países Alemanha, Indonésia e Argentina, ambos produziram 3,0 bilhões de litros de biodiesel produzidos no ano de 2016. A alta produtividade do biodiesel nesses países é advinda de políticas implantadas por seus governos por meio de incentivos fiscais e com a obrigatoriedade da adição do biodiesel ao diesel, o que aumenta a demanda por esse produto (STATISTA, 2016). A produção mundial de biodiesel é mostrada na Figura 3.

Figura 3 - Produção mundial de biodiesel no ano de 2016.

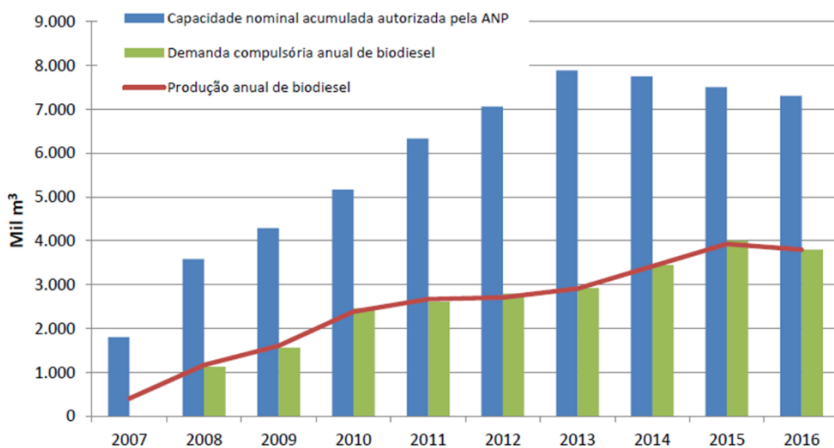


Fonte: Adaptado de Statista, 2016.

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo - ANP (2016), o Brasil encerrou o ano de 2017 com 51 plantas de biodiesel autorizadas para operar com a capacidade de mais de 20 22,29 mil m³.dia⁻¹. As plantas autorizadas a operar com as maiores capacidades situam-se nos estados de Goiás, de Mato Grosso e do Rio Grande do Sul; e as de menores capacidades no Rio Grande do Norte, em Rondônia e no Rio de Janeiro. A capacidade autorizada que as indústrias têm para produzir é um fator importante porque é através dela que se consegue apoio do BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social) para financiamentos, o que impulsiona a economia local.

A evolução da produção de biodiesel foi a partir de 2006, ano que o governo já havia autorizado o uso do biodiesel no diesel. No ano de 2008 foi obrigatório a adição de 2% de biodiesel ao diesel, o chamado B2, esse fato é marcado com o aparecimento da demanda compulsória, fator esse que conduz a produção de biodiesel, e é o que impulsiona os aumentos da produção nos anos subsequentes, com destaque para o ano de 2010 e de 2014, com a obrigatoriedade da adição do biodiesel B5 e B7, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 - Evolução anual da produção de biodiesel, da demanda compulsória de biodiesel e da capacidade autorizada pela ANP.

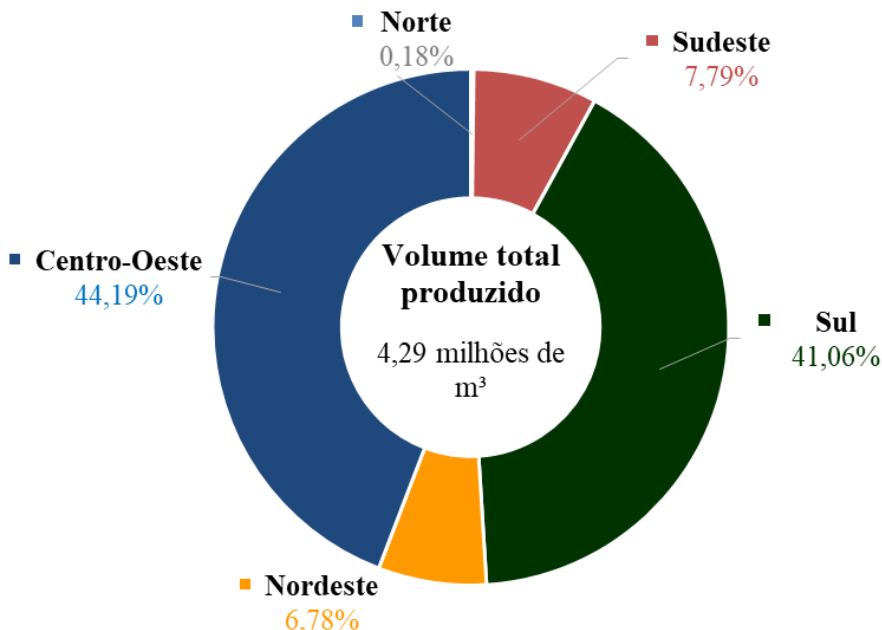


Fonte: ANP, 2018.

No ano de 2017 o volume de biodiesel produzido no Brasil foi de mais de 4,29 milhões m³ de biodiesel, sendo cerca de 11,42% maior

que no ano de 2016. As regiões Centro-oeste e Sul se destacam com a produção de 1,89 e 1,76 milhões m³, respectivamente, juntas elas representaram 85,25% da produção brasileira no ano de 2017 (Figura 5) (ANP, 2018).

Figura 5 - Produção por região brasileira de biodiesel em 2017.

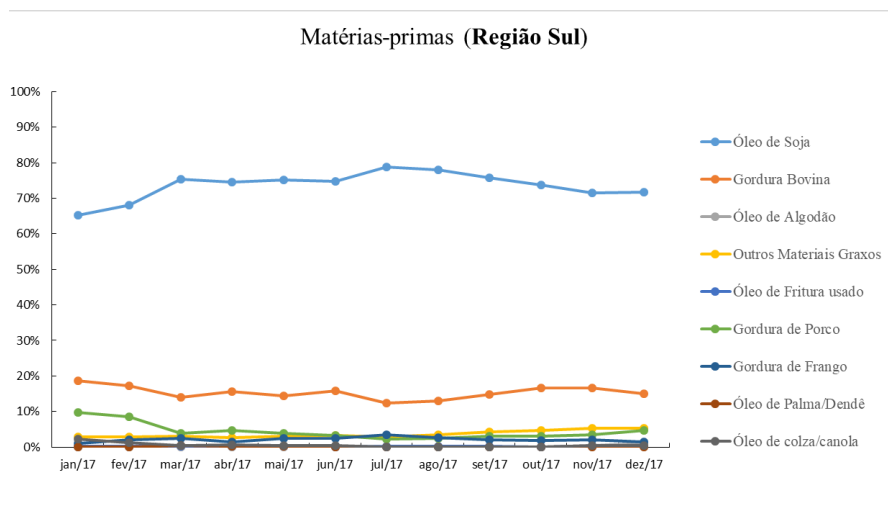


Fonte: Adaptado da ANP, 2017.

Os estados do Rio Grande do Sul, do Mato Grosso e de Goiás foram os três maiores produtores de biodiesel, em 2015, em volume produziram mais de 1,1 milhões m³, 845 mil m³ e 695 mil m³, respectivamente. Esses estados possuem a maior capacidade de operação autorizada (ANP, 2016).

A principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel é o óleo de soja, seguido da gordura bovina e do óleo de algodão e em menos de 6% foi utilizada a gordura de porco, o óleo de fritura, a gordura de frango, óleo de palma/dendê e outros materiais graxos. A Figura 6 exemplifica as matérias-primas mais utilizadas para a produção de biodiesel na região Sul do país no ano de 2017 (ANP, 2018).

Figura 6 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel na região Sul em 2017.



Fonte: Adaptado de ANP, 2017.

2.5 ENZIMAS

As enzimas são moléculas de proteína, glicoproteína, ou de RNA obtidas de fontes como células de plantas e animais e microrganismos, responsáveis por catalisar reações biológicas (ROLAND, 1981).

As enzimas são uma alternativa aos processos químicos uma vez que apresentam elevada velocidade de reação, utilizam de condições brandas de processo, em algumas reações podem catalisar as reações nos dois sentidos e são seletivas quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES; MACEDO, 2006).

As enzimas apresentam uma variada aplicabilidade como na síntese de fármacos, detergentes, surfactantes, produtos agroquímicos, biodiesel, cosméticos, aromas, laticínios, entre outros (JAEGER; EGGERT, 2002; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

2.5.1 Lipase

As lipases são enzimas de grande interesse industrial pelo seu alto potencial biotecnológico, classificada como hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) (BROCKMAN, 1984), destacando-se por sua

versatilidade ao catalisar reações de hidrólises, transesterificação, interesterificação, entre outras (SÁNCHEZ et al., 1996).

Segundo o microbiologista Christiaan Eijkman, diferentes cepas podem produzir e secretar as lipases (JAEGER; EGGERT, 2002) e podem ser produzidas por microrganismos (fungos e bactérias), animais (pancreática, hepática e gástrica) e plantas. As mais utilizadas na indústria são as de origem fúngica e bacteriana (ARPIGNY; JAEGER, 1999), devido ao baixo custo de produção e fácil modificação genética (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Segundo Pandey, Soccol e Mitchell (2000) e Sharma, Chisti e Banerjee (2001) a produção das lipases microbianas acontece principalmente por fermentação submersa, pois comparada com a fermentação em estado sólido, apresenta uma melhor homogeneidade do meio de cultura, e tem-se uma maior capacidade de controlar os parâmetros, como o pH e a temperatura.

As lipases podem ter massa molecular de 19,6 a 75 kDa, atuar em pH na faixa entre 4 e 9 e em temperaturas de ambiente até 70 °C. Entretanto, sua termoestabilidade varia em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (JAEGER; REETZ, 1998).

Empregadas em processos biotecnológicos são responsáveis por atuar na interface óleo-água, uma vez que os substratos são caracteristicamente insolúveis em água (NAVARRO; BRACE, 1997). O mecanismo de ativação interfacial das lipases é dividido em duas vertentes: (I) o substrato é ativado na presença de uma interface óleo/água e (II) a lipase recebe uma mudança conformacional para uma forma ativada quando em contato com a interface óleo/água (MALCATA et al., 1992). Os motivos do seu uso nos processos biotecnológicos são devidos a sua estabilidade em solventes orgânicos, por não necessitar de cofatores e por possuírem uma alta especificidade (estereosseletividade, regioseletividade e quimiosseletividade) (JAEGER; REETZ, 1998).

No mercado as lipases estão disponíveis em sua forma livre ou imobilizada. A lipase livre é comercializada em pó (liofilizada) ou líquida (caldo enzimático). A lipase livre em pó é obtida através da liofilização e é pouco empregada nos processos biotecnológicos em larga escala, pois apresenta grande risco à saúde, uma vez que o pó ao ser inalado pode causar reações alérgicas (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Como alternativa mais segura e mais barata, emprega-se o caldo enzimático, que contém estabilizante (por exemplo, o glicerol ou o sorbitol) e conservante (por exemplo, o benzoato de metila) para evitar a desnaturação proteica e

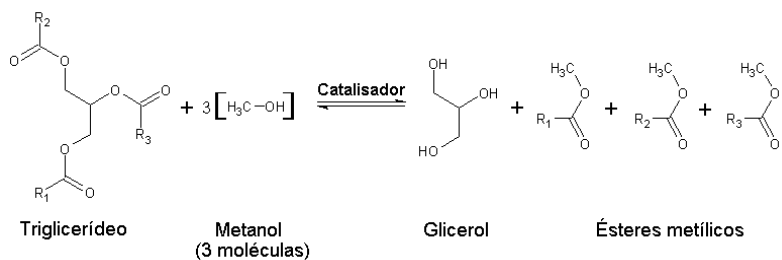
o crescimento microbiano, respectivamente (AGUIEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

A aplicação das lipases livres em processos biotecnológicos revela-se atraente, pois apresenta um menor preço da enzima, mais rápida velocidade de reação quando comparada com lipases imobilizadas e assim como as lipases imobilizadas é possível o reuso através da utilização de membranas (REN, 2011), ou pela retirada da fase densa no reator (glicerol, enzima, produtos não reagidos) (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Apesar do baixo preço da enzima livre em relação à enzima imobilizada, a baixa estabilidade operacional pode aumentar o custo do processo (AGUIEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; YAN et al., 2014). Outras desvantagens quanto ao uso das lipases livres são em relação ao uso de solventes orgânicos e condições extremas de processo, por exemplo, pH e temperatura, fatores estes que ocasionam a desnaturação da lipase (YAN et al., 2014).

2.6 TIPOS DE REAÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDO GRAXO

2.6.1 Transesterificação

A transesterificação é o processo comumente utilizado para a obtenção de biodiesel. O processo converte triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos e, para que este seja completamente convertido são necessários três moles de álcool (1 mol de triglicerídeo para 3 moles de álcool), essa proporção varia em diferentes sistemas. O processo de transesterificação é reversível e o equilíbrio do processo é deslocado para a formação do produto utilizando álcool em excesso ou pela remoção contínua do produto. A Figura 7 representa um esquema geral da reação de transesterificação, quando um triglicerídeo (óleo vegetal, animal ou resíduo) reage com um álcool (ex. metanol), formando éster de ácido graxo e glicerol.

Figura 7 – Reação de transesterificação.

Fonte: Wordpress, 2018.

Abaixo (Tabela 4) estão apresentados trabalhos que utilizaram a reação de transesterificação utilizando catalisador enzimático em sua forma livre.

Tabela 4 – Reações de transesterificação utilizando lipase livre e em modo batelada.

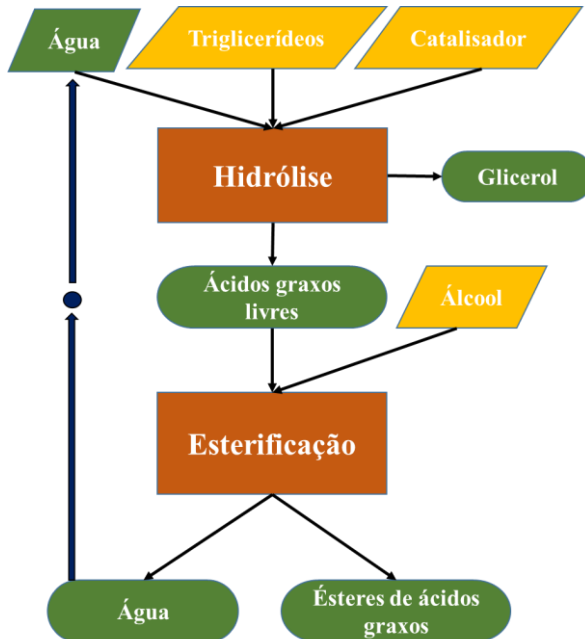
Referência	Catalisador (% em massa)	Substrato	Álcool	Temperatura (°C), Tempo (h), Agitação (rpm)	Teor de ésteres de ácidos graxos (%)
LI; DU; LIU (2014)	NS 81006 – 1,5 % (m/v)	Óleo de soja + 5 % de fosfolípidos	Metanol (4,4:1), 6 adições	45 °C, 8h, 1200 rpm 10 % (m/m) de água	93,5
KAREEM et al. (2016)	Lipase de <i>A. niger</i> - 5 % (m/m)	Óleo de Palma ¹ Óleo de Palmiste ²	Metanol (3:1), 3 adições	40 °C, 48 h e 150 rpm	95,0 ¹ 86,04 ²
YANG et al. (2016)	SL-4 (<i>Burkholderia ubonensis</i>) – 0,5 % (m/m) Lipase de hepatopâncreas do camarão branco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) – 70kUnit	Óleo de soja	Metanol (4:1), 3 adições	45 °C, 36 h e 200 rpm 12 % (m/m) de água	92,05
KUEPETHKAEW et al. (2017)		Óleo de Palma	Metanol (4:1)	45 °C, 16 h e 200 rpm 3 % (m/m) de água	97,01
LV et al. (2017)	NS 81006 – 1,5 % (m/v)	Óleo de cozinha residual	Metanol ³ (4,2:1) Etanol ⁴ (5:1)	45 °C, 17 h, 1000 rpm 3 % (m/m) de água	➤ 90 ^{3,4}

2.6.2 Hidroesterificação

A hidroesterificação é um importante processo para a produção do biodiesel, sendo alternativo ao processo de transesterificação onde tem como vantagens a utilização de matérias-primas de elevada acidez e umidade, ou seja, matérias-primas de baixo custo (KABBASHI et al., 2015).

A hidroesterificação engloba a reação de hidrólise do óleo vegetal/animal produzindo ácidos graxos e glicerol. A partir dos ácidos graxos livres (AGLs) gerados na hidrólise juntamente com um álcool de cadeia curta são responsáveis por produzirem ésteres metílicos/etílicos e água através da reação de esterificação. Na Figura 8 está representado o esquema de produção de ésteres através da reação de hidroesterificação (MACHADO et al., 2015; AGUIEIRAS et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011; ARANDA, et al., 2009).

