

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTU SENSU” EM BIOENERGIA
NÍVEL DE MESTRADO

**ESTUDO DA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA CATALISADA PELA ENZIMA
LIPOZYME TL IM**

ANDRIELE MAGARINOS FOCKING

Toledo, PR

2017

ANDRIELE MAGARINOS FOCKING

**ESTUDO DA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA CATALIZADA PELA ENZIMA
LIPOZYME TL IM**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Professor Dr. Carlos Eduardo Borba.

Co-orientadora: Professora Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Toledo, PR

2017

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

FOCKING, ANDRIELE MAGARINOS

F652e Estudo da hidrólise do óleo de soja catalisada pela enzima lipozyme
TL IM / Andriele Magarinos Focking. -- Toledo, PR : [s. n.], 2017.
101 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do
Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

Inclui Bibliografia

1. Bioenergia – Dissertações 2 Óleo de soja 3. Óleos e gorduras 4.
Óleos vegetais como combustível 5. Ácidos graxos 6. Hidrólise 7. Cinética
enzimática 8. Enzimas - Aplicações industriais I. Borba, Carlos Eduardo,
orient. II. Rodrigues, Maria Luiza Fernandes, coorient. III. T

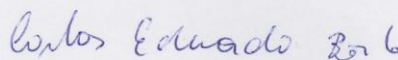
CDD 20. ed. 662.8

665.3

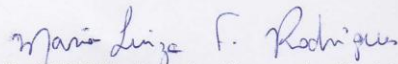
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por ANDRIELE
MAGARINOS FOCKING perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em
Bioenergia em 09 de março de 2017

COMISSÃO JULGADORA



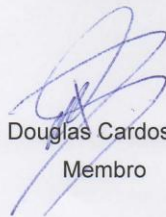
Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba
Orientador



Profª Drª Maria Luiza Fernandes Rodrigues
Co-orientadora



Profª. Drª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner
Membro



Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski
Membro

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me colocado nesse caminho e me dado disposição e força para continuar sempre.

Aos meus pais, Rubiamara e Noelcy, que estiveram ao meu lado com apoio incondicional por toda a minha vida.

Ao meu orientador Carlos Eduardo Borba por ter me recebido tão bem como orientada e ser uma pessoa de fácil interação e descontraída, por todo o apoio e contribuição para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Maria Luiza Machado Fernandes Rodrigues pela sua disponibilidade e dedicação, além da amizade adquirida ao desenvolver de todo o trabalho.

A Greice Jacomini, por todo o incentivo e momentos de descontração, agradeço sempre por ter uma amiga como você em minha vida.

As amigas Michela Bianchi, Pâmela Magarinos e Alana Nunes, não imagino uma vida sem o apoio e carinho de vocês.

À aluna de iniciação científica, Maria Julia Arroyo, pela ajuda no trabalho, por sua dedicação e simpatia.

A colega de mestrado Meline Goulart, pela contribuição e principalmente pelo carinho e ajuda dada para este trabalho.

À LNF Latino Americana pelo fornecimento da enzima utilizada nesse trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO GERAL	20
2.1. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Óleos e Gorduras.....	21
3.1.1. Óleo de Soja.....	23
3.2. Composição de Óleos e Gorduras.....	26
3.2.1. Ácidos Graxos Livres	29
3.3. Transformação de Óleos e Gorduras e suas Aplicações	32
3.4. Transesterificação	33
3.5. Hidroesterificação	36
3.6. Hidrólise de Óleos e Gorduras	38
3.7. Enzimas	40
3.7.1. Hidrólise Enzimática	41
3.7.2. Lipozyme TL IM	43
3.8. Agentes Emulsificantes	45
3.9. Estado da Arte	46
4. METOLOGIA	49
4.1. Reagentes Químicos	49
4.2. Enzima.....	49
4.3. Óleo de Soja	49

4.4. Determinação da Atividade Enzimática.....	49
4.5. Hidrólise Enzimática.....	50
4.6. Quantificação dos Ácidos Graxos Livres (AGL).....	51
4.7. Planejamento Experimental.....	51
4.8. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja	54
4.8.1. Efeito do uso de Agentes Emulsificantes na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja.....	54
4.9. Modelagem Matemática	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Planejamento Experimental Placket-Burmann	59
5.2. Planejamento Experimental DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional.....	66
5.3. Cinética da Reação de Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja	74
5.3.1. Efeito do uso de Agentes Emulsificantes na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja.....	77
5.3.2. Efeito da dosagem de Enzima na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja	82
5.3.3. Efeito da Razão molar tampão/óleo na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja	84
5.4. Modelagem Matemática	86
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Matérias primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.....	22
Figura 3.2. Percentual da produção de grãos no Brasil – 2015/2016.....	23
Figura 3.3. Estrutura de um triacilglicerídeo.....	28
Figura 3.4. Estrutura gerais dos Diacilglicerídeos.....	28
Figura 3.5. Estruturas gerais dos Monoacilglicerídeos.....	28
Figura 3.6. Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras: (i) saturados: (a) palmítico com 16 carbonos; (b) esteárico com 18 carbonos; (ii) insaturados com 18 carbonos: (c) oléico com uma ligação dupla; (d) linoleico com duas ligações duplas; (e) linolenico.....	29
Figura 3.7. Reação de transesterificação de um triacilglicerol.....	34
Figura 3.8. Fluxograma do processo de produção de biodiesel via transesterificação.....	35
Figura 3.9. Diagrama do processo de Hidroesterificação.....	38
Figura 5.1. Gráfico de pareto na interação dos efeitos das variáveis para o índice de acidez, com um intervalo de 95% de confiança.....	60
Figura 5.2. Distribuição dos valores observados versus valores preditos.....	62
Figura 5.3. Gráfico de pareto na interação dos efeitos das variáveis para o índice de acidez, com um intervalo de 95% de confiança.....	68
Figura 5.4. Distribuição dos valores observados versus valores preditos.....	70
Figura 5.5. Superfície de resposta para o índice de acidez em função da temperatura e do pH.....	71
Figura 5.6. Superfície de resposta para o índice de acidez em função da temperatura e da razão água/óleo.....	71
Figura 5.7. Superfície de resposta para o índice de acidez em função do pH e da razão água/óleo.....	72
Figura 5.8. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja (T = 52,2°C, 150 rpm, A/O = 37,7:1, pH= 6,1, E/S= 1%).	75
Figura 5.9. (■) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja sem agente emulsificante; (●) Cinética da hidrólise enzimática utilizando ultrassom; (▲) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando ultrassom e agente emulsificante; (▼) Cinética da hidrólise enzimática utilizando somente agente emulsificante (T = 52,2°C, 150 rpm, A/O = 37,7:1, pH= 6,1, E/S= 1%).	78

Figura 5.10. Gráfico demonstrativo da inibição da atividade enzimática pelo uso da goma arábica.....	82
Figura 5.11. (■) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando 1% de enzima; (●) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando 2% de enzima (T = 52,2°C, 150 rpm, A/O = 37,7:1, pH= 6,1).....	83
Figura 5.12. (■) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com razão molar água/óleo 37,7:1; (●) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com razão molar água/óleo 20:1; (▲) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com razão molar água/óleo 50:1 (T = 52,2°C, 150 rpm, pH= 6,1, E/S= 1%).....	86
Figura 5.13. Cinética para o experimento do modelo de referência (A/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm).....	89
Figura 5.14. Cinética para o experimento do modelo com variação na dosagem enzimática (A/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 2%; Temp.:52,2°C; 150 rpm).....	89
Figura 5.15. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (A/O: 20:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)	90
Figura 5.16. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (A/O: 50:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm).....	90
Figura 5.17. Cinética para o experimento do modelo de referência (A/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm).....	91
Figura 5.18. Cinética para o experimento do modelo com variação na dosagem enzimática (A/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 2%; Temp.:52,2°C; 150 rpm).....	91
Figura 5.19. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (A/O: 20:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)	92
Figura 5.20. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (A/O: 50:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição de Ácidos Graxos no óleo de soja.....	24
Tabela 3.2. Características das Oleaginosas.....	26
Tabela 3.3. Nome e fórmulas de ácidos graxos.....	30
Tabela 3.4. Teor dos ácidos graxos em óleos vegetais.....	31
Tabela 3.5. Ficha técnica da Lipozyme TL IM.....	44
Tabela 3.6. Estudos de hidrólise enzimática utilizando a enzima Lipozyme TL IM.....	48
Tabela 4.1. Planejamento Experimental Placket-Burmann: níveis e experimentos realizados.....	53
Tabela 4.2. Planejamento Experimental DCCR: níveis e experimentos realizados.....	53
Tabela 4.3. Mecanismo de Michaelis-Menten para hidrólise enzimática de óleo vegetal ..	56
Tabela 5.1. Valores do índice de acidez obtidos para os experimentos do planejamento Placket-Burmann.....	60
Tabela 5.2. Análise da variância.....	61
Tabela 5.3. Valores do índice de acidez do óleo de soja hidrolisado conforme condições de um planejamento experimental DCCR.....	67
Tabela 5.4. Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez, para um intervalo de confiança de 95%.....	68
Tabela 5.5. Análise da variância do planejamento DCCR, para um intervalo de confiança de 95%.....	69
Tabela 5.6. Reações de hidrólise enzimática.....	72
Tabela 5.7. Valores das constantes de velocidade específica do modelo matemático.....	88
Tabela 5.8. Valores para os coeficientes de correlação (R^2).....	88

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ANP – Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ABIOVE – Associação Brasileira das Industrias de Óleos Vegetais

AGL – Ácidos Graxos Livres

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DAG – Diacilgliceróis

E/S – Razão mássica enzima substrato

GL – Glicerol

MAG – Monoacilgliceróis

rpm – Velocidade de agitação

TAG – Triacilgliceróis

Temp. – Temperatura

T/O – Razão molar solução tampão e óleo de soja

ESTUDO DA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA CATALIZADA PELA ENZIMA LIPOZYME TL IM

AUTOR: ANDRIELE MAGARINOS FOCKING

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO BORBA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000–Toledo–PR, Brasil, março de 2017, 101p.

RESUMO

A utilização do biodiesel como substituto do óleo diesel é uma das alternativas que visa minimizar a utilização de combustíveis não renováveis (petróleo) na matriz energética mundial. Mundialmente, a produção de biodiesel ocorre pelo processo de transesterificação. No Brasil, a matéria-prima mais utilizada para esta finalidade é o óleo de soja. Uma nova rota que se mostra promissora para a produção de biodiesel é o processo de hidroesterificação. Desta maneira, o presente trabalho objetivou avaliar a hidrólise enzimática do óleo de soja, utilizando a enzima comercial Lipozyme TL IM como catalisador da reação. Foram realizados ensaios de hidrólise do óleo de soja em sistema fechado e batelada, baseados em dois planejamentos experimentais (Plackett-Burmann e DCCR), visando avaliar os efeitos das variáveis envolvidas no processo (pH; temperatura; razão molar água/óleo; velocidade de agitação no reator batelada e razão mássica enzima/substrato). A partir disto, foram realizados estudos cinéticos com diferentes condições de razão molar água/óleo e diferentes dosagens de catalisador, bem como a utilização de ultrassom de ponta e um agente químico visando avaliar seus efeitos na cinética da reação. Para descrever a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja foi utilizado um modelo matemático baseado na cinética de Michaelis-Menten. Os resultados dos planejamentos experimentais indicaram que o índice de acidez foi favorecido quando temperatura de 52,2°C, pH 6,1, velocidade de agitação de 150 rpm e razão molar água/óleo 37,7:1, obtendo 82,4% no valor do índice de acidez. Os estudos cinéticos demonstraram que a utilização do ultrassom de sonda não acelerou a velocidade da reação de hidrólise

enzimática. A cinética envolvendo a utilização de agente químico sofreu um alto decaimento na velocidade da reação, demonstrando que este seria um inibidor da atividade enzimática da Lipozyme TL IM. Pela modelagem matemática verificou-se que o modelo descreveu bem os dados experimentais, bem como possibilitou a visualização da concentração dos demais componentes (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol, ácidos graxos livres e água). Acredita-se que os valores das constantes da velocidade de reação obtidos no modelo tenham maior significado físico e possam ser utilizados para realização de simulações em outras condições.

Palavras-chave: Óleos e gorduras, Óleo de Soja, Ácidos Graxos Livres, Hidrólise enzimática, Enzima Lipozyme TL IM.

STUDY OF HYDROLYSIS OF SOY OIL CATALYZED BY ENZYME LIPOZYME
TL IM

AUTHOR: ANDRIELE MAGARINOS FOCKING

SUPERVISOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO BORBA

Master Thesis; Post Graduate Program in Bioenergy; Western Paraná State University;
Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo-PR, Brazil, March of 2017, 101p.

ABSTRACT

The utilization of biodiesel as a substitute for diesel oil is one of the alternatives that aims to minimize the utilization of non-renewable fuels (petroleum) in the world energy matrix. Worldwide, biodiesel production occurs through the transesterification process. In Brazil, the most commonly used raw material for this purpose is soybean oil. A new way that has been promising for the biodiesel production is the Hydroesterification process. With that, the present work aimed to evaluate the soy oil enzymatic hydrolysis, using the commercial enzyme Lipozyme TL IM as the catalyst of the reaction. Was performed hydrolysis test of soy oil in closed and batch system, based on two experimental plannings (Placket-Burmann and DCCR), to evaluate the effects of the variables involved in the process (pH; temperature; molar fraction water/oil; stirring speed of the batch reactor and mass fraction enzyme/substrate). Since that, was performed kinetic studies with different conditions of molar fraction water/oil and different dosages of catalyst, as well as the utilization of a tip ultrasonic and a chemical agent to evaluate its effects on the kinetic of the reaction. To describe the kinetic of enzymatic hydrolysis of soy oil, was used a mathematical model based on the Michaelis-Menten kinetic. The results of experimental plannings indicated that the acidity levels were favored when the temperature of 52,2°C, pH 6.1, stirring speed 150 rpm and molar fraction water/oil 37,7:1, getting 82,4% in the value of acidity level. The kinetic studies showed that the utilization of the probe ultrasonic did not accelerated the velocity of the enzymatic hydrolysis reaction. The kinetic involving the utilization of the chemical agent suffered a high decrease in the velocity of reaction, showing that this would be a inhibitor of enzymatic activity of Lipozyme TL IM. By the mathematical model, was verified that the model described well the experimental data, as

well made able the visualization of others components concentration (triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, glycerol, free fatty acids and water). It is believed that the values of the constants of the reaction velocity obtained in the model has more physical meaning and could be used to conducting the simulations in anothers conditions.

Key-words: oil and fats, soy oil, free fatty acids, enzymatic hydrolysis, Lipozyme TL IM enzyme.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente um dos maiores desafios da humanidade é a busca por suprir a demanda energética mundial. Isso se deve as questões econômicas relacionadas ao preço do barril de petróleo e também as questões ambientais ligadas à queima de combustíveis fósseis, que se torna outro grande problema a ser solucionado. Ambas as questões têm contribuído para colocar a população frente à necessidade de utilização de novos recursos energéticos, provindos de fontes alternativas que minimizem os impactos ambientais ocasionados pelas fontes fósseis. Uma alternativa que pode vir a suprir esta demanda energética é a utilização de biodiesel como substituto do óleo diesel.

O biodiesel é um combustível biodegradável proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais, sendo definido quimicamente como uma mistura de mono-álquil éster de ácidos graxos derivados de lipídeos naturais (óleos vegetais/gorduras animais).

O Brasil é favorecido pela variedade de matérias-primas cultivadas para extração de óleo vegetal e produção de biocombustíveis. Dentre essas, a soja é uma das oleaginosas que se destaca em função de seu expansivo cultivo em diferentes regiões do país e pela utilização de tecnologias para produção.

Dentre as rotas de produção, a transesterificação é o processo mais utilizado industrialmente para a produção mundial. Além deste, o processo de hidroesterificação vêm sendo uma rota muito estudada nos últimos anos para a obtenção de biodiesel (SILVEIRA, 2014). Estes processos ainda contam com a utilização de catalisadores. Os catalisadores visam acelerar a velocidade da reação e podem ser de origem química (ácidos ou básicos) e enzimática (homogêneos ou heterogêneos).

A catálise ácida permite a utilização de óleos e gorduras com um alto teor de ácidos graxos livres, como os óleos não refinados ou resíduos de frituras. Os catalisadores ácidos homogêneos são mais utilizados e se dão pelos ácidos de Brønsted - Lowry (HCl, H₂SO₄ e ácidos sulfônicos). A reação ácida apresenta alto rendimento, contudo, demanda de um elevado tempo reacional e alta razão molar álcool/óleo para a síntese (SUAREZ *et al.*, 2007).

Na catálise básica faz-se a utilização de matérias-primas com baixos teores de acidez (abaixo de 3,0 mgNaOH/g) e umidade (0,1% m/m), característico de óleos vegetais

refinados (DEMIRBAS, 2009). Os catalisadores básicos homogêneos apresentam maiores taxas de rendimento em menores quantidades e baixos períodos de tempo, mesmo em temperatura ambiente, são facilmente manipuláveis e menos corrosivos em comparação com os catalisadores ácidos (VICENTE, MARTINEZ & ARACIL, 2004). As bases mais utilizadas são bases fortes como KOH (hidróxido de potássio) e NaOH (hidróxido de sódio).

A catálise enzimática se dá pela atuação de enzimas e a sua utilização tem se mostrado significativa nos processos industriais. As enzimas possuem propriedades como especificidade e seletividade, e assim, tornam-se capazes de executar diversas transformações de modo rápido e seletivo, atuando em condições brandas de reação (temperaturas <70°C) (PATEL, 2002). As enzimas do grupo das lipases vêm sendo muito utilizadas na indústria de bioenergia (PARQUES & MACEDO, 2006). As lipases são enzimas acil-hidrolases capazes de catalisar reações de hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis, por isso, os ácidos graxos livres presentes são facilmente convertidos. Geralmente são utilizadas na forma heterogênea, tornando-a vantajosa por poder ser recuperada e reutilizada na reação, porém, ainda demandam de um alto custo.

Na transesterificação a reação ocorre entre um triacilglicerol com um álcool (etanol ou metanol), produzindo ésteres e glicerol. Industrialmente são utilizados catalisadores básicos homogêneos, o que implica na utilização de matérias - primas refinadas, de alto valor agregado. Além disso, o processo industrial apresenta problemas operacionais em função deste catalisador, que forma reações de saponificação, ocasionando uma alta geração de efluentes para as fases de separação e purificação do produto (biodiesel). Desta forma, a produção via transesterificação ainda apresenta desvantagens devido ao alto custo associado no processo e com isso outros meios de produção vêm sendo pesquisados.

A hidroesterificação é uma rota de produção que está se mostrando promissora, pois visa solucionar os problemas encontrados pelo método de produção tradicional (reações de saponificação e utilização de matérias-primas refinadas). Este processo ocorre em duas etapas: hidrólise e esterificação. A hidroesterificação mostra-se vantajosa, pois permite o uso de matérias-primas com alta acidez e umidade (de baixa qualidade e baixo valor agregado como resíduos de óleo de fritura, óleos que não passaram pelo processo de refino, gorduras animais, dentre outras). Esta seria a principal vantagem da hidroesterificação em relação à transesterificação (ARANDA *et al.*, 2009).

A hidrólise se dá pela reação entre um triacilglicerol com água, produzindo ácidos graxos livres e glicerol. O objetivo da hidrólise é a obtenção de um alto teor de ácidos graxos livres (FREIRE, SOUZA & CAVALCANTE-OLIVEIRA, 2011), assim, dispensa-se o refino da matéria-prima. Segundo Feiten (2013), uma reação completa de hidrólise é influenciada por diversos fatores como o tempo de reação, tipo e quantidade de catalisadores, disponibilidade de reagentes para uma reação completa, temperatura, pH, o modelo de reator e as demais tecnologias utilizadas a fim de otimizar o processo.

Após a hidrólise, o glicerol é removido e os ácidos graxos livres produzidos são esterificados por um álcool (etanol ou metanol) produzindo então o biodiesel. Assim, outra vantagem da hidroesterificação se dá pela geração de subprodutos (glicerol) mais limpos, com alto valor agregado, que, ao ser removido pela etapa de hidrólise, não entra em contato com o produto final (biodiesel) podendo então ser reaproveitado pela indústria para outros fins.

Nos últimos anos, vários estudos de hidrólise enzimática para obtenção de ácidos graxos livres vêm sendo desenvolvidos com diferentes matérias-primas: óleo de soja (*Glycine max*) (RAIZER, 2014); óleo de mamona (*Ricinus communis*) (OLIVEIRA, 2004); óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) (TEIXEIRA, 2011); óleo de girassol (*Helianthus annuus*) (REINEHR *et al.*, 2014); óleo de crambe (*Crambe abyssinica Hochst*) (MELLO, 2014), dentre outros encontrados na literatura. Nestes trabalhos, os pesquisadores geralmente avaliam as condições reacionais temperatura, razão molar água/óleo e razão mássica enzima/substrato. Para a avaliação da razão molar água/óleo as pesquisas comumente utilizam água (pH neutro) na reação. Assim, poucos trabalhos que avaliassem a utilização de solução tampão (pH) ao invés da utilização de água na razão molar água/óleo foram localizadas na literatura. Além disto, também não foram documentadas muitas pesquisas que avaliassem a influência da utilização do ultrassom de sonda e da goma arábica como agentes emulsificantes sob o índice de acidez nas reações de hidrólise enzimática. Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem a eficiência da enzima comercial Lipozyme TL IM na hidrólise enzimática do óleo de soja sob o índice de acidez da reação utilizando agentes emulsificantes (ultrassom de sonda e goma arábica) – tecnologias utilizadas para otimizar o processo (acelerando a velocidade de reação), sendo assim uma pesquisa inédita. Nesse contexto esta pesquisa objetivou avaliar a eficiência da enzima Lipozyme TL IM na produção de ácidos graxos livres a partir da

reação de hidrólise do óleo de soja para posterior processo de esterificação bem como avaliar a influência das variáveis operacionais do processo.

2.OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência da enzima comercial Lipozyme TL IM na produção de ácidos graxos livres a partir da reação de hidrólise do óleo de soja para posterior processo de esterificação destes ácidos graxos livres e produção de biodiesel.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das condições operacionais: temperatura, pH, velocidade de agitação, razão molar tampão/óleo e razão mássica enzima/substrato, na hidrólise enzimática do óleo de soja, empregando a metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja a partir da obtenção de dados experimentais;
- Realizar a modelagem matemática e simulação da cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ÓLEOS E GORDURAS

Óleos e gorduras são substâncias que pertencem à classe dos lipídeos, tendo origem em diversas fontes como no tecido adiposo de animais, em frutos e em sementes (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Os lipídeos caracterizam-se por terem como principais componentes ácidos graxos livres e seus derivados e designam um grupo heterogêneo de substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas) e solúveis em solventes orgânicos. De acordo com Moretto & Fett (1998), óleos e gorduras são produtos da condensação entre os ácidos graxos livres e o glicerol contido nos lipídeos. Desses gliceróis, os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triacilgliceróis (TAG), constituindo a maior fração, e, em menores proporções, compõem-se de ácidos graxos livres (AGL), monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG).

De acordo com a resolução ANVISA, RDC nº 270 de 2005, a classificação de lipídeos graxos em óleos ou gorduras depende do ponto de fusão da fonte oleaginosa na temperatura de 25°C. Em temperatura ambiente, os óleos são classificados como líquidos (óleo de soja, milho, oliva, etc.) e as gorduras são classificadas como sólidas ou pastosas (manteiga, sebo, etc.). Contudo, esses óleos podem ter a elevação do ponto de fusão através do processo de hidrogenação (BABICZ, 2009), modificando e sua cadeia carbônica, alterando as propriedades da mistura e tornando-se outro tipo de gordura, chamada gordura trans.

Óleos e gorduras possuem um papel fundamental na alimentação humana, sendo fornecedores de calorias, agindo como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, e, também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoléico, linolênico e araquidônico (KARLESKIND, 1996; GURR & HARWOOD, 1996).

Além de possuírem alto valor alimentício, óleos e gorduras estão entre os primeiros insumos naturais que o homem usou com fins não alimentares, tanto na forma natural como a partir de modificações químicas. Segundo Ramalho & Suarez (2013), desde a civilização egípcia até o Século XIX os óleos e gorduras eram uma das principais fontes de combustíveis líquidos para uso em sistemas de iluminação (lâmparas) ou de

lubrificantes(engrenagens mecânicas). Além destes, sabe-se que a utilização também é antiga para a produção de sabões e tintas. Desde então, óleos e gorduras vêm sendo utilizados em diversas indústrias, como alimentícia, química, farmacêutica, bioenergia, entre outras.

Na indústria de bioenergia, óleos e gorduras são utilizados para a produção de biodiesel. Dentre os óleos e gorduras, a matéria – prima mais utilizada pela indústria brasileira para produção de biodiesel é o óleo de soja.

Dados mensais da ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (2016), indicam que até outubro de 2016 o óleo de soja garantiu 78,66% da produção de biodiesel brasileira em relação a outras matérias – primas utilizadas (Figura 3.1).

Desta maneira, este dado deixa subentendido a liderança da cultura de soja no mercado brasileiro, ressaltando sua alta disponibilidade para suprir a necessidade da indústria alimentícia quanto para atender a demanda do mercado de biocombustíveis. Diante deste fato, sua alta disponibilidade, também se tem em vista que esta matéria – prima deva possuir um preço de mercado interno menos competitivo, sendo mais atrativa para a produção de biodiesel. Além disso, a venda do óleo de soja no mercado interno brasileiro para a produção de biodiesel garante que a parcela do óleo que não foi exportada e não foi utilizada pela indústria de alimentos receba outra destinação significativa.