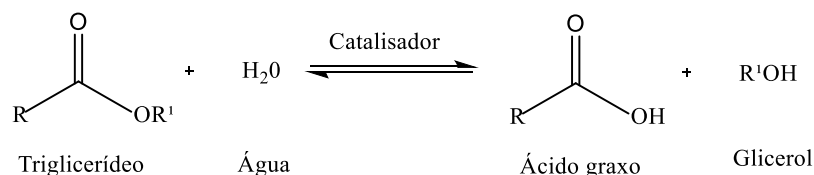
Figura 8 - Esquema de produção de éteres de ácidos graxos através da reação de hidroesterificação.



Fonte: Adaptado de ENCARNAÇÃO, 2008.

A reação de hidrólise que ocorre na presença de um catalisador e água aumenta propositalmente a acidez da matéria-prima justificando o uso de óleos e gorduras de alto teor de ácidos graxos livres, essa reação também é responsável por produzir um glicerol mais puro, sem contaminação, quando comparado ao processo de transesterificação. Na Figura 9 encontra-se a reação de hidrólise do triglicerídeo.

Figura 9 – Reação de hidrólise do triglicerídeo.



Fonte: Adaptado de Fernandes (2002).

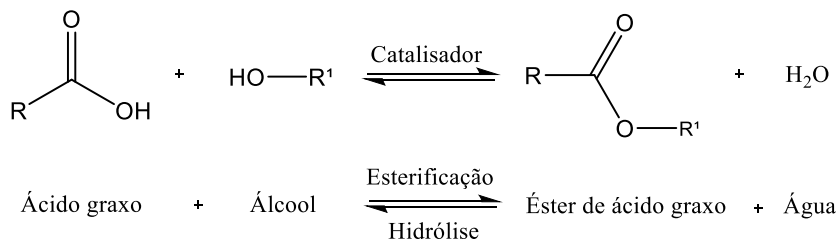
A hidrólise do óleo quando realizada por catalisadores químicos necessita de altas temperaturas e pressões, como consequência podem ocorrer reações indesejáveis como oxidação, desidratação dos ácidos graxos livres ou interesterificação de triglicerídeos. Em contrapartida, as reações catalisadas por lipases necessitam menos energia, têm elevada seletividade, alta pureza do glicerol e ainda os processos enzimáticos são menos poluentes que o processo químico, pois as enzimas são biodegradáveis (SATYARTHIA; SRINIVASA; RATNASAMYB, 2011).

A reação de esterificação é um processo de obtenção de ésteres a partir do ácido graxo livre (AGL) e um álcool de cadeia curta com a formação de água como subproduto, catalisados por bases, ácidos ou enzimas (KIM et al., 2004). O álcool adicionado é responsável por neutralizar a acidez gerada pela reação anterior (ENCARNAÇÃO, 2008). Em termos de velocidade de reação, a reação de esterificação acontece de forma mais rápida em relação a reação de transesterificação, por exemplo: a explicação está na relação estequiométrica na reação de esterificação que é de 1:1 (AGL:álcool), enquanto que na transesterificação essa relação é de 1:3 (triglicerídeo:metanol), ou seja, necessita-se romper três ligações do triglicerídeo para a formação do éster, está ainda apresenta como desvantagem o glicerol como subproduto (NEVES, 2008).

A Figura 10 mostra a representação da reação de esterificação onde pode-se notar que esta reação é reversível, o ácido catalisa tanto a reação

direta (esterificação) como a reação inversa (hidrólise do éster), para deslocar o equilíbrio na formação do produto pode-se remover um dos produtos de preferência a água, ou utilizar o álcool em excesso, esse é o método mais utilizado. Os álcoois mais utilizados são os de baixo peso molecular (metanol e etanol), sendo metanol o mais usado devido ao seu baixo preço (NEVES, 2008).

Figura 10 - Representação da reação de esterificação.



Fonte: CONSTANTINO et al., 2004.

Os fatores que influenciam a eficiência da esterificação enzimática são as enzimas (tipo, método de preparação e concentração), tempo, temperatura, e pH da reação; razão molar dos substratos; e do tipo de álcool, velocidade de mistura, a presença de impurezas, e o teor de água no meio da reação (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Todos esses fatores são pertinentes na transesterificação e hidroesterificação.

As lipases catalisam a transformação de ambos os AGLs e acilgliceróis aos ésteres metílicos, e utilizam temperaturas mais baixas do que em meio alcalino ou ácido (30-40 °C). Além disso, a purificação do biodiesel enzimático é mais fácil, mais barata e implica um consumo inferior de água, porque nem álcalis ou ácidos necessitam ser separados, apenas o excesso de álcool e o glicerol. O glicerol também é facilmente recuperado num elevado grau de pureza (sem misturar com bases ou ácidos), e com maior valor agregado. Por outro lado, se é utilizada a lipase imobilizada a separação da mistura reacional e do catalisador é simples (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

As reações de transesterificação e hidroesterificação podem ocorrer pela via química e/ou via enzimática. Na reação por via enzimática não é necessário o pré-tratamento da matéria-prima, uma vez que a reação não é propensa à formação de sabão, e permite-se reutilização do catalisador, e ao final da reação obtém-se um produto de alta pureza, e glicerol isento de sal (MACHADO et al., 2015). O emprego

das lipases como catalisadores nesse tipo de reação apresenta como vantagens elevada seletividade, especificidade, elevada pureza dos produtos (glicerol e ésteres), condições brandas de processo e os resíduos gerados são facilmente tratados, como exposto na Tabela 5 (AGUIEIRAS et al., 2014).

Tabela 5 - Comparação das reações de transesterificação e hidroesterificação pela via química e enzimática.

	Via química	Via enzimática
Condições de operação	Rigoroso	Branda
Resíduos	Requer tratamento	Biodegradáveis
Reutilização do catalisador	Não	Sim
Tempo de processo	Curto	Longo
Matéria-prima	Qualquer	Qualquer
Álcool	Não atua sobre o catalisador	Pode inativar o catalisador
Custo	Baixo	Alto

A instabilidade e/ou inativação das lipases na presença dos álcoois de cadeia curta como metanol, etanol, propanol, e butanol, pode ser evitada por meio da adição gradual dos álcoois, sendo eficaz para a produção do biodiesel (SHIMADA et al., 2002). O metanol e o etanol são frequentemente utilizados na produção do biodiesel, principalmente o metanol, devido a sua disponibilidade e ao seu baixo preço, já que é um álcool advindo de uma fonte fóssil, o petróleo, considerada não-renovável (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; SHIMADA et al., 2002). Esse fator torna o etanol atraente já que ele é advindo de fontes renováveis, reduzindo as emissões de gases geradas pelos motores dos veículos, além de possuir outras características desejáveis como a baixa toxicidade e o baixo preço.

A problemática da aplicação industrial do processo de transesterificação e hidroesterificação enzimática na produção do biodiesel é o tempo de reação relativamente longo, o alto custo das enzimas disponíveis no mercado, e a eficiência destas na conversão em ésteres metílicos (HAMA; KONDO, 2013). Há enzimas em fase de estudo que superam as dificuldades citadas acima, como a lipase livre NS 40116 e a Eversa®.

A implantação de uma planta industrial de biodiesel que se utiliza o processo de transesterificação e hidroesterificação enzimática mostra-se viável, apesar do alto investimento inicial (49,6 milhões de dólares), quando comparada com uma planta industrial de transesterificação alcalino (19,3 milhões de dólares) (ENCARNAÇÃO, 2008). Jegannathan et al. (2011) mostraram que o custo de produção de biodiesel por catalisador alcalino foi menor (\$ 1166,67/ ton) do que o processo catalisado por lipases solúveis (\$ 7821,37/ ton) e imobilizadas (\$ 2414,63/ ton). Ao se utilizar matérias-primas e enzimas de baixo custo, e se reutilizar as enzimas em dois ciclos, o custo de produção de biodiesel seria de 0,95 centavos por litro, sendo considerado um valor aceitável e competitivo (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2014).

Foram encontrados alguns estudos sobre a hidroesterificação em duas etapas (hidrólise e esterificação separadamente), na qual em um dos processos utiliza catalisador enzimático em sua forma livre (Tabela 6).

Tabela 6 – Hidroesterificação que utilizaram em pelo menos uma etapa (hidrólise e/ou esterificação) enzimas livres e em batelada.

Referências	Etapa de Hidrólise	Modo de Operação	Matéria-prima	Reagente	Catalisador (% em peso de óleo)	Condições Reacionais	Teor de AGL (%)
WATANABE et al. (2007)	Enzimática	Batelada	Sobrenadante e de óleo ácido	40% de água	<i>Candida rugosa</i> (20 U/g)	30 °C, 500 rpm	92
TALUKDER; WU; CHUA (2010)	Enzimática	Batelada	Óleo de cozinha	1:1 (óleo de cozinha :água)	<i>Candida rugosa</i> (0,5 g/L)	30 °C, 250 rpm, 10 h	100
TALUKDER et al. (2010)	Enzimática	Batelada	Óleo de palma cru (CPO)	1:1 (v / v) isooctano/CPO	<i>Candida rugosa</i> em tampão de fosfato de sódio 0,1 M (0,1% em massa de óleo)	30 °C, 250 rpm, 4h	100

SOUSA et al. (2010)	Enzimática	Batelada	Óleo de pinhão manso	Tris-HCL 0,1 mol L ⁻¹ :óleo de pinhão manso (9:1 v/v)	Extrato vegetal de sementes germinadas (VEEG) 10% (m/m) <i>Thermomyc</i> <i>es</i> <i>lanuginosus</i> (2,3 v/v)	40 °C, 2 h	97
CAVALCAN TI- OLIVEIRA et al. (2011)	Enzimática	Batelada	Óleo de soja	1:1 (v/v)	10% (m/m) <i>Thermomyc</i> <i>es</i> <i>lanuginosus</i> (2,3 v/v)	60 °C	89
AGUIEIRAS et al. (2014)	Enzimática	Batelada	Óleo de macaúba	óleo de macaúba (50% v/v):tampão acetato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ (50% v/v)	Lipase vegetal de semente de mamona (2,5 % m/v)	6 h	96

Referências	Etapa de Esterificação	Modo de Operação	Reagente	Catalisador (% em peso de óleo)	Condições Reacionais	Teor de éster de ácidos graxos (%)
WATANABE et al. (2007)	Enzimática	Batelada	AGL:Metanol 66:34 % (m/m)	Lipase imobilizada C. <i>antarctica</i> (1% m/m)	30 °C, 130 oscilações/min 24 h	95,6
TALUKDER; WU; CHUA (2010)	Química	Batelada	4:1 (AGL:Metanol) e isoctano	Amberlyst 15	60 °C, 2 h	99
TALUKDER et al. (2010)	Enzimática	Batelada	1:4,2 metanol (AGL:Metanol)	Novozym 435	6 h	98
SOUSA et al. (2010)	Química	Batelada	1:3 (AGL:Metanol)	Ácido nióbio (20%)	200 °C, 34 atm, 2 h	97,1
CAVALCANTI -OLIVEIRA et al. (2011)	Química	Batelada	AGL:Metanol (1:3)	Ácido (20%)	200 °C, 25 atm, 1 h	92
AGUIEIRAS et al. (2014)	Enzimática	Reator descontinuo	AGL:Etanol (1:2)	Sólido fermentado seco (<i>Rhizomucor miehei</i>) 1,5 U	40 °C, 8 h	91

Fonte: Autora

2.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Com base no exposto ao longo deste capítulo, pode-se observar que as agroindústrias de aves encaram o resíduo gorduroso como problema econômico para a empresa e ambiental para a sociedade, estas. O biodiesel, por exemplo, é uma alternativa economicamente rentável, e que surgiu como alternativa viável aos combustíveis fósseis.

O biodiesel enzimático apresenta como vantagem ser uma tecnologia limpa, entretanto de alto custo de produção. A utilização de lipases comerciais livres surge como alternativa de baixo custo, e com desempenho semelhante aos obtidos com enzimas comerciais imobilizadas.

A literatura apresenta poucos trabalhos para a produção de biodiesel enzimático utilizando lipases em sua forma livre e não há relatos de biodiesel produzido a partir de gorduras animais utilizando lipases livres, bem como não há relatos sobre a produção de biodiesel catalisado pela lipase livre NS 40116 a partir de gordura abdominal de frango.

A relevância do trabalho deve-se à aplicabilidade da lipase comercial livre NS 40116 na produção de biodiesel a partir de resíduo agroindustrial, a gordura abdominal de frango, no que se refere ao seu potencial em utilizar matérias-primas de alto teor de ácidos graxos e água e à otimização das condições experimentais por meio de cinéticas e planejamento de experimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos aplicados para a realização dos experimentos. O trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) e na Central de Análises, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.1 MATERIAL

Os materiais utilizados durante o trabalho estão listados a seguir.

3.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada como fonte de triglicerídeos foi a gordura abdominal de frango bruta, gentilmente cedida pela BRF- Brasil Foods S.A., localizada no município de Chapecó - SC. A gordura congelada foi transportada em caixa de isopor para a Universidade Federal de Santa Catarina, no Laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio) - Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, localizado no município de Florianópolis - SC.

A extração da gordura abdominal de frango foi realizada utilizando a metodologia de fritura descrita por Sheu e Chen (2002), com modificações no tempo de fritura, sendo necessário um aumento de 22 minutos no tempo de extração da gordura. A matéria-prima, gordura abdominal de frango bruta, mostrada na Figura 11, foi colocada em uma panela e aquecida no fogão, a fim de extrair a gordura aderida à parede abdominal, por aproximadamente 30 minutos. O processo de extração foi encerrado quando se notou uma redução no tamanho e uma mudança na coloração da parede abdominal. Foi possível obter em 1 Kg de gordura abdominal bruta um rendimento de 0,67 Kg de gordura (67%) e 0,19 Kg (19%) de resíduo (parede abdominal).

Figura 11 – Processo de obtenção da gordura abdominal de frango.



Fonte: SILVA, 2015.

3.1.2 Enzima

A lipase NS 40116 é um caldo enzimático obtido a partir do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* modificado geneticamente, e foi gentilmente cedida pela empresa Novozymes Latin América Ltda (Araucária-PR).

3.1.3 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a caracterização do perfil de ácidos graxos:

- Solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N;
- Solução metanólica de trifluoreto de boro (BF₃) 14%;
- Heptano;
- Solução saturada de cloreto de sódio;
- Sulfato de sódio.

Para a determinação do índice de acidez foram usados os seguintes reagentes:

- Etanol (95% de pureza, Vetec);
- Fenolftaleína;
- Hidróxido de potássio (Vetec).

Foram utilizados, para a determinação do índice de peróxido, os seguintes reagentes:

- Ácido acético:clorofórmio (3:2 v/v);
- Iodeto de potássio;
- Água destilada;
- Tiosulfato de sódio hidratado;
- Solução indicadora de amido.

Para a determinação do teor de água pelo método de Karl Fischer foram usados os seguintes reagentes:

- Solução Karl Fischer (Merck);
- Metanol anidro.

Foram utilizados para a determinação da atividade hidrolítica da lipase NS 40116 os seguintes reagentes:

- p-Nitrofenil palmitato (p-NPP);
- Etanol (95% de pureza, Vetec);
- Tampão fosfato 0,05 M pH 7,0;
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3).

Foram utilizados os seguintes reagentes para a determinação dos AGLs da gordura abdominal de frango:

- Água destilada;
- Etanol (95% de pureza, Vetec);
- Hidróxido de sódio (NaOH);
- Fenolftaleína.

Para a obtenção das curvas cinéticas de transesterificação e hidroesterificação foram utilizados:

- Gordura abdominal de frango;
- Metanol;
- Água destilada;
- Heptadecanoato de metila (99% de pureza, Sigma-Aldrich).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO

3.2.1 Perfil de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos seguiu as normas da AOCS Ce 2-66, sendo a análise realizada em um cromatógrafo gasoso. O resultado para perfil de ácido graxo é expresso em relação à porcentagem da área do pico. Essa análise foi realizada no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidade La Republica (UDELAR) no Uruguai. O Apêndice A apresenta a descrição do procedimento analítico utilizado.

3.2.2 Índice de acidez

O índice de acidez da gordura abdominal de frango foi determinado segundo metodologia AOCS Cd 3d-63 e representa a acidez do meio, devido à presença de ácidos graxos livres.

Em um Erlenmeyer de 250 mL foi pesada 3 g de gordura abdominal de frango, em seguida adicionou-se 40 mL de etanol previamente neutralizado, essa mistura foi homogeneizada e acrescentou-se 3 gotas do indicador fenolftaleína 1%, este fez-se necessário para indicar o ponto de viragem (mudança de cor) na titulação com solução padronizada de KOH 0,1 M. Os resultados foram expressos como índice de acidez, calculado pela Equação 1:

$$IA = \frac{MM_{\text{KOH}} * V_{\text{KOH}} * C_{\text{KOH}}}{m} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que, IA é o índice de acidez (mg KOH.g⁻¹), MM_{KOH} é a massa molar de KOH (56,1 g.mol⁻¹), V_{KOH} é o volume gasto na titulação da amostra (mL), C_{KOH} é a concentração de KOH da solução (mol.L⁻¹), m é a massa da amostra utilizada na titulação (g).