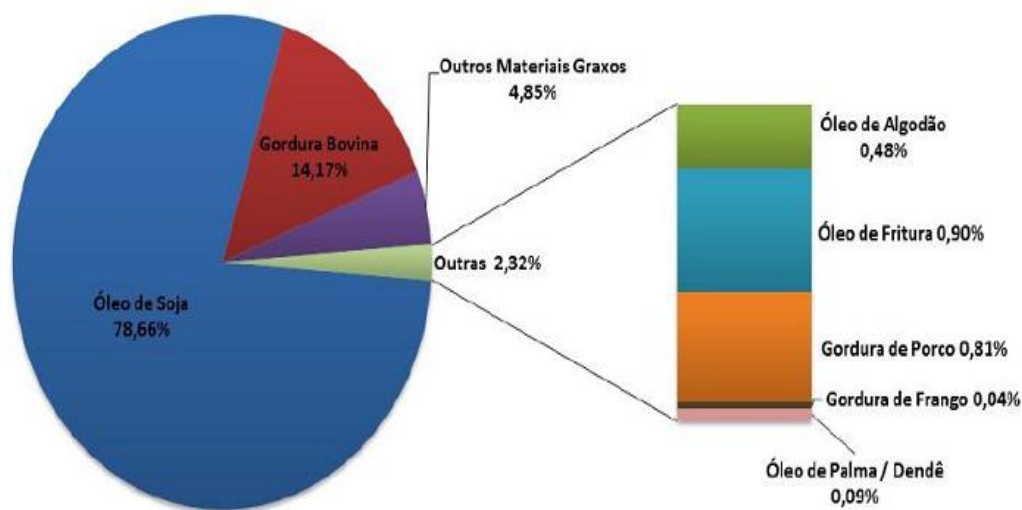


Figura 3.1. Matérias – primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.

Fonte: ANP (2016).

3.1.1. Óleo de Soja

A *Glycinemax*, leguminosa conhecida como Soja, é uma cultura de crescimento rápido, levando em torno de 80 a 120 dias entre semeadura e colheita, que pôs o Brasil na posição de segundo maior produtor mundial desta cultura, situando-se atrás apenas dos Estados Unidos.

No país a soja é cultivada em grandes extensões de diversas regiões, sendo responsável por 57,02% da área cultivada do país, com 32,1 milhões de hectares cultivados na safra de 2014/2015. As regiões Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal) lideram a produção nacional do grão.(CONAB, 2016).

Dados disponibilizados pela Conab (2016) indicaram que a produção de soja na safra brasileira de 2014/2015 chegou a 96,2 milhões de toneladas e que, para a safra, 2015/2016, foi estimado um aumento de 6,8%, elevando a produção em aproximadamente 102,8 milhões de toneladas. Desta forma, para a primeira safra de 2015/2016, a soja representou 51,2% da produção brasileira de grãos em relação as demais culturas de verão (Figura 3.2).

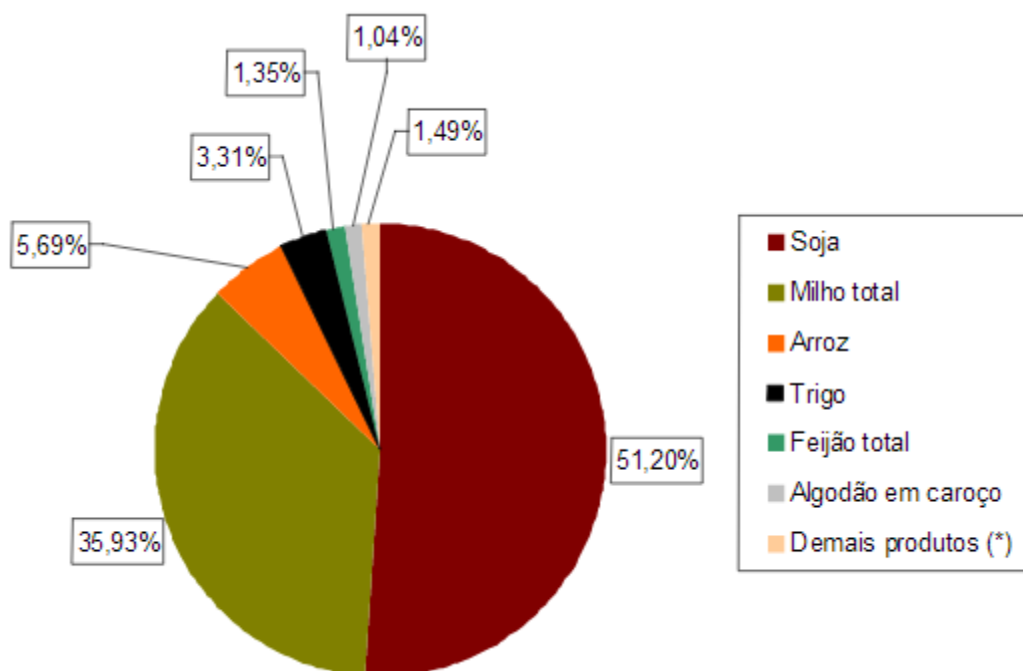


Figura 3.2. Percentual da produção de grãos no Brasil – 2015/2016.

Fonte: Conab (2016)

Na semente da soja a proteína corresponde a 40% do peso seco e o óleo a aproximadamente 20%, sendo também composta por carboidratos solúveis (açúcares como sacarose, rafinose e estaquiose), carboidratos insolúveis (fibras) e também uma pequena percentagem de minerais (FONTANA, 2011).

O grão de soja, ao ser processado, vai gerar como produtos inicialmente o óleo de soja, o farelo e a farinha. Segundo Cavalcante *et al.* (2011), o lipídio do óleo de soja é o líder mundial dos óleos vegetais, representando entre 20 e 24% de todos os óleos e gorduras consumidas no mundo. De acordo com a ANVISA, RDC nº 482 de 1999, a composição de ácidos graxos livres presentes no óleo de soja se dá por, em média, dez diferentes tipos de ácidos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Composição de Ácidos Graxos no óleo de soja

Ácido Graxo	Estrutura	Valor de referência (%)
-	C<14	<0,1
Mirístico	C 14:0	<0,5
Palmítico	C 16:0	7,0 – 14,0
Palmitoléico	C 16:1	<0,5
Esteárico	C 18:0	1,4 - 5,5
Oléico	C 18:1	19,0 – 30,0
Linoléico	C 18:2	44,0 – 62,0
Linolênico	C 18:3	4,0 – 11,0
Araquídico	C 20:0	< 1,0
Eicosenóico	C 20:1	< 1,0
Behênico	C 22:0	< 0,5

• O número justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número, a quantidade de duplas ligações.

Fonte: Adaptado de ANVISA, RDC 482 (1999).

Pelos valores de referência aproximados indicados na Tabela 3.1, é possível notar que a composição química do óleo de soja bruto em ácidos graxos se dá principalmente

pelos ácidos linoleico (53,7%), oleico (22,8%), palmítico (10,2%), linolenico (8,6%) e esteárico (3,7%) (MA & HANNA, 1999).

No Brasil, para o ano de 2015, a Abiove – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais - estimou uma produção de 8,074 milhões de toneladas de óleo, dos quais 6,521 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo interno e 1,665 milhões de toneladas seguiram para exportação. Desta forma, em vista da disponibilidade no mercado interno brasileiro, o óleo de soja além de suprir a demanda na indústria alimentícia, veio a se tornar uma opção para o mercado de biocombustíveis, sendo matéria – prima para a produção de biodiesel. Outros dados previstos pela Abiove (2015) indicaram que dos 6,521 milhões de toneladas de óleo de soja que permaneceram no mercado interno brasileiro, obtidos na safra de 2014/2015, 2,9 milhões de toneladas foram destinados à produção de biodiesel. Contudo, o óleo de soja não é a matéria – prima mais indicada para esta produção.

O óleo de soja possui características que podem comprometer a estocagem do biodiesel por longo período de tempo, por seu alto grau de insaturação devido à presença de aproximadamente 60% de cadeias de ácidos graxos insaturados, incluindo também as cadeias alquílicas com 18 carbonos (KNOTHE & STEIDLEY, 2005; GASPARINI, 2010). Esses problemas relacionados a um alto período de estocagem são dados, principalmente, pela oxidação. A oxidação se dá por uma série de reações químicas, envolvendo ácidos graxos insaturados e oxigênio, assim, a estabilidade do óleo é definida com o tempo para se atingir o nível de rancidez, ou seja, a alteração na taxa de oxidação. Além disso, o grão da soja produz um baixo índice de óleo em comparação com outras culturas oleaginosas (Tabela 3.2).

Apesar do baixo teor de óleo presente no grão da soja, a forte utilização do óleo de soja para a produção de biodiesel se dá em função da concepção do programa PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel), que foi criado no Brasil com o intuito de eliminar a sobre oferta do óleo de soja no início dos anos 2000 (Biodiesel BR, 2016). Assim a utilização do óleo de soja ocorre devido à alta quantidade de óleo disponível em relação aos óleos das demais culturas, já que sua colheita pode ocorrer em até cada três meses ao ano (dependendo da região) além de ser cultivada em grandes extensões de área.

Tabela 3.2. Características das Oleaginosas

Oleaginosa	Origem	Teor de óleo (%)	Colheita (meses)	Produtividade (toneladas Óleo/ha)
Palma (Dendê)	Amêndoa	22,0	12	2,0 – 8,0
Coco	Fruto	55,0 – 60,0	12	1,3 – 1,9
Girassol	Grão	40,0 – 47,0	3	0,5 – 1,9
Colza/Canola	Grão	40,0 – 48,0	3	0,5 – 0,9
Mamona	Grão	45 – 50	3	0,5 – 0,9
Amendoim	Grão	40 – 52	3	0,6 – 0,8
Soja	Grão	18 – 21	3	0,2 – 0,6
Babaçu	Amêndoa	66	12	0,1 – 0,3
Algodão	Grão	18 – 20	3	0,1 – 0,2

Fonte: Adaptado de Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012)

3.2. COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

As propriedades físicas, químicas e nutricionais de óleos e gorduras dependem da natureza, do número de átomos de carbono e da posição dos grupos acila presentes nas moléculas dos triacilgliceróis (LEHNINGER *et al.*, 2000). Em suma, o esqueleto de óleos e gorduras é formado por cadeias de ácidos graxos livres e, a composição destes óleos e gorduras, se dá por aproximadamente 95% de triacilgliceróis (TAG, também chamados de trigliceróis).

Devido à alta variedade de ácidos graxos livres contidos nos óleos e gorduras, fica perceptível que estes sejam compostos por vários tipos de triacilgliceróis com diferentes graus de insaturações. Desta forma, pelo grau de insaturações, também se diferenciam óleos e gorduras pelo seu estado físico da matéria, em líquidos ou sólidos/ pastosos.

Além dos triacilgliceróis, os óleos e gorduras possuem outros componentes menores como ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis (importantes emulsificantes), tocoferol (atuam como antioxidantes), esteróis (principal esteroide de origem animal é o colesterol) e vitaminas de gorduras solúveis (FARIA *et al.*, 2002).

Triacilgliceróis (TAG) são compostos ésteres formados de uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos. São insolúveis em água, mudam sua consistência dependendo da temperatura ambiente e representam a principal forma de armazenamento de energia em sementes e no tecido adiposo dos animais (TAVARES, 2014; KOLAKOWSKA & SIKORSKI, 2002). A estrutura de um TAG é representada pela Figura 3.3.

Os diacilgliceróis (DAG) são ésteres de glicerol que possuem dois grupos hidroxila esterificados por ácidos graxos e podem ser encontrados em duas formas estequiométricas: 1,2(2,3)-DAG e 1,3-DAG (Figura 3.4) (SAMBANTHAMURTHI & SUNDRAM, 2000). É um componente natural dos TAG, tendo suas propriedades físico-químicas semelhantes, estão presentes em diversos óleos e gorduras em níveis de até 10%.

Os DAG são utilizados como emulsificantes e estabilizadores de alimentos, cosméticos e indústrias farmacêuticas. Sua mais recente aplicação é como óleo de cozinha, com pelo menos 80% de 1,3-DAG (NAGAO *et al.*, 2000). De acordo com estudos toxicológicos, o óleo de DAG possui metabolismo diferente do óleo de TAG, sendo um óleo mais seguro para consumo (KATSURAGI *et al.*, 2004). Mesmo possuindo propriedades físico-químicas semelhantes, tanto em relação ao sabor, no cozimento ou frituras de alimentos, o óleo de DAG tem melhores propriedades nutricionais que o óleo de TAG, que comprovadamente, pode ocasionar doenças quando consumido em excesso, assim, vêm sendo muito utilizado na indústria alimentícia.

Monoacilgliceróis (MAG) são compostos por apenas uma molécula de ácido graxo substituída na hidroxila de uma molécula de glicerol via ligação éster e possui duas formas estequiométricas: 1(3)-MAG e 2-MAG (Figura 3.5) (MATOS, 2010). Assim como os DAG, os MAG também são amplamente empregados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêuticas como promotores de emulsões. Além disso, possuem ótimas propriedades lubrificantes e plastificantes, sendo também utilizados no processo têxtil para produção de plásticos e formulação de óleos para diferentes tipos de máquinas (KAEWTHONG *et al.*, 2005).

Para a soja, teor de óleo encontrado no grão fica em torno de 15% a 22% dependendo das condições ambientais durante a maturação das sementes (ISSARIYAKUL & DALAI, 2014). Deste teor de óleo, YANAI *et al.* (2007), cita que o óleo de soja é composto quase que exclusivamente de triacilglicerídeos, com 97,9%, mas possui também

alguns traços de diacilglicerídeos, 1%. Assim, observando a elevada concentração de triacilglicerídeos presentes no óleo, verifica-se que a soja é uma cultura que, além da sua forte produção, também possui um alto índice de ácidos graxos livres que se destacam na produção de biodiesel.

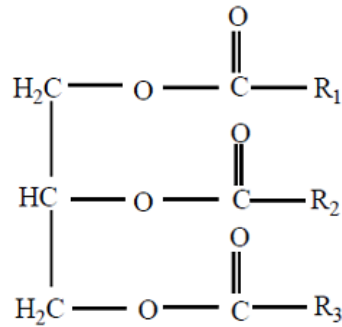


Figura 3.3. Estrutura de um triacilglicerídeo.

Fonte: Adaptado de Almeida (2016).

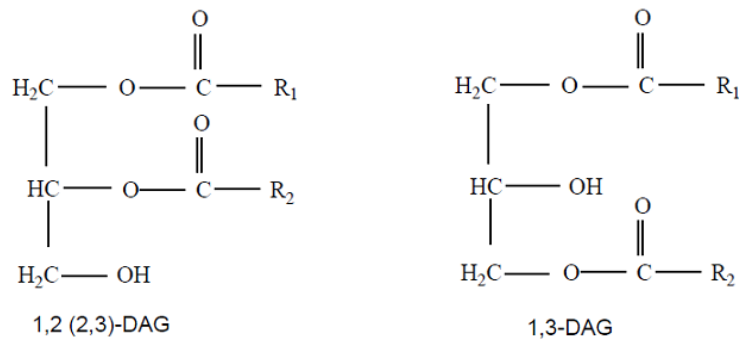


Figura 3.4. Estrutura gerais dos Diacilglicerídeos.

Fonte: Adaptado de Almeida (2016).

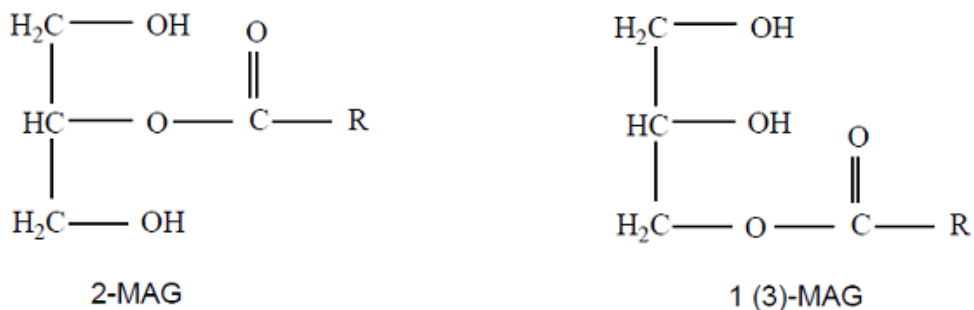


Figura 3.5. Estruturas gerais dos Monoacilglicerídeos.

Fonte: Adaptado de Almeida (2016)

3.2.1. Ácidos Graxos Livres

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias entre 4 e 36 carbonos (BOBBIO & BOBBIO, 1992). São encontrados na natureza nas formas não associadas (ácidos graxos livres) ou associados, formando uma classe de compostos químicos como fosfatídeos e glicerídeos (BABICZ, 2009).

Os ácidos graxos diferenciam-se pelo número de átomos de carbono e pela presença de insaturações (duplas ligações entre os átomos de carbono) em sua cadeia hidrofóbica. Os ácidos graxos que contêm apenas ligação simples entre os átomos de carbono são denominados ácidos graxos saturados. Os ácidos graxos que possuem uma dupla ligação entre os átomos de carbono, são denominados ácidos graxos insaturados e, os que apresentam mais de uma ligação dupla, são conhecidos como poli-insaturados. Além destes, também há possibilidade de formação de isômeros “cis” e “trans”. Contudo, a isomeria do tipo trans não é encontrada naturalmente na formação dos ácidos graxos e seus derivados (BABICZ, 2009), pois é resultante de processos industriais, como na hidrogenação (formação de margarinas) e processos de aquecimento dos óleos vegetais (fritura), sendo assim, prejudiciais à saúde humana.

Os principais ácidos graxos presentes naturalmente em óleos e gorduras são: palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolenico. A representação destes ácidos graxos perante a sua cadeia carbônica pode ser observada, respectivamente, pela Figura 3.6.

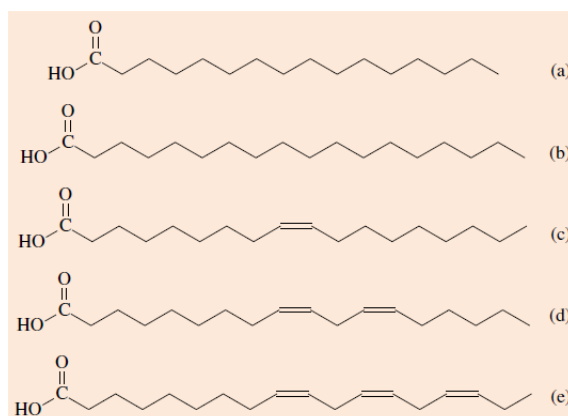


Figura 3.6. Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras: (i) saturados: (a) palmítico com 16 carbonos; (b) esteárico com 18 carbonos; (ii) insaturados com 18 carbonos: (c) oléico com uma ligação dupla; (d) linoleico com duas ligações duplas; (e) linolenico.

Fonte: Ramalho & Suarez (2012).

A nomenclatura dos ácidos graxos se dá pelo comprimento da sua cadeia e pelo número de ligações duplas separadas por dois pontos. Assim, um ácido graxo saturado com 16 carbonos é abreviado para 16:0; o ácido oleico, com 18 carbonos e uma dupla ligação entre o primeiro e o segundo carbono da cadeia é abreviado para 18:1 (BOBBIO & BOBBIO, 1992). As posições das duplas ligações são representadas por números seguidos da inicial do tipo de isomeria, assim, um ácido graxo de 20 carbonos, ligação dupla entre o nono e o décimo carbono (sendo o primeiro o carbono carboxílico), entre o décimo segundo e o décimo terceiro e entre o décimo quinto e o décimo sexto, com isomeria “cis” em todas as ligações, é designado por 20:3 9c12c15c (TAVARES, 2014). A fórmula e nomenclatura dos diferentes ácidos graxos perante a sua cadeia carbônica e o tipo de ligação são representadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Nome e fórmulas de ácidos graxos

Ácido graxo	Nome comum	Fórmula
4:0	Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
6:0	Capróico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8:0	Caprílico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10:0	Cáprico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
12:0	Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
18:1 9c	Oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2 9c 12c	Linoléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 9c 12c15c	α -Linoléico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
22:1 13c	Erúico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

Fonte: Adaptado de Scrimgeour (2005).

De acordo com Lehninger *et al.* (2000), é muito comum a ocultação do tipo de isomeria e da posição duplas ligações, pois o mais usual é que a primeira ou única dupla ligação, normalmente cis se encontra no carbono “9” e as demais duplas ligações (quando

ocorrem) se encontram com um espaçamento constante de 3 carbonos. Além disso, os ácidos graxos também podem ser divididos em famílias ou séries, dependendo da localização da última ligação dupla em relação ao seu grupamento metílico terminal, como: família ômega-6 ($\omega 6$) representada pelo ácido linoleico e a família ômega-3 ($\omega 3$), pelo ácido α -linolenico (CARVALHO *et al.*, 2003). A nomenclatura e a fórmula dos ácidos graxos podem ser observadas pela Tabela 3.3.

O teor de ácidos graxos nos principais óleos vegetais utilizados é representado por Moretto &Fett (1998) na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Teor dos ácidos graxos em óleos vegetais

Óleos	AG	AG	AG	
	Saturado	Monoinsaturado	Ác. Linoléico	Ác. Linolênico
CANOLA	6%	58%	26%	10%
GIRASSOL	11%	2%	69%	-
MILHO	13%	25%	61%	1%
OLIVA	14%	77%	8%	< 1%
SOJA	15%	24%	54%	7%

Fonte: Adaptado de Moretto &Fett(1998).

Os ácidos graxos livres presentes nos óleos e gorduras podem ser convertidos em uma série de produtos de alto valor agregado. Em sua maioria, os óleos vegetais acabam sendo mais utilizados para a alimentação e, atualmente, na produção de biocombustíveis. Por outro lado, os óleos de origem animal acabam tendo mais aplicações industriais, como:

- Oleína animal (ômega 9): utilizada na produção de sabões e sabonetes, bronzeadores, cremes, plastificantes, lubrificantes, entre outros;
- Óleo de fígado de Pescado: utilizado na medicina produzindo remédios que auxiliam na cicatrização e manutenção saudável da pele e na absorção de cálcio pelo corpo. Além disso, também são utilizados nas indústrias de cosmética, entre outros;

- Óleo de Mocotó: dentre outras aplicações, é mais utilizado na indústria frigorífica para amaciar e conservar o couro;
- Óleo de Peixe: utilizado na fabricação de rações para animais e pode servir também como lubrificante de cabos de aço, proteção de madeira e equipamentos aquáticos;
- Óleo de Salmão: utilizado principalmente na fabricação de rações animais;
- Sebo bovino: tem utilização na produção de sabões, rações, conservantes, lubrificantes, entre outros.

Considerando as diferentes origens e aplicações, os óleos e gorduras são transformados industrialmente por diferentes métodos.

3.3. TRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS E SUAS APLICAÇÕES

Os métodos de modificação de óleos e gorduras podem ser divididos em três níveis de intensidade pelas alterações produzidas: fracionamento, interesterificação e hidrogenação. Porém, o fracionamento consiste apenas em uma separação física entre as frações sólida e líquida, obtida normalmente por cristalização parcial (TIMMS, 2005). Desta maneira, os ácidos graxos livres permanecem inalterados. De acordo com Castro *et al.* (2004), a estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser redesenhada por meio da modificação química dos ácidos graxos livres (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e pela reorganização dos ácidos graxos livres na cadeia principal do triacilglicerol (interesterificação).

A interesterificação é normalmente empregada para modificar as características físicas e propriedades das misturas de óleos e gorduras por meio da alteração da distribuição dos grupos glicéricos (CLAUSS, 1996; HAMMOND & GLATZ, 1988). Deste modo, os ácidos graxos livres apenas são redistribuídos nas ligações éster, criando novas estruturas, mas permanecendo quimicamente inalterados. A interesterificação compreende os processos de alcoólise (intercâmbio entre uma gordura e um álcool) e transesterificação (rearranjo dos ácidos graxos livres em triacilgliceróis, alterando as propriedades físicas e químicas da matéria – prima)(HAUMANN, 1994).

A hidrogenação consiste em modificações químicas dos ácidos graxos livres. Segundo Haumann (1994), as ligações éster nos triacilgliceróis não se alteram, mas os

ácidos graxos livres são modificados por saturação, por isomerização espacial (cis-trans) ou por posição (mudança de posição das duplas ligações ao longo da cadeia). A hidrogenação é o método de modificação mais versátil e mais empregado comercialmente para óleos e gorduras com fins alimentícios.

Na hidrólise de óleos e gorduras ocorre a quebra de ligações químicas de uma molécula de triacilglicerol com uma molécula de água. A reação de hidrólise tradicional geralmente é conduzida sob pressão da ordem de 4,83 MPa e temperatura ao redor de 250°C, por um período máximo de 2 horas, obtendo-se rendimentos entre 96 a 99% (BARMEBEY & BROWN, 1948). Os produtos resultantes são ácidos graxos livres e glicerol.

A partir destes processos de modificações das cadeias de triacilgliceróis de óleos e gorduras, os produtos obtidos, além de serem essenciais no consumo alimentício (óleos vegetais refinados, margarinas/manteigas, ração animal) também possuem uma vasta aplicação industrial, como na área farmacêutica - fabricação de medicamentos e cosméticos; na indústria de plastificantes – fabricação de garrafas pets, sacolas plásticas; atuam também na fabricação de tintas, sabões e sabonetes, lubrificantes, etc. Além destas aplicações, óleos e gorduras são muito utilizados na indústria de combustíveis, como para a fabricação biodiesel.

O biodiesel pode ser feito através de diferentes rotas de produção microemulsões, craqueamento térmico (pirólise) e trans/inter/esterificação (MA & HANNA, 1999). Entretanto, o melhor método custo-benefício utilizado industrialmente para produção de biodiesel com maior qualidade é o processo de transesterificação de óleos ou gorduras.

3.4. TRANSESTERIFICAÇÃO

A transesterificação consiste em uma reação reversível entre um triacilglicerol com um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol) que, na presença de um catalisador, produz ésteres e glicerol (Figura 3.7).A sua reação estequiométrica exige 1 mol de um triacilglicerol e 3 moles de álcool, que resulta na produção de 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol, contudo, é utilizado um excesso do álcool a fim de aumentar os rendimentos dos ésteres.

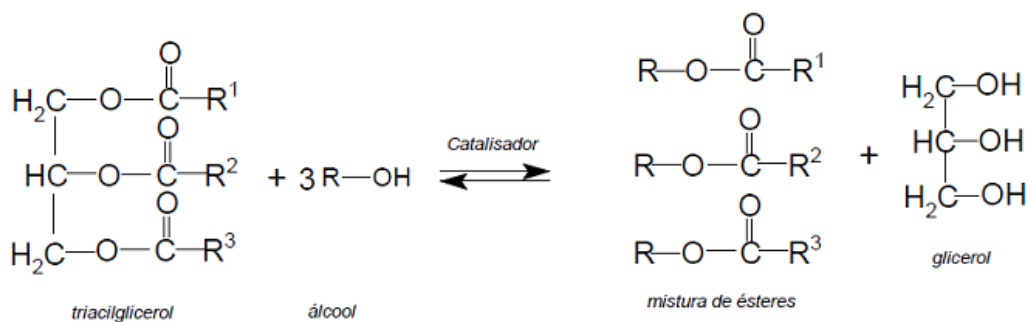


Figura 3.7. Reação de transesterificação de um triacilglicerol.