3.2.3 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado de acordo com a metodologia AOCS Cd 8-53. Por meio desse método foi possível avaliar o teor de oxidação da matéria-prima estudada.

Em um Erlenmeyer pesou-se 5 g de gordura abdominal de frango e adicionou-se 30 mL de solução de ácido acético:clorofórmio (3:2 v/v). A solução foi agitada em uma chapa magnética, e após adicionou-se 0,5 mL da solução saturada de iodato de potássio. A mistura permaneceu em repouso por um minuto com breves agitações (15 segundos), em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada.

A mistura foi titulada com tiosulfato de sódio hidratado 0,1 N até que a cor amarela esmaecesse, depois adicionou-se 2 mL de solução indicadora de amido e, novamente, titulou-se com tiosulfato de sódio hidratado 0,1 N até que a cor amarela esmaecesse. Os experimentos foram realizados em triplicata. O índice de peróxido foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$IP = \frac{(v_{\text{amostra}} - v_{\text{branco}}) \cdot N \cdot 1000}{m_a} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que, IP é o índice de peróxido (miliequivalente de peróxido 1000 g⁻¹), V_{amostra} é o volume gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} é o

volume gasto na titulação do branco (mL), N é a normalidade da solução de tiosulfato de sódio hidratado, m_a é a massa da amostra (g).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS 40116

De acordo com Price et al. (2016) a NS 40116 é um caldo enzimático obtido a partir do microrganismo modificado geneticamente de *Thermomyces lanuginosus*. Ainda em fase de estudos, deverá ser lançada no mercado com baixo preço e específica para produção de biodiesel de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres.

3.3.1 Quantificação do teor de água do caldo enzimático da lipase NS 40116

Os métodos descritos abaixo de quantificação do teor de água, umidade e Karl-Fisher, foram utilizados para determinar a quantidade de água livre no caldo enzimático.

Umidade

O método baseia-se na perda de massa da amostra através da remoção de água, sendo recomendado aplicar em amostras líquidas. Pesou-se 5 g da amostra (caldo enzimático da NS-40116) em uma placa de Petri, previamente dessecada durante 1 hora, e levou-se para a estufa, em temperatura constante de 105 °C. A amostra foi retirada ao atingir uma massa constante (Af). Para as pesagens foi necessário retirar a amostra e esfriá-la em dessecador. Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$U = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que, U é a umidade (%), A_i é o massa da amostra (g) e A_f é a massa da amostra seca (g).

Karl-Fisher

O método baseia-se na redução do iodo e dióxido de enxofre, com simultâneo consumo de água, ou seja, o método é utilizado para medir o teor de água presente na amostra. Para a análise foi usado um titulador manual, modelo Q349-2 da marca QUIMIS. Como titulante foi utilizada solução de Karl-Fischer (Merck), composta por uma solução de iodo e dióxido de enxofre em metanol anidro. Primeiramente adicionava-se ao copo do reator o metanol, em quantidade que cobrisse as pontas do

eletrodo de platina, em seguida titulava-se com solução de Karl-Fischer até o indicador do aparelho indicar a cor vermelha. A seguir foi realizada a fatoração com água para verificar o fator de correção, segundo a equação abaixo:

$$F_c = \frac{M_a * 1000}{V} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que, F_c é o fator de correção; M_a é a massa da amostra (g); V é o volume gasto de Karl-Fischer (mL).

Com o fator de correção determinado, dava-se continuidade às análises das amostras. A amostra a ser analisada foi pesada e adicionada ao frasco onde está o metanol anidro. O indicador do aparelho estará verde indicando que está molhado, então é titulado com solução de Karl-Fischer até o indicador ficar vermelho indicando a secagem do material. A partir da massa de amostra e o valor gasto da solução pode ser realizado o cálculo segundo a Equação 5:

$$C_{H_2O} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{V * F_c}{10 * M_a} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: C_{H_2O} é o teor de água na amostra (% , m/m); V é o volume gasto da solução de Karl-Fischer (mL); F_c é o fator de correção, M_a é a massa da amostra (g).

3.3.2 Atividade hidrolítica da lipase NS 40116

A atividade hidrolítica da enzima livre NS 40116 foi medida utilizando uma solução de 0,5% de *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) em etanol. Em um tubo falcon de 15 mL foi adicionado 0,1 mL de enzima, 1 mL da solução *p*-NPP e 1 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, a mistura foi colocada em banho termoestático por 5 minutos à 30 °C. Após, a mistura foi retirada e adicionado 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,5 N afim de frear a reação, em seguida foi centrifugada (marca Sigma Laboratory Centrifuges, modelo 4 K 15) por 10 minutos à 10.000 rpm. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante e adicionou 4,5 mL de tampão fosfato para a leitura da absorbância no espectrofotômetro (BEL Photonics®, modelo Spectrophotometer SP 1105) no comprimento de onda de 410 nm. Os resultados foram obtidos em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida pela quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições experimentais (adaptado de CHIOU; WU, 2004).

3.4 HIDRÓLISE DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO CATALISADA PELA LIPASE NS 40116

A hidrólise da gordura abdominal de frango foi medida através da acidez do meio devido à presença de ácidos graxos livres.

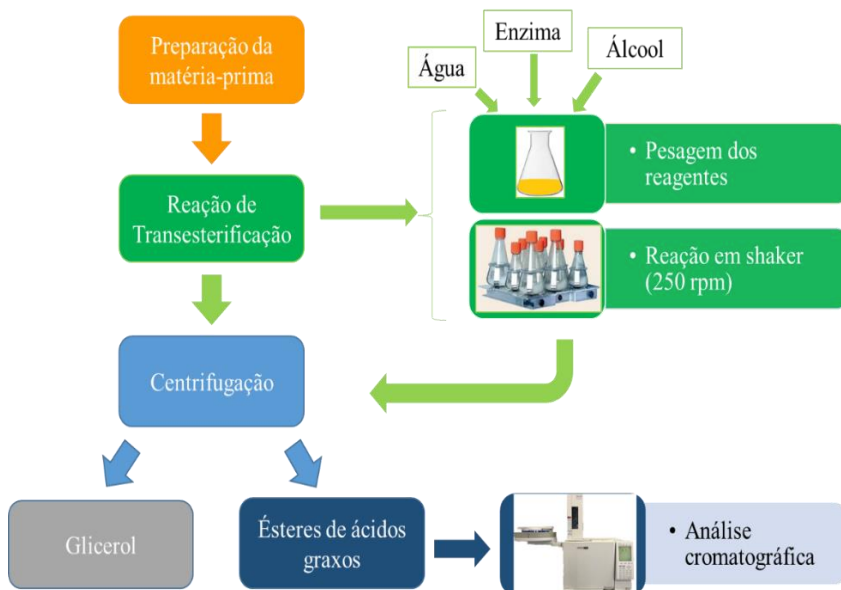
Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers aletados de 250 mL com tampas rosqueáveis, e as condições reacionais foram definidas a partir dos estudos anteriores desenvolvidos no grupo Biodiesel da Universidade Federal de Santa Catarina (REMONATTO et al., 2016; ZENEVICZ et al., 2015), entretanto, utilizou-se um excesso de água a fim de garantir que a hidrólise ocorresse. A incubadora orbital (*shaker*) foi utilizada com rotação de 250 rpm, à 35 °C, nas condições experimentais de 100 g de gordura abdominal de frango, 0,3% (m/m de GAB) da lipase NS 40116 e 4% de água. As amostras foram retiradas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Após a incubação, realizou-se a medição de acordo com o item 3.1.3.

3.5 SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

3.5.1 Estudo cinético da reação de transesterificação enzimática na produção de ésteres metílicos

Os experimentos para a produção de ésteres metílicos foram realizados em uma incubadora orbital (*shaker*) (Tecnal, modelo TE-424), com controlador de temperatura e agitação. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers aletados de 250 mL com tampas rosqueáveis, as cinéticas foram destrutivas e realizadas em duplicata, com agitação de 250 rpm e em sistema livre de solventes orgânicos. Os tempos avaliados foram 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20 e 24 horas. A Figura 12 descreve o fluxograma geral das reações de transesterificação para a produção de ésteres metílicos de ácido graxo.

Figura 12 – Fluxograma geral das reações de transesterificação para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos.



As condições reacionais avaliadas nos estudos cinéticos foram baseadas em resultados prévios obtidos nos estudos do grupo de pesquisa Biodiesel (REMONATTO et al., 2016), relativos a produção de ésteres de ácidos graxos utilizando lipases livres. Assim, foram investigados o comportamento da NS 40116 em meio reacional com a presença ou não de água (2 e 0% (m/m)), em diferentes concentrações da NS 40116 (0,1, 0,3 e 0,7% (m/m)), em diferentes temperaturas (30, 35 e 45 °C), em diferentes razões molares (1:3, 1:4,5 e 1:6 gordura:metanol) e em diferentes números de adições de metanol (1, 3 e 6).

3.5.1.1 Estudo cinético para avaliar o comportamento da lipase na presença de água

Inicialmente, realizou-se uma cinética para determinar o desempenho da lipase NS 40116 na reação de transesterificação, para isso em uma cinética não houve adição de água e em outra foi adicionado 2% de água (m/m de gordura). As condições experimentais de 0,3% (m/m de gordura) de lipase NS 40116, 1:3 razão molar gordura:metanol,

adicionados em seis frações iguais durante as seis primeiras horas, à 35 °C.

3.5.1.2 Estudo cinético para investigar diferentes concentrações da enzima NS 40116

A cinética foi realizada para comparar as diferentes concentrações da NS 40116 de 0,1, 0,3 e 0,7% (m/m). As condições experimentais utilizadas foram de 2% (m/m de gordura) de água, 0,7% (m/m de gordura) de lipase livre NS 40116 e razão molar de 1:3 gordura:metanol (adicionados em seis frações iguais durante as seis primeiras horas) à 35 °C.

3.5.1.3 Estudo cinético para avaliar diferentes temperaturas

A cinética foi realizada para avaliar o comportamento da lipase NS 40116 em diferentes temperaturas (30, 35 e 45 °C). As condições experimentais utilizadas foram 2% (m/m) de água, 0,3% (m/m) de enzima livre (NS 40116) e razão molar de 1:3 gordura:metanol (adicionado em seis frações iguais durante as seis primeiras horas).

3.5.1.4 Estudo cinético para estudar diferentes razões molares

A cinética foi realizada para avaliar o comportamento da lipase imobilizada NS 40116 em diferentes razões molares gordura:metanol (1:3, 1:4,5 e 1:6) adicionados em seis frações iguais durante as seis primeiras horas. As condições experimentais utilizadas foram de 0,3% (m/m) da lipase NS 40116, 2% (m/m) de água, à 30 °C.

3.5.1.5 Cinética para avaliar diferentes adições de metanol

A cinética foi realizada para avaliar o comportamento da lipase imobilizada NS 40116 em adições fracionadas de metanol de 1, 3 e 6 adições, durante as primeiras horas. As condições experimentais de 0,3% (m/m) da lipase NS 40116, 2% (m/m) de água, razão molar de 1:4,5 gordura:metanol à 30 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.

Ao final de todas as reações, as amostras foram transferidas para um tubo falcon e centrifugadas à 6000 rpm por 10 minutos para separar o éster metílico do glicerol, do catalisador e dos substratos que não foram consumidos totalmente.

3.5.2 Otimização da reação de transesterificação enzimática para a produção de ésteres etílicos

A síntese enzimática para obtenção de ésteres etílicos de ácidos graxos foi realizada pela transesterificação da gordura abdominal de frango com álcool etílico catalisada pela lipase comercial livre NS 40116 em sistema livre de solvente orgânico. Para tanto, foram avaliadas as variáveis de processo (temperatura (°C), razão molar (gordura/álcool e gordura/água), concentração enzimática (% m/m) e agitação (rpm)) por meio do planejamento experimental sequencial, utilizando a matriz do tipo Plackett-Burman com triplicata do ponto central. O tempo de reação foi baseado nos ensaios para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos e mantido fixo em 4 horas (item 3.5.1).

Seguido da metodologia do composto central rotacional (DCCR) 2^2 para avaliar o efeito da temperatura e da razão molar gordura:água, com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais. A Tabela 7 apresenta as variáveis e níveis estudados, com os parâmetros fixados: razão molar (1:3 gordura para etanol), concentração enzimática (0,5 % m/m) e agitação (150 rpm). Os níveis das variáveis investigadas foram baseados no planejamento Plackett-Burman.

Tabela 7 – Variáveis independentes da matriz do planejamento dos experimentos para a obtenção de ésteres etílicos a partir da gordura abdominal de frango e etanol por transesterificação enzimática utilizando a lipase NS 40116 em sistema livre de solvente orgânico.

Variáveis	Níveis				
	1º Planejamento de experimentos				
	-1		0		1
Temperatura (°C)	35		45		55
Razão molar gordura: etanol	1:3		1:4,5		1:6
Razão molar gordura: água	1:2,5		1:3		1:4,5
Concentração enzimática (% m/m)	0,1		0,3		0,5
Agitação (rpm)	150		200		250
	2º Planejamento de experimentos				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	20,9	25	35	45	49,1
Razão molar gordura: água	1:3,09	1:3,5	1:4,5	1:5,5	1:5,9

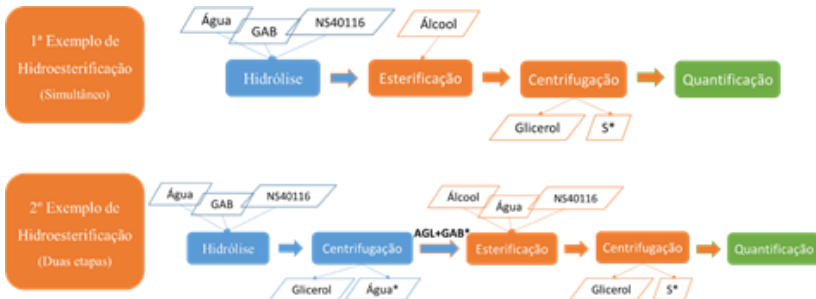
A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e otimização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais, com 95% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc., USA).

Afim de validar o modelo empírico foi realizada uma cinética na melhor condição observada (0,5 % da lipase livre NS 40116 (m/m em relação ao substrato), razão molar de 1:5.5 gordura:água, razão molar de 1:3 gordura para etanol adicionados em três frações iguais durante as três primeiras horas e 150 rpm). A partir da condição otimizada a reação foi avaliada em diferentes concentrações enzimáticas (0,1, 0,3 e 0,5 %).

3.5.3 Hidroesterificação enzimática

Os procedimentos experimentais realizados nessa etapa foram divididos em duas etapas: hidrólise e esterificação enzimática em modo batelada (Figura 13).

Figura 13 – Fluxograma da reação de hidroesterificação.



Água*- Água não reagida; GAB*- Gordura abdominal de frango não reagida; S*- Lipase livre NS40116, água e gordura abdominal de frango não reagida.

Hidroesterificação via rota metílica

A síntese enzimática para obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada pela transesterificação da gordura abdominal de frango com álcool metílico catalisada pela lipase comercial livre NS 40116 em sistema livre de solvente orgânico.

Através do planejamento Fatorial completo (DCC) (2²), com duplicata dos ensaios e triplicata do ponto central, avaliou as variáveis de processo razão molar (gordura para metanol e gordura para água).

O processo de hidroesterificação enzimática foi baseado nos estudos acima (item 3.5.1 e 3.5.2). O tempo de hidrólise foi fixado em 2 horas. A esterificação foi iniciada em seguida, por 4 horas, com o metanol adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas. Foram fixados a concentração enzimática (0,3 % (m/m de gordura) de lipase livre NS 40116), temperatura (30 °C) e agitação (250 rpm). A Tabela 8 mostra as variáveis e os níveis correspondentes.

Tabela 8 - Estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento dos experimentos para a obtenção de ésteres metílicos a partir do resíduo da gordura abdominal de frango utilizando como catalisador a lipase livre NS40116.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Razão molar gordura:água	1:2,5	1:3	1:4,5
Razão molar gordura:metanol	1:3	1:4	1:5

A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e otimização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais, com 95% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc., USA).

Para validação do modelo empírico realizou-se cinética da melhor condição encontrada (0,3% da lipase livre NS 40116 (m/m), razão molar de 1:2,5 gordura:água, razão molar de 1:3 gordura:metanol adicionados em três frações iguais, à 30 °C e agitação de 250 rpm) obtida por meio do modelo está inserida no estudo cinético e baseado nos dados otimizados foram realizadas cinéticas em diferentes concentrações enzimática (0,1, 0,2 e 0,3 %).

Hidroesterificação via rota etílica

Com base em estudos prévios definiu-se o tempo da hidrólise em 2 horas. Em erlenmeyers aletados de 125 mL com tampas rosqueáveis foram pesados 50 g de GAB, 0,5 % (m/m de gordura) de lipase livre NS 40116 e razão molar de 1:5,5 gordura:água, 25 °C à 150 rpm. A etapa de esterificação foi iniciada pela adição do etanol (razão molar de 1:3 gordura:etanol, adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas) e visou o estudo cinético de diferentes concentrações enzimáticas (0,1, 0,3 e 0,5 %).