Fonte: Santos (2016).

O processo de transesterificação tem como objetivo diminuir a viscosidade do óleo para produzir o biodiesel e, para isso, consiste de várias etapas as quais vão desde a preparação da matéria – prima (etapas de neutralização do óleo) até a separação do produto (biodiesel) e subproduto (glicerina) (Figura 3.8).

Os catalisadores utilizados na reação podem ser homogêneos ou heterogêneos, ácidos ou básicos, ou ainda, enzimáticos. No processo de transesterificação os principais catalisadores utilizados são homogêneos, ácidos ou básicos (VICENTE *et al.*, 2004). No entanto, nos processos industriais o emprego da catálise alcalina homogênea é preferível para a transesterificação.

De acordo com Christopher *et al.* (2014), o melhor método para a produção do biodiesel é a transesterificação catalisada por bases homogênea sem função das altas conversões obtidas em um curto período de tempo (30 – 60 minutos) de reação a um menor custo. Entretanto, a catálise alcalina é delimitada pela utilização de matérias – primas com teores de água abaixo de 0,06% (m/m) e de ácidos graxos livres abaixo de 0,5% (m/m) (MA & HANNA, 1999). Estes teores de acidez e umidade são característicos de óleos vegetais refinados. Segundo Meher *et al.* (2006), a reação de transesterificação alcalina não é vantajosa pela utilização de matérias – primas refinadas, pois quanto maior a acidez e o teor de umidade do óleo utilizado, menor será a eficiência de conversão da reação.

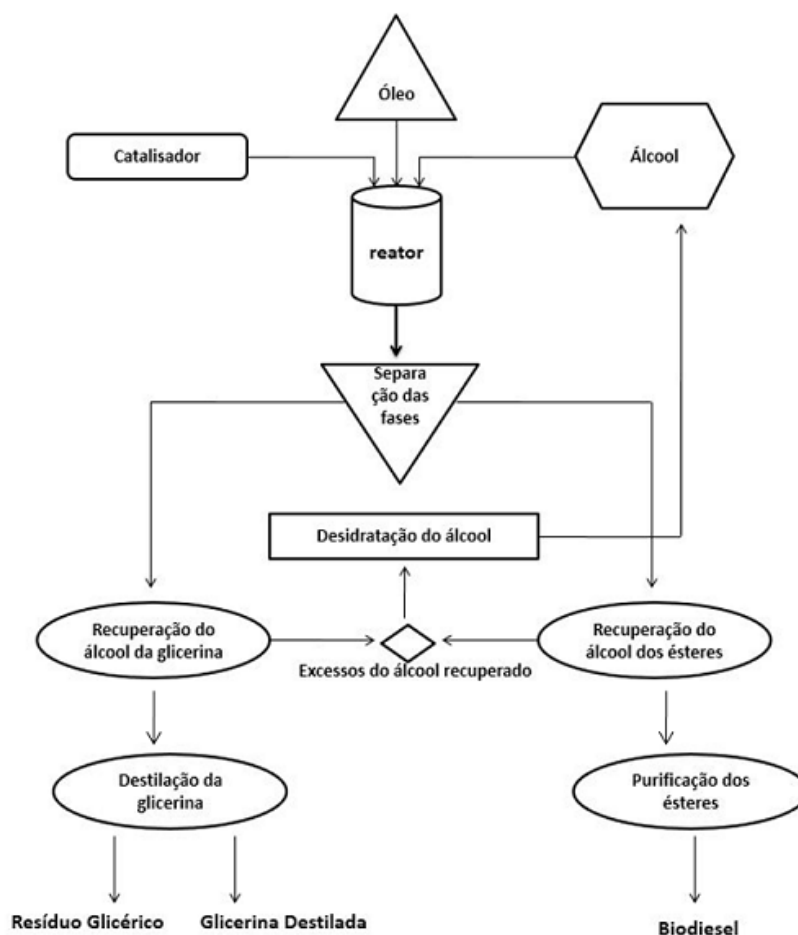


Figura 3.8. Fluxograma do processo de produção de biodiesel via transesterificação.

Fonte: Adaptado de Parente (2003).

A transesterificação catalisada por bases ainda apresenta alguns problemas relacionados ao processo, ocorrendo reações secundárias, como a hidrólise dos triacilgliceróis e a produção de sabões (saponificação dos gliceróis ou dos ésteres formados). Segundo Marx (2016), a hidrólise e a saponificação acontecem quando há um teor de água em excesso no meio reacional. Essas reações secundárias consomem parte do catalisador, interferindo no rendimento da produção de ésteres, já que a saponificação produz água como subproduto, o que conduz a formação de mais sabão ao longo do tempo de reação (MARX, 2016). Desta forma, a hidrólise e a saponificação dificultam o processo de separação do glicerol e a produção do biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006; LEUNG *et al.*, 2010), refletido na qualidade dos produtos finais.

Por estes problemas, ainda há uma grande dificuldade vinculada à produção industrial de biodiesel, pois, além da utilização de matérias – primas com alto valor agregado, o processo em si demanda de muito tempo e energia, implicando em altos custos

para a produção. Com isso, pesquisadores vêm buscando encontrar soluções viáveis para estes problemas. O processo de hidroesterificação é uma rota de produção inovadora que está se mostrando capaz de superar os problemas relacionados ao processo de transesterificação para produção de biodiesel.

3.5. HIDROESTERIFICAÇÃO

A hidroesterificação é um meio de produção de biodiesel que visa resolver os problemas relacionados com o processo de produção tradicional – transesterificação. Nesse sentido, o processo busca utilizar matérias – primas de segunda geração, que contenham elevados teores de água e ácidos graxos livres, tais como gorduras animais, óleos não comestíveis e óleos provindos de resíduos de cozinha (fritura) (NGAOSUWAN *et al.*, 2009). Assim, a hidroesterificação mostra-se como uma rota promissora para produção de biodiesel.

O processo de hidroesterificação consiste na integração entre dois processos reacionais: hidrólise e esterificação. Como nos demais processos, também ocorrem na presença de catalisadores: homogêneos ou heterogêneos; ácidos, básicos ou enzimáticos.

A catálise homogênea diz respeito a processos nos quais um catalisador está em solução com pelo menos um dos reagentes, ou seja, encontra-se misturado no meio. Na catálise heterogênea o catalisador encontra-se em uma fase diferente dos reagentes, normalmente sendo sólido, e assim, para que ocorra reação, um ou mais reagentes se difundem sobre a superfície do catalisador, que então irá adsorvê-los (TEIXEIRA, 2011). Os catalisadores homogêneos mostram obter uma taxa de reação mais alta em comparação com os catalisadores heterogêneos. Contudo, o processo de recuperação do catalisador homogêneo é lento e de alto custo e, parte dele acaba sendo consumido no processo (TAPANES *et al.*, 2008). Desta maneira, os catalisadores heterogêneos tornam-se vantajosos, pois podem ser recuperados por processos mais simples e, em alguns casos, podem ser reutilizados no processo.

A catálise alcalina, muito empregada industrialmente, apresenta algumas restrições quanto na utilização das matérias – primas. Esses catalisadores possuem alta sensibilidade aos ácidos graxos livres, e assim, para bons rendimentos, faz-se a utilização de matérias – primas com baixos teores de acidez (abaixo de 3,0 mgNaOH/g) e umidade (0,1%

m/m)(DEMIRBAS, 2009). Por outro lado, atuam em um curto período de tempo reacional, utilizando temperaturas ambientes, o que diminui os custos com energia.

Na catálise ácida podem ser utilizadas matérias – primas com alto índice de acidez e umidade. Segundo Knothe *et al.* (2005), os catalisadores ácidos proporcionam um rendimento muito elevado (99% de conversão de ésteres), porém, necessitam de altas temperaturas (acima de 100°C) e de um vasto tempo reacional (acima de 24 horas) para alcançar o referido rendimento. Além disso, a catálise ácida necessita de uma razão molar álcool/óleo maior do que a requerida pela síntese alcalina. Os catalisadores homogêneos ácidos mais empregados na produção de biodiesel são os ácidos de Brønsted-Lowry, dentre os quais se incluem o HCl (ácido clorídrico), H₂SO₄(ácido sulfúrico) e ácidos sulfônicos, pois evitam a formação de sabões (SANTOS, 2016).

A catálise enzimática emprega enzimas como biocatalisadores. As enzimas são muito versáteis e possuem propriedades que as tornam vantajosas. Patel (2002) destaca as propriedades de: seletividade e, atuação em condições brandas de temperatura e em pressão atmosférica como as principais propriedades que as tornam altamente requisitadas para a utilização como catalisadores. Perante essas propriedades, o processo de catálise enzimática diminui os problemas associados à utilização de catalisados ácidos ou básicos. Segundo Watanabe *et al.* (2001) e Shimada *et al.* (2002), a produção de biodiesel via catálise enzimática torna-se vantajosa pela não formação de sabão; obtenção de um glicerol mais puro; por ser um processo de produção mais simplificado; por ter menor consumo de energia no processo; pela enzima ser facilmente separada dos produtos e assim, poder ser reciclada e até reutilizada no processo.

Uma reação de hidroesterificação se inicia pelo processo de hidrólise. Na hidrólise o triacilglicerol presente na matéria – prima, na presença de catalisadores, reagirá com água e produzirá ácidos graxos livres e glicerol. Após, o glicerol e a água são separados do meio reacional e os ácidos graxos livres passam para o processo de esterificação, onde, na presença de catalisadores, irão reagir com o álcool, produzindo como produto o biodiesel e como subproduto a água, a qual pode retornar para o processo de hidrólise, fechando o ciclo (Figura 3.9).

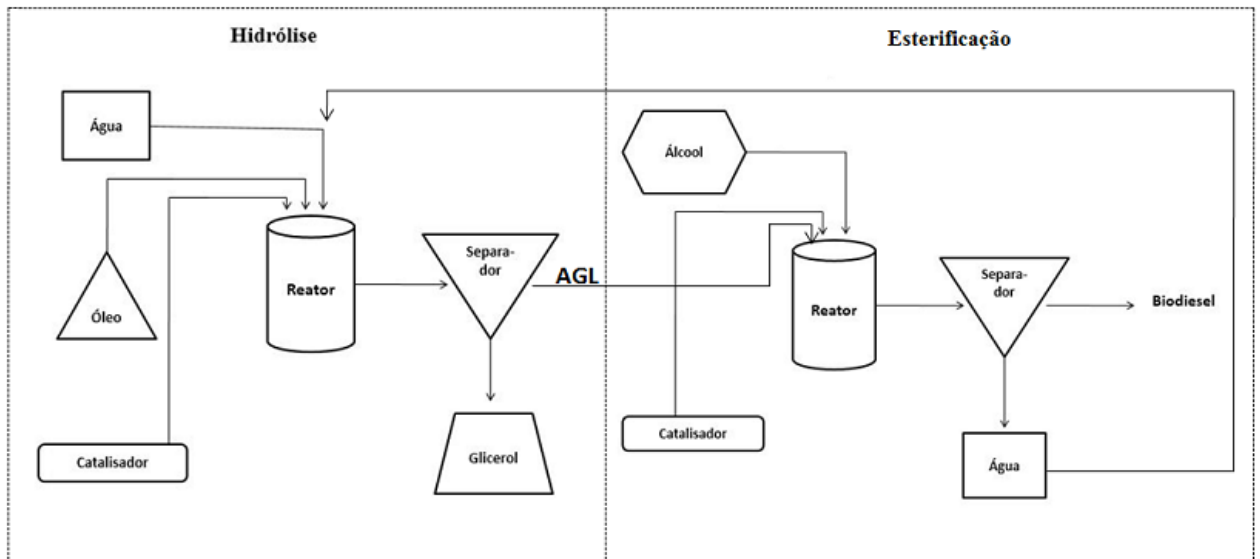


Figura 3.9. Diagrama do processo de Hidroesterificação.

Fonte: Adaptado de Pourzolfaghar (2016).

A principal vantagem da hidroesterificação está contida pela etapa do processo de hidrólise, pois esta etapa permite a utilização de matérias – primas com baixo valor agregado e também permite a produção de um biodiesel com pureza elevada, já que o glicerol é separado e fica contido nesta fase, permitindo assim, o seu uso em outros processos industriais.

3.6. HIDRÓLISE DE ÓLEOS E GORDURAS

A palavra “hidrólise” significa decomposição pela água. Desta maneira, o processo opera na reação entre triacilgliceróis com água, tendo como produtos ácidos graxos livres e glicerol.

O objetivo da hidrólise é a obtenção de um alto teor de ácidos graxos livres (FREIRE, SOUZA & CAVALCANTE-OLIVEIRA, 2011), assim, o processo visa elevar propositalmente a acidez da matéria prima (ENCARNAÇÃO, 2008). Com isso, podem ser utilizadas matérias – primas de baixo valor agregado como gordura animal, resíduos de óleos de frituras, borras ácidas de refino de óleo, bem como óleos vegetais brutos ou refinados, independentemente do teor de acidez e umidade que possuem.

Segundo Moquin & Temelli (2008), o processo completo da hidrólise ocorre em uma sequência de três reações reversíveis, que, em processo intermediário da reação do

triacilglicerol (TAG) à ácidos graxos livres (AGL), formam diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) (Equações 01, 02 e 03).



Inicialmente, o triacilglicerol (TAG) reagirá com a água (H₂O) produzindo ácidos graxos livres (AGL) e diacilglicerol (DAG) (Equação 1). Em seguida, o diacilglicerol (DAG) irá reagir com a água (H₂O), formando ácidos graxos livres (AGL) e monoacilglicerol (MAG) (Equação 2). Por fim, o monoacilglicerol (MAG) vai reagir com a água (H₂O) para então produzir ácidos graxos livres (AGL) e glicerol (G) como produtos finais da reação de hidrólise enzimática (Equação3). De acordo com Silva *et al.* (2011), em cada etapa da reação um mol de ácido graxo livre (AGL) será produzido para cada mol de água consumido. Ademais, ressalta-se que na hidrólise há a possibilidade de ocorrência da síntese reversa das reações, onde o excesso de água no meio reacional tende a deslocar o equilíbrio da reação para a formação de ácidos graxos livres.

O processo tradicional de hidrólise de triacilgliceróis exige que a reação ocorra à temperatura de 250°C ou superiores e com pressão em cerca de 4,82 MPa para obter um alto rendimento de conversão de ácidos graxos livres (98%) (BARNEBEY& BROWN, 1948). Porém, este processo tradicional demanda de uma intensa energia.

A fim de reduzir o consumo de energia e a degradação térmica dos produtos pelo processo tradicional, muitos pesquisadores buscam desenvolver alternativas que minimizem estes problemas. Segundo Feiten (2013), uma reação completa de hidrólise é influenciada por diversos fatores como o tempo de reação, tipo e quantidade de catalisadores, disponibilidade de reagentes para uma reação completa, temperatura, pH, o modelo de reator e as demais tecnologias utilizadas a fim de otimizar o processo.

Diante disto, uma alternativa que vêm a suprir esta necessidade de aperfeiçoar o processo se dá pela utilização de catalisadores enzimáticos na reação de hidrólise.

3.7. ENZIMAS

Enzimas são proteínas formadas por longas cadeias de aminoácidos e possuem em suas estruturas grupos polares como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, os quais são responsáveis pelo seu poder catalítico (LEHNINGER, 1991).

As principais propriedades enzimáticas se dão: pela presença de um sítio ativo e a interação com o substrato, caracterizando sua alta especificidade de atuação; por apresentar ação reversível, catalisando a reação direta e inversa, não modificando o equilíbrio da reação; e pela atuação em temperaturas e pH específicos, tendo seu ponto ótimo de atuação para cada variável. Dentre as vantagens existentes na utilização de enzimas como catalisadores, destaca-se: sua alta especificidade e seletividade, atuando em condições suaves de reação (temperaturas na média de 25 à 30°C). Desta maneira, a utilização de enzimas diminui os custos com energia e evitam a formação de co-produtos indesejados (já que ocorre a síntese de um produto específico), reduzindo os problemas ambientais e toxicológicos relacionados aos processos (COELHO *et al.*, 2008; FARIA, 2010).

As enzimas também são classificadas de acordo com as reações as quais catalisam. Assim, a utilização de enzimas lipolíticas como catalisadores de reações de hidrólise enzimática torna-se vantajosa para o processo.

As lipases são enzimas carboxilesterases, classificadas como glicerol éster hidrolases (E. C. 3.1.1.3). Esse grupo de enzimas catalisam reações de hidrólise dos triacilgliceróis de origem animal ou vegetal na ligação éster, fornecendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (RAMIN, 2007; HASAN *et al.*, 2009). Entretanto, podem atuar sobre a reação inversa, ou seja, na reação de esterificação a partir de um álcool e ácidos graxos livres para fornecer ésteres e uma molécula de água (RAMIN, 2007).

Por provirem de diferentes fontes, as propriedades das lipases podem demonstrar diferentes atividades para os variados substratos. Além disso, as lipases são rotuladas dependendo da especificidade do substrato em dois grupos: 1,3 específicas (hidrolisam ésteres primários, liberando ácidos graxos livres apenas nas posições 1,3 do triacilglicerol), e, não específicas (hidrolisam igualmente as ligações ésteres nas posições 1,3 e também 2 do triacilglicerol). (HASAN *et al.*, 2009). Desta maneira, o processo de hidrólise pode ser

otimizado baseado no seu substrato e na enzima selecionada para tal reação. Essa propriedade regioseletividade é mais conhecida como relação “chave-fechadura”.

A relação “chave-fechadura” das enzimas se dá pela ligação entre o sítio ativo da enzima e o substrato, sendo uma ligação extremamente específica, ou seja, a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu “encaixe” com a proteína. Segundo Molinari (2015), a existência do sítio ativo em uma proteína enzimática, ao ser ligada no substrato, diminui a energia do estado de transição da reação, que leva ao produto desejado.

Babicz (2009) menciona que uma das principais características das lipases é a sua capacidade de atuar apenas quando adsorvidas em uma interface água/óleo, ou seja, em meio à ésteres emulsionados.

Diante de tais características, evidenciam-se a aplicabilidade das lipases como enzimas catalisadoras no processo de hidrólise de óleos e/ou gorduras, tornando o processo vantajoso para produção de biodiesel.

3.7.1. Hidrólise Enzimática

A utilização de enzimas como catalisadores para promover a hidrólise de triacilgliceróis tem sido alvo de muitas pesquisas nos últimos anos. Reações enzimáticas podem ocorrer sob certas condições de pH e temperaturas mais brandas (< 70°C), reduzindo os custos com energia, consumindo menos solvente, fornecendo produtos mais puros e diminuindo o perigo com reações secundárias indesejáveis (SHARMA *et al.*, 2009; LI & WU, 2009). Desta forma, a catálise enzimática torna-se uma alternativa favorável para suprir os problemas relacionados aos processos tradicionais.

De acordo com Merçon (1998), o processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Verger (1997) denomina as lipases como enzimas responsáveis pela hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, estas enzimas são classificadas como hidrolases e atuam sobre as ligações ésteres de tri, di e monoacilgliceróis, sendo ativas na interface água/óleo. Assim, quanto maior a interface água/óleo, maior será a quantidade de

enzima adsorvida, o que acarreta maiores velocidades de reação de hidrólise e elevados índices de acidez.

Para avaliar a cinética de hidrólise enzimática podem ser utilizados diversos modelos de mecanismos. Segundo Sorensen & Novak (1996) o mecanismo de Michaelis – Menten é o mecanismo mais utilizado em cinéticas de hidrólise enzimática, pois fornece a relação entre a velocidade de hidrólise do substrato com a concentração do substrato limitante. Nesse modelo cinético, a enzima é catalisada por um sistema de multi-fase – onde a reação aumenta pela adsorção da enzima sobre a interface água/substrato (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2015). Em suma, é um modelo de equilíbrio para reações enzimáticas que envolve apenas um substrato em um processo de duas etapas: onde a enzima combinada com o substrato vai constituir o complexo enzima-substrato e, a partir deste, produzirá o produto final (Equação 04).



Em que:

E: Enzima

S: Substrato

ES:Complexo enzima-substrato

P: Produto

$k_{(1;2;3)}$:Velocidade específica de reação

A constante de velocidade específica k_2 indica que o processo ainda pode ser reversível. Desta maneira, ao considerar que no processo de hidrólise pode ocorrer a síntese reversa das reações, Gandhi (1995) salienta que as lipases são capazes de catalisar a reação de hidrólise e também sua reação de síntese no sentido inverso de maneira mais eficiente.

Estudos envolvendo lipases em reações de hidrólise vêm sendo documentados pela literatura ao longo dos anos utilizando diferentes enzimas e substratos. Kiatsimkul *et al.*(2006) estudaram 8 diferentes lipases comerciais na hidrólise de óleo de soja em

agitador rotativo e verificaram que a lipase de *C. rugosa* conduziu a um melhor índice de acidez na reação de hidrólise enzimática em 24 horas (25%) seguida da lipase de *A. Níger* (13%). Quando foi realizada hidrólise enzimática do óleo de soja epoxidado, 45% no índice de acidez foram obtidos pela lipase de *B. cepaciae* 23% pela lipase de *C. rugosa*, em 2 horas de reação.

Rodrigues & Ayub (2011) estudaram a hidrólise de óleo de soja com mistura de enzimas comerciais de *T. Lanuginosus* (TLL, Lipolase 100L, imobilizada em Lewatit® VP OC 1600) e *R. Miehei* (RML, Lipozyme RM IM). A condição ótima encontrada foi a razão molar água/óleo 3:1, a 30°C, com 10 horas de reação em um agitador rotativo, utilizando-se 25% de enzima em relação à massa de óleo (razão mássica TLL/RML de 65%) resultando em 95% no índice de acidez.

Pesquisas documentadas na literatura para a hidrólise enzimática de óleos ou gorduras demonstram que os maiores índices de acidez obtidos da utilização de lipases comerciais, geralmente imobilizadas, como catalisadores. Uma destas lipases comerciais imobilizadas que possui alta atividade enzimática e é muito utilizada para a conversão de ésteres de ácidos graxos livres é a enzima Lipozyme TL IM.

3.7.2. Lipozyme TL IM

A Lipozyme®TL é uma lipase extraída do fungo *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e produzida por fermentação submersa do microorganismo *Aspergillus oryzae*. A Lipozyme®TL pode ser encontrada comercialmente tanto em forma líquida (Lipozyme TLL) quanto em forma imobilizada (Lipozyme TL IM) (BABICZ, 2009).

Segundo Rampin (2007) a Lipozyme TL IM é imobilizada em sílica granulada com tamanho de suas partículas variando de 300 µm a 1000 µm e foi desenvolvida inicialmente para reações de interesterificação de óleos vegetais na produção de margarinas.

A Lipozyme TL IM possui sua especificidade pelas posições 1 e 3, isto é, hidrolisa as ligações em triacilgliceróis nos substratos preferencialmente nas posições 1 e 3. Segundo Cavalheiro (2013) a especificidade da enzima ao hidrolisar os ácidos graxos livres se deve ao tipo de aminoácido presente na estrutura do sítio ativo da enzima.

A lipase *Thermomyces lanuginosus* apresenta sítio ativo recoberto por uma tríade catalítica de aminoácidos “Ser (146) – His (258) – Asp (201)”. Estes aminoácidos (Ser –

His – Asp) são resíduos de aminoácidos localizados em pontos relativamente distantes entre si na cadeia peptídica, porém, devido ao dobramento desta cadeia (estrutura terciária), tornam-se estrategicamente próximos no centro ativo, comum no sítio ativo das lipases. Esta tríade de aminoácidos é protegida na molécula por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica em forma de α -hélice (resíduos 86-93) resultando em uma tampa, que, ao interagir com a interface lipídeo/água, sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo. (RAMPIN, 2007; POPPE, 2012;CAVALHEIRO, 2013).

Esta mudança conformacional ocorre na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo e é conhecida como ativação interfacial. De acordo com Poppe (2012) a lipase quando presente em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, tem seu sítio ativo coberto por esta tampa, permanecendo em sua forma fechada e tornando-se inativa. Por outro lado, na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são adsorvidas na interface água/óleo, alterando a sua estrutura enzimática (o que conduz a sua forma aberta), deixando a enzima ativa.

A Tabela 3.5 apresenta a ficha técnica da lipase Lipozyme TL IM, fornecida pela NOVOZYMES.

Tabela 3.5. Ficha técnica da Lipozyme TL IM

Forma	Atividade enzimática	pH ótimo	Temperatura ótima	Substrato específico
Imobilizada	250 IUN/g	6 – 8	50 – 75°C	Ésteres

Fonte: Adaptado de Novozymes (2016).

Devido a estas características, sendo capaz de atuar em uma ampla faixa de pH e temperatura, a Lipozyme TL IM vêm sendo cada vez mais aplicada na hidrólise enzimática de óleos e gorduras. Esta enzima possui sua maior utilização voltada para a indústria alimentícia. Entretanto, a TL IM esta sendo cada vez mais aplicada em outros setores industriais como, por exemplo, para a fabricação de detergentes de roupas em pó, facilitando na remoção das manchas de gorduras (DARIO, 2006) e na indústria de biocombustíveis, sendo alvo de pesquisas como catalisadores para produção de biodiesel em diversos óleos vegetais como de Canola (CAVALHEIRO, 2013); Soja (RAIZER *et al.*, 2014);Palma (BABICZ, 2009); dentre outras oleaginosas.

3.8. AGENTES EMULSIFICANTES

Emulsificante é um composto orgânico que contribui para a estabilidade de uma emulsão devido à sua estrutura molecular anfifílica, a qual envolve dois componentes: um lipofílico, que é solúvel em gordura e solventes apolares, e um hidrofílico, que é solúvel em água (PROENÇA *et al.*, 2006).

Os agentes emulsificantes, com propriedade de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e a água, têm papel fundamental na estabilização de emulsões. As emulsões são dispersões de duas fases líquidas imiscíveis entre si (óleo e água) estabilizadas pela presença de agentes emulsivos, localizados na interface óleo/água. Segundo Oliveira *et al.* (2004), estes compostos não conseguem diminuir a tensão interfacial a ponto de contrariar totalmente a energia livre de superfície provocada pelo aumento da área interfacial. Desta forma as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e, no desenvolvimento tecnológico, procura-se utilizar de meios que possam retardar pelo maior tempo possível a separação das fases.

De acordo com Adamson (1982), quando um surfactante é adicionado ao sistema óleo/água, o sistema espontaneamente adsorve-o na interface provocando a redução da tensão interfacial do sistema. No equilíbrio, a parte polar da molécula do surfactante se orienta em direção à água, e a parte hidrofóbica em direção ao óleo, arranjo que representa um estado de estabilidade favorecido por interações entre os grupos.

Os agentes emulsificantes podem ser divididos em três classes de compostos: materiais naturalmente presentes no óleo, sólidos finamente divididos e compostos tensoativos introduzidos no óleo. A presença de tais agentes garante que a dispersão se mantenha inalterada por um longo período, estabilizando cineticamente a emulsão.

As emulsões podem ser preparadas através de métodos mecânicos como os homogeneizadores e a técnica de ultrassom. Além disso, se faz necessária a adição de agentes emulsificantes (goma arábica), a fim de provocar um abaixamento da tensão interfacial do sistema (KARCHER, 2008).

Todas as técnicas utilizadas para emulsificar uma mistura possuem em comum o mesmo objetivo de formar uma emulsão entre as fases água/óleo. Desta forma, estas técnicas colaboram com a atuação da enzima numa reação de hidrólise enzimática,

umentando a área interfacial da mistura possibilitando uma maior taxa de reação enzimática.

3.9. ESTADO DA ARTE

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres mono-alquílicos produzidos a partir de óleos vegetais, gorduras animais e óleo de algas.

Em escala industrial, o processo mais utilizado para a produção deste biocombustível é a transesterificação, a qual utiliza óleos e gorduras refinadas, com baixos teores de acidez (abaixo de 3,0 mgNaOH/g) e umidade (0,1% m/m) (DEMIRBAS, 2009). A transesterificação ocorre quando o substrato (óleo/gordura), na presença de catalisadores, reage com um álcool produzindo ésteres de ácidos graxos livres e glicerol. Catalisadores químicos são comumente utilizados, e desta maneira, a catálise básica tornou-se o principal meio para a produção industrial de biodiesel. Contudo, o processo ainda apresenta muitos problemas, como a reação de saponificação dos ácidos graxos livres e a significativa geração de água residual durante as fases de separação e purificação do produto. Nesse contexto, são encontrados muitos estudos recentes referentes à transesterificação (Fu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Yahya *et al.*, 2016; Musa, 2016; Marx, 2016).

Sob outra perspectiva, recentemente, estudos vêm propondo a hidroesterificação como uma nova rota para a produção de biodiesel. Este processo ocorre em duas etapas: hidrólise e esterificação. Nesta rota é possível a utilização de matérias – primas graxas com elevados teores de acidez e umidade. Desta forma, a principal vantagem da hidroesterificação em relação à transesterificação se dá pela utilização de matérias primas com alta acidez, não havendo necessidade de realizar seu pré-tratamento por uma reação de neutralização. Além disso, a rota também se torna vantajosa já que também produz água como subproduto final da reação (fase de esterificação), a qual ainda pode ser reutilizada no processo (ARANDA *et al.*, 2009).

Na hidrólise ocorre a reação entre um triacilglicerol com água, produzindo ácidos graxos livres e glicerol. O processo de hidrólise pode ser controlado pelo excesso de água no meio reacional, e assim, ainda há a possibilidade de ocorrer à síntese reversa das reações. Pode-se ressaltar que uma das vantagens do processo de hidroesterificação está

contida na fase de hidrólise, onde o glicerol produzido fica contido nesta fase, não se misturando com o produto final (biodiesel). Desta forma, Encarnação (2008) enfatiza que o glicerol obtido é muito mais puro do que o obtido pelo processo convencional, onde um significativo teor de sais, álcoois e outras impurezas acabam misturando-se no subproduto.

Na hidrólise também são utilizados catalisadores, podendo ser químicos ou enzimáticos. Todavia, pesquisas com catalisadores enzimáticos comerciais destacam-se na literatura. Reações enzimáticas podem ocorrer sob certas condições de pH e temperaturas mais amenas ($< 70^{\circ}\text{C}$), reduzindo os custos com energia, consumindo menos solvente, fornecendo produtos mais puros e diminuindo o perigo com reações secundárias indesejáveis – reações de purificação (SHARMA *et al.*, 2009; LI & WU, 2009), tornando-se vantajosa em comparação à utilização de catalisadores químicos. Contudo, o principal empecilho para a utilização de catalisadores enzimáticos comerciais consiste em fatores econômicos, tendo um alto valor de comercialização.

A cinética da reação de hidrólise enzimática pode ser definida como um mecanismo de Michaelis-Menten (HERMANSYAH *et al.*, 2007). O mecanismo de Michaelis – Menten fornece a relação entre a velocidade de hidrólise do substrato com a concentração do substrato limitante. Nesse modelo de cinética a lipase é catalisada por um sistema de multi-fase – onde a reação aumenta através da adsorção da enzima sobre a interface água/substrato e, após, esta enzima adsorvida pela molécula de substrato produz o complexo enzima-substrato (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2015).

Dentre as enzimas comerciais a Lipozyme TL IM vêm sendo aplicada e documentada em diferentes processos como: transesterificação (KHOR *et al.*, 2010), interesterificação (YANG *et al.*, 2014), hidrólise (CHEW *et al.*, 2008; ZENEVICZ *et al.*, 2016) e esterificação (PALUDO *et al.*, 2014). Segundo a fabricante, Novozymes (2016), a Lipozyme TL IM é uma enzima imobilizada e suas condições ótimas se dão em uma faixa de pH de 6 à 8, em temperatura de 50 à 75°C, tendo especificidade em seu sítio ativo pelas posições 1 e 3, o que eleva seu potencial de atividade hidrolítica.

Nesse sentido, alguns estudos referentes à utilização da enzima Lipozyme TL IM acoplados a outras tecnologias de produção na hidrólise de triacilgliceróis foram localizados na literatura (Tabela 3.6).

Tabela 3.1. Estudos de hidrólise enzimática utilizando a enzima Lipozyme TL IM

Substrato	Condições reacionais					Obs.	Autor	
	Temp. (°C)	pH	Razão molar	Catalisador	Tempo de reação (horas)			Índice de acidez (%)
Óleo de palma		Água	Concenção de óleo:874.76g/l. Água: 3,6% em relação ao substrato.	1g	5		Utilizou modelo ping-pongbi-bi para verificar a inibição da enzima por substrato e água, descrevendo características cinéticas para a hidrólise enzimática. A não inibição da enzima foi dada pelas condições citadas.	Chew <i>et al.</i> (2008)
Óleo de soja	55	8	1:1	Líquido (TLL) 2,3% em relação ao total de substra-to	48	89	Utilizou um modelo DCCR para a hidrólise enzimática. As reações foram realizadas em reator a batelada a 200 rpm.	Cavalcanti-Oliveira <i>et al.</i> (2011)
Óleo de soja	65	Água	1:9	10%	2	95	Testou a hidrólise enzimática com e sem a utilização do banho de ultrassom nas condições citadas, constatando que o melhor índice de acidez se obteve com a utilização do ultrassom na potência de 132W e velocidade de agitação de 600 rpm.	Feiten <i>et al.</i> (2013)
Óleo de soja e resíduo de óleo de fritura	40	Água	1:20	10% em relação à massa da razão molar	2	60(óleo de soja) e 61 (óleo de fritura)	Analizou diferentes razões molares água/óleo e testou a reutilização da enzima na hidrólise enzimática com o uso do ultrassom (132W–300rpm). Conclui que com a utilização do solvente álcool iso-propil o índice de acidez do primeiro ciclofoi 15% maior.	Zenevicz <i>et al.</i> (2016)

4. METOLOGIA

4.1. REAGENTES QUÍMICOS

Como indicador para as medidas de acidez do óleo foi utilizado uma solução de fenolftaleína (Synth®). No processo de medição para diluição da amostra foi utilizado Etanol (Chemco®) e Éter etílico (BIOTEC®) absolutos e, como titulante na determinação da acidez utilizou-se NaOH (Synth®). Estas soluções apresentam grau de pureza acima de 99%.

As soluções tampões foram preparadas com soluções de Fosfato de Sódio Monobásico P.A. e Fosfato de Sódio Dibásico P.A.

A goma arábica (BIOTEC®) foi utilizada como agente emulsificante.

4.2. ENZIMA

A lipase comercial Lipozyme TL IM, na forma imobilizada, foi utilizada como catalisador da reação. Esta enzima é produzida pela Novozymes Biotecnologia Industrial e foi cedida pela LNF Latino Americana.

4.3. ÓLEO DE SOJA

O substrato da reação de hidrólise utilizado neste trabalho foi o óleo de soja refinado da Cocamar, fornecido pelos mercados locais.

4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática da Lipozyme TL IM foi determinada por titulometria, baseada no método proposto por Franken (2007) com adaptações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis.

Inicialmente preparou-se uma emulsão para o meio reacional. Esta emulsão foi composta por solução de Tampão fosfato 50mM pH 7,0, goma arábica 10% e pelo substrato óleo de oliva (1,0 mM ou 7,15 % m/v). O pH da emulsão foi medido e corrigido para 7,0 (com NaOH 0,05 M).

As amostras foram preparadas adicionando 20 mL da emulsão com 1,0 grama de enzima em erlenmeyers de 125 mL e, após, foram incubadas em Shaker, sob agitação de 130 rpm, em um tempo de 20 minutos à temperatura de 37°C. Dado tempo, a reação foi interrompida adicionando-se 20 mL de solução etanol/acetona (1:1 v/v). Desta forma, a amostra foi titulada em solução de NaOH (0,05 M) até atingir pH 10.

A atividade enzimática foi calculada conforme a Equação (05), onde o resultado é expresso em unidades por grama de substrato sólido (U/gSS).

$$A = \left(\sum \frac{\Delta V}{\Delta t} \right) \frac{M_{NaOH} F_c (60seg)}{1000 mL 1 min} \quad (05)$$

Em que:

A: Atividade Enzimática (U/gSS – Unidades por grama de substrato seco)

ΣV : Média dos volumes obtidos em cada tempo

Δt : Variação do tempo de hidrólise

M_{NaOH} : Molaridade da solução de hidróxido de sódio

F_c : Fator de correção do NaOH obtido da padronização

4.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As reações de hidrólise enzimática do óleo de soja foram realizadas em sistema fechado e batelada. Utilizando frascos Erlenmeyer - 125 mL, foram adicionadas as devidas quantidades de razão molar tampão/óleo (pH e substrato) e razão mássica enzima/substrato (quantidade de catalisador). As amostras foram inseridas em uma incubadora refrigerada sob certa velocidade de agitação. Ao final da reação, as amostras foram centrifugadas

por 5 minutos, visando uma melhor separação das fases água/óleo para a quantificação dos ácidos graxos livres.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL)

O percentual de AGL do óleo de soja (ácidos: palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico) foi determinado pelo método de titulação ácido/base Cd3d-63, recomendado pela AOCS (1998). A titulação foi realizada com solução de NaOH. Aproximadamente 1 grama de óleo e 4 gotas de solução de fenolftaleína foram diluídas em 15 mL de uma solução 1:1 Etanol/Éter. Esta solução foi titulada com uma solução de NaOH 1,0 M sob agitação vigorosa até mudança de coloração (mudança súbita de uma coloração branca para rosa). Após, o índice de acidez, o qual está relacionado com a concentração de ácidos graxos livres na amostra, foi quantificado a partir da Equação (06).

$$AGL (\%) = 100 \times \frac{V \times M_{NaOH} \times MM_{AGL}}{m} \quad (06)$$

Em que:

V : volume de solução de NaOH utilizado na titulação (mL);

M_{NaOH} : molaridade da solução de NaOH (mol L^{-1});

MM_{AGL} : massa molar média ponderada dos ácidos graxos do óleo de soja

m : massa da amostra de óleo (g)

4.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados dois planejamentos experimentais: um do tipo Plackett-Burmann e outro do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). Para estes planejamentos as condições de temperatura ($50 - 60^\circ\text{C}$) e pH ($6 - 8$) foram definidas a partir da ficha técnica da enzima, fornecida pela sua fabricante: Novozymes. As condições da razão molar tampão/óleo ($10 - 50:1$) e razão mássica enzima/substrato ($1 - 10\%$) foram

definidas baseando-se em estudos documentados na literatura para a enzima Lipozyme TL IM (FEITEN *et al.*, 2013; ZENEVICZ *et al.*, 2016). Os níveis da velocidade de agitação do reator foram definidos considerando um limite mínimo e máximo para a agitação (o limite máximo foi delimitado pela condição do equipamento: 100 – 150 rpm).

O planejamento Placket-Burmann objetivou avaliar todas as condições operacionais influenciáveis na reação de hidrólise enzimática: temperatura da reação, pH, velocidade de agitação do reator, razão molar tampão/óleo e razão mássica enzima/substrato. A reação ocorreu em um período de 1 hora. Os níveis e experimentos realizados para este planejamento são apresentados na Tabela 4.1. Pelo planejamento, foram verificados os efeitos destas variáveis na reação de hidrólise enzimática.

Após a avaliação de todos os efeitos das condições operacionais sob a reação de hidrólise foi realizado um novo planejamento experimental do tipo DCCR. Este planejamento objetivou realizar uma melhor avaliação dos efeitos que se demonstraram menos significativos pelo planejamento Placket – Burmann: temperatura, pH e razão molar tampão/óleo. Desta forma, as variáveis, avaliadas anteriormente, velocidade de agitação do reator e razão mássica enzima/substrato foram fixadas. A velocidade de agitação foi fixada no nível máximo analisado (150 rpm) e a razão mássica enzima/substrato foi fixada em 1% em relação à massa de óleo. Esta porcentagem mínima de catalisador foi fixada de modo que esta variável não exercesse maior influência na reação sob as demais variáveis e também levando em conta os fatores econômicos associados à utilização de enzimas comerciais. Assim, o planejamento DCCR buscou otimizar a reação de hidrólise enzimática do óleo de soja considerando as variáveis mais econômicas que influenciam no resultado (índice de acidez) do processo. Esta reação de hidrólise enzimática ocorreu em um período de 3 horas. Os níveis e experimentos realizados para este planejamento são apresentados pela Tabela 4.2.

Os resultados destes planejamentos foram verificados pela metodologia de superfície de resposta, utilizando o *software* Statistic 7.1 (FRÉ, 2009), com um nível de significância de 95%.

Tabela 4.1. Planejamento Experimental Placket-Burmann: níveis e experimentos realizados

Ensaio	Valores Codificados/Reais				
	Temp. (°C)	pH	rpm	T/O (% razão molar)	E/S (% razão mássica)
1	1 (60)	1 (8)	1 (150)	-1 (10)	1 (10)
2	-1 (50)	1 (8)	1 (150)	1 (50)	-1 (1)
3	-1 (50)	-1 (6)	1 (150)	1 (50)	1 (10)
4	1 (60)	-1 (6)	-1 (100)	1 (50)	1 (10)
5	-1 (50)	1 (8)	-1 (100)	-1 (10)	1 (10)
6	1 (60)	-1 (6)	1 (150)	-1 (10)	-1 (1)
7	1 (60)	1 (8)	-1 (100)	1 (50)	-1 (1)
8	-1 (50)	-1 (6)	-1 (100)	-1 (10)	-1 (1)
PC	0 (55)	0 (7)	0 (125)	0 (30)	0 (5)

Temp.= temperatura; pH= solução tampão; rpm= velocidade de agitação do reator; T/O= razão molar tampão/óleo; E/S= razão mássica enzima/substrato

Tabela 4.2. Planejamento Experimental DCCR: níveis e experimentos realizados

Ensaio	Valores Codificados/Reais		
	Temp. (°C)	T/O (% razão molar)	pH
1	-1 (40,1)	-1 (26,1)	-1 (6,4)
2	1 (54,9)	-1 (26,1)	-1 (6,4)
3	-1 (40,1)	1 (43,9)	-1 (6,4)
4	1 (54,9)	1 (43,9)	-1 (6,4)
5	-1 (40,1)	-1 (26,1)	1 (7,6)
6	1 (54,9)	-1 (26,1)	1 (7,6)
7	-1 (40,1)	1 (43,9)	1 (7,6)
8	1 (54,9)	1 (43,9)	1 (7,6)
9	-1,68 (35,0)	0 (35,0)	0 (7,0)
10	1,68 (60,0)	0 (35,0)	0 (7,0)
11	0 (47,5)	-1,68 (20,0)	0 (7,0)
12	0 (47,5)	1,68 (50,0)	0 (7,0)
13	0 (47,5)	0 (35,0)	-1,68 (6,0)
14	0 (47,5)	0 (35,0)	1,68 (8,0)
PC1	0 (47,5)	0 (35,0)	0 (7,0)
PC2	0 (47,5)	0 (35,0)	0 (7,0)
PC3	0 (47,5)	0 (35,0)	0 (7,0)

Temp.= temperatura; T/O= razão molar tampão/óleo; pH= solução tampão

4.8. CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA

As cinéticas da hidrólise enzimática do óleo de soja foram realizadas a partir da melhor condição para a velocidade de agitação do reator (Placket – Burmann) e para a melhor condição de temperatura e pH dada pelo ponto ótimo do planejamento experimental DCCR. No total, foram realizadas sete cinéticas variando a razão molar tampão/óleo, a dosagem de enzima e avaliando a utilização de agentes emulsificantes.

A cinética de referência e as cinéticas que avaliaram a utilização de agentes emulsificantes foram realizadas pela condição ótima encontrada no planejamento experimental DCCR (Temp., pH, T/O). A partir desta, variou-se a dosagem de enzima e a razão molar tampão/óleo na hidrólise enzimática do óleo de soja.

Para a cinética de referência, pesou-se, em balança analítica, 23,60000 gramas de massa de óleo diretamente em um reator de vidro (Erlenmeyer - 125 mL). Após, 18,30000 gramas de pH e 0,23000 gramas de enzima (1% de enzima em relação a massa de óleo) (pesados em balança analítica) foram adicionados neste reator. Na cinética variando a dosagem de enzima, adicionaram-se a mesma quantidade para a razão molar tampão/óleo, contudo, inseriu-se 2% (0,46000 gramas) de enzima em relação à massa de óleo. Para as cinéticas que avaliaram a razão molar tampão/óleo, da mesma forma, foram acrescentadas a mesma quantidade de óleo e de enzima utilizados para a curva de referência, mudando a quantidade de pH para as razões molares: 20:1 (9,70000 gramas) e 50:1 (24,30000 gramas). Estas reações foram conduzidas em um reator refrigerado e com agitação mecânica a uma velocidade de agitação de 150 rpm, em 52,2°C. Ao término da reação, as amostras foram centrifugadas para separação das fases água – óleo. Após, pesou-se, em balança analítica, 1,00000 gramas da fase óleo da amostra e avaliou-se o índice de acidez obtido na reação.

4.8.1. Efeito do uso de Agentes Emulsificantes na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja

As cinéticas foram realizadas com a utilização de ultrassom de sonda Ultronique, de potência nominal de 500 W e frequência de ondas ultrassônicas de 20 kHz. As amostras para a hidrólise enzimática do óleo de soja foram previamente preparadas (em frascos de

Erlenmeyer - 125 mL), com a melhor condição de razão molar tampão/óleo (T/O= 37,7:1) e a partir de então, foram emulsificadas pelo ultrassom utilizando a potência máxima do equipamento (99 W) durante 1 minuto. A potência máxima do ultrassom foi utilizada a fim de homogeneizar as fases em um curto período de tempo para que não houvesse influência da temperatura do equipamento na amostra. Após a homogeneização das fases, a enzima (1%) foi inserida na amostra emulsificada e a reação de hidrólise enzimática seguiu no reator refrigerado e com agitação mecânica (52,2°C e 150 rpm).

A cinética que utilizou a goma arábica BIOTEC® simultaneamente com o ultrassom de sonda como agentes emulsificantes também foi previamente preparada. Em um reator de vidro (Erlenmeyer - 125 mL) foi adicionada a razão molar tampão/óleo (37,7:1) e 10% (4,20000 gramas) de goma arábica – esta porcentagem foi determinada a partir de testes iniciais onde a estabilidade da emulsão foi testada com diferentes porcentagens de goma arábica (1 – 5 – 10%). As amostras foram emulsificadas por 10 minutos até a completa homogeneização das fases água – óleo com a goma arábica. Para a adição da enzima foi feito um controle da temperatura na amostra, com um termômetro digital, pois esta era retirada do ultrassom em torno de 80°C. Quando a temperatura da amostra emulsificada atingiu a faixa de 50 – 55°C a enzima (1%) foi adicionada na mistura e a reação seguiu no reator refrigerado e com agitação mecânica (52,2°C e 150 rpm).

A amostra para a cinética realizada somente com a goma arábica como agente emulsificante foi preparada em um reator de vidro (Erlenmeyer - 125 mL) adicionando-se a razão molar tampão/óleo (37,7:1), os 10% de goma arábica e o 1% de enzima. Após, a amostra seguiu para reação de hidrólise enzimática no reator refrigerado e com agitação mecânica (52,2°C e 150 rpm).

Ao término de cada reação as amostras da hidrólise enzimática do óleo de soja foram centrifugadas por 5 minutos, separando as fases água – óleo. Pesou-se, em balança analítica, 1,00000 gramas da amostra de óleo e avaliou-se o índice de acidez obtido pelas reações.

4.9. MODELAGEM MATEMÁTICA

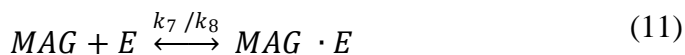
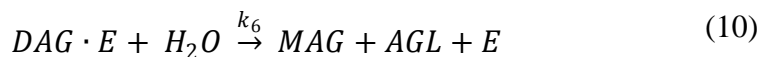
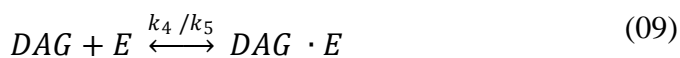
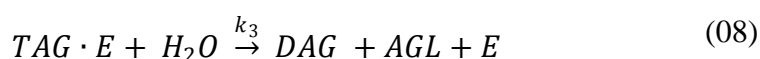
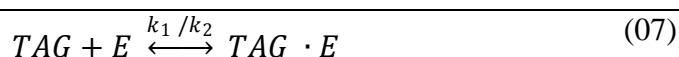
A cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja, em um sistema fechado e em batelada, foi modelada considerando as seguintes hipóteses:

- (i) hipótese do estado pseudo- estacionário(HEPE) para compostos intermediários;
- (ii) reação de hidrólise enzimática definida como um mecanismo de Michaelis – Menten;
- (iii) mistura ideal para a fase líquida;
- (iv) processo isobárico e isotérmico;
- (v) taxa de reação elementar.

O mecanismo de Michaelis – Menten para reações de hidrólise catalisadas por enzimas é descrita pela Equação presente na Tabela 4.3. Este mecanismo considera a adsorção da enzima na interface água-óleo, ligando-se com o substrato (tri, di e monoacilgliceróis) e produzindo o complexo enzima-substrato. Após, este complexo enzima-substrato reagirá com a água e produzirá ácidos graxos livres e glicerol.

O modelo matemático para a cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja foi obtido pela aplicação da lei de conservação de massa (base molar) para todos os compostos. O balanço molar para tri, di e monoacilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos livres são demonstrados pelas Equações (13) – (18), respectivamente.

Tabela 4.3. Mecanismo de Michaelis-Menten para hidrólise enzimática de óleo vegetal



TAG= Triacilglicerol, DAG= diacilglicerol, MAG= monoacilglicerol, AGL= ácidos graxos livres, GL= glicerol, E= enzima, TAG•E, DAG•E, MAG•E = complexo enzima – substrato. k_1 , k_4 , e k_7 = constantes da velocidade específica de adsorção da enzima entre a interface aquosa enzima – substrato, k_2 , k_5 , e k_8 = constantes de velocidade específica de desorção da enzima entre a interface aquosa enzima – substrato, k_3 , k_6 , e k_9 = constantes de velocidade específicas das reações.

$$\frac{dC_{TAG}}{dt}(t) = -k_1 C_{TAG}(t)C_E(t) + k_2 C_{TAG \cdot E}(t) \quad (13)$$

$$\frac{dC_{DAG}}{dt}(t) = k_3 C_{TAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) - k_4 C_{DAG}(t)C_E(t) + k_5 C_{DAG \cdot E}(t) \quad (14)$$

$$\frac{dC_{MAG}}{dt}(t) = k_6 C_{DAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) - k_1 C_{MAG}(t)C_E(t) + k_8 C_{MAG \cdot E}(t) \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{H_2O}}{dt}(t) = & -k_3 C_{TAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) - k_6 C_{DAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) \\ & - k_9 C_{MAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) \end{aligned} \quad (16)$$

$$\frac{dC_{GL}}{dt}(t) = k_9 C_{MAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) \quad (17)$$

$$\frac{dC_{AGL}}{dt}(t) = k_3 C_{TAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) + k_6 C_{DAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) + k_9 C_{MAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) \quad (18)$$

O balanço molar para o complexo enzima-substrato (TAG•E, DAG•E, MAG•E) foi escrito baseado na Hipótese do estado pseudo-estacionário, o qual considera que os reativos intermediários reagem tão rápido quanto são formados, ou seja, a taxa de formação dos reativos intermediários é nula. Com isso, o balanço molar dos complexos enzima-substrato é apresentado pelas Equações (19) – (21).

$$0 = k_1 C_{TAG}(t)C_E(t) - k_2 C_{TAG \cdot E}(t) - k_3 C_{TAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) \quad (19)$$

$$0 = k_4 C_{DAG}(t)C_E(t) - k_5 C_{DAG \cdot E}(t) - k_6 C_{DAG \cdot E}(t)C_{H_2O}(t) \quad (20)$$

$$0 = k_1 C_{MAG}(t) C_E(t) - k_8 C_{MAG \cdot E}(t) - k_9 C_{MAG \cdot E}(t) C_{H_2O}(t) \quad (21)$$

O balanço molar para a enzima livre (E), dado pela Equação (22), foi escrito baseado na concentração do complexo enzima-substrato e na concentração total de enzima (C_E^{total}).

$$C_E(t) = C_E^{total} - C_{TAG \cdot E}(t) - C_{DAG \cdot E}(t) - C_{MAG \cdot E}(t) \quad (22)$$

O modelo matemático, composto pelas Equações (19) - (21) e pelas condições iniciais apresentadas anteriormente, foram solucionadas utilizando o método numérico Rosenbrock pelo software Maple®.