Ainda, a partir do hidrolisado foram realizados outros dois estudos cinéticos, um com a adição de água e outro sem adição de água na esterificação. Foi inserido o processo de centrifugação (6000 rpm/10 minutos) na gordura hidrolisada, retirou-se o sobrenadante e adicionou a este 0,5% (m/m de gordura) de lipase livre NS 40116, razão molar gordura: etanol de 1:3 (m/m de gordura) adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas, e a água quando adicionada uma razão

molar de 1:5,5 gordura: água. Os tempos avaliados foram 2, 4, 8, 16, e 24 horas. As cinéticas foram destrutivas e realizadas em duplicata.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES PRODUZIDOS

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

A solução foi então injetada (1 µL) em um cromatógrafo gasoso (CG) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar MXT-Biodiesel TG (15m x 0.32mm x 0,10um) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. A temperatura inicial da coluna foi 120 °C permanecendo por 1 minuto, seguido pelo aquecimento de 15 °C/min até 180 °C permanecendo por 2 minutos, e novamente aquecendo 5 °C/min até 250 °C, permanecendo assim por mais 2 minutos. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector foi de 250 °C. Possibilitando realizar o somatório das áreas para a determinação da conversão de triglicerídeos para ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos, cujos cálculos estão descritos abaixo.

O cálculo do teor de ésteres de ácidos graxos da amostra foi obtido através da equação abaixo, com base na EN 14103 (2001):

$$T_E = \left(\frac{\sum A - A_{PI}}{A_{PI}} * \frac{C_{PI}}{C_a} \right) * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que T_E é o teor de ésteres de ácidos graxos na amostra (% m/m), $\sum A$ é o somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14 a C24) e do padrão interno (C8:0), A_{PI} é a área do padrão interno (heptadecanoato de metila), C_{PI} é a concentração do Padrão Interno (heptadecanoato de metila) na amostra injetada (mg/L), C_a é a concentração da amostra diluída em heptano (mg/L).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho sobre o processo de transesterificação e hidroesterificação enzimática da gordura abdominal de frango utilizando a lipase livre NS 40116 em modo batelada.

4.1 CARACTERÍSTICAS DA MATÉRIA-PRIMA

A gordura abdominal de frango possui característica semissólida em temperatura ambiente (20-25 °C), é composta por 71,34% de ácidos graxos insaturados, e apresenta uma massa molar de 861,05 g.mol⁻¹, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango.

Ácidos graxos	%
C16:0 – Palmítico	23,68
C16:1 – Palmitoleico	5,50
C18:0 – Esteárico	4,98
C18:1 – Oleico	40,40
C18:2 – Linoleico	25,44
Total	100

Fonte: O autor.

Não existe uma legislação específica que defina o padrão de qualidade das matérias-primas e resíduos de origem animal. Sabe-se que a qualidade da matéria-prima influencia na produção e nas características dos ésteres de ácidos graxos.

As amostras de gordura abdominal de frango utilizadas nesse trabalho apresentaram um índice de acidez de 0,705 mg KOH.g⁻¹, valor este que é relativamente baixo, mas não se aproxima dos padrões de qualidade exigidos pela RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para óleos vegetais, como o óleo soja (0,6 mg KOH.g⁻¹). No entanto, mesmo fora do padrão de qualidade exigido pela RDC nº 270, o resíduo apresenta baixo índice de acidez, tendo uma relação positiva com a qualidade do produto final, para atender ao padrão de qualidade do biodiesel exigido pela ANP (0,5 mg KOH/g). Resultados semelhantes de caracterização da matéria-prima foram obtidos por Cunha (2008) e Moreira (2009) que encontraram

valores de índice de acidez de 0,684 e 0,921 mg KOH.g⁻¹, respectivamente, para gordura de frango.

Outro método de análise da qualidade da gordura é o índice de peróxido, que fornece o grau de oxidação em que a matéria-prima graxa se encontra. No presente estudo, a gordura abdominal de frango apresentou um índice de 2,32 mEq.10⁻³.g⁻¹, esse valor encontra-se dentro dos padrões exigidos pela RDC nº 270 para a análise de índice de peróxido em óleos e gorduras vegetais (máximo de 10 mEq.10⁻³.g⁻¹).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO DA LIPASE NS 40116

O caldo enzimático da lipase NS 40116 apresentou uma atividade hidrolítica de 5,36 U.mL⁻¹. No intuito de avaliar o teor de água livre contida no caldo enzimático da lipase NS 40116 realizou-se dois testes, umidade e Karl Fisher. Por meio da análise da umidade foi possível obter 46,4%, análise esta realizada em substâncias líquidas; enquanto que o método Karl Fisher é realizado em substâncias semissólidas, e apresentou uma diferença de 0,5% no teor de água livre (Tabela 10).

Tabela 10 – Análises do teor de água livre contida no caldo enzimático da lipase NS 40116.

Análises	% (m/m)
Umidade	46,4 ± 1,06
Karl Fisher	45,9 ± 0,85

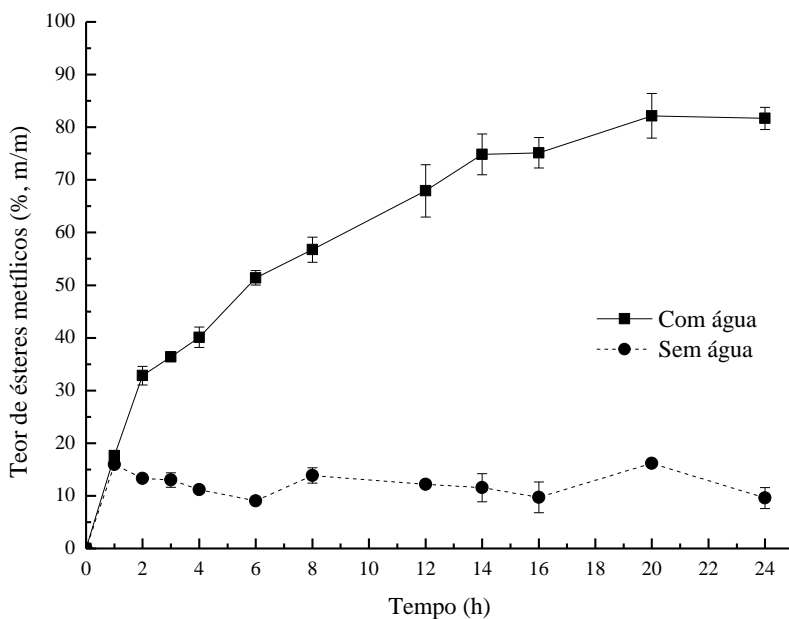
Além de água livre, o caldo ainda contém água ligada, lipase, estabilizantes e conservantes (AGUIEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

4.3 ESTUDOS CINÉTICOS DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

A literatura apresenta poucos trabalhos para a produção enzimática de ésteres de ácidos graxos utilizando lipases em sua forma livre. Há ainda uma discussão em torno das lipases livres, acerca da adição de água nas reações. Diversos trabalhos (PRICE et al., 2016; NIELSEN et al., 2016; FIRDAUS et al., 2016; BUESO et al., 2015; NORDBLAD et al., 2014) tratam a adição de água como necessária para manter a enzima livre

em sua conformação mais ativa ou até mesmo para protegê-la da ação do álcool adicionado. Outros trabalhos (AGUIERAS et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011) citam a água como reagente necessário para a produção de biodiesel, além de ser necessária para manter a enzima livre em sua conformação mais ativa. A Figura 14 apresenta a cinética enzimática na qual é possível observar o comportamento da lipase NS 40116 em reações com e sem a presença de água, a partir da gordura abdominal de frango.

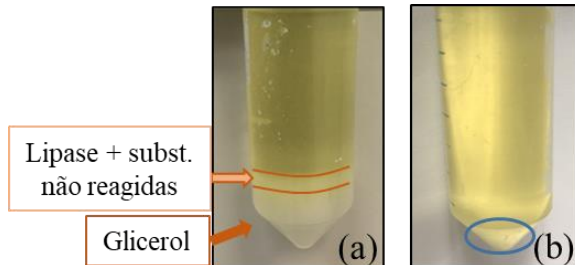
Figura 14 - Cinética enzimática para avaliar o comportamento da lipase NS 40116 na presença ou não de água em reações de transesterificação. Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 1:3 razão molar gordura:metanol à 35 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.



Ao avaliar a Figura 14, observa-se que em uma hora as reações de transesterificação com e sem água conduziram a conversões de 17,61% e 15,93%, respectivamente. Nas reações com a gordura abdominal de frango sem adição de água obteve-se máxima produção de ésteres

metílicos de ácidos graxos de 16% em 20 horas de reação, sendo muito menor em relação aos ensaios com adição de água. Ainda, é possível observar nas reações de transesterificação enzimática da gordura abdominal de frango um aumento gradativo no teor de ésteres metílicos de ácidos graxos, atingindo 82,17% em 20 horas, e ao final de 24 horas obteve-se 81,67% de ésteres metílicos de ácidos graxos e ao realizar a mesma reação com o óleo padrão, o óleo de soja, foi possível obter 96,02% de ésteres metílicos de ácidos graxos. Realizou-se reações com o óleo de soja (óleo padrão) somente no tempo de 24 horas e observou-se o mesmo comportamento da reação utilizando a matéria-prima gordura abdominal de frango, ou seja, maiores conversões com adição de água na reação. A Figura 15 ilustra as reações enzimáticas para a produção de biodiesel a partir de óleo de soja após a centrifugação.

Figura 15 – Reações enzimáticas centrifugadas para produção de ésteres metílicos a partir de óleo de soja, nas condições de 0,3% (m/m) da lipase livre NS 40116, razão molar de 1:3 óleo:metanol, à 35 °C, agitação de 250 rpm em sistema livre de solvente por 24 horas. (a) reação com adição de 2% de água, (b) reação sem adição de água.



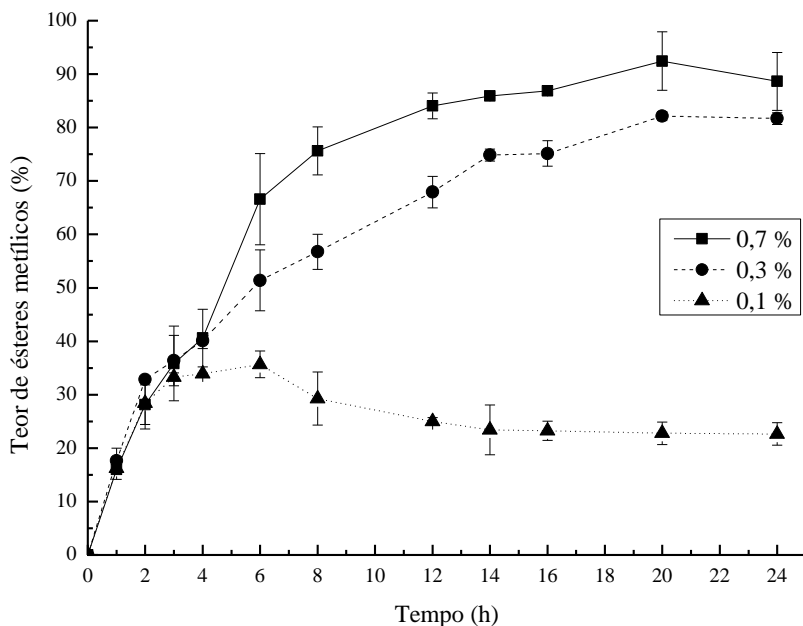
Conforme ilustra a Figura 15 (a) (reação com adição de 2% de água) nota-se a formação da fase de glicerol, fase inferior, após a centrifugação da reação padrão. Ainda pode-se observar um halo acima da fase do glicerol de cor amarelo claro, fase intermediária, na qual encontra-se a lipase, a água e metanol não reagido. Já na Figura 15 (b) (reação sem adição de água) não é possível observar a definição nítida dessas fases, entretanto o que se pode observar uma cor amarela esmaecida ao fundo do tubo falcon que se pode interpretar como o glicerol, a lipase, a água e o metanol.

Segundo Chen; Du; Liu (2008), a concentração de água é um fator importante para a reação de esterificação do ácido oleico utilizando a

lipase livre NS 81020, uma vez que a não adição de água resultou em baixas concentrações de ésteres metílicos. O mesmo foi observado no presente estudo, em que na presença de água a enzima teve sua atividade mantida, ou seja a água manteve a lipase em sua conformação mais ativa e a protegeu da ação do álcool, o quê, em termos de processo é muito importante pois há a possibilidade de se utilizar matérias-primas de baixa qualidade (resíduos) que contenham água e sem a necessidade de um pré-tratamento da matéria-prima.

Como pode ser visto na Figura 16 as concentrações de lipase NS 40116 de 0,7 e 0,3% (m/m) apresentaram valores próximos ao longo do estudo cinético, e seus valores máximos foram atingidos no tempo de 20 horas, 92,45 e 82,16%, respectivamente. A concentração da lipase NS 40116 de 0,1% (m/m) apresentou baixos valores quando comparados com as demais concentrações testadas.

Figura 16 - Cinética enzimática de transesterificação para comparar diferentes concentrações de enzima NS 40116. Condições experimentais de 2% de água (m/m), 1:3 razão molar óleo:metanol à 35 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.

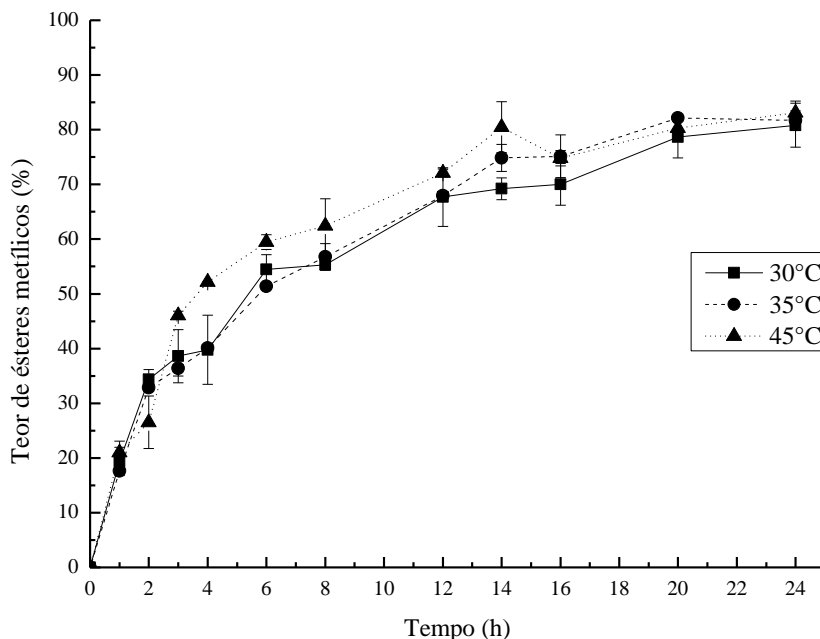


Firdaus; Guo; Fedosov (2016) verificaram que na esterificação enzimática da Callera Trans G (Calt), a velocidade inicial da reação não foi diretamente proporcional à concentração de enzima, apesar de incomum esse fenômeno pode ocorrer em sistemas em que o catalisador e o substrato estão em fases diferentes interagindo somente na interface. Esse fenômeno também pode ser observado no presente trabalho onde os resultados obtidos mostram que a velocidade inicial obtida em 0,3% (m/m) ($16,65 \text{ h}^{-1}$) foi maior do que a velocidade inicial obtida ao se utilizar 0,7% (m/m) ($14,46 \text{ h}^{-1}$). Price et al. (2016) avaliaram a concentração enzimática da lipase NS 40116 (0,061 - 0,2% (m/m)), em planta piloto de 4 m^3 com sistema de batelada alimentada, e encontraram os melhores resultados com 0,1% (m/m) de enzima. Ao aumentar a escala da planta piloto (80 L) observaram que o aumento da vazão de entrada dos reagentes resultou no aumento da velocidade inicial da reação.

Cavalcanti-Oliveira et al. (2011) estudaram a concentração ótima da lipase Lipozyme TL 100L (4 a 8% (m/m)), e concluíram que em concentração baixa (4% de enzima) o sítio ativo da enzima tem mais acesso aos reagentes e em concentrações maiores, essa enzima pode se ligar formando um dímero e como consequência, ocorre a diminuição da atividade.

Após avaliar os resultados ilustrados na Figura 16, os quais demonstram uma diferença de 10,29% no teor de ésteres metílicos entre as concentrações enzimáticas de 0,7 e 0,3%, optou-se por utilizar uma menor quantidade de enzima a fim reduzir custos operacionais e os resíduos gerados. A Figura 17 apresenta a cinética de transesterificação enzimática para avaliar a influência de diferentes temperaturas.

Figura 17 - Cinética enzimática de transesterificação para avaliar diferentes temperaturas). Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% de água (m/m), 1:3 razão molar gordura:metanol, agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.

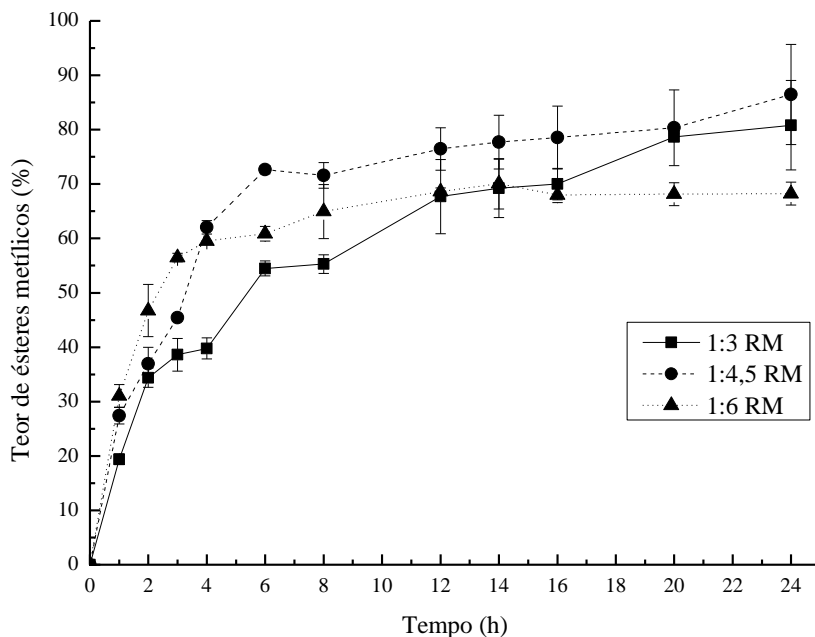


Como pode-se notar por meio da Figura 17, as três temperaturas estudadas, 30, 35 e 45 °C, não conduziram a uma diferença aparente no teor de ésteres metílicos produzidos. Nos tempos de 4, 8 e 14 horas pôde-se observar uma variação de 12,4; 7,13 e 11,25% entre as temperaturas de 30 e 45 °C. Ao final de 24 horas de reação foi possível obter em 30, 35 e 45 °C um teor de ésteres metílicos de 80,82, 81,67 e 83,12%, respectivamente, valores estes que apresentam uma diferença entre si de 2,3%, ou seja, o rendimento final é satisfatório para todas as temperaturas estudadas. Li; Du; Liu (2014) observaram que em reações de metanólise enzimática que utilizaram lipase livre NS 81006 e matérias-primas de baixa qualidade ao elevar a temperatura obteve-se a redução no teor de ésteres metílico.

A redução da temperatura em processos enzimáticos é relevante afim de evitar a perda da atividade enzimática, principalmente quando se há o interesse em reutilizar as enzimas e, é importante salientar a redução de custo com a redução de gastos energéticos. Na cinética enzimática de

transesterificação abaixo (Figura 18) foi avaliado o teor em ésteres metílicos produzidos em diferentes razões molares gordura:metanol.

Figura 18 - Cinética enzimática de transesterificação para comparar diferentes razões molares gordura: metanol (1:3, 1:4,5 e 1:6). Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% de água (m/m), à 30 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.



Conforme a Figura 18 pode-se verificar que, a partir de 6 horas, as reações com as razões molares de 1:4,5 e 1:6 gordura:metanol apresentaram uma tendência à estabilidade, conduzindo a valores acima de 70 e 60% de teor de ésteres metílicos, respectivamente. Após 24 horas, as reações com as razões molares de 1:3; 1:4,5 e 1:6 gordura:metanol proporcionaram 80,82, 86,47 e 68,24% de ésteres metílicos produzidos. O excesso de metanol mostrou-se necessário para a obtenção de elevados teores de ésteres metílicos visando o deslocamento do equilíbrio químico na direção dos produtos. Entretanto, ao utilizar a razão molar de 1:6 notou-se o efeito inibitório do álcool na atividade enzimática, obtendo-se

rendimentos finais inferiores quando comparado com as outras razões molares estudadas.

Nordblad et al. (2014) investigaram a influência do aumento da concentração do metanol na atividade enzimática, e observaram que altas concentrações do álcool beneficiam a velocidade inicial da reação, entretanto após algumas horas de reação há uma redução no teor de ésteres metílicos devido à perda da atividade enzimática. Li et al. (2015) confirmaram, na reação de metanólise, o efeito inibitório do álcool, ao analisar a constante de inibição do metanol sobre a atividade da lipase livre NS 81006.

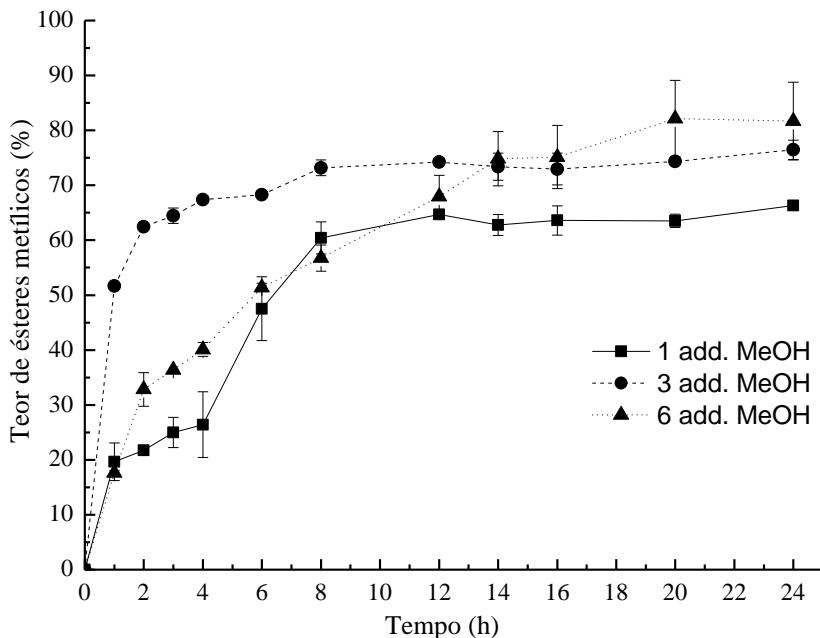
Chen, Du e Liu (2008) avaliaram diferentes concentrações de metanol na reação de esterificação utilizando a lipase livre NS 81020, e verificaram que altas concentrações de metanol aumentam o teor de ésteres metílicos, entretanto optaram por uma menor concentração devido ao seu efeito tóxico acumulativo sobre a atividade enzimática.

A Figura 19 apresenta o comparativo de diferentes adições fracionadas do metanol. Por meio desta figura é possível observar o efeito inibitório do metanol sobre a atividade enzimática, a adição do álcool em uma única vez resultou em uma redução de 10,16 e 15,38% no teor de ésteres metílicos ao comparar com 3 adições e 6 adições fracionadas do metanol, respectivamente.

Conforme observado na Figura 19, ao final de 24 horas de reação, foi possível obter em 3 adições fracionadas do metanol, 76,45% de conversão, e em 6 adições fracionadas do metanol, 81,65% de ésteres metílicos. A adição fracionada do álcool em três vezes mostra-se estável a partir de 8 horas de reação, contrário ao que se observa em 6 adições fracionadas, no qual essa estabilidade somente é alcançada em 20 horas.

Shimada et al. (2002) observaram que a adição do metanol em uma única vez causou a perda da atividade enzimática observada através da redução de ésteres metílicos, justificada pela baixa solubilidade do metanol em óleo que permite o contato direto entre o álcool e a lipase que é instável em sua presença; ao contrário do que ocorre nas adições fracionadas do álcool, onde a solubilidade do metanol é alta em meios na presença de ésteres metílicos.

Figura 19 - Cinética enzimática de transesterificação para comparar adições fracionadas de metanol (1, 3 e 6 adições) durante as 6 primeiras horas. Condições experimentais de 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% de água (m/m), 1:4,5 razão molar gordura:metanol à 30 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.



Nielsen et al. (2016) e Cesarini; Diaz; Nielsen (2013) observaram que o álcool metanol causou redução da atividade enzimática da lipase livre e utilizaram adições fracionadas de metanol afim de evitar sua inativação. Firdaus et al. (2016) utilizaram a modelagem matemática para analisar diferentes adições fracionadas de metanol e concluíram que estas adições podem ser feitas de diversas maneiras e em variados tempos desde que não haja um acúmulo de metanol no sistema reacional de 3 molar, pois nesta condição pode causar a inativação da lipase livre.

Desse modo, as condições definidas de transesterificação catalisada pela lipase NS 40116 a partir da gordura abdominal de frango foram: 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 2% (m/m) de água, razão molar de 1:4,5 gordura:metanol, temperatura de 30 °C, e agitação de 250 rpm (Figura 19).

4.4 OTIMIZAÇÃO DA TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO ETANOL COMO SUBSTRATO

Após verificar a viabilidade técnica da utilização da lipase NS 40116 nos estudos cinéticos de transesterificação via rota metálica tornou-se relevante estudar o processo utilizando o etanol buscando um processo mais limpo, e apesar do etanol ser menos reativo ele é menos agressivo à estrutura da lipase, visto que a lipase não possui um suporte para protegê-la.

Realizou-se um planejamento de experimentos utilizando o modelo proposto por Plackett-Burman, com 12 ensaios, com triplicata do ponto central, para avaliar o efeito das variáveis: temperatura, razão molar gordura para etanol, razão molar gordura para água, concentração enzimática e agitação na produção enzimática de éster etílico, tendo como catalisador a enzima livre NS 40116. A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento de experimentos com valores reais e codificados e as respostas em termos de teor de ésteres etílicos (% m/m).

Ao observar a Tabela 11 notou-se que os maiores teores de ésteres etílicos de ácidos graxos foi obtido no experimento 8 (73 %) e no experimento 9 (66 %) quando utilizou a menor temperatura (35 °C) e razão molar gordura para etanol (1:3) adicionados em três frações iguais nas três primeiras horas e a maior concentração enzimática (0,5 %) e agitação (250 rpm), diferenciando somente na razão molar gordura:água. Em contrapartida, o experimento 7 contido na Tabela 11 também apresentou uma alta resposta em teor de ésteres etílicos (62%) utilizando a maior razão molar gordura para etanol estudada (1:6), e ao comparar com experimento 8, ambos empregaram a maior razão molar de gordura para água estudada (1:1.5). O etanol é responsável por remover a água presente no sítio ativo da lipase por sua polaridade, por sua vez, uma maior adição de água na reação aumenta a mobilidade e a flexibilidade do sítio ativo da lipase e, simultaneamente, a polarização de sua estrutura proteica (LIMA; ANGNES, 1999). A água presente no meio ainda protege a lipase, uma vez que se ligará primeiro com o etanol (FU; VASUDEVAN, 2009).

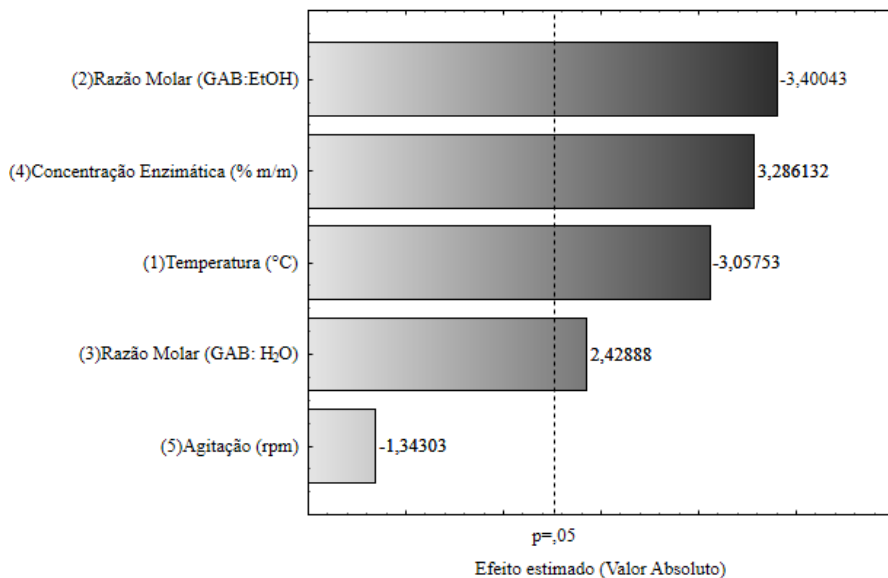
Tabela 11 - Matriz do planejamento Plackett-Burman (valores reais e codificados) para a produção de ésteres etílicos (% m/m).

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar (G:EtOH) ^a	Razão molar (G:H ₂ O) ^b	Concentração enzimática (%)	Agitação (rpm)	Teor de ésteres etílicos (% m/m)
1	1(55)	-1(1:3)	1(1:1,5)	-1(0,1)	-1(150)	50
2	1(55)	1(1:6)	-1(1:0,5)	1(0,5)	-1(150)	31
3	-1(35)	1(1:6)	1(1:1,5)	-1(0,1)	1(250)	30
4	1(55)	-1(1:3)	1(1:1,5)	1(0,5)	-1(150)	58
5	1(55)	1(1:6)	-1(1:0,5)	1(0,5)	1(250)	16
6	1(55)	1(1:6)	1(1:1,5)	-1(0,1)	1(250)	18
7	-1(35)	1(1:6)	1(1:1,5)	1(0,5)	-1(150)	62
8	-1(35)	-1(1:3)	1(1:1,5)	1(0,5)	1(250)	73
9	-1(35)	-1(1:3)	-1(1:0,5)	1(0,5)	1(250)	66
10	1(55)	-1(1:3)	-1(1:0,5)	-1(0,1)	1(250)	22
11	-1(35)	1(1:6)	-1(1:0,5)	-1(0,1)	-1(150)	32
12	-1(35)	-1(1:3)	-1(1:0,5)	-1(0,1)	-1(150)	39
13	0(45)	0(1:4,5)	0(1:1)	0(0,3)	0(200)	57
14	0(45)	0(1:4,5)	0(1:1)	0(0,3)	0(200)	59
15	0(45)	0(1:4,5)	0(1:1)	0(0,3)	0(200)	58

^aRazão molar gordura para etanol. ^bRazão molar gordura para água

Os experimentos que mais produziram ésteres etílicos (experimento 7, 8 e 9) foram aqueles que utilizaram uma menor temperatura (35°C). Andrade; Errico; Christensen (2017) observaram que temperaturas acima de 35°C para a lipase livre Eversa® Transform provocou a desnaturação térmica da enzima. As reações enzimáticas utilizando lipase livre possuem menor resistência térmica quando comparada com enzimas imobilizadas (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). Foi possível observar uma boa reprodutibilidade através da triplicata do ponto central com o teor de ésteres etílicos próximos a 58%. Os dados da Tabela 11 foram tratados estatisticamente, e de acordo com o gráfico de Pareto (Figura 20) observa-se que as variáveis temperatura e razão molar gordura para etanol (1:3) apresentaram um efeito significativo negativo, e as variáveis concentração enzimática e razão molar gordura para água apresentaram um efeito significativo positivo, ou seja, estas variáveis interferiram na obtenção do teor de ésteres final. Enquanto que a variável agitação apresentou um efeito negativo porém não significativo ($p < 0,05$) sobre o teor de ésteres etílicos.

Figura 20 - Diagrama de Pareto para a produção de ésteres etílicos utilizando o resíduo GAB e a lipase livre NS 40116, em diferentes temperaturas (35-55 °C), razão molar gordura:etanol (1:3-1:6), razão molar gordura:água (1:0,5-1:1,5), concentração enzimática (0,1-0,5 % (m/m)) e agitação (150-250 rpm).



Levando em consideração os resultados obtidos pelo Plackett-Burman para a produção de ésteres etílicos utilizando o resíduo GAB e a lipase livre NS 40116 foi realizado um delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² (Tabela 12), avaliando o efeito da temperatura e da razão molar gordura para água. Os outros efeitos significativos foram desconsiderados devido à impossibilidade de redução da razão molar gordura para etanol e por não ser interessante em termos de processo o aumento da concentração enzimática. Tendo como parâmetros fixos a concentração enzimática (0,5%(m/m)) da lipase livre NS 40116), razão molar de gordura para etanol (1:3) e agitação (150 rpm).

Através da matriz do DCCR 2² foi possível observar que os maiores teores de ésteres etílicos foram obtidos ao utilizar a maior razão molar gordura para água (ensaios 5, 6, 7 e 8) em diferentes faixas de temperatura estudada (45 e 25°C). E o menor teor de ésteres etílicos (37,63 %) foi obtido ao utilizar a menor razão molar gordura para água (1:3,09) na temperatura de 35°C.

A partir da ANOVA foi possível obter um alto valor de r^2 (0,95) com 90% de confiança, ou seja 90% das variâncias no teor de ésteres metílicos podem ser explicadas a partir do modelo quadrático, demonstrando o bom ajuste do modelo aos dados experimentais o que demonstra confiabilidade no modelo empírico obtido. Ainda através da ANOVA foi possível obter um grau de liberdade de 14 e um $F_{\text{calculado}}$ (41,957) 12 vezes maior que o F_{tabelado} (3,48), confirmando que a Equação 7 representa o modelo.