Os valores das constantes de velocidade (k_1, \dots, k_9), foram estimados a partir dos dados experimentais obtidos pela cinética da hidrólise enzimática e a minimização da função objetiva é representada pela Equação (23). O método de otimização Simplex Dowhill desenvolvido por Nelder & Mead (1964) foi utilizado para pesquisar o mínimo da função objetiva.

$$O.F. = \sum_{j=1}^{nc} \sum_{i=1}^{nd} (C_{j,i}^{exp} - C_{j,i}^{mod})^2 \quad (23)$$

Em que:

nc : número de componentes (TAG, DAG, MAG, AGL);

nd : número de dados experimentais;

$C_{j,i}^{exp}$: concentração experimental do componente j ;

$C_{j,i}^{mod}$: concentração do componente j calculado pelo modelo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos pelo estudo da hidrólise enzimática do óleo de soja em função dos planejamentos experimentais e do estudo cinético.

5.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKET-BURMANN

Ensaio, baseados em um planejamento experimental tipo Placket-Burmann, foram realizados com o intuito de avaliar o efeito das condições de temperatura (50-60°C), pH (6-8), velocidade de agitação do reator batelada (100-150), razão molar tampão/óleo (10:1-50:1) e razão mássica enzima/substrato (1-10%) no rendimento da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando a enzima Lipozyme TL IM. Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados do índice de acidez do óleo após a reação de hidrólise para cada ensaio. Nas condições investigadas, o índice de acidez variou de 2 a 27,2%, sendo que a máxima concentração de ácidos graxos livres foi observada na menor temperatura (50°C), no pH mais ácido (6), na maior velocidade de agitação (150 rpm), na maior razão tampão/óleo (50:1) e, finalmente, na maior quantidade de enzima (10%). Embora tenha sido obtido um resultado relativamente baixo para o índice de acidez máximo (27,2%), mesmo utilizando uma enzima com atividade elevada (213,75 U/g), deve-se considerar o curto tempo de reação em que foram realizados os experimentos (1 hora). No processo de hidrólise enzimática, utilizando enzimas comerciais como catalisadores, são desejados resultados com valores no índice de acidez de até, aproximadamente, 99%. AGUIEIRAS *et al.* (2014) avaliaram a hidrólise enzimática (Lipozyme RM IM) do óleo de macaúba e, alcançaram valores no índice de acidez de 99,6% após 6 horas de reação. Em 1 hora de reação foi atingido 76,7% no índice de acidez. Os autores utilizaram alta concentração de óleo (50%) e concentração de tampão (pH 4) para 2,5% de enzima.

Com intuito de avaliar o efeito das condições operacionais investigadas foi utilizado o gráfico de Pareto, o qual é apresentado na Figura 5.1. Este gráfico permite observar que a um nível de significância de 5%, apenas a razão molar tampão/óleo não foi estatisticamente significativa, dentro dos níveis avaliados. Além disto, o gráfico de Pareto indica que maiores valores no índice de acidez podem ser obtidos com maiores valores de

razão mássica enzima/substrato (E/S), velocidade de agitação (rpm), temperatura (temp.) e razão molar tampão/óleo (T/O), bem como com menores valores de pH.

Tabela 5.1. Valores do índice de acidez obtidos para os experimentos do planejamento Placket-Burmann

Ensaio	Valores Codificados/Reais					
	Temp. (°C)	pH	rpm	T/O (% razão molar)	E/S (% razão mássica)	Índice de acidez (%)
1	1 (60)	1 (8)	1 (150)	-1 (10)	1 (10)	22,8 ± 1
2	-1 (50)	1 (8)	1 (150)	1 (50)	-1 (1)	5,8 ± 1
3	-1 (50)	-1 (6)	1 (150)	1 (50)	1 (10)	27,2 ± 0,3
4	1 (60)	-1 (6)	-1 (100)	1 (50)	1 (10)	23,8 ± 2
5	-1 (50)	1 (8)	-1 (100)	-1 (10)	1 (10)	4,8 ± 0,6
6	1 (60)	-1 (6)	1 (150)	-1 (10)	-1 (1)	21,3 ± 3
7	1 (60)	1 (8)	-1 (100)	1 (50)	-1 (1)	2,0 ± 0,4
8	-1 (50)	-1 (6)	-1 (100)	-1 (10)	-1 (1)	2,2 ± 0,2
PC	0 (55)	0 (7)	0 (125)	0 (30)	0 (5)	18,4 ± 0,9

Atividade enzimática = 213 U/g.

Temp.= temperatura;pH= solução tampão; rpm= velocidade de agitação do reator; T/O= razão molar tampão/óleo; E/S= razão mássica enzima/substrato

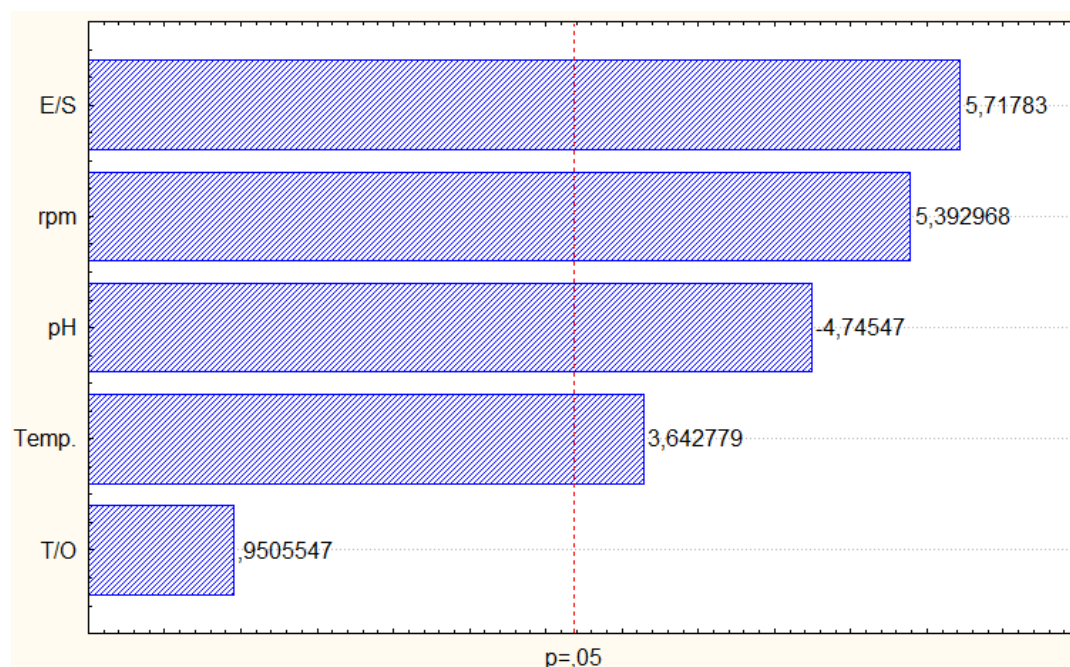


Figura 5.1. Gráfico de pareto na interação dos efeitos das variáveis para o índice de acidez, com um intervalo de 95% de confiança.

Na Tabela 5.2 são apresentados os resultados da análise da variância referente aos resultados do planejamento experimental tipo Placket-Burmann. A partir do teste de Fischer foi verificada a validade do modelo. De acordo com Box & Wetz (1973) para uma regressão ser considerada significativa é sugerido que o valor de F_{calc} seja de 4 a 5 vezes maior que o valor de F_{tab} . Neste trabalho o valor de F_{calc} foi 2,2 vezes maior que o valor de F_{tab} , não demonstrando desejada significância para a regressão, contudo, o valor foi considerado já que $F_{calc} > F_{tab}$. Por outro lado, o valor do coeficiente de determinação obtido para o modelo foi de 0,97, indicando que 97% da variabilidade da resposta (índice de acidez) pode ser explicada pelo modelo, o qual tem como variáveis independentes as condições operacionais testadas (Temp., pH, rpm, T/O, E/S).

Tabela 5.2. Análise da variância

	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	830,9297	5	166,1859	19,70	9,01
Resíduos	25,3151	3	8,4344		
Total	856,2448	8			

$R^2 = 0,97$

O índice de acidez em função das variáveis analisadas pode ser descrito pelo modelo estatístico apresentado na Equação 24. O modelo foi elaborado considerando todos os efeitos analisados neste planejamento experimental.

$$IA = 14,33 + 7,48T - 9,75pH + 11,08rpm + 1,95 T/O + 11,74E/S \quad (24)$$

Em que:

IA : índice de acidez (%);

T : temperatura (°C);

pH : pH;

rpm : velocidade de agitação (rpm);

T/O : razão molar tampão/óleo (%);

E/S : razão mássica enzima/substrato (%).

A Figura 5.2 exibe a distribuição dos valores preditos pelo modelo e os valores observados. Nota-se que os pontos observados e preditos não se distanciam muito da reta identidade, deste modo, torna-se possível afirmar que o modelo segue uma distribuição normal observando que há um bom ajuste. Além do mais, o modelo apresenta a distribuição do erro de forma aleatória, fato que elimina a existência de erros sistemáticos ou de que a análise seja tendenciosa, o que atribui uma maior confiabilidade ao modelo.

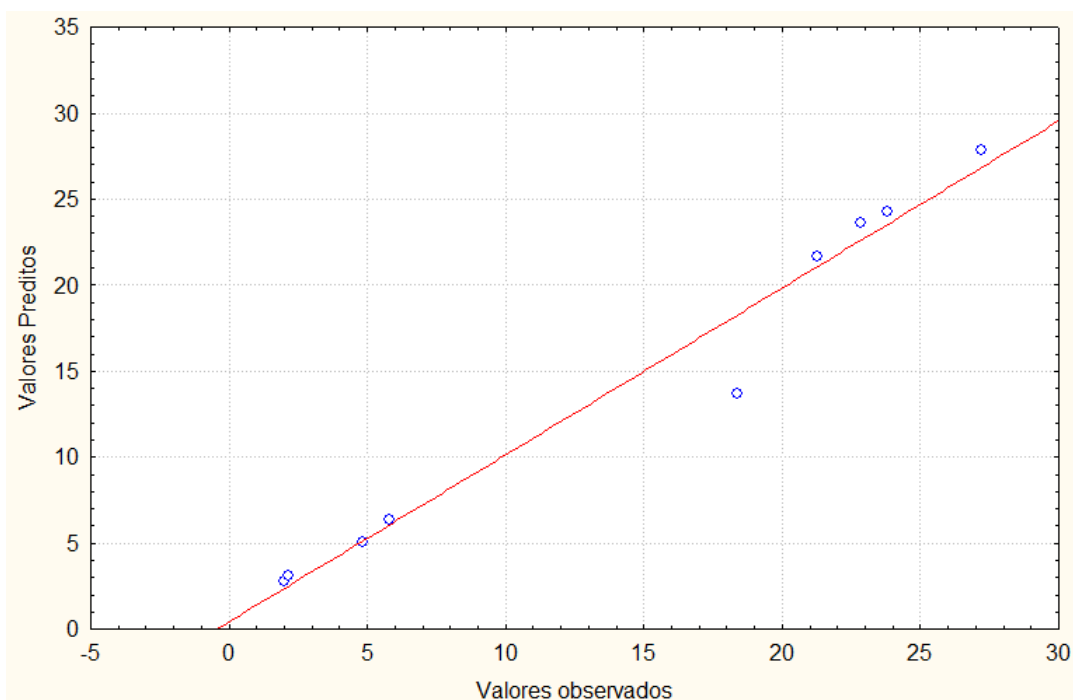


Figura5.2. Distribuição dos valores observados versus valores preditos

Segundo Vulfson (1994) a estabilidade das lipases depende da sua fonte de origem (animais, vegetais ou microbianas), da sua massa molecular, da temperatura e do pH utilizado no processo. Shanley (1998) comenta que as lipases são estáveis em soluções aquosas e neutras à temperatura ambiente, porém a grande maioria possui uma atividade ótima entre 30 – 50°C. Para a enzima Lipozyme TL IM, a fonte de dados disponibilizada pela Novozymes indica que para esta enzima a temperatura ótima poderia variar de 50 à 75°C. Neste estudo o melhor índice de acidez da hidrólise enzimática do óleo de soja pela enzima Lipozyme TL IM encontrou-se dentro da faixa fornecida pelo fabricante, ficando em torno de 52°C. Khor *et al.* (2010) também verificaram o efeito da temperatura (30 à 60°C) e sua estabilidade enzimática na transesterificação do óleo de palma com a enzima TL IM e concluíram que a melhor temperatura ficou em 40°C, e que as reações ocorridas

além desta temperatura ocasionaram uma desativação da atividade enzimática. Observa-se que a melhor temperatura obtida pelo autor encontrou-se abaixo da faixa especificada para a enzima. De acordo com Hayes (2004) propriedades estruturais das lipases podem exibir diferentes atividades enzimáticas para diferentes substratos, assim, qualquer processo enzimático deve ser otimizado baseando-se no seu substrato. Nesse sentido, acredita-se que o diferente substrato (óleo de palma e álcool) utilizado possa ter influenciado para a obtenção da melhor temperatura (40°C) se dar fora da faixa de especificação da enzima.

As enzimas freqüentemente possuem um pH ótimo de atividade catalítica e, valores diferentes destes, podem modificar a sua estrutura tridimensional, levando a uma inativação parcial ou completa de sua atividade (LIU *et al.*, 2008). Assim, o pH pode exercer uma considerável influência na hidrólise enzimática de óleo vegetais. De acordo com a fabricante da Lipozyme TL IM (Novozymes), a sua melhor atividade catalítica encontra-se na faixa de pH 6 à 8. Neste estudo constatou-se que a enzima Lipozyme TL IM teve seus melhores resultados perante o índice de acidez relacionados com a utilização de pH em torno de 6, ficando dentro da faixa especificada pelo fabricante. Contudo, pelo efeito do gráfico de Pareto, para obter um melhor resultado no índice de acidez, deve-se diminuir o pH utilizado na reação. Liu *et al.* (2008) analisaram o efeito do pH (na faixa de 5,2 à 8,3) na hidrólise do óleo de soja com a enzima imobilizada *C. Lipolytica*, temperatura 45°C, em banho de ultrassom. Verificou que a mínima atividade enzimática ocorreu com pH 6,1 e sua máxima atividade se deu com o pH 7,7. Após deste, houve uma ligeira diminuição desta com o aumento do pH até 8,3. Cavalheiro (2013) avaliou o efeito do pH (5 – 8) para as enzimas combinadas Lipozyme RM IM e Calb e também Lipozyme RM IM com a Lipozyme TL IM, tendo óleo de canola como substrato. Foi verificada a enzima Lipozyme RM IM combinada com a Calb, em temperatura de 65,8°C, ativou-se melhor em pH básico de 8,2, por outro lado, a combinação da Lipozyme RM IM com a TL IM, com temperatura de 40°C, teve melhor atividade em pH ácido de 5,3. Desta forma, fica constatado que cada enzima atua em sua faixa de pH específica e assim, a verificação do pH para as reações enzimáticas torna-se essencial para a otimização dos processos. Pelos resultados obtidos com a enzima Lipozyme TL IM, neste estudo e pelo estudo de Cavalheiro (2013), verifica-se que esta enzima, apesar de atuar em uma ampla faixa de pH (6 – 8), obteve sua melhor atividade em pHs mais ácidos (6 e 5,3).

Além disso, foi observado que os maiores valores do índice de acidez foram obtidos com uma maior porcentagem de razão mássica enzima/substrato (10%) e uma maior

velocidade de agitação do reator (150 rpm). Estas duas variáveis geram um impacto de grandeza similar na reação.

A utilização de um catalisador tem por objetivo acelerar a velocidade da reação de hidrólise enzimática. Desta forma, tem-se em vista que quanto maior a razão mássica enzima/substrato utilizada maior seria o índice de acidez obtido em um menor período de tempo reacional. Isso explica a maior significância deste efeito perante as demais variáveis avaliadas no processo. Zenevicz (2015) obteve em seu trabalho a melhor condição da hidrólise enzimática do óleo de soja, com o catalisador Lipozyme TL IM, utilizando 10% de enzima em relação a massa total de água/óleo (20:1) e o nível máximo de velocidade de agitação do reator batelada, 300 rpm. Além disso, a velocidade de agitação também é muito significativa para o estágio inicial da reação, e esta, pode tanto favorecer a atuação do catalisador na reação quanto desfavorecer, tendo em vista que altas velocidades aumentam o cisalhamento sobre a enzima, podendo ocorrer a sua desnaturação e, por consequência desativação. Chew *et al.* (2008) testou o efeito da velocidade da agitação do reator em diferentes níveis de rotação (100; 150; 200; 250; 300), utilizando óleo de palma (razão molar água/óleo 3,6:1) e a enzima Lipozyme TL IM (1 grama), atingindo maiores conversões em ácidos graxos livres para as maiores velocidades de agitação (200, 250 e 300 rpm).

O teor de água desempenha uma importante função na atividade enzimática da lipase. Para que haja sua total atividade catalítica, é necessária a existência de uma interface lipídeo/água e uma adsorção de enzima nesta interface. Contudo, esta interface é crítica, pois mesmo em solventes hidrofóbicos há uma quantidade de água considerada ótima nas circunvizinhanças da enzima, formando a interface essencial para a ativação da lipase (FARIA, 2010; BUENO, 2005). Assim, torna-se essencial avaliar a razão molar água/óleo que mais se adequará à enzima utilizada, pois mesmo com um excesso de água, sua atividade poderá exercer efeito reverso na hidrólise enzimática, podendo desnaturar devido a este excesso (POPPE, 2012). Para este estudo, nas faixas investigadas, observou-se que a razão molar tampão/óleo, não exerceu significativa influência na reação. Cavalheiro (2013) ao estudar a hidrólise do óleo de canola avaliou as variáveis temperatura, pH, quantidade de enzima e difentes razões molares tampão/óleo: 3:1; 7,5:1; 12:1; 16,5:1 e 21:1, utilizando a combinação de enzimas: Lipozyme RM IM com Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM com Calb. Para estas variáveis, observou-se que a razão molar

tampão/óleo também não foi significativa na reação, destacando-se a influência da temperatura sob as outras variáveis.

Em suma, os resultados deste planejamento experimental indicam que, dentre os fatores testados (Temp., pH, rpm, T/O, E/S), apenas a razão molar tampão/óleo não foi estatisticamente significativa (na faixa investigada) e que, em ordem decrescente de significância estatística, os efeitos significativos foram razão mássica enzima/substrato, velocidade de agitação, pH e temperatura.

A razão molar tampão/óleo juntamente com a razão mássica enzima/substrato, são variáveis que podem, dependendo dos níveis utilizados, exercer significativa influência em uma reação de hidrólise enzimática. A enzima irá atuar na reação sob a interface água/óleo (BABICZ, 2009) e, o tipo e a quantidade de catalisador vão influenciar diretamente na velocidade e no índice de acidez da reação. A utilização de enzimas comerciais nos processos de hidrólise enzimática vêm demonstrando ser uma excelente opção de catalisadores, contudo, sua utilização torna-se limitada, geralmente, por fatores econômicos (Lipozyme TL IM = 10 g- R\$ 750,00; SIGMA- ALDRICH, 2016). Desta forma, analisando os fatores econômicos que envolvem as reações enzimáticas e tendo em vista que essas atuam sobre uma interface água/óleo, verifica-se que a melhor opção, a fim de otimizar o processo de hidrólise enzimática do óleo de soja, se dá por buscar uma razão molar tampão/óleo que seja favorável para a atuação da Lipozyme TL IM.

Neste planejamento observou-se que a razão molar tampão/óleo não demonstrou ser significativa para a hidrólise enzimática do óleo de soja. Entretanto, tendo em vista sua importância perante a atuação do catalisador, intervindo no índice de acidez da reação, e considerando os fatores econômicos associados com a utilização da enzima Lipozyme TL IM, um novo planejamento experimental do tipo DCCR foi elaborado com o intuito de avaliar melhor o efeito deste e das demais variáveis que influenciam no processo, mas, que neste planejamento, não demonstraram maior significância: temperatura, pH e razão molar tampão/óleo. Além de avaliar melhor o efeito destas variáveis, o planejamento DCCR objetivou otimizar o resultado do índice de acidez pelas variáveis analisadas, utilizando uma porcentagem mínima de enzima (considerando o seu alto custo para o processo) na hidrólise enzimática do óleo de soja.

5.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR – DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Ensaio, baseados em um planejamento experimental tipo DCCR, foram realizados com o intuito de avaliar o efeito das condições de temperatura (35 – 60°C), pH (6 - 8) e razão molar tampão/óleo (20:1-50:1) no rendimento do resultado (índice de acidez) da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando a enzima Lipozyme TL IM. Ademais, também objetivou-se elevar o índice de acidez do processo com a otimização destas variáveis, a fim de utilizar a menor razão mássica enzima/substrato e diminuir os custos envolvidos no processo com a utilização de catalisadores enzimáticos comerciais. Desta forma, nestes ensaios, foram fixadas a razão mássica de enzima/substrato em 1% de catalisador em relação à massa de óleo utilizada e a velocidade de agitação em 150 rpm. Embora os resultados do planejamento Placket-Burmann tenham sugerido um aumento da temperatura e do pH, para este planejamento foi considerada apenas a faixa de valores indicados pela ficha técnica da enzima Lipozyme TL IM, fornecida pela Novozymes. Por outro lado, como indicado nos resultados anteriores, e, tendo em vista a forte influência que a razão molar água/óleo (tampão/óleo) exerce sob a atividade enzimática (SHARMA *et al.*, 2009) a sua faixa de estudo foi aumentada para uma melhor análise desta variável na reação.

Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados do índice de acidez do óleo após a reação de hidrólise para cada ensaio (tempo reacional = 3 horas). Nas condições investigadas, o índice de acidez variou de 6,3 a 43,8%, sendo que a máxima concentração de ácidos graxos livres foi observada em condições próximas dos limites mínimos (Temp.= 50°C; pH=6,4) e máximos (T/O= 43,9:1;) das variáveis.

Com intuito de analisar o efeito das condições operacionais avaliadas neste planejamento foi utilizado o gráfico de Pareto, o qual é apresentado na Figura 5.3. Este gráfico permite observar que, a um nível de significância de 5%, a temperatura, o pH e a sua interação demonstraram ser significativos no processo, por outro lado, a razão molar tampão/óleo, bem como as suas interações com os outras variáveis, não demonstra ser significativa para este planejamento. Além disso, o gráfico de Pareto indica que podem ser obtidos maiores valores no índice de acidez com a diminuição dos valores para todas as variáveis analisadas.

Na Tabela 5.4 são apresentados os coeficientes do modelo estatístico bem como os *p*-valores de cada fator. Baseado nos *p*-valores, com um nível de significância de 5%, foi verificado que as variáveis temperatura e pH, bem como sua interação, são estatisticamente significativas, pois apresentam *p*-valores menores que 0,05. Nesse sentido, também verifica-se que a razão molar tampão/óleo não demonstrou-se significativa no processo, entretanto, apresenta *p*-valores relativamente baixos, podendo ser considerados no modelo.

Na Tabela 5.5 são apresentados os resultados da análise da variância referente aos resultados do DCCR. A partir do teste de Fischer foi verificada a validade do modelo, uma vez que o valor de *F*_{calc} demonstrou-se 6,20 vezes maior que o valor de *F*_{tab}, sendo assim, considerado um modelo significativo conforme Box & Wetz (1973).

Tabela 5.3. Valores do índice de acidez do óleo de soja hidrolisado conforme condições de um planejamento experimental DCCR

Ensaio	Valores Codificados/Reais			
	Temp. (°C)	T/O (% razão molar)	pH	Índice de acidez (%)
1	-1 (40,1)	-1 (26,1)	-1 (6,4)	35,61
2	1 (54,9)	-1 (26,1)	-1 (6,4)	39,47
3	-1 (40,1)	1 (43,9)	-1 (6,4)	35,28
4	1 (54,9)	1 (43,9)	-1 (6,4)	43,75
5	-1 (40,1)	-1 (26,1)	1 (7,6)	33,02
6	1 (54,9)	-1 (26,1)	1 (7,6)	8,74
7	-1 (40,1)	1 (43,9)	1 (7,6)	35,99
8	1 (54,9)	1 (43,9)	1 (7,6)	6,3
9	-1,68 (35,0)	0 (35,0)	0 (7,0)	34,37
10	1,68 (60,0)	0 (35,0)	0 (7,0)	11,77
11	0 (47,5)	-1,68 (20,0)	0 (7,0)	40,25
12	0 (47,5)	1,68 (50,0)	0 (7,0)	31,69
13	0 (47,5)	0 (35,0)	-1,68 (6,0)	37,13
14	0 (47,5)	0 (35,0)	1,68 (8,0)	10,62
PC1	0 (47,5)	0 (35,0)	0 (7,0)	41,29
PC2	0 (47,5)	0 (35,0)	0 (7,0)	36,56
PC3	0 (47,5)	0 (35,0)	0 (7,0)	38,15

Atividade enzimática = 213 U/g.