Tabela 12 - Matriz do planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 (valores reais e codificados) para a produção de ésteres etílicos (% m/m). Condições experimentais de 0,5%(m/m) da lipase livre NS 40116, razão molar de 1:3 gordura para etanol e 150 rpm.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar (G:H ₂ O) ^a	Teor de ésteres etílicos (%)	Teor predito (%) ^b	Erro relativo ^c (%)
1	-1 (25)	-1 (1:3,5)	48,00	45,23	5,77
2	-1 (25)	-1 (1:3,5)	47,00	45,23	3,76
3	1 (45)	-1 (1:3,5)	50,00	50,95	-1,90
4	1 (45)	-1 (1:3,5)	54,00	50,95	5,65
5	-1 (25)	1 (1:5,5)	71,00	68,37	3,70
6	-1 (25)	1 (1:5,5)	69,00	68,37	0,91
7	1 (45)	1 (1:5,5)	69,00	69,09	-0,13
8	1 (45)	1 (1:5,5)	70,00	69,09	1,30
9	-1,41 (20,9)	0 (1:4,5)	58,00	62,40	-7,59
10	1,41 (49,1)	0 (1:4,5)	66,00	66,94	-1,42
11	0 (35)	-1,41 (1:3,09)	34,00	37,63	-10,69
12	0 (35)	1,41 (1:5,9)	65,00	66,73	-2,67
13	0 (35)	0 (1:4,5)	63,00	61,31	2,68
14	0 (35)	0 (1:4,5)	60,00	61,31	-2,18
15	0 (35)	0 (1:4,5)	61,00	61,31	-0,51

^a Razão molar gordura para água. ^b Calculado de acordo com a Equação 8.

^c Desvio Relativo ao Erro - RED = $\left(\frac{C_{exp} - C_{pred}}{C_{exp}} \right) \times 100$

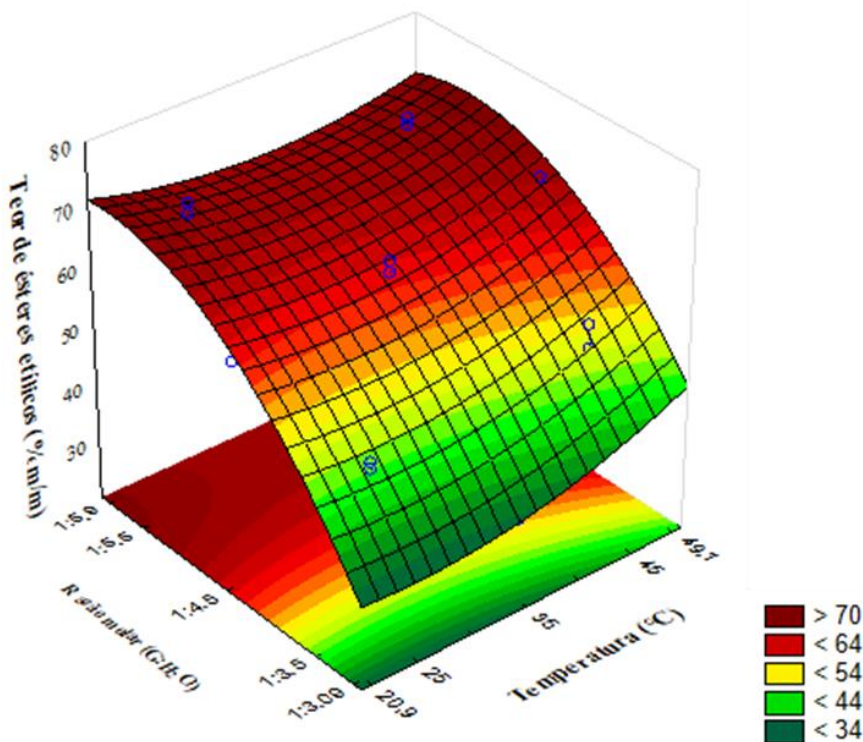
O modelo de regressão quadrática apresentado pela Equação 7 corresponde ao teor de ésteres etílicos (Y) em função da temperatura (T), razão molar gordura:água (W).

$$Y = 61,31 + 161 * T + 1,69 * T^2 + 10,32 * W - 4,59 * W^2 - 1,25 * T * W$$

(Equação 7)

A partir do modelo proposto foi possível representar a superfície de resposta (Figura 21), que possibilita a visualização das condições experimentais que maximizam as respostas.

Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta - Efeito da razão molar gordura:água e temperatura em função do teor de ésteres etílicos (% m/m) para reação de transesterificação da gordura abdominal de frango.

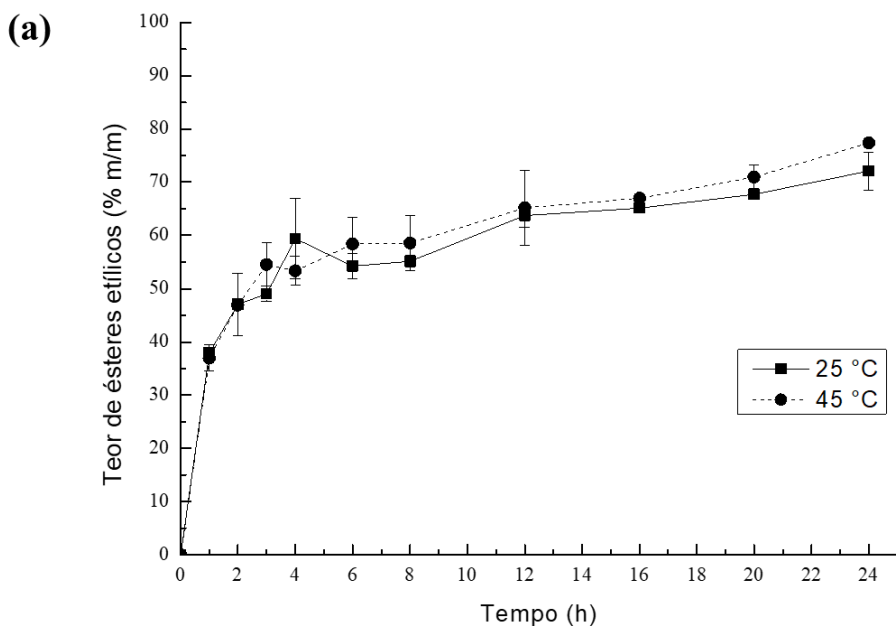


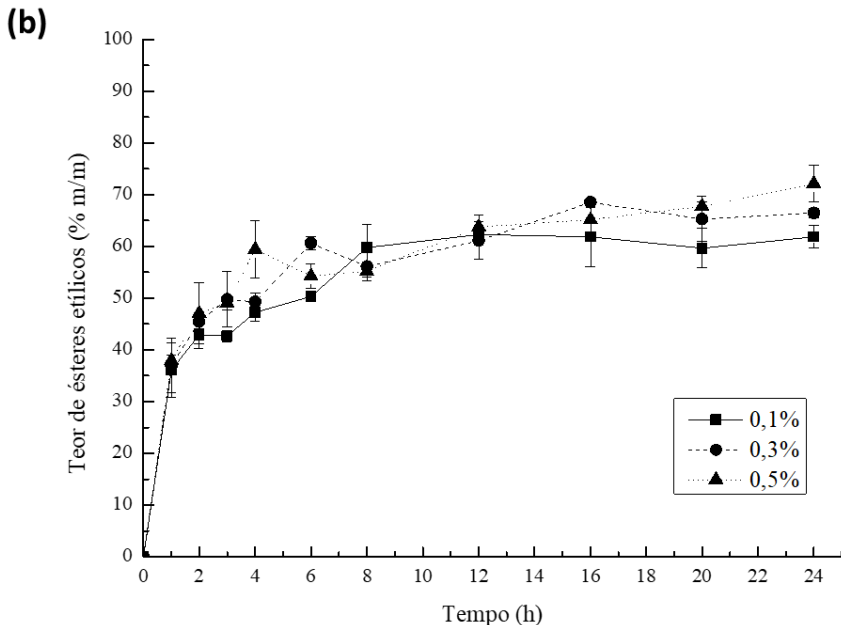
Através da Figura 21 é possível visualizar que na razão molar de 1:5,5 gordura para água obteve o maior teor de ésteres etílicos produzidos

(acima de 70%), independente da faixa de temperatura estudada. Em menores razões molares de gordura para água obteve-se teores de ésteres etílicos abaixo de 64 %, e ao se trabalhar na menor razão molar de gordura para água associado à temperaturas até 35°C menores faixas de temperatura obteve-se teores de ésteres etílicos abaixo de 34%. Andrade; Errico; Christensen (2017) observaram, por meio de superfície de resposta, que em reações de transesterificação o teor de água apresentou um impacto positivo no teor de ésteres de ácidos graxos finais.

Para a verificação do modelo realizou-se um estudo cinético de 24 horas (Figura 22), e a condição otimizada (0,5 % da lipase livre NS 40116 (m/m em relação ao substrato), razão molar de 1:5.5 gordura:água, razão molar de 1:3 gordura para etanol e 150 rpm) (a) em diferentes temperaturas (25 e 45 °C) e (b) diferentes concentrações enzimáticas (0,1, 0,3 e 0,5%).

Figura 22 - Estudo cinético da reação de transesterificação enzimática. Condições experimentais: razão molar de 1:5,5 gordura para água, razão molar de 1:3 gordura para etanol e agitação de 150 rpm (a) diferentes temperaturas, (b) diferentes concentrações enzimáticas.





De acordo com a Figura 22 (a) nota-se que as temperaturas de 25 e 45 °C obtiveram teores de ésteres etílicos semelhantes durante toda cinética, em 24 horas na temperatura de 25 e 45 °C obteve 72,09 e 77,36 % (m/m) de ésteres etílicos produzidos, respectivamente. A maior variação encontrada entre as temperaturas estudadas foi no tempo de 3 horas (5,5%). Como foi observada uma pequena diferença no teor final de ésteres (5,27% (m/m)), optou-se pela menor temperatura (25 °C) para a continuação dos trabalhos reduzindo o gasto energético. Na Figura 22 (b) é possível observar que as concentrações enzimáticas 0,1, 0,3 e 0,5% apresentaram 61,83, 66,41 e 72,09% de ésteres etílicos, respectivamente, ao final de 24 horas, confirmando o gráfico de Pareto onde a concentração enzimática apresentou um efeito significativo positivo.

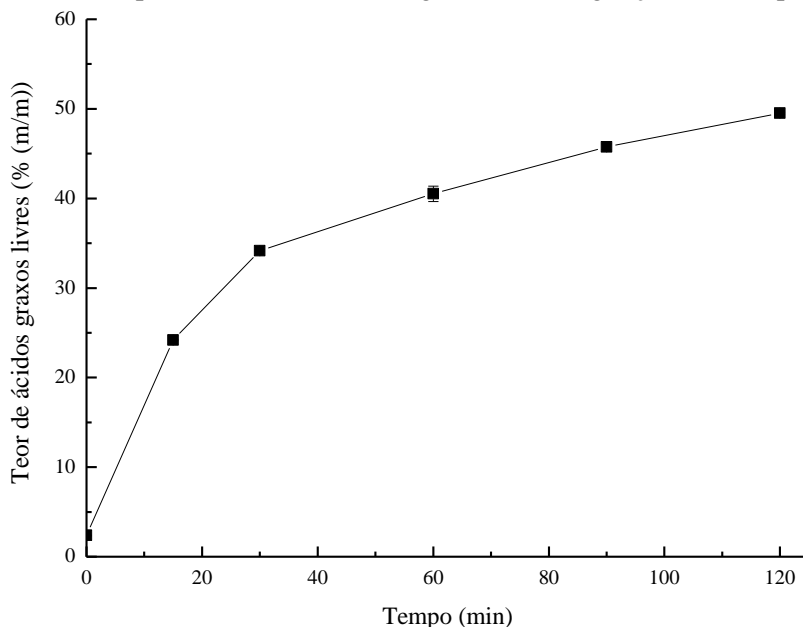
4.5 HIDRÓLISE DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO CATALISADA PELA LIPASE NS 40116

Com o objetivo de avaliar previamente o desempenho da lipase livre NS 40116 nas reações de hidroesterificação foi realizada uma cinética de hidrólise da gordura abdominal de frango catalisada pela

lipase livre NS 40116, uma vez que a presença de ácidos graxos livres está ligada diretamente ao teor de ésteres de ácidos graxos liberados. Empregou-se, nesta etapa, o teor de água em excesso (4%) foi para garantir o deslocamento químico no sentido dos produtos. Os resultados estão apresentados na Figura 23, expressos em teor de AGL (% , m/m).

De acordo com a Figura 23 observa-se que em 15 minutos de reação foi possível obter 24,18% (m/m) de AGL. Após noventa minutos observou-se um aumento de 16,34% (m/m) no teor de AGL (45,76% m/m AGL), e ao final de duas horas obteve-se 49,51% (m/m) de AGL.

Figura 23 – Cinética de hidrólise da gordura abdominal de frango catalisada pela lipase NS 40116. Condições experimentais: 0,3% (m/m) de lipase NS 40116, 4% de água, à 35 °C; agitação de 250 rpm.



Portanto, para as reações de hidroesterificação definiu-se o tempo de hidrólise em duas horas por observar a máxima obtenção de ácidos graxo livres. Zenevicz (2015) observou a partir de cinéticas de hidrólise que duas horas de reação era o tempo necessário para a obtenção máxima de ácidos graxos livres. Li; Du; Liu (2014) definiram o tempo de duas horas para a reação de hidrólise, como o tempo necessário para contribuir para o melhor desempenho catalítico da lipase NS81006 na etapa de

esterificação, mesmo observando que a obtenção máxima de ácidos graxos livres aconteceu em oito horas. Cesarini; Diaz; Nielsen (2013) observaram que a hidrólise catalisada pela lipase livre “Callera Trans L” do óleo de soja bruto acontece nas três primeiras horas, e obtiveram uma acidez de aproximadamente 16 e 27% ao utilizar 3 e 15 % de água, respectivamente.

4.6 HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O METANOL

A reação de hidroesterificação é um processo que utiliza matérias-primas de elevada acidez e umidade, ou seja, matérias-primas residuais, sendo alternativo ao processo de transesterificação para a produção do biodiesel (KABBASHI et al., 2015). Para aumentar a eficiência foi necessário conhecer o comportamento da lipase como catalisador nas reações de hidroesterificação e que utilizam como substratos o resíduo de gordura de frango e o metanol, uma vez que o aumento do teor de ésteres de ácidos graxos depende do aumento da área interfacial que pode ser conseguida com a adição de água, mas em excesso ela pode causar a reação de hidrólise diminuindo o teor de ésteres na esterificação (GOG et al., 2012). A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento completo 2² com valores reais e codificados e as respostas em termos de teor de ésteres metílicos, em 6 horas de reação.

A partir da Tabela 13 observou-se que os experimentos 1 e 3 juntamente com suas duplicatas obtiveram os maiores teores de ésteres metílicos, 70 e 68% respectivamente, tendo em comum a variável razão molar gordura para metanol (1:3). Os menores teores de ésteres obtidos experimentalmente diferenciaram dos maiores teores ao utilizar a maior razão molar gordura para metanol (1:5).

Razões molares de gordura para metanol maiores que 1:3 podem reduzir a atividade enzimática uma vez que o metanol é um solvente hidrofílico (Log P = -0,70) e, conseqüentemente, tende a permanecer na camada de água em torno da lipase e com alto poder desidratante. Pollardo et al. (2018) observaram que solventes polares em alta concentração possuem um efeito inibitório sobre a enzima (LogP<0), limitando a concentração do solvente ao redor da lipase, por exemplo o metanol.

Tabela 13 - Matriz do planejamento fatorial completo 2² (DCC) com ensaios em duplicata e triplicata do ponto central da reação de hidroesterificação (valores reais e codificados) com as respostas em termos de teor de ésteres metílicos. Condições experimentais: Concentração enzimática de 0,3% (m/m em relação ao substrato) da lipase livre NS 40116, o metanol foi adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas, à 30 °C e agitação de 250 rpm, com tempo reacional de 2 h de hidrólise e 4 horas de esterificação.