Temp.= temperatura; T/O= razão molar tampão/óleo; pH= solução tampão

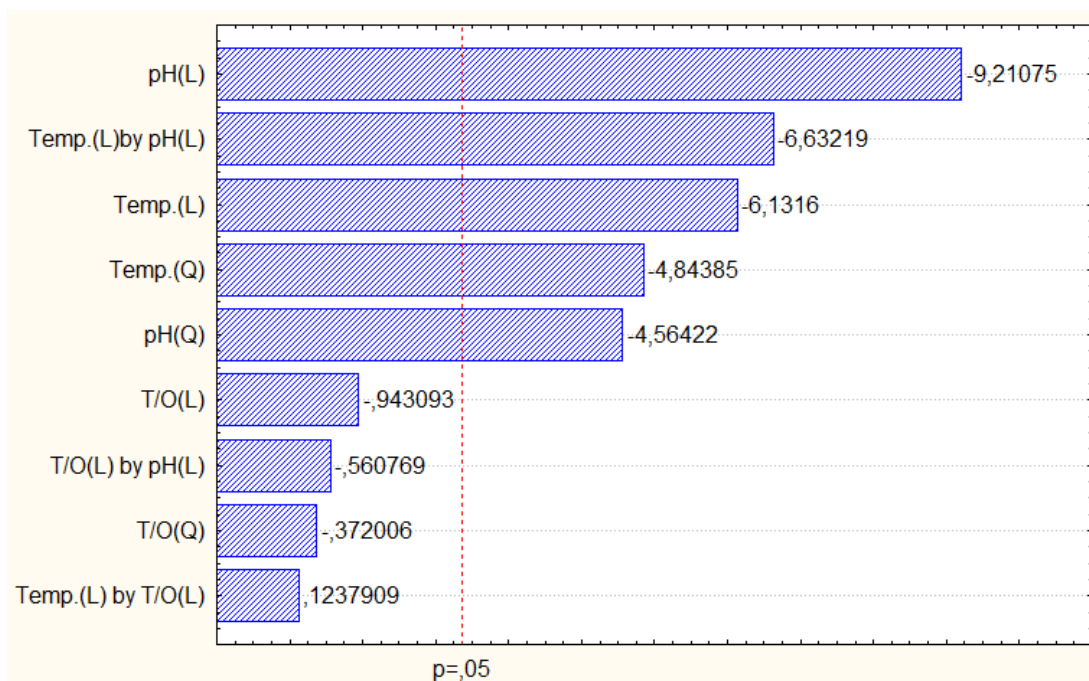


Figura 5.3. Gráfico de Pareto na interação dos efeitos das variáveis para o índice de acidez, com um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 5.4. Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez, para um intervalo de confiança de 95%.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coeficiente
Média/Intercepto.	38,4925	1,974768	0,000000	38,4925
Temperatura (L)	-11,3791	1,855820	0,000476	-5,68957
Temperatura (Q)	-9,9033	2,044515	0,001869	-4,95166
T/O (L)	-1,7502	1,855820	0,377036	-0,87511
T/O (Q)	-0,7606	2,044515	0,720894	-0,38029
pH (L)	-17,0935	1,855820	0,000037	-8,54674
pH (Q)	-9,3316	2,044515	0,002592	-4,66581
Temp. (L) by T/O (L)	0,3000	2,423676	0,904960	0,15001
Temp.(L) by pH(L)	-16,0743	2,423676	0,000295	-8,03714
A/O (L) by pH (L)	-1,3591	2,423676	0,592443	-0,67956

Tabela 5.5. Análise da variância do planejamento DCCR, para um intervalo de confiança de 95%

	SQ	GL	QM	Fcal.	Ftab.
Regressão	3213,329	9	357,0365394	22,84303	3,68
Resíduos	109,460	7	15,63		
Total	3322,789	16			

$$R^2 = 0,97$$

O valor coeficiente de determinação obtido para o modelo foi de 0,97, indicando 97% da variabilidade da resposta (índice de acidez) pode ser explicada pelo modelo, o qual tem como variáveis independentes as condições operacionais testadas e significativas (Temp., pH).

A Equação 25 descreve o modelo estatístico para o índice de acidez (IA), dentro dos níveis investigados, em função de todas as variáveis analisadas (Temp., pH e razão molar tampão/óleo).

$$IA = 38,49 - 5,69T - 4,95T^2 - 0,86 T/O - 0,38 T/O^2 - 8,55pH - 4,66pH^2 + 0,15T T/O - 8,04T pH - 0,68T/O pH \quad (25)$$

Na Figura 5.4 está demonstrada a distribuição dos valores preditos pelo modelo e os valores observados. A distribuição dos valores preditos versus os valores observados tem por objetivo indicar o ajuste ou a falta de ajuste do modelo. Desta forma, pode-se observar que há um bom ajuste, uma vez que os pontos dos valores são encontrados em torno da reta identidade, assim, torna-se possível afirmar que o modelo segue uma distribuição normal. Além disso, também observar-se que a distribuição do erro é aleatória, descartando a existência de erros sistemáticos ou que a análise seja tendenciosa, o que nesse sentido, confere uma maior confiabilidade ao modelo.

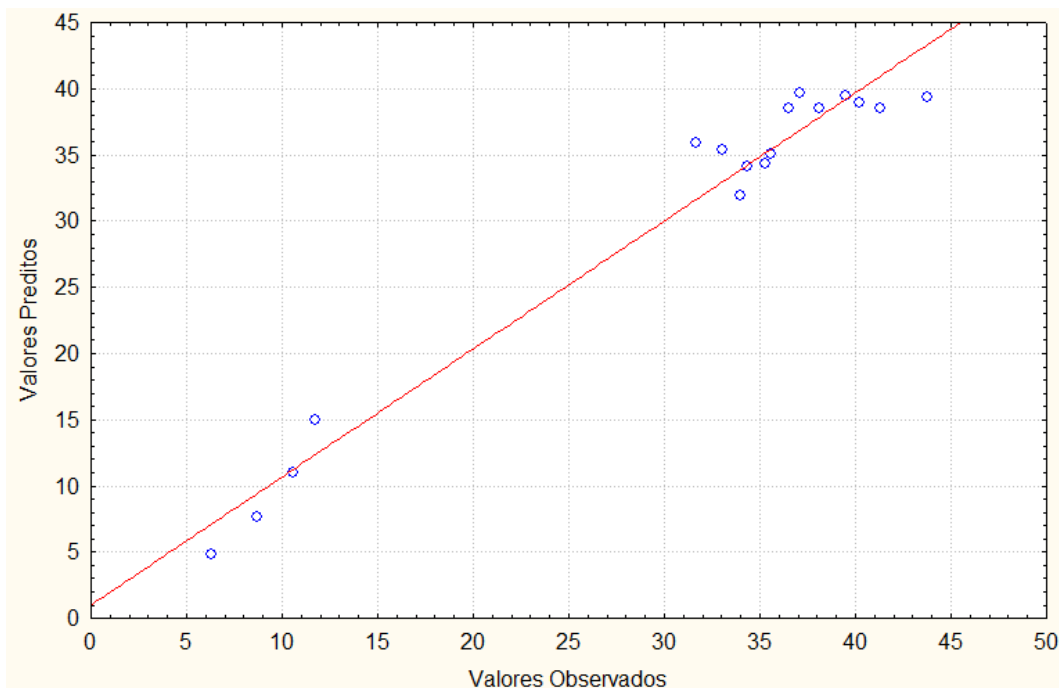


Figura 5.4. Distribuição dos valores observados versus valores preditos.

Nas Figuras 5.5 a 5.7 são apresentadas as superfícies de resposta referente aos resultados do DCCR. Na Figura 5.5 é possível verificar a influência da temperatura e do pH sob o índice de acidez. Observa-se que os resultados mais significativos no índice de acidez da hidrólise do óleo de soja foram obtidos por temperatura na faixa de 44 – 55°C e pH na faixa de 6 – 7 (na faixa mais ácida). A Figura 5.6 representa a influência da temperatura e da razão molar tampão/óleo sob o índice de acidez, na qual é possível notar que a representação dos melhores resultados são indicados pela temperatura de, aproximadamente, 50°C (temperatura) e para razão molar tampão/óleo em uma faixa de 25:1 – 40:1. Na Figura 5.7 é demonstrada a influência do pH e da razão molar tampão/óleo sob o índice de acidez, observando-se que os melhores resultados para o índice de acidez da hidrólise enzimática do óleo de soja encontra-se sob a faixa de pH 6 – 7 e de razão molar tampão/óleo na faixa de 25:1 – 40:1. De uma maneira geral, foi verificado que os melhores pontos da superfície de respostas foram atingidos em condições de pH mais ácido, temperatura próxima ao limite estudado e razão molar tampão/óleo sob uma faixa mais na média analisada.

A partir do modelo estatístico, representado pela Equação 25, foram determinadas a condição ótima de temperatura (52,2°C), pH (6,1) e razão molar tampão/óleo (37,7:1), na qual, segundo o modelo, é obtido um índice de acidez de 42,9%. Para validação desta

resposta foi realizada uma triplicata experimental, nestas condições, na qual obteve-se um valor de índice de acidez de $41,3 \pm 0,8$ %, constatando assim a validade da predição do modelo, pois o desvio observado, entre modelo e experimental, foi de 4% aproximadamente.

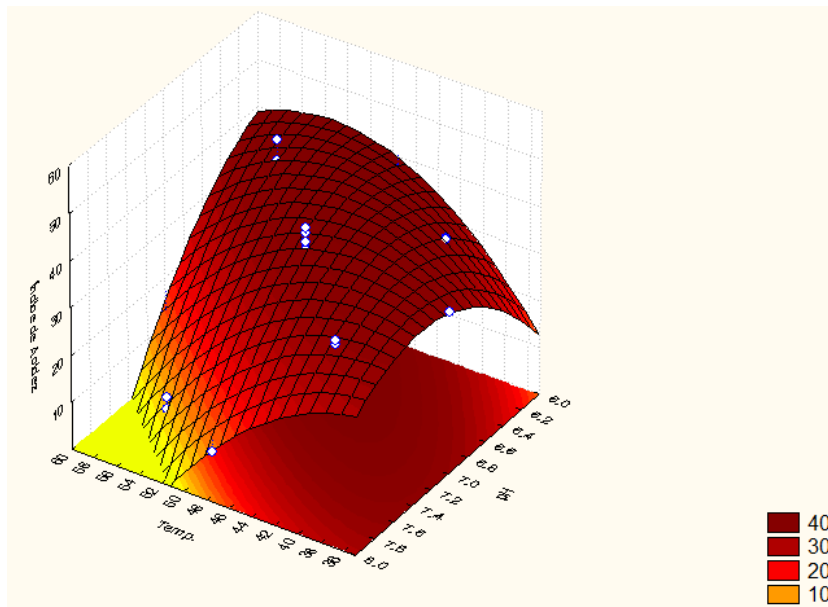


Figura 5.5. Superfície de resposta para o índice de acidez em função da temperatura e do pH

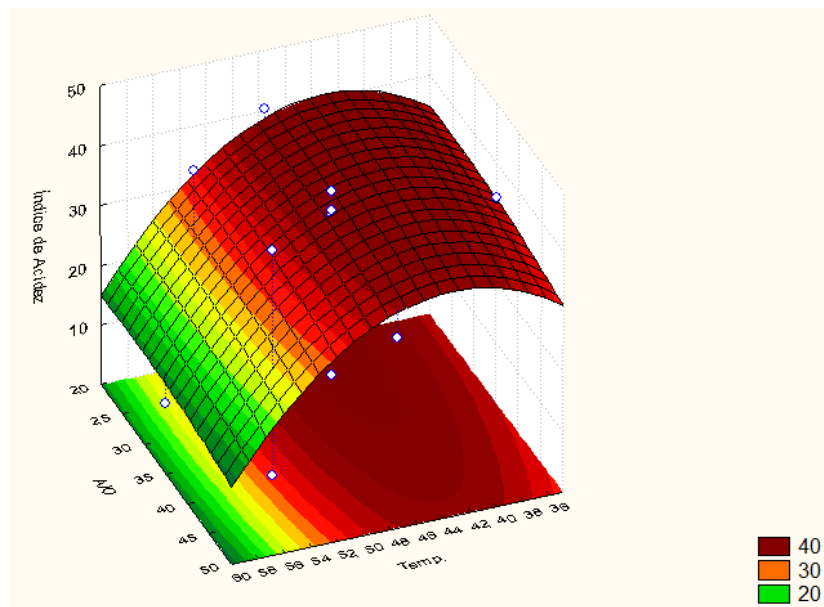


Figura 5.6. Superfície de resposta para o índice de acidez em função da temperatura e da razão água/óleo

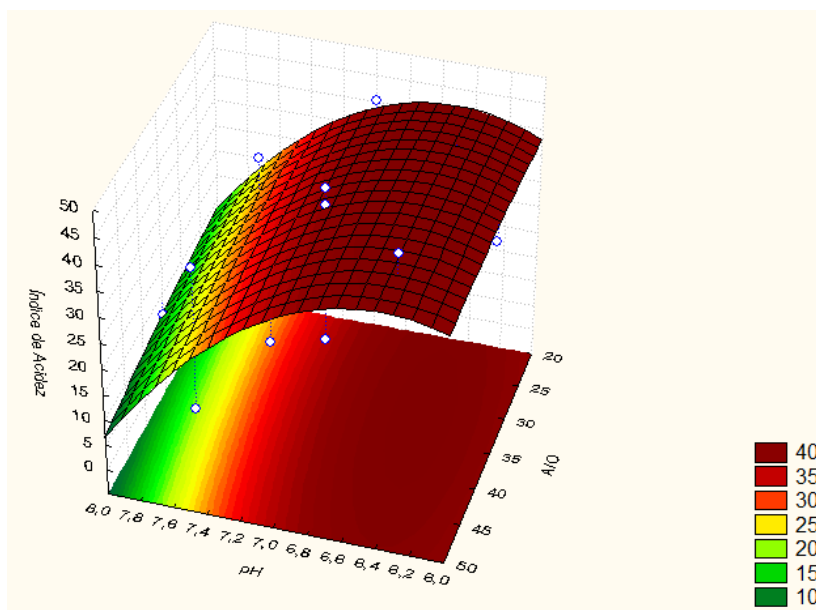


Figura 5.7. Superfície de resposta para o índice de acidez em função do pH e da razão água/óleo

Na Tabela 5.6 são apresentados os valores das melhores condições obtidas por diferentes pesquisadores para a hidrólise enzimática com enzimas comerciais, sendo que estas reações ocorreram em reatores à batelada e sem a utilização de demais tecnologias (como uso do ultrassom). Nota-se, principalmente, a diferença na melhor condição de temperatura para as enzimas utilizadas. Contudo, considera-se o fato das enzimas apresentarem-se em diferentes condições de razão molar água/óleo e razão mássica enzima/substrato.

Tabela 5.6. Reações de hidrólise enzimática

Óleo	Catalisador (Enzimas)	Condições Avaliadas	Melhores condições	Índice de acidez	Referência
Óleo de soja	Lipozyme TLL	Temp. Conc. óleo Conc. enz.	Temp.: 55°C; Conc. óleo: 4,9 g Conc. enz.: 2,3%	89%	CAVALCANTE-OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011
Óleo de girassol	Lecitase Ultra	Conc. enz. Conc. óleo	Conc enz: 5% Conc. óleo:29,4 g	16,74%	RAIZER <i>et al.</i> , (2014)
Óleo de canola	Lipozyme RM-IM Combinada com CALB, Novozyme435	Temp. pH Conc. enz. R. m. T/O	Temp.: 65,8°C pH: 8,2 Conc. enz.: 18,75% R. m. T/O: 18,75:1	58%	CAVALHEIRO (2013)
Óleo de soja	Lipozyme TL IM	Temp. pH Conc. enz. (r. mas.) R. m. T/O Rpm	Temp.: 52,2°C pH: 6,1 Conc. enz (r. mas.): 1% R. m. T/O: 37,7:1 rpm: 150 rpm	41,3 %	FOCKING (2017)

Temp = temperatura; Conc. óleo= concentração de óleo; Conc. enz.(r. mas.)= concentração de enzima (razão mássica); R. m. T/O = razão molar tampão/óleo; rpm= velocidade de agitação do reator

Verifica-se que no geral, a temperatura utilizada para as enzimas comerciais se dá entre 40 – 60°C, mas, pela ficha técnica da Lipozyme TL IM, a enzima pode atuar entre 50 – 75°C. A avaliação na temperatura obtida por CAVALCANTE-OLIVEIRA *et al.*(2011) (Lipozyme TLL), demonstrou que a enzima obteve sua melhor condição de temperatura um pouco acima (55°C) da melhor condição de temperatura obtida por este estudo (52,2°C). Desta maneira, considera-se que a hidrólise enzimática do óleo de soja foi conduzido sob a atuação da Lipozyme TL IM na sua média de temperatura ótima. A melhor condição de temperatura avaliada por Cavalheiro (2013) demonstrou atingir uma temperatura bem acima das demais temperaturas avaliadas por outros autores. Contudo, esta temperatura (65,8°C) encontra-se na faixa de temperatura ótima especificada para as enzimas comerciais. Acredita-se que essa maior temperatura tenha sido obtida pelo fato de que o autor utilizou uma combinação de duas enzimas comerciais (que possuem diferentes faixas de atuação para temperatura ótima pelas suas fichas técnicas) para a hidrólise enzimática do óleo de canola.

A razão molar tampão/óleo (água/óleo), onde se insere a concentração de óleo, é um fator que possui muita influência na reação, e assim, é muito variável dependendo do substrato e do catalisador utilizado. As razões molares ótimas citadas pelos autores demonstraram-se ser valores bem abaixo do valor para a razão molar utilizada no devido estudo (37,7:1). Além disso, somente Cavalheiro (2013) utilizou solução tampão (pH) para a razão molar água/óleo, os demais autores utilizaram água nas suas avaliações (pH neutro).Entretanto, para a hidrólise enzimática do óleo de soja, a razão molar de 37,7:1 demonstrou ser eficiente para reações, considerando a utilização 1% de enzima, o baixo tempo de reação (3 horas) e um considerável índice de acidez (41,3%) alcançado nestas condições.

Outro fator muito avaliado para estas enzimas é o pH. Considerando que para cada enzima a faixa deste fator é diferente, e que, cada substrato utilizado também influenciará na utilização desta variável, considera-se que o pH ótimo (6,1) obtido neste trabalho foi muito favorável para a reação de hidrólise enzimática do óleo de soja, ficando na média especificada pela ficha técnica da enzima Lipozyme TL IM.

A concentração de enzima tem um papel muito significativo nas reações de hidrólise enzimática, grande parte dos autores constata que quanto uma maior concentração de catalisador maior será o índice de acidez resultante. Contudo, a busca por minimizar sua concentração na reação (levando em conta principalmente os fatores econômicos) leva a

estudos mais aprofundados sobre os outros fatores influenciáveis no processo. Neste planejamento, constata-se que mesmo utilizando um valor muito baixo de enzima (1% em relação à massa de óleo) os resultados no índice de acidez obtiveram significativas porcentagens, chegando a $41,3 \pm 0,8 \%$, para um tempo de 3 horas.

Nesse sentido, a fim de melhor avaliar o desempenho da enzima Lipozyme TL IM na hidrólise do óleo de soja, bem como verificar a existência de desativação da enzima durante a reação, foram realizados ensaios cinéticos na condição ótima, definida a partir do DCCR.

5.3. CINÉTICA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA

Na Figura 5.8 é apresentada a cinética de hidrólise do óleo de soja, empregando a enzima Lipozyme TL IM, em termos do índice de acidez. Estes dados foram obtidos em condições determinadas a partir do DCCR (Temp., pH e T/O) e, em condições previamente fixadas (rpm e E/S). Basicamente, podem ser observadas quatro regiões na curva cinética. Na primeira (0 – 1 hora) há um aumento rápido do índice de acidez (1 → 30%) no óleo de soja. Na segunda região (1 – 6 horas) observa-se uma diminuição da taxa de reação (diminuição da inclinação considerando a projeção de uma reta sobre os pontos), e uma elevação de 25% no índice de acidez (30 → 55%). Na terceira região (6 – 18 horas), o índice de acidez manteve seu aumento em 23,5% no índice de acidez (55 → 78,5%). Finalmente, na quarta região (tempo > 18 horas), verifica-se que a reação de hidrólise tende a atingir a condição de equilíbrio, alcançando 82,4% no índice de acidez final em um tempo de 24 horas. Esta condição de equilíbrio pode ser observada pela elevação de apenas 4% no índice de acidez (78,5 → 82,4%).

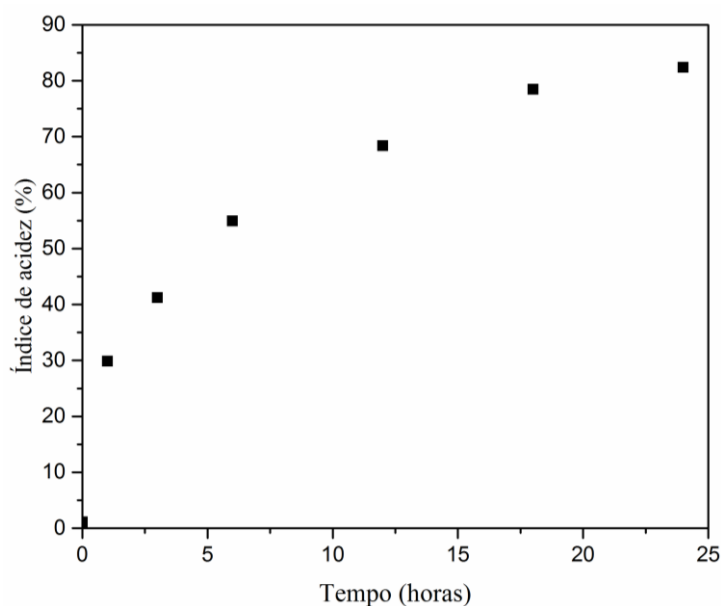


Figura 5.8. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja ($T = 52,2^{\circ}\text{C}$, 150 rpm, $T/O = 37,7:1$, $\text{pH} = 6,1$, $E/S = 1\%$).

Basri *et al.* (2013) obtiveram dados da cinética da reação de transesterificação em um reator a batelada, tendo como substrato o óleo de palma e como catalisador a enzima Lipozyme TL IM. O experimento foi conduzido nas seguintes condições: razão molar óleo/álcool = 1:3, 250 rpm, temp.= 50°C , $E/S = 24,7\%$. Em um tempo de 3 horas, foi obtido o maior valor na síntese de ésteres (79,54%). Na faixa de 3-5 horas observou-se leves variações nos resultados e, a partir de 5 horas de reação constatou-se a estabilização da conversão de ésteres, atingindo o equilíbrio da cinética enzimática da reação de transesterificação. Para a hidrólise enzimática do óleo de soja os maiores valores do índice de acidez foram obtidos por um tempo muito elevado de reação (24 horas para o valor de 82,4%) quando comparado aos resultados reportados por Basri et al. (2013) (79,54% de conversão de ésteres em 3 horas de reação).

Milliren *et al.* (2013) avaliaram a cinética da hidrólise do óleo de soja em água supercrítica sem a utilização de catalisador. Obtiveram dados nas temperaturas de 250, 275 e 300°C , utilizado uma razão molar água/óleo de 4:1 e uma agitação de 700 rpm. Foi adicionado 10% de ácido caprílico ao óleo de soja. A reação foi conduzida a alta pressão sob adição de gás nitrogênio. A temperatura que conduziu a uma maior velocidade de reação foi de 300°C , levando 40 minutos para atingir o maior valor no índice de acidez, Enquanto para as demais temperaturas, 275 e 250°C , o mesmo índice de acidez foi atingido com 60 e 100 minutos, respectivamente. De acordo com Falcão(2011), os fluidos

supercríticos como solventes não aquosos possuem viscosidades e difusividades intermediárias entre gases e líquidos. Além disso, tensões superficiais aproximadamente nulas permitem a fácil penetração destes solventes em materiais macro e microporosos. Em função destas características, os fluídos supercríticos são atrativos para reações que envolvem de transferência de massa, como é o caso da hidrólise enzimática. Desta forma, verifica-se que o curto período de reação (40 minutos) da hidrólise do óleo de soja com um maior índice de acidez foi obtido pela utilização deste meio de produção. No entanto, deve-se ressaltar que o processo supercrítico demanda de uma significativa quantidade de energia.

Phuah *et al.* (2012) avaliaram a cinética da hidrólise enzimática do óleo de palma utilizando a enzima Lipozyme RM IM visando, principalmente, a obtenção de um óleo rico em diacilgliceróis. A cinética foi realizada na temperatura de 55°C, utilizando 10% de razão mássica enzima/substrato, razão molar água/óleo 5:1 e com velocidade de agitação de 500 rpm. Em 6 horas de reação foi obtido o máximo índice de diacilgliceróis (31%). Observa-se que esta cinética utilizou uma temperatura um pouco acima (55°C) da temperatura avaliada para a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja (52,2°C). Contudo, a velocidade de agitação do reator foi muito maior (500 rpm) do que a utilizada para o presente trabalho (150 rpm), fator que pode ter contribuído para acelerar a velocidade da reação de hidrólise enzimática do óleo de palma. Além disso, outro fator que pode ter exercido grande influência para este resultado se dá pela utilização de 10% de enzima em relação à razão molar água/óleo. Para a cinética de hidrólise enzimática do óleo foi utilizado 1% de enzima. Desta forma, a dosagem de enzima deve ter influenciado diretamente na velocidade da reação da hidrólise enzimática do óleo de soja.

O processo tradicional de hidrólise exige a utilização de alta temperatura e pressão, sendo conduzido geralmente por temperaturas de 250°C ou mais, sob pressão na ordem de 4,83 Mpa por, no máximo, 2 horas de reação. Este processo geralmente conduz a uma alta conversão (98%) (BARNEBEY& BROWN, 1948). Entretanto, este processo demanda de intensiva energia.

Os catalisadores enzimáticos são utilizados nas reações de hidrólise visando reduzir o alto consumo de energia que se tem pelo processo tradicional. Nesse sentido, as reações de hidrólise enzimática são conduzidas em condições de temperaturas amenas (<70°C) e pressão atmosférica. No entanto, um dos principais problemas associados a hidrólise enzimática de óleos vegetais se dá pela lenta taxa de reação, que mesmo em longos

períodos de tempo, atinge baixos índices de acidez. Desta maneira, buscando acelerar a velocidade da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja, obtendo uma melhor mistura das fases água/óleo (interface de atuação da enzima), foram testadas o efeito de agentes para emulsificar a mistura água/óleo.

5.3.1. Efeito do uso de Agentes Emulsificantes na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja

Foram realizados experimentos cinéticos para avaliar o efeito de agentes emulsificantes (ultrassom de sonda e/ou goma arábica) na cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja.

Na Figura 5.9 são apresentadas as curvas cinéticas para a hidrólise enzimática com a utilização do ultrassom, com a utilização simultânea de ultrassom e goma arábica e com a utilização de goma arábica, além da curva cinética sem a utilização de nenhum agente emulsificante. Verificou-se que a cinética realizada utilizando o ultrassom praticamente não sofreu mudanças no comportamento do índice de acidez comparando-se com a cinética sem a utilização de nenhum agente emulsificante (curva de referência). Desta maneira, considera-se que somente a utilização da agitação mecânica na reação pode ter sido suficiente na avaliação das condições operacionais estabelecidas para a hidrólise enzimática do óleo de soja.

Comparando a curva cinética obtida com uso de ultrassom e goma arábica (simultaneamente) com a curva de referência verificou-se uma diminuição acentuada da produção de ácidos graxos livres. O mesmo pode ser constatado ao observar a curva cinética obtida somente com a presença de goma arábica.

Em suma, constatou-se que as utilizações dos agentes emulsificantes não aumentaram a velocidade da reação e que, além disso, a utilização da goma arábica na hidrólise enzimática do óleo de soja pode ter inibido a atuação da enzima Lipozyme TL IM na interface tampão/óleo da mistura.

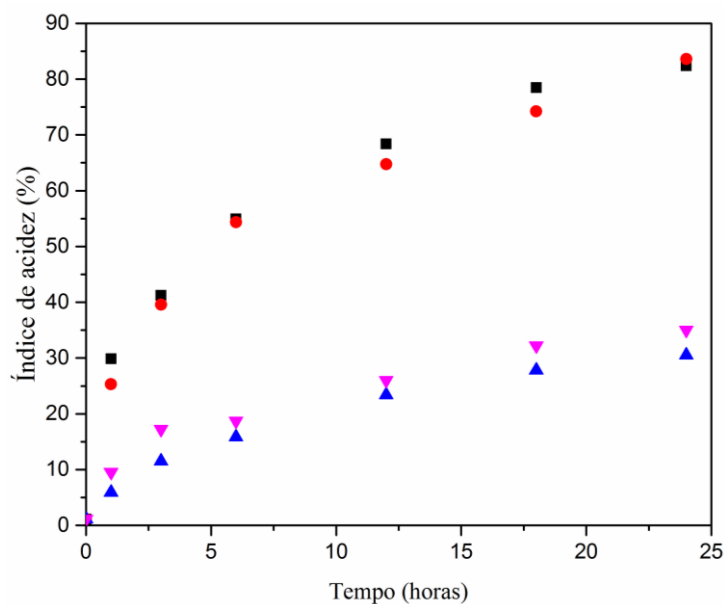


Figura 5.9. (■) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja sem agente emulsificante; (●) Cinética da hidrólise enzimática utilizando ultrassom; (▲) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando ultrassom e agente emulsificante; (▼) Cinética da hidrólise enzimática utilizando somente agente emulsificante (T = 52,2°C, 150 rpm, T/O = 37,7:1, pH= 6,1, E/S= 1%).

De acordo com Ji *et al.* (2006), as ondas de ultrassom são conhecidas como uma ferramenta que visa aumentar a transferência de massa de sistemas heterogêneos líquido-líquido. Desta forma, as tecnologias de ultrassom visam acelerar a velocidade das reações químicas. No entanto, neste trabalho, a utilização do ultrassom de sonda não demonstrou-se ser satisfatória para o objetivo de elevar a velocidade da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja.

Trabalhos que avaliaram a utilização do banho de ultrassom na hidrólise enzimática são documentados pela literatura (LIU *et al.*, 2008; REINEHR *et al.*, 2014; FEITEN *et al.*, 2013; ZENEVICZ *et al.*, 2016). Nestes trabalhos, os autores utilizam o banho de ultrassom juntamente com agitação mecânica para as reações de hidrólise enzimática. Por outro lado, neste trabalho, foi utilizado um ultrassom de sonda na preparação previa das amostras (emulsificação das fases água/óleo). Desta forma, a utilização do ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de soja diferencia-se da utilização do banho de ultrassom demonstrados pelos demais trabalhos. Para a hidrólise enzimática do óleo de soja as amostras foram previamente preparadas, sendo emulsificadas pelo ultrassom de sonda. Após a mistura ser homogeneizada a amostra foi retirada do ultrassom. Para dar continuidade ao processo de hidrólise enzimática, inseriu-se a enzima na amostra emulsificada e, desta maneira, as amostras foram colocadas no reator a batelada para a

devida reação. Nota-se que, diferentemente de outros autores, o ultrassom não foi utilizado na presença da enzima e juntamente com a agitação mecânica em todo o processo de hidrólise enzimática do óleo de soja. Segundo Özbek & Ülgen (2000) a exposição direta de enzimas a ondas ultrassônicas de alta potência por períodos prolongados pode resultar na desativação enzimática parcial ou total.

Zeneviz *et al.* (2016) avaliaram a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja empregando a enzima Lipozyme TL IM. Os experimentos foram conduzidos a partir das melhores condições obtidas: razão molar água/óleo 20:1, 40°C, velocidade de agitação de 300 rpm, utilizando banho de ultrassom na potência de 132W. Utilizou-se 10% de enzima em relação à massa de substrato. Nestas mesmas condições, também foi realizada outra cinética sem a utilização do banho de ultrassom, a fim de comparar a sua influência no processo. Na presença do banho de ultrassom, o melhor valor do índice de acidez da hidrólise do óleo de soja foi obtido com 2 horas de reação, chegando a 60%. Após esse tempo, este valor no índice de acidez manteve-se constante até o final da cinética (24 horas). Para a cinética realizada sem a presença do ultrassom, este mesmo valor de índice de acidez (60%) foi obtido somente com 16 horas de reação. Observa-se que a utilização do banho de ultrassom juntamente com a agitação mecânica na hidrólise enzimática demonstrou ser favorável para o objetivo de acelerar a velocidade da reação, diminuindo 14 horas de reação para a obtenção de um resultado mais elevado. Este aumento de velocidade reacional não foi observado no devido estudo. Acredita-se que a utilização do ultrassom não interferiu na elevação da velocidade da reação pelo fato de que sua utilização ocorreu previamente, para a preparação da amostra, não acompanhando toda a reação de hidrólise enzimática, como foi analisado por Zeneviz *et al.* (2016).

Para avaliar o efeito da goma arábica como agente emulsificante na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja foram realizadas duas cinéticas: utilizando goma arábica e ultrassom e utilizando somente goma arábica (Figura 5.9). Os emulsificantes apresentam em sua estrutura química segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, espacialmente separados, e, em função destas características, reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis (água/óleo), permitindo a sua mistura e a formação da emulsão (SANTOS, 2008). De acordo com Leong *et al.* (2009) a utilização de agentes surfactantes em conjunto com o ultrassom objetivando formar emulsões de sistemas água/óleo aumentam a estabilidade e diminuem o diâmetro médio da fase dispersa. Nestas reações, as amostras foram previamente preparadas. Na cinética com a utilização do ultrassom a goma

arábica foi emulsificada pelo ultrassom na mistura das fases tampão/óleo, após, adicionou-se a enzima e o processo de hidrólise enzimática seguiu no reator. Na cinética em que utilizou-se somente a goma arábica, esta foi adicionada a mistura de tampão/óleo (sem haver mistura prévia), e posteriormente, a enzima foi adicionada e a hidrólise seguiu o processo no reator. Verificou-se que em ambas cinéticas a utilização da goma arábica demonstrou-se ineficiente para o objetivo de acelerar a velocidade da reação. Além do mais, notou-se um acentuado decaimento no índice de acidez (em uma média de 50%) destas cinéticas em comparação com a cinética da hidrólise enzimática de referência. Por este resultado, acredita-se que a goma arábica possa ter inibido a atividade enzimática da Lipozyme TL IM.

Noor *et al.* (2003) avaliaram o efeito da goma arábica ($1 - 50 \text{ mg/L}^{-1}$) na hidrólise enzimática do óleo de palma utilizando uma enzima em solução líquida (lipase-SP398) nas condições de 40°C , pH 6 (50 mL), 2,5% em massa de óleo e velocidade de agitação em um agitador com pás de hélice de 1000 rpm. A goma arábica foi adicionada na amostra depois que esta atingiu a temperatura desejada para a hidrólise (40°C) e, posteriormente, a enzima foi adicionada. Os autores observaram que inicialmente houve um aumento da velocidade na reação da hidrólise enzimática com a utilização da goma arábica até a concentração de 25 mg/L^{-1} . A partir desta concentração, a atividade enzimática não exerceu mais efeito na reação da hidrólise enzimática do óleo de palma. Para a hidrólise enzimática do óleo de soja foram utilizados 10% de goma arábica em relação à massa de substrato (4,2 g), constatando o baixo índice de acidez nos resultados obtidos. Verifica-se que para o presente estudo utilizou-se um valor muito alto comparado ao valor de goma arábica utilizado pelo autor, que constatou o decréscimo na velocidade da reação para concentrações maiores que 25 mg/L^{-1} de goma arábica na mistura. Além disso, deve-se considerar que a reação de hidrólise enzimática do óleo de soja ocorreu a uma velocidade de agitação muito pequena (150 rpm) quando compara com a velocidade de agitação utilizada para a hidrólise enzimática do óleo de palma (1000 rpm). Esta variável pode ter influenciado significativamente no que diz respeito à mistura da goma arábica na amostra. Outro fator que pode ter contribuído para a aceleração da velocidade de reação do estudo de Noor *et al.*, (2003) é o fato da enzima utilizada estar em sua forma líquida, o que a manteve facilmente misturada na amostra. Acredita-se que a goma arábica tenha elevado a tensão superficial na interface tampão/óleo, impedindo a atuação da enzima nesta interface.

No que diz respeito à indústria de alimentos, Jurado *et al.* (2008) realizaram estudos cinéticos da hidrólise enzimática emulsificada da tributirina com a enzima Lipozyme TLL. As amostras foram emulsionadas com agitação mecânica (13 000 rpm durante 1 minuto). As amostras continham 15 mL de substrato em pH 7, 1 mL de enzima e para o teste da goma arábica, utilizou-se 0,1 grama de goma arábica por mL de tributirina. Os autores verificaram que a enzima Lipozyme TLL demonstrou ser de 3 a 4 vezes mais ativa nas amostras de tributirina emulsionadas com a goma arábica. Concluíram que a goma arábica, nas condições analisadas, não exerceu nenhuma interferência significativa pelo contato com a lipase, pelo contrário, exercendo um efeito positivo sobre a sua atividade. Este resultado que pode ser atribuído ao aumento da área interfacial da emulsão de tributirina. Diferentemente deste resultado, no presente estudo da hidrólise enzimática do óleo de soja, a goma arábica demonstrou influenciar significativamente na atividade enzimática da Lipozyme TL IM (Figura 5.9).

Para verificar a influência da utilização da goma arábica na referente hidrólise enzimática do óleo de soja, foram testadas diferentes dosagens de goma arábica (1, 5 e 10%) – nas mesmas condições anteriormente verificadas, por um período reacional de 3 horas (Figura 5.10).

Na Figura 5.10 é possível notar que para a utilização de 1% de goma arábica o índice de acidez na hidrólise enzimática do óleo de soja demonstrou-se mais elevado (38,84%) em relação aos índices de acidez para utilização de 5 e 10% de goma arábica, 26,25% e 17,21 % respectivamente. Verificando a evidente queda nos índices de acidez para o aumento das dosagens de goma arábica, evidenciado-se a possível ação inibitória da goma arábica na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando a enzima Lipozyme TL IM.

Verificando que a utilização dos agentes emulsificantes testados (ultrassom e goma arábica não aumentaram a velocidade da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja novas curvas cinéticas foram obtidas alterando a dosagem de catalisador (enzima Lipozyme TL IM).

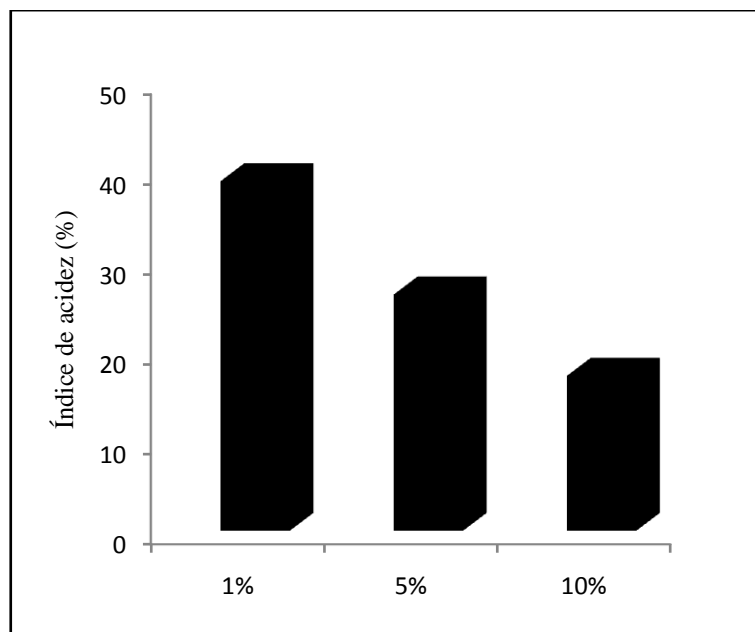


Figura 5.10. Gráfico demonstrativo da inibição da atividade enzimática pelo uso da goma arábica

5.3.2. Efeito da dosagem de Enzima na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja

Para avaliar o efeito da dosagem da enzima na cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja, foram obtidos dados cinéticos utilizando condições de razão molar tampão/óleo igual a 37,7:1 e 2% de enzima, os quais estão apresentados na Figura 5.11. Nota-se que as curvas cinéticas são similares, não apresentando mudanças pela diferença de dosagem enzimática. As curvas cinéticas apresentam quatro regiões. Pela primeira região (0 – 1 hora), observa-se que o aumento da enzima não influenciou na aceleração da velocidade da reação, pois não houve mudanças significativas, sendo que o índice de acidez obtido foi de 1 → 28,5%. Na segunda região (1 – 6 horas) ainda é possível verificar que os resultados para o índice de acidez da curva com 2% de enzima (28,5 → 56,5%) praticamente não sofreu alterações, havendo apenas um leve aumento (1,5%). Na terceira região (6 – 18 horas) nota-se um breve aumento, 5,5%, no índice de acidez (56,4 → 84%) para a dosagem enzimática de 2%. Por último, na quarta região (tempo > 18 horas), verifica-se que o valor do índice de acidez para a curva de 2% de enzima (84 → 85%) teve um aumento de apenas 2,6%. No geral, evidencia-se que o aumento de 1 para 2% (apesar de pequeno mas significativo em termos de quantidade – gramas) de dosagem enzimática não foi relevante (máximo de 5%) para elevar o índice de acidez da reação de hidrólise

enzimática do óleo de soja. Ainda, observa-se que o comportamento da curva para a dosagem de 2% de enzima seguiu o mesmo comportamento da curva de referência, elevando seu índice de acidez no mesmo período de tempo e estabilizando-se após a quarta região (tempo > 18 horas).

Liu *et al.* (2008) relatam que a velocidade da reação de hidrólise enzimática deve acelerar com o aumento da concentração de enzima. Entretanto, esse fato não foi observado pela cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando um aumento de 1 → 2% de Lipozyme TL IM. Considera-se que este aumento tenha sido insuficiente para acelerar a velocidade da reação de forma significativa.

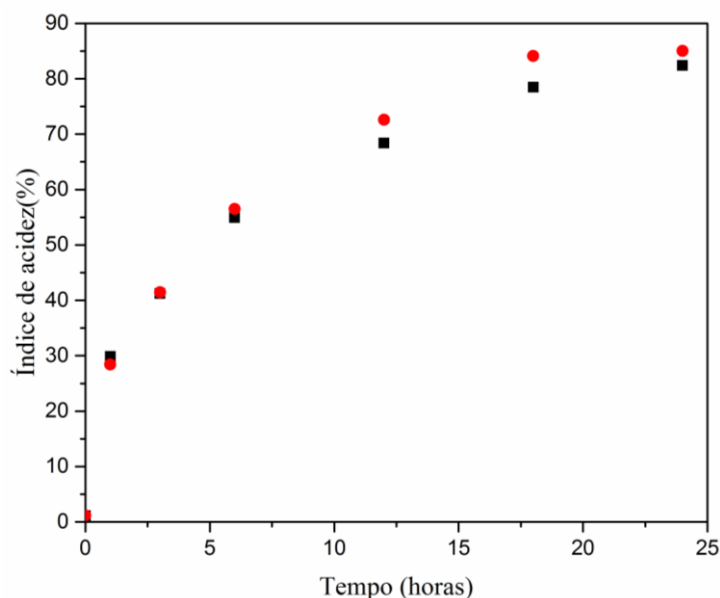


Figura 5.11. (■) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando 1% de enzima; (●) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando 2% de enzima (T = 52,2°C, 150 rpm, T/O = 37,7:1, pH= 6,1).

Liu *et al.* (2008) avaliaram a influência da concentração da enzima (*C. lipolytica*) na hidrólise enzimática do óleo de palma. Os efeitos foram analisados nas concentrações de 0,1 – 0,55 – 1 – 2 e 3% para razão molar água/óleo 0.675:1, temperatura de 45°C e pH= 7,7. Constataram que, em condições de agitação mecânica e tempo de 1 hora, há um pequeno aumento na velocidade da reação (5%) para as concentrações de 0,1 a 0,55. Após 0,55%, verificou-se uma diminuição na velocidade da reação quando as concentrações passaram de 1 → 3%. Segundo Liu *et al.* (2008) os efeitos causados pelo aumento da concentração de lipase são limitados pela área interfacial entre as fases dos substratos. A partir de certa concentração, essa área interfacial fica saturada de enzimas, e o aumento da

carga enzimática não exibe efeito significativo nas taxas de hidrólise. Desta maneira, verificando que o aumento da concentração de enzima na hidrólise enzimática do óleo de soja não alterou o comportamento da velocidade da reação, acredita-se que a dosagem de 2% na reação possa ter saturado a interface água/óleo da melhor condição da razão molar água/óleo da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja.

5.3.3. Efeito da Razão molar tampão/óleo na Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja

Para avaliar o efeito da razão molar tampão/óleo na cinética da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja, empregando a enzima Lypozyme TL IM, foram obtidos dados cinéticos utilizando condições de razão molar igual a 20:1, 37,7:1 e 50:1, os quais estão apresentados na Figura 5.12. Embora os resultados de ambos planejamentos experimentais tenham indicado que a razão molar tampão/óleo não é estatisticamente significativa, verifica-se a partir dos dados apresentados na Figura 5.12 que a razão molar tampão/óleo demonstrou influenciar na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja. Entretanto, nota-se que esta influência não foi positiva na reação, pois não superou os valores obtidos no índice de acidez pela cinética de referência.

Nas quatro regiões observadas na Figura 5.12, evidencia-se que na primeira região (0 – 1 hora), comparando-se com a curva de referência, razão molar de 37,7:1 (1→29,9%), há um decréscimo no índice de acidez de 3% para a razão molar de 20:1 (1→26,9%) e de 11% para a razão molar de 50:1 (1→18,9%). Na segunda região (1 – 6 horas) observa-se uma diferença de 10,4% entre o índice de acidez da curva de referência (29,9→ 55%), e o índice de acidez da razão molar 20:1 (26,9→44,6%). Para a razão molar de 50:1, é possível notar que ao longo do tempo, nesta região, o seu valor do índice de acidez (18→ 42%) chega a alcançar o valor do índice de acidez da curva de referência (29→ 41,3%) no tempo de 3 horas. Contudo, o índice de acidez desta razão molar volta a decair até o tempo de 6 horas (18,9→ 49%) em 6% em comparação com a curva de referência. Na terceira região (6 – 18 horas), os índices de acidez para as razões molares analisadas continuam mantendo-se abaixo dos valores obtidos pela curva de referência (55→ 78,5%). Para a razão molar de 20:1 (44,6→ 63,5%) há uma diferença de 15% e, para a razão molar de 50:1 (49→ 66,7%), há uma diferença de 11,8%. Por fim, na quarta região (tempo > 18 horas), verifica-se que

reação de hidrólise tende a atingir a condição de equilíbrio para ambas as razões molares, acompanhando a curvatura de referência, porém, continuando com os valores do índice de acidez abaixo desta. Para a razão molar de 20:1 (71,3% de índice de acidez) há uma diferença de 11% a menos do valor do índice de acidez da curva de referência (82,4%). Para a razão molar de 50:1 (77,6% de índice de acidez), essa diferença é de apenas 4,8% a menos. Em suma, nesta cinética é possível observar que, mesmo as curvaturas das razões molares 20:1 e 50:1 se posicionarem abaixo da curvatura de referência, ambas acompanham a elevação nos valores do índice de acidez em função do tempo, ou seja, apresentam o mesmo comportamento da melhor condição (razão molar 37,7:1). Além disso, verifica-se que a razão molar de 50:1 apresenta um melhor comportamento perante os valores obtidos no índice de acidez, isto é, mesmo mantendo valores menores do que os indicados pela curva de referência, a sua diferença é menor do que a diferença apresentada pela razão molar de 20:1.

Segundo Liu *et al.* (2008), nas reações de hidrólise enzimática a concentração de água é um dos fatores mais importantes. O excesso de água para a hidrólise enzimática aumenta a interface água/óleo do meio reacional, o que eleva a atividade enzimática da enzima. Por outro lado, esse excesso de água, após certa quantidade, poderá exercer efeito contrário, inibindo a atuação da enzima, ocorrendo perdas na atividade enzimática (Chew *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Zenevycz *et al.*, 2016). Desta forma, as reações de hidrólise enzimática são conduzidas pela existência de um ponto crítico para a razão molar água/óleo, onde um excesso ou uma falta de água na reação leva a uma aceleração ou diminuição da atividade enzimática, influenciando diretamente no índice de acidez da reação. Esse fato é verificado pela Figura 5.12, onde o aumento (50:1) e a diminuição (20:1) da razão molar tampão/óleo demonstraram não superar os valores obtidos no índice de acidez pela razão molar, dada estatisticamente, do seu ponto crítico (37,7:1).

Zenevycz *et al.* (2016) avaliaram a razão molar água/óleo na hidrólise enzimática do óleo de soja. As reações foram conduzidas em sistema de banho de ultrassom, a 40°C, condição mínima de enzima (1% em relação à massa de substrato – Lipozyme TL IM), velocidade de agitação de 300 rpm e potência do ultrassom de 132W. A razão molar água/óleo analisada foi de 9:1 – 10:1 – 20:1 – 40:1 e 46:1. A melhor condição obtida foi com a razão molar de 20:1, chegando a 35% no índice de acidez em duas horas de reação. Verificaram também que acima desta razão molar houve um decaimento no índice de acidez. Pode-se notar que o mesmo foi verificado neste trabalho, ou seja, quando utilizou-

se a razão molar água/óleo de 20:1 obteve-se um índice de acidez de 26,9% e para a razão molar de 50:1 foi de 18,9%, havendo 8% de diferença entre essas razões no tempo de 1 hora de reação. Verifica-se que o índice de acidez de 35,2% também foi atingido neste trabalho com a razão molar de 20:1 em 3 horas de reação. Entretanto, neste mesmo tempo, atingiu-se 41,3% no índice utilizando a razão molar ótima (37,7:1). Observa-se que, mesmo utilizando o sistema de ultrassom, o índice de acidez não sofreu grande aumento, comparando a razão molar de 20:1, para o presente estudo, pois o mesmo índice neste trabalho (sem utilizar banho de ultrassom) foi obtido apenas com uma hora de diferença. Acredita-se que esta diferença entre o tempo de reação possa estar associado à utilização do pH, pois os testes da razão molar água/óleo de Zenevicz *et al.* (2016) foram realizados com água destilada e, para a razão molar água/óleo testada nesta cinética, foi utilizado o pH ótimo da reação (6,1).

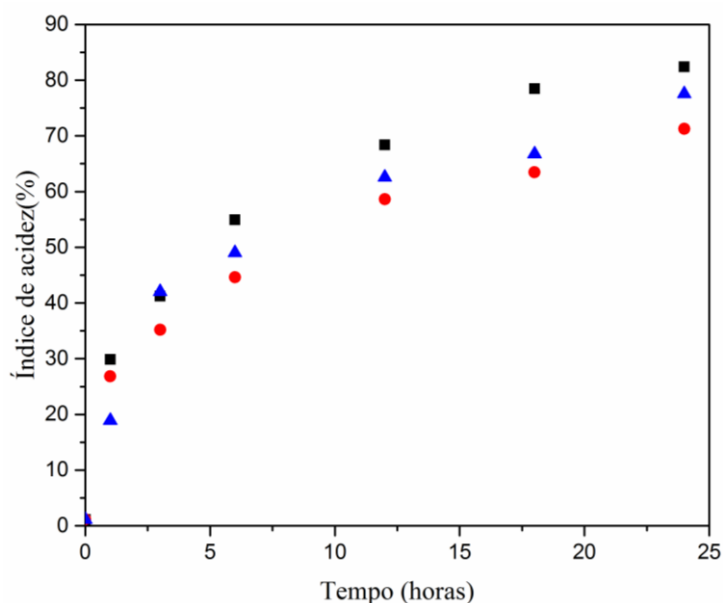


Figura 5.12. (■) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com razão molar tampão/óleo 37,7:1; (●) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com razão molar tampão/óleo 20:1; (▲) Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com razão molar tampão/óleo 50:1 (T = 52,2°C, 150 rpm, pH= 6,1, E/S= 1%)

5.4. MODELAGEM MATEMÁTICA

A modelagem matemática busca descrever a física de um processo estimando os parâmetros adequados e realizando previsões do sistema por meio da computação, sendo que, para isso, utiliza-se de modelos empíricos obtidos geralmente da correlação

matemática de dados experimentais ou de modelos fenomenológicos que consideram etapas elementares de transferência de massa (FEYISSA, GERNAEY E ADLER-NISSEM, 2012; ABDOLLAHZADEH E GHOBADI, 2015). De acordo com Chapwanya e Misra (2015) a modelagem matemática é um artifício útil para compreender a dinâmica do processo.

A modelagem matemática realizada para a cinética da hidrólise do óleo de soja possibilitou a visualização da concentração de triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol (GL), água (H₂O) e ácidos graxos livres (AGL) a partir dos quatro experimentos estudados.

Nas Figuras 5.13 – 5.20 são apresentadas as curvas cinéticas simuladas pelo modelo para as concentrações de TAG, DAG, MAG, GL, H₂O e AGL, bem como os dados experimentais referentes à concentração de ácidos graxos livres, para cada ensaio. Em todas as simulações (Figuras 5.13 - 5.20) observa-se que a medida que a concentração de TAG diminui (isto é, TAG é consumido) com o passar do tempo, DAG e MAG aumentam até determinado ponto, em seguida decrescem (DAG é consumido para formação de MAG, em seguida MAG é consumido para formação de GL e AGL). Nas três reações em que há o consumo de ácidos graxos (TAG, DAG e MAG) nota-se, também, que há consumo da água, pois esta reage para formação dos subprodutos (DAG, MAG e AGL) e produtos (GL e AGL), como pode ser visto pelas equações do mecanismo (Equação 07 - 12).

Na Tabela 5.7 são apresentados os valores das constantes de velocidade específica das cinéticas de reação (k) obtidas a partir de um ajuste do modelo aos dados experimentais. Verifica-se que as k 's são expressas em função da temperatura de acordo com a equação de Arrhenius¹. Desta forma, foram realizadas simulações utilizando os valores das constantes de velocidade específica médios (\bar{k}) de cada ensaio. Nas Figuras 5.17 – 5.20 são apresentadas as curvas cinéticas simuladas pelo modelo utilizando \bar{k} para as concentrações de TAG, DAG, MAG, GL, H₂O e AGL, bem como os dados experimentais referentes à concentração de ácidos graxos livres, para cada ensaio.