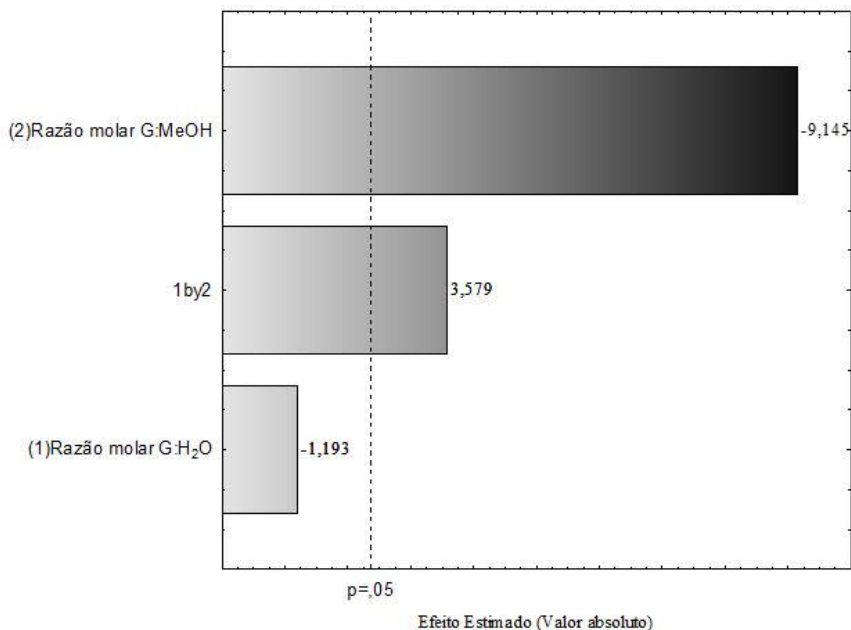
Ensaio	Razão molar (G:H ₂ O) ^a	Razão molar (G:MeOH) ^b	Teor de ésteres metílicos (m/m %)	Teor predito ^c (%)	Erro relativo ^d (%)
1	-1 (1:2,5)	-1 (1:3)	70	70,46	-0,66
2	-1 (1:2,5)	-1 (1:3)	71	70,46	0,76
3	1 (1:4,5)	-1 (1:3)	68	67,48	0,76
4	1 (1:4,5)	-1 (1:3)	67	67,48	-0,72
5	-1 (1:2,5)	1 (1:5)	63	62,48	0,82
6	-1 (1:2,5)	1 (1:5)	62	62,48	-0,77
7	1 (1:4,5)	1 (1:5)	65	63,98	1,57
8	1 (1:4,5)	1 (1:5)	63	63,98	-1,56
9	0 (1:3)	0 (1:4)	65	66,1	-1,69
10	0 (1:3)	0 (1:4)	67	66,1	1,34
11	0 (1:3)	0 (1:4)	66	66,1	-0,15

^a Razão molar gordura para água. ^b Razão molar gordura para metanol. ^c Calculado de acordo com a equação 10. ^d

$$\text{Desvio Relativo ao Erro} - RED = \left(\frac{C_{exp} - C_{pred}}{C_{exp}} \right) \times 100$$

Os maiores teores de ésteres metílicos foram obtidos ao utilizar a menor razão molar gordura para metanol, esta apresentou-se significativa negativa, mas sua interação com o fator razão molar gordura para água mostrou-se significativa positiva. Em reação de hidroesterificação a variável razão molar gordura para água não apresentou diferença significativa (Figura 4). Lv et al. (2017) observaram que ao utilizar diferentes concentrações de água (3-10%), as cinéticas não apresentaram diferenças aparentes no teor de ésteres metílicos final.

Figura 24 - Diagrama de Pareto para a produção de ésteres metílicos utilizando o resíduo GAB e a lipase livre NS 40116 em diferentes razões molares gordura: água (1:2.5-1:4.5) e em diferentes razões molares gordura: metanol (1:3-1:5).



Segundo a análise de variância (ANOVA) (Tabela 14), o valor F do modelo de regressão ($F_{\text{Calculado}} = 32,62$) foi maior que o valor F_{tabelado} (3,34) indicando que as diferenças de tratamento são significativas, o que

confirma que a regressão estabelecida representa adequadamente os dados observados. A análise de variância para o modelo linear apresentou um coeficiente de determinação r^2 de 0,95, com 95% de confiança, ou seja 95% das variâncias no teor de ésteres metílicos podem ser explicadas a partir do modelo linear, demonstrando o bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

Tabela 14 - Análise de Variância (ANOVA) para modelo matemático linear que descreve a produção de ésteres metílicos.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	77,37	3	25,79	32,62
Resíduo	5,53	7	0,79	
Total	82,90	10		

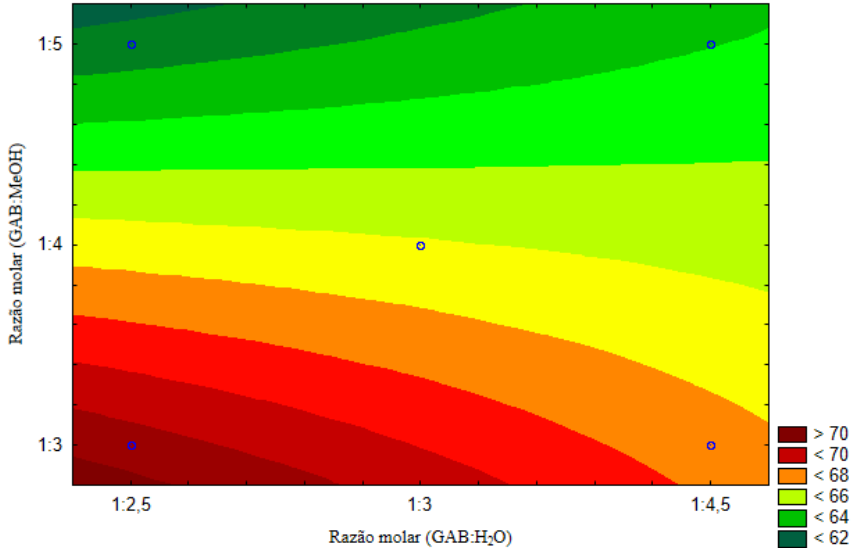
$$R^2 = 0,95 \quad F_{\text{tabelado}}(0,95; 3 \text{ e } 7) = 4,34$$

O modelo de regressão linear apresentado pela Equação 8 corresponde ao teor de ésteres metílicos (X) em função da razão molar gordura:água (W) e da razão molar gordura:metanol (M).

$$X = 66,1 - 0,37 * W - 2,87 * M + 1,12 * W * M \quad (\text{Equação 8})$$

O modelo representado pela Equação 8 gerou o gráfico de contorno que avaliou o efeito da razão molar de gordura para metanol e razão molar de gordura para água com resposta em teor de ésteres metílicos, mostrado na Figura 25.

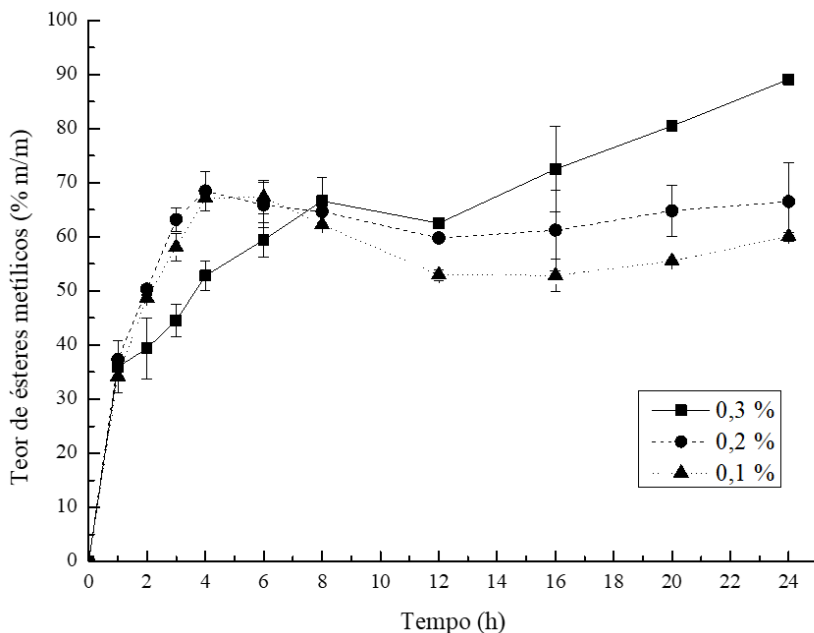
Figura 25 - Curva de contorno - Efeito da razão molar gordura:metanol e razão molar gordura:água para a produção de ésteres metílicos (% m/m) a partir da gordura abdominal de frango, em temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.



A Figura 25 mostra que as maiores respostas em teor de ésteres metílicos (acima de 70%) foram alcançados ao utilizar a menor razão molar gordura para metanol estudada (1:3) e a menor razão molar gordura para água (1:2.5). Nas maiores faixas estudadas de razão molar gordura para metanol (1:4 e 1:5) obteve-se um teor de ésteres metílicos menor que 67%, independente da razão molar gordura para água estudada.

Para a verificação do modelo realizou-se um estudo cinético (Figura 26), e a condição otimizada (0,3% da lipase livre NS 40116 (m/m), razão molar de 1:2,5 gordura:água, razão molar de 1:3 gordura:metanol adicionados em três frações iguais durante as três primeiras horas, 30 °C à 250 rpm) obtida por meio do modelo está inserida no estudo cinético (Figura 26).

Figura 26 - Estudo cinético de hidroesterificação enzimática em diferentes concentrações enzimáticas. Condições experimentais: razão molar de 1:2,5 gordura para água, razão molar de 1:3 gordura para metanol, 30 °C, 250 rpm, em sistema livre de solvente.



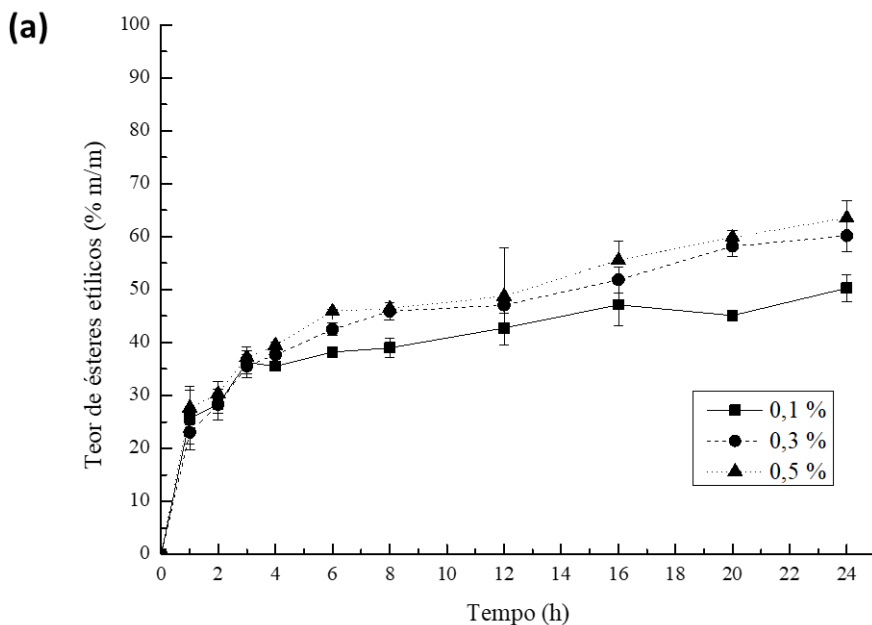
De acordo com a Figura 26 nota-se que ao final de 24 horas a concentração enzimática de 0,3% apresentou o maior teor de ésteres metílicos (89,04%) utilizando a menor razão molar gordura:metanol (1:3) e a menor razão molar gordura:água (1:2,5). As concentrações de 0,1 e 0,2% não apresentaram um alto teor de ésteres metílicos quando comparado com 0,3%, tendo uma diferença de 22,59 e 28,98%, respectivamente, em 24 horas.

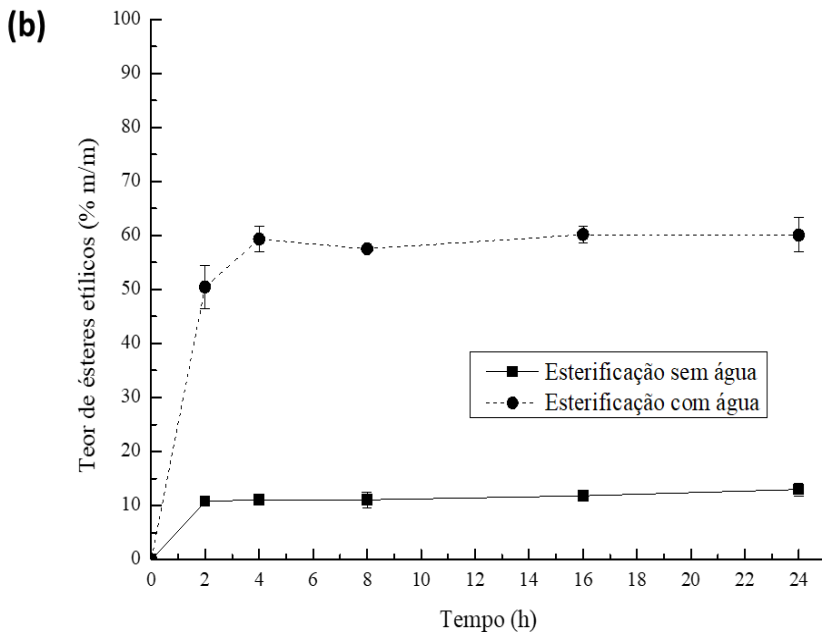
4.7 ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO O ETANOL COMO SUBTRATO

Para verificar a produção de ésteres etílicos via reação de hidroesterificação baseado no estudo das variáveis de processo via reação de transesterificação realizou-se cinéticas com diferentes concentrações enzimáticas (Figura 27 (a)). E para avaliar sobre o uso do hidrolisado

enzimático da gordura abdominal de frango, sem a presença do glicerol, realizou-se cinéticas na etapa de esterificação com/sem adição de água no meio reacional (Figura 27 (b)).

Figura 27 - Hidroesterificação utilizando etanol como substrato. Condições experimentais: razão molar de 1:5,5 (m/m de gordura) gordura para água razão molar gordura para etanol de 1:3 (m/m de gordura) adicionado em três frações iguais durante as três primeiras horas, 25 °C, 150 rpm.(a) diferentes concentrações enzimática (0,1-0,5% (m/m)) (b)Reação de esterificação com/sem a adição de água (água quando adicionada, razão molar de 1:5,5 (m/m de gordura) gordura: água).





Observando o estudo cinético (Figura 27(a)) nas três primeiras horas os teores de ésteres etílicos obtidos foram semelhantes nas diferentes concentrações enzimáticas estudadas. Em 24 horas notou-se um teor de ésteres etílicos de 63,50% ao utilizar 0,5% da lipase livre NS 40116. Ao comparar com a concentração enzimática de 0,3% de lipase livre NS 40116 obteve-se uma diferença de 3,35%. Enquanto que em 24 horas a concentração enzimática de 0,1% de lipase livre NS 40116 conduziu à 50,26% de ésteres etílicos.

A Figura 27(b) mostra a influência da adição de água no segundo passo da reação de hidroesterificação utilizando a concentração enzimática de 0,5% (m/m) da lipase livre NS40116. E foi possível observar que o teor máximo de ésteres foi alcançado em 4 horas (59,13%) e ao comparar com a Figura 27(a) que em 4 horas produziu 39,46% de ésteres etílicos e, somente alcançou o teor máximo em 24 horas ((63,50%), valor próximo ao encontrado na cinética 27(b)).

Pode-se notar que o produto da hidrólise, o glicerol, não interferiu no teor de ésteres etílicos final, entretanto foi possível atingir o máximo de ésteres etílicos produzidos em menor tempo de reação, ao retirar o glicerol para o passo de esterificação. Quando não adicionou água na

reação de esterificação notou-se a inatividade da lipase, produzindo menos de 12% de ésteres etílicos em 24 horas.

4.8 RESUMO GERAL DOS RESULTADOS

O presente estudo investigou o sistema de produção de ésteres de ácidos graxos utilizando como substratos de reação o resíduo de gordura de frango e de álcoois de cadeia curta, metanol e etanol, e como catalisador a lipase livre NS40116. A partir dos resultados foi possível direcionar a GAB como substrato para produção de biodiesel com uma possível aplicação custo-efetiva, reduzindo os custos do processo enzimático. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos no presente estudo para as reações de transesterificação e hidroesterificação da GAB e sob diferentes condições de reação.

Tabela 15 - Resumo geral dos resultados obtidos nas reações de transesterificação e hidroesterificação em 24 horas.

Reação	Substrato	Teor de ésteres de ácidos graxos (% m/m)	Referência
Transesterificação	Metanol	76,45	Figura 19
	Etanol	72,09	Figura 22b
Hidroesterificação	Metanol	89,04	Figura 26
	Etanol	63,50	Figura 27a

Ao comparar as reações de transesterificação e hidroesterificação que utilizaram o metanol como substrato, a reação de hidroesterificação mostrou ser a reação mais eficiente estudada, pois em 24 horas foi possível obter 89,04% na condição experimental de 0,3% em peso de lipase NS 40116 usando a menor razão molar de GAB para metanol (1: 3) e a menor razão molar de GAB para água (1: 2,5) (Tabela 4). A estratégia de adição de metanol apenas na segunda etapa da reação e em três frações iguais apresentou as vantagens de maior solubilidade do álcool aos ácidos graxos gerados na hidrólise (Aranda et al., 2008) e de minimizar o poder do álcool de inativar ou desnaturar a lipase NS 40116, uma vez que este distorce a estrutura da lipase, por ser muito hidrofílica (Laane et al., 1987).

Ao estudar as reações com etanol, a reação de transesterificação teve maior teor de éster (72,09%) do que a reação de hidroesterificação

(63,50%). Vale ressaltar que na reação de hidroesterificação a etapa de hidrólise obteve 49,51% de ácidos graxos livres, ou seja, menor disponibilidade do reagente da reação de esterificação mais o fator que o etanol é um álcool menos reativo. O excesso de água na etapa de esterificação (água não reagida da etapa de hidrólise e água gerada a partir da etapa de esterificação) pode ter causado reação reversa, hidrólise, reduzindo o teor de ésteres etílicos produzidos (Nasaruddin et al., 2014).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A matéria-prima residual, gordura abdominal de frango, demonstrou aplicabilidade no processo de produção de ésteres de ácidos graxos sem a necessidade de pré-tratamento. Associado a esse fato, o uso de uma enzima de baixo custo, a lipase livre NS40116, mostrou-se versátil pois apresentou respostas satisfatórias quando aplicada nos processos industriais com potencial utilização em reações de transesterificação e hidroesterificação empregando os álcoois metanol e etanol. O processo de hidroesterificação utilizando o álcool metanol mostrou-se mais eficiente em termos de ésteres de ácidos graxos quando o processo envolve o biocatalisador NS40116 e a presença da água mostra-se necessária para a manutenção da atividade do biocatalisador. Nas condições experimentais de 0,3% (m/m) de NS 40116, utilizando a menor razão molar gordura:metanol (1:3) e a menor razão molar gordura:água (1:2,5), à 30 °C e agitação de 250 rpm foi possível obter o máximo teor de ésteres metílicos (89,04%) em 24 horas.

De forma geral, a produção enzimática de ésteres metílicos e etílicos utilizando o resíduo de gordura abdominal de frango e a lipase livre NS40116 mostra ser um processo sustentável, com condições brandas de processo e com grande potencial para ser aplicado nas indústrias de biodiesel, sendo esta uma boa opção para a valorização do resíduo na indústria avícola.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser traçadas:

- Estudo da reação de esterificação com adição de carga ácida ao hidrolisado.
- Avaliar a recuperação da lipase livre NS 40116, através do teste de diferentes formas de recuperação (decantação, centrifugação) afim de avaliar a mais eficiente na aplicação do reuso da lipase.
- Avaliar a qualidade dos ésteres de ácidos graxos produzidos.
- Avaliar a viabilidade econômica dos processos de transesterificação e hidroesterificação em escala piloto utilizando a lipase livre NS40116.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, n. 3, p. 233-271, 2007.

AGUIEIRAS, E. C. G.; OLIVEIRA, E. D. C. FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67, 2015.
doi:10.1016/j.fuel.2015.06.064

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysis. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

ANASTOPOULOS, G. et al. A preliminary evaluation of esters of monocarboxylic fatty acid on the lubrication properties of diesel fuel. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 40, p. 452-456, 2001.

ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Transesterification of Castor Oil Catalyzed by Liquid Enzymes: Optimization of Reaction Conditions. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 40, p. 2863-2868, 2017.

ARANDA, D. A. G.; SILVA, C. C. M.; DETONI, C. Current process in brazilian biodiesel production. **International Review of Chemical Engineering**, v. 1, n. 6, 2009.

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

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

BONOLI, M. et al. Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1327–1337, 2007.

BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis - ANP. Boletim mensal do biodiesel ano de 2015. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=79404&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1455456761110>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2016.

BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível – ANP. Evolução anual da produção de biodiesel, da demanda compulsória e da capacidade autorizada pela ANP. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: abril de 2018.

BRASIL, Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm. Acesso em: 30 de junho de 2016.

BRASIL, Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm. Acesso em: 30 de junho de 2016.

BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – ITURRA, A. R. Histórico do Biodiesel no Brasil. 2003. Disponível em: [ftp://ftp.mct.gov.br/Biblioteca/31561-Historico Biodiesel Brasil.pdf](ftp://ftp.mct.gov.br/Biblioteca/31561-Historico_Biodiesel_Brasil.pdf). Acesso em: 30 de junho de 2016.

Brasil, Ministério de Minas e Energia, MME. Biodiesel, Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Disponível em:

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 "REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS, GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL". Disponível em:

http://www.oliva.org.br/assets/pdfs/RDC_270_2005_oleos_gorduras_vegetais_azeite_de_oliva.PDF. Acesso em: 05 de agosto de 2016.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. Elsevier, Amsterdam, p. 3–46, 1984.

BUESO, F. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production and quality with *Jatropha curcas* oil: exploring its potential for Central America. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 12, 2015. doi: 10.1186/s13036-015-0009-9

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. et al. A preliminary economic analysis of biodiesel production by enzymatic hydroesterification. VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations and 1o Simposio Latinoamericano de Biocatalisis y Biotransformaciones, 2014.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. d'A.. et al. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. **Enzyme Research**, 2011. Doi:10.4061/2011/618692.

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, n. 8, p. 4031- 4039, 2008.

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Review Biodiesel in Brazil: History and relevant policies, **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 11, p. 1147-1153, 2010. DOI: 10.5897/AJAR09.708

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 484-487, 2013.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2097-2102, 2008. doi 10.1007/s11274-008-9714-6.

CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, n. 2, p. 197–204, 2004.

CHIU, M. C.; GIOIELLI, L. A. Consistência da gordura abdominal de frango, de suas estearinas e de suas misturas binárias com toucinho. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002.

CHIU, M. C.; GIOIELLI, L. A.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média: 1- Composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis. **Química Nova**, v.31, n. 2, p. 232-237, 2008.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J.; DONATE, P. M. Fundamentos de Química Experimental. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, Acadêmica:53, IV série, p. 270, 2004.

CUNHA, M. E. Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de soja. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v. 35, n. 9, p. 4661-4670, 2007.

DUBÉ, M. A.; TREMBLAY, A. Y.; LIU, J. Biodiesel production using a membrane reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 639-647, 2007.

Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária - Embrapa, 2006.
Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/534/ave---embrapa-022>. Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Exportação de carne de frango no Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>. Acesso em: abril de 2018.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. Geração de Biodiesel pelos processos de Transesterificação e Hidroesterificação, Uma Avaliação Econômica. Dissertação de Mestrado, Federal do Rio de Janeiro, p. 144, 2008.

FERNANDES, M. L. M. Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reservadas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2002.

FIRDAUS, M. Y. et al. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133; p. 55-64, 2016.

FIRDAUS, M. Y.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. N. Development of kinetic model for biodiesel production using liquid lipase as a biocatalyst, esterification step. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, part A, p. 52-61, 2016.

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. DOI 10.1002/bit.22256

FU, B.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. *Energy Fuels*, v. 23, n. 8, p. 4105–4111, 2009. DOI: 10.1021/ef900187v

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001. doi:10.1016/S1389-1723(01)80288-7

GIOIELLI, L. A.; CHIU, M. C. Conteúdo de gordura sólida da gordura abdominal de frango, de suas estearinas e de suas misturas binárias com toucinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 151-157, 2002.

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, v. 39, n. 1, p.10-161, 2012.

- GOMES, L. F. S. et al. Potencial de produção de biodiesel a partir do óleo de frango nas cooperativas do oeste do Paraná. **Revista Varia Scientia**, v. 4, n. 8, p. 133-146, 2006.
- GUAN, G.; KUSAKABLE, K.; SAKURAI, N. Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalysts in the presence of dimethyl ether. *Fuel*, v. 88, n. 1, p. 81-86, 2009.
- HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386-395, 2013.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002. doi:10.1016/S0958-1669(02)00341-5
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998. doi:10.1016/S0167-7799(98)01195-0
- JEGANNATHAN, K.R., ENG-SENG, C., RAVINDRA, P. Economic assessment of biodiesel production: comparison of alkali and biocatalyst processes. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 745-751, 2011.
- KABBASHI, N. A. et al. Hydrolysis of *Jatropha curcas* oil for biodiesel synthesis using immobilized *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 116, p. 95-100, 2015. doi:10.1016/j.molcatb.2015.03.009.
- KAREEM, S. O. et al. Enzymatic biodiesel production from palm oil and palm kernel oil using free lipase. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 26, n. 3, p.635-642, 2017.
- KIM, H. J. et al. Development of heterogeneous catalyst system for esterification of free fatty acid contained in used vegetable oil. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 153, p. 201-204, 2004.
- KISS, A. A.; DIMIAN, A. C.; ROTHENBERG, G. Solid Acid Catalysts for Biodiesel Production —Towards Sustainable Energy. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 1-2, p. 75–81, 2006.

KUEPETHKAEW, S. et al. Optimized synthesis of biodiesel using lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. **Renewable Energy**, v. 104, p. 139–147, 1 abr. 2017.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81-87, 1987.

LEESON, S.; LYONS, T. P.; JACQUES, K. A.; ALTECH, U. K., STAMFORD, U. K. The role of nutrition in maintaining quality of poultry products. *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 15 th Annual Symposium: under the microscope, focal for the new millennium*, p. 89-101, 1999.

LI, Y. et al. Kinetic study on free lipase NS81006 catalyzed biodiesel production from soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 121, p. 22-27, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.07.013>.

LI, Y.; DU, W.; LIU, D. Free lipase-catalyzed biodiesel production from phospholipids-containing oils. **Biomass and Bioenergy**, v.71, p. 162-169, 2014.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, 1999.

LV, L. et al. Effect of water on lipase NS81006-catalyzed alcoholysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 239–244, 1 jul. 2017.

MACHADO, G. D. et al. Computer simulation of biodiesel production by hydro-esterification. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. 2016. doi:10.1016/j.cep.2015.10.015

MALCATA, F. X. et al. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 1, n. 6, p. 426-446, 1992.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007.

MATTEI, L. F. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): Trajetória, Situação Atual e Desafios. Rio Branco, Acre: XLVI Congresso da Sober (Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural); 2008.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.
Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/anos-anteriores/cenario-carne-2014-2015.pdf/view>. Acesso em: março de 2015.

MOREIRA, A. L. V. Produção de biodiesel a partir de gordura de frango. 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química), 2009.

NASARUDDIN, R. R.; ALAM, M. Z.; JAMI, M.S. Evaluation of solvent system for the enzymatic synthesis of ethanol-based biodiesel from sludge palm oil (SPO). **Bioresource Technology**, v. 154, p. 155-161, 2014.

NAVARRO, H. G.; BRACE, L. Improving lipase activity in solvent-free media by interfacial activation-based molecular bioimprinting. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 111-119, 1997.

NEVES, A. A. S. Avaliação do Aproveitamento de Óleos Alimentares Usados Para a Produção de Biodiesel na Área Metropolitana do Porto. 2008. 276 f. Dissertação (Mestrado em Energias Renováveis) - Universidade do Porto. Porto, 2008.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692-700, 2008.

NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n.7, p. 905-910, 2016. doi: 10.1007 / s11746-016-2843-4.

NORDBLAD, M. et al. Identification of critical parameters in liquid enzyme-catalyzed biodiesel production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 12, p. 2446-2453, 2014. DOI: 10.1002/bit.25305View/save citation

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000. doi:10.1016/S0032-9592(00)00152-7

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.

POLLARDO, A. A. et al. Solvent effect on the enzymatic production of biodiesel from waste animal fat. *Journal of Cleaner Production*, v.185, p.382-388, 2018.

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

PRICE, J. et al. Scale-up of industrial biodiesel production to 40m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, 2016. DOI 10.1002/bit.25936

Produção mundial de biodiesel no ano de 2016. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/271472/biodiesel-production-in-selected-countries/>. Acesso em: abril de 2018.

QUINTELLA, C. M. et al. Biodiesel chain from the lab bench to the industry: an overview with technology assessment, R&D&I opportunities and tasks. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

RANGANATHAN, V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.060

Reação de transesterificação. Disponível em: <https://ewtbiodiesel.wordpress.com>. Acesso em: abril de 2018.

REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 4, 2016.

REN, H. et al. Study on Free Lipase-Catalyzed Ethanolysis for Biodiesel Preparation in an Oil/Water Biphasic System. **Journal America Oil Chemist Society**, v. 88, p.1551–1555, 2011. Doi 10.1007/s11746-011-1813-0

ROLAND, J. F. Regulation of food enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p. 105-110, 1981.

ROSSET, I. G. et al. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1-2, p. 136-142, 2011.

RYMER, C; GIVENS, D. I. n-3 Fatty Acid Enrichment of Edible Tissue of Poultry: A Review. **Lipids**, v. 4, n. 2, 2005.

SÁNCHEZ, E. M.; BELLO, J. F.; ROIG, M. G.; BURGUILLO, F. J.; MORENO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Kinetic and enantioselective behavior of the lipase from *Candida cylindracea*: A comparative study between the soluble enzyme and the enzyme immobilized on agarose and silica gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 7, p. 468-476, 1996. Doi:10.1016/0141-0229(95)00133-6.

SARANTOPOULOS, I. et al. Optimization of biodiesel production from waste lard by a two-step transesterification process under mild conditions. **Energy for Sustainable Development**, v. 28, p. 110-114, 2014.

SATYARTHIA, J. K.; SRINIVASA, D.; RATNASAMYB, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 391, n. 1-2, p. 427-435, 2011. Doi:10.1016/j.apcata.2010.03.047

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001. doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6

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

SHEU, K. S.; CHEN, T. C. Yield and quality characteristics of edible broiler skin fat as obtained from five rendering methods. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2002. [doi:10.1016/S0260-8774\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00100-0)

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p.133-142, 2002.

SHIN, H. Y.; LEE, S. H.; RYU, J. H.; BAE, S. Y. Biodiesel production from waste lard using supercritical methanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 134–138, 2012. [doi:10.1016/j.supflu.2011.09.009](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.09.009).

SOUSA, J. S.; OLIVEIRA, E. D'A. C.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n.1-4, p. 133-137, 2010. [doi:10.1016/j.molcatb.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.003)

Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO. 4ª Edição, 2011. Disponível em: https://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em 29 de junho de 2016.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. **Energy Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2016-2019, 2010. [doi: 10.1021/ef9011824](https://doi.org/10.1021/ef9011824)

TALUKDER, M. M. R. et al. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 207-212, 2010.

USDA, Livestock and Poultry: World markets and trade, abril 2018. Consumo da carne de frango. Disponível em:

http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF.

Acesso em: maio de 2018.

WATANABE, Y. et al. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015-1021, 2007.

WIDYAN, M. I. SHYOUKH, A. O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. **Bioresource Technology**, v.85, n.3, p. 253-256, 2002.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.doi:10.1016/j.apenergy.2013.09.029

YANG, W. et al. A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from Burkholderia ubonensis SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 76–89, abr. 2016.

ZANETTI, M. Produção de biodiesel a partir de gordura abdominal de frangos. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ZENEVICZ, M. C. P. Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom. 2015. 174 p. Tese (doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2015.

ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO JR, A. F.; OLIVEIRA, J. V.; De OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.

8 APÊNDICE A

Determinação do perfil de ácidos graxos

Foi pesado entre 40 a 90 mg da amostra de gordura em um tubo de ensaio com tampa. Com uma pipeta graduada adicionou-se 1,5 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N no tubo. O tubo foi fechado e colocado num banho de água com temperatura de 100 °C por 10 minutos. Após esse tempo, retirou o tubo do banho e deixou esfriar, então, adicionou-se 2 mL de solução metanólica de Trifluoreto de boro (BF₃) 14 % colocou-o novamente no banho por 5 minutos. Em seguida, deixou o tubo com a amostra esfriar por 1 minuto, adicionou-se 2 mL de heptano e agitou-se por 30 segundo. Então, adicionou-se 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e agitou-se novamente por 30 segundos. Depois, deixou ocorrer a decantação das fases, na fase superior contém o solvente orgânico com os ésteres metílicos e na inferior é a fase aquosa. Com uma pipeta de Pasteur retirou-se a fase superior e coloca-se em um tubo de centrífuga. Em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro para secar a amostra e realizou-se a centrifugação do mesmo. Transferiu-se a amostra para um vial e realizou-se a análise com um cromatógrafo gasoso da Shimadzu GC-14B, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar SGE BPX70 (60m x 0,25mm x 0,25 µm). O programa de temperatura utilizado no cromatógrafo foram: início a 160 °C, após aquecimento a 4°C.min⁻¹ até 230 °C, com permanência nessa temperatura por 10 minutos. O resultado para o perfil de ácido graxo é expresso em relação a porcentagem da área do pico. Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidad de La Republica (UDELAR) no Uruguai.

9 APÊNDICE B

Cromatograma

Neste apêndice é apresentado, para exemplificação, um cromatograma obtido no decorrer do estudo.

Figura 28 – Cromatograma da cinética de hidroesterificação enzimática da gordura abdominal de frango. Condições experimentais de 0,3% (m/m) da lipase NS 40116, 2% de água (m/m), 1:3,5 razão molar óleo:metanol à 35 °C; agitação de 250 rpm, em sistema livre de solvente.