Nota-se na Tabela 5.8 que, os coeficientes de correlação (R^2) - descrição da cinética utilizando as constantes de velocidade específicas (k s) ótimas e médias, são bastante similares, visto que há uma mesma ordem de grandeza para eles. Logo, acredita-se que

¹O aumento da velocidade das reações químicas a partir do aumento da temperatura da reação pode ser expressa pela equação de Arrhenius: $k = A_0 e^{-E_a/RT}$. Essa equação é muito utilizada para análise de dados cinéticos experimentais de reações e transformações químicas e físico – químicas.

estes valores tenham maior significado físico e possam ser utilizados para realização de simulações em outras condições. Baseado nos valores do coeficiente de correlação apresentado na Tabela 5.8, verifica-se o modelo matemático descreveu bem os dados experimentais.

Tabela 5.7. Valores das constantes de velocidade específica do modelo matemático

Parâmetro $(\frac{cm^3 \cdot kg}{mol \cdot h})$	Padrão (T/O 37,7:1 – 1% de enzima)	Enzima (T/O 37,7:1 – 2% de enzima)	Razão molar tampão/óleo		Médio
			20:1	50:1	
k ₁	6,819x10 ⁵	4,216x10 ⁵	2,040x10 ⁵	2,263x10 ⁶	8,926x10 ⁵
k ₂	2,297x10 ⁷	2,483x10 ⁷	1,168x10 ⁶	1,867x10 ⁵	1,224x10 ⁷
k ₃	2,961x10 ⁵	2,023x10 ⁵	4,300x10 ⁴	1,893x10 ³	1,358x10 ⁵
k ₄	5,123x10 ³	2,990x10 ³	1,819x10 ³	5,765x10 ³	3,924x10 ³
k ₅	7,708x10 ⁸	1,004x10 ⁹	1,019x10 ⁹	1,018x10 ⁹	9,530x10 ⁸
k ₆	6,892x10 ⁸	7,106x10 ⁸	7,154x10 ⁹	7,143x10 ⁸	7,074x10 ⁸
k ₇	2,150x10 ⁵	3,221x10 ⁶	2,596x10 ⁵	2,805x10 ⁶	1,625x10 ⁶
k ₈	1,800x10 ⁸	1,760x10 ⁸	1,772x10 ⁸	1,738x10 ⁸	1,768x10 ⁸
k ₉	4,730x10 ⁷	5,137x10 ⁷	4,731x10 ⁷	4,987x10 ⁷	4,896x10 ⁷

Tabela 5.8. Valores para os coeficientes de correlação (R²)

Experimento	R ²	R ²
	<i>k</i> otimizado	<i>k</i> médio
T/O 37,3:1 – 1% de enzima	0,9931	0,9910
T/O 37,7:1 – 2% de enzima	0,9899	0,9878
T/O 20:1	0,9712	0,9875
T/O 50:1	0,9939	0,9618

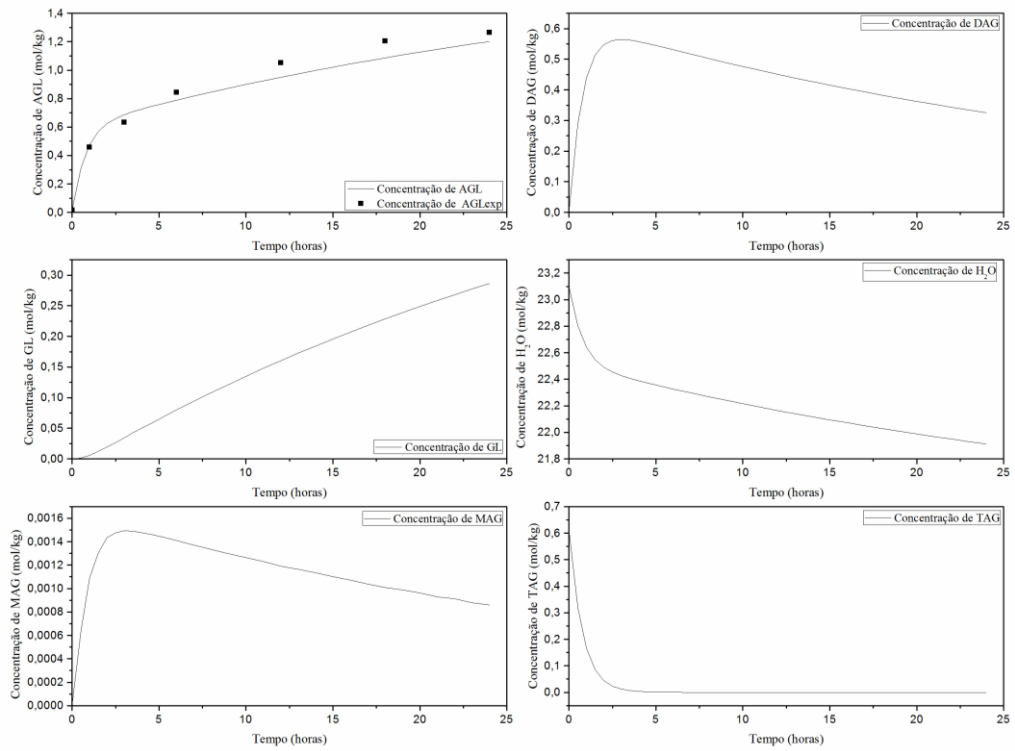


Figura 5.13. Cinética para o experimento do modelo de referência (T/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

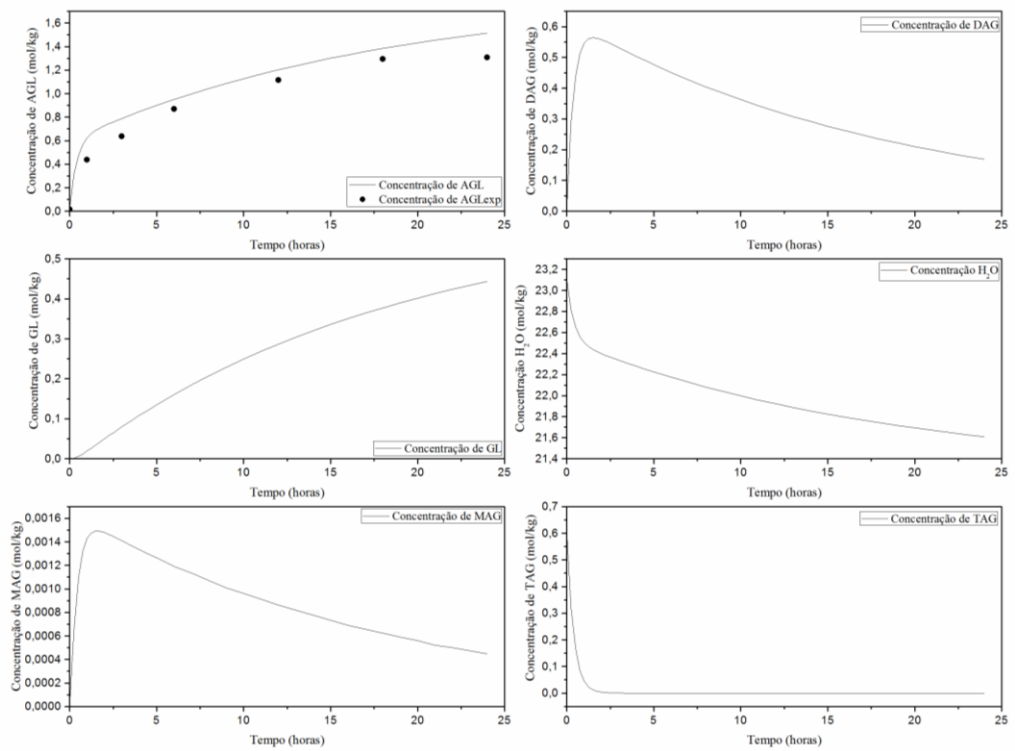


Figura 5.14. Cinética para o experimento do modelo com variação na dosagem enzimática (T/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 2%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

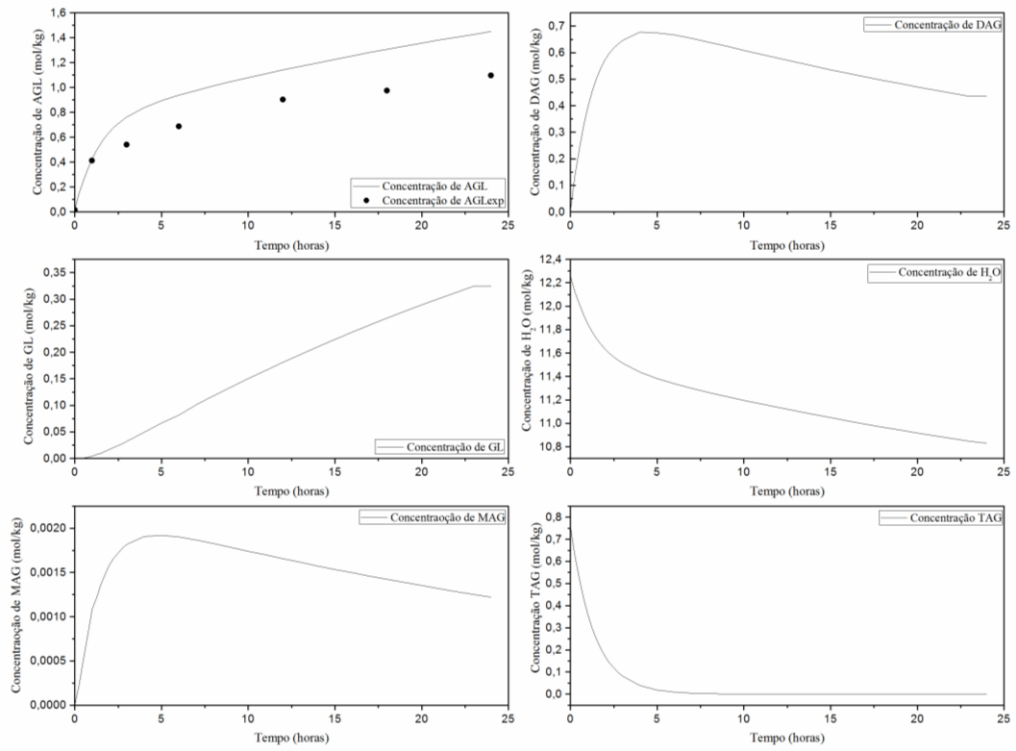


Figura 5.15. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (T/O: 20:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

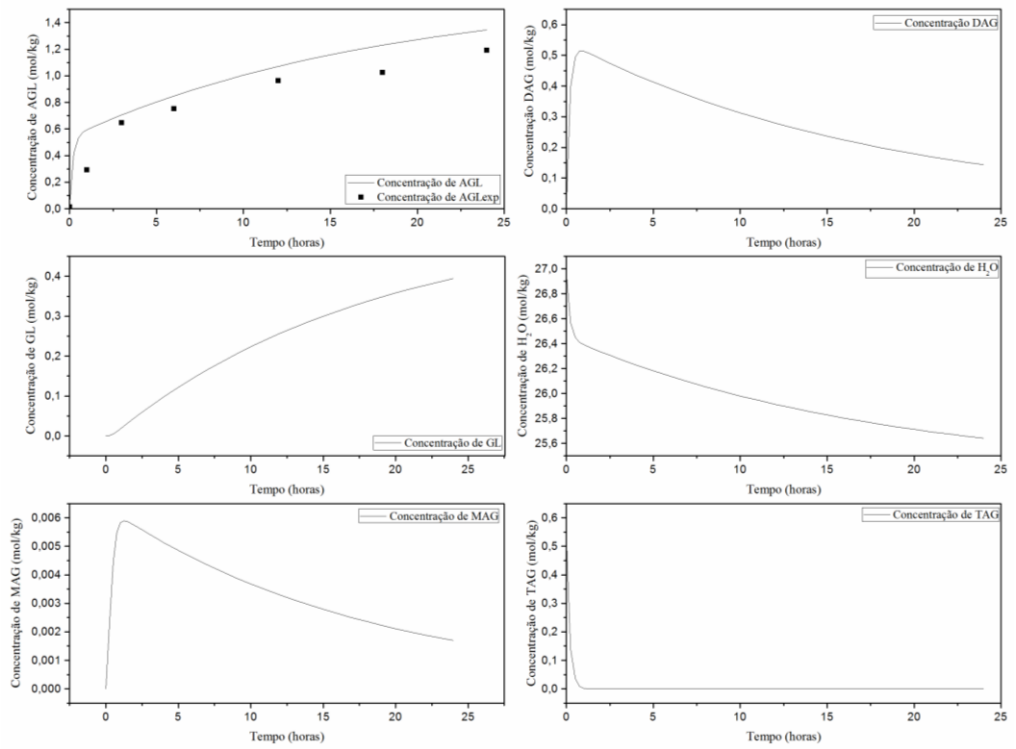


Figura 5.16. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (T/O: 50:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

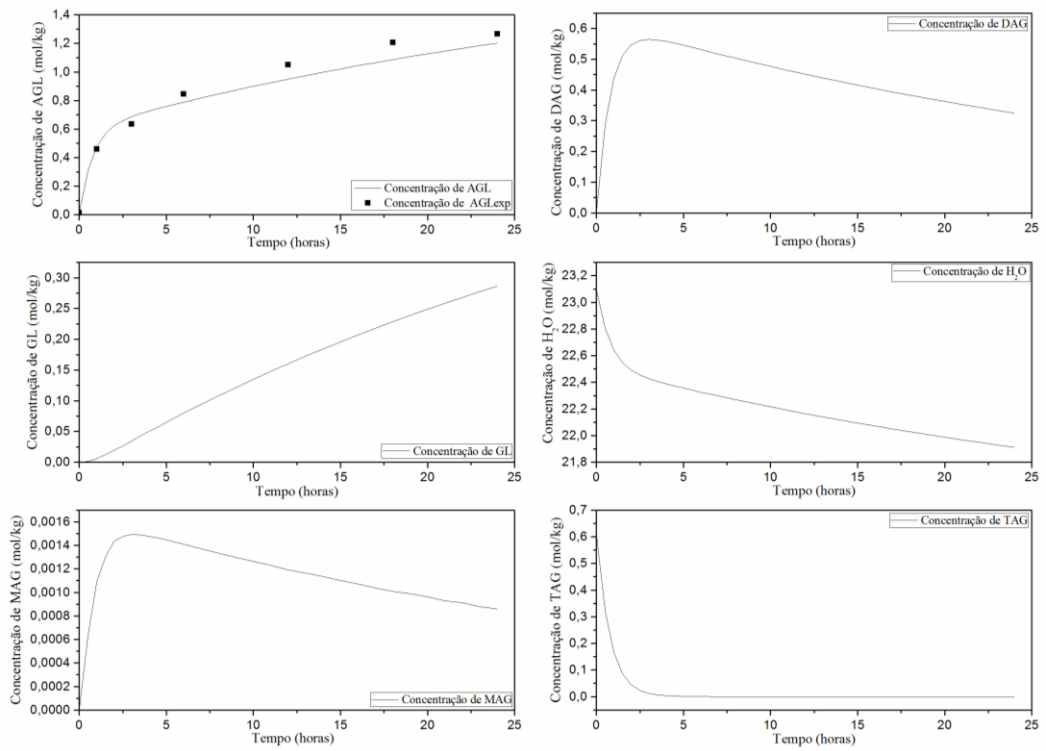


Figura 5.17. Cinética para o experimento do modelo de referência (T/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

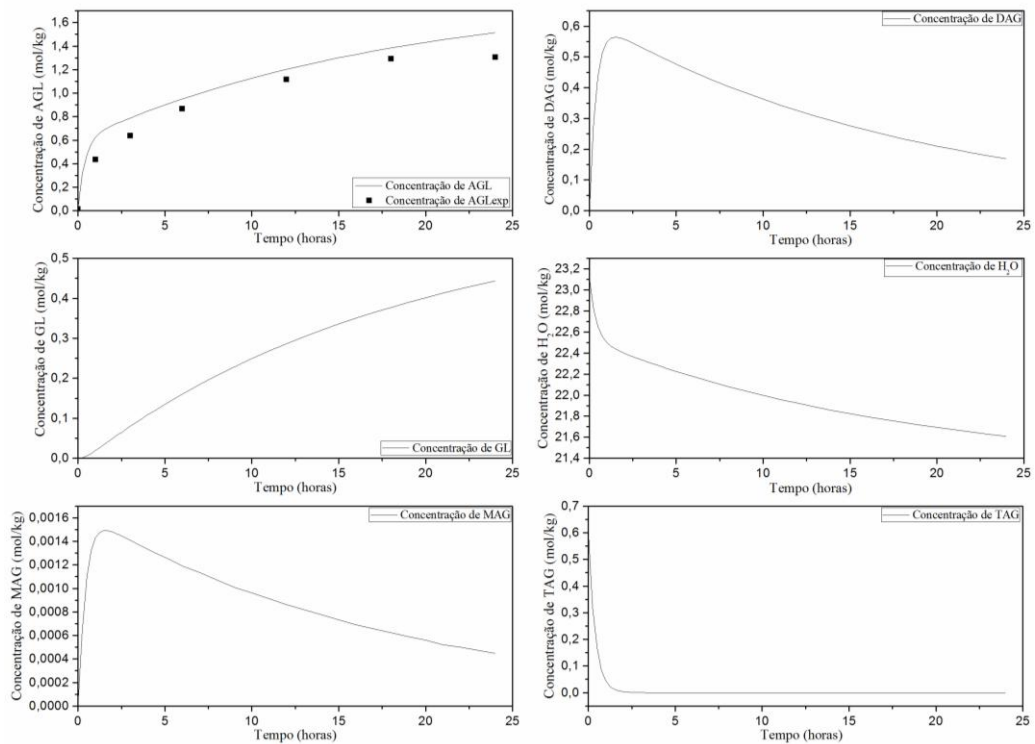


Figura 5.18. Cinética para o experimento do modelo com variação na dosagem enzimática (T/O: 37,7:1; pH: 6,1; E/S: 2%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

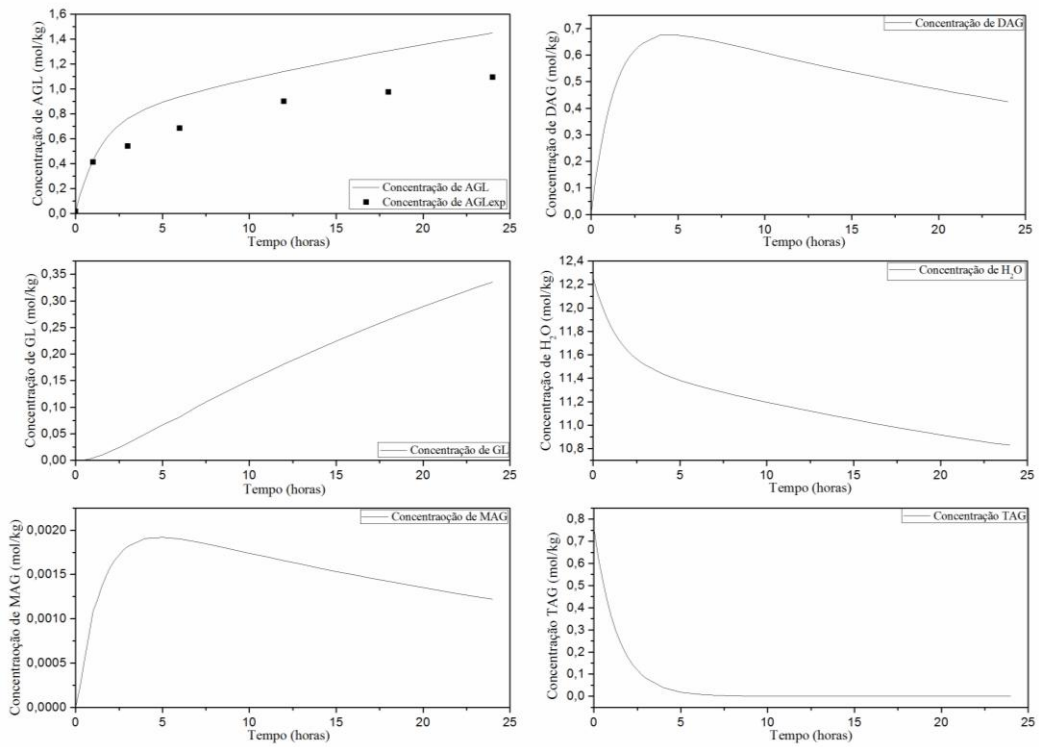


Figura 5.19. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (T/O: 20:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

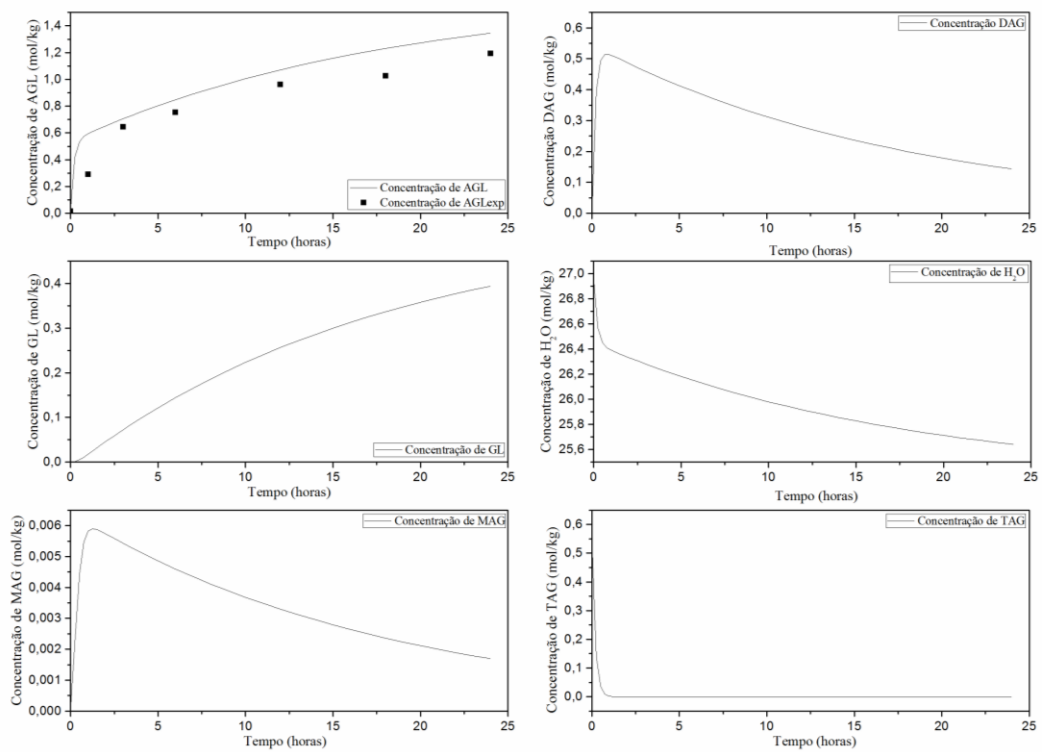


Figura 5.20. Cinética para o experimento do modelo com variação na razão molar água/óleo (T/O: 50:1; pH: 6,1; E/S: 1%; Temp.:52,2°C; 150 rpm)

6.CONCLUSÃO

Inicialmente, pelo primeiro planejamento experimental (Placket – Burmann) pode ser verificado que a variável razão mássica enzima/substrato demonstrou ser mais significativa na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja, utilizando uma maior porcentagem (10%) e, que as demais variáveis que demonstraram ser significativas neste processo foram: velocidade de agitação (rpm), temperatura e pH, influenciando sob a variável razão molar tampão/óleo (não significativa neste processo).

Em um segundo planejamento experimental (DCCR) observou-se que a variável razão molar tampão/óleo continuou demonstrando não exercer significância na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja, onde somente as variáveis temperatura e pH foram significativas para este processo. Além disso, através deste planejamento obteve-se as condições ótimas para a reação: temperatura em 52,2°C; pH de 6,1; razão molar tampão/óleo de 37,7:1; velocidade de agitação do reator em 150 rpm e razão mássica enzima/substrato de 1%, chegando a 41,3% no índice de acidez em 3 horas de reação.

A cinética realizada pela condição ótima dada no planejamento experimental demonstrou que o melhor índice de acidez do processo foi obtido em 24 horas de reação, chegando a 82%. As demais cinéticas avaliadas, utilizando-se agentes emulsificantes, aumentando-se a dosagem de enzima e variando-se a razão molar tampão/óleo não demonstraram aumentar a taxa de reação da hidrólise enzimática, não superando o índice de acidez obtido pela cinética de referência (82% de índice de acidez em 24 horas de reação). Ademais, as cinéticas que utilizaram a goma arábica como agente emulsificante demonstraram uma queda na curva cinética perante o índice de acidez da reação. Assim, a goma arábica possivelmente estaria inibindo a atividade da enzima Lipozyme TL IM na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja.

A modelagem matemática das cinéticas avaliadas possibilitou a visualização da concentração de TAG, DAG, MAG, AGL, GL e H₂O, bem como o comportamento destes componentes na reação. Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram bastante similares, acreditando que estes valores tenham maior significado físico e possam ser utilizados para realização de simulações em outras condições. Desta forma, verifica-se que o modelo matemático descreveu bem os dados experimentais.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. **Soja Brasil**. Disponível em <<http://www.projetosojabrasil.com.br/>>. Acesso em 20 de dezembro de 2015.

ABDOLLAHZADEH, G.R.; GHOBADI, F. **Linked Mathematical–informational Modeling of Perforated Steel Plate Shear Walls**. *Thin-Walled Structures*, n. 94, p. 512–20, 2015.

ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of Surfaces**. 4. ed. John Willey and Sons, 777p., 1982.

ALMEIDA, L. **Estudo cinético da hidrólise em água subcrítica do óleo de soja usado em fritura**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química da Universidade Estadual do Paraná, Curitiba, 2016.

AGUIEIRAS, E. C.; CAVALCANTI – OLIVEIRA, E. D.; CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. **Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts**. *Fuel*, v. 135, p. 315–321, 2014.

ANVISA. **Resolução RDC nº 482, 1999**.

ANVISA. **Resolução RDC nº 270, 2005**.

ANP. **Matérias – primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional)**. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>> Acesso de 2 de novembro de 2016.

ARANDA, D. A. G.; GONÇALVES, J. A.; PERES J. S.; RAMOS A. L. D.; MELO – JUNIOR C. A. R. ; ANTUNES, O. A. C.; FURTADO, N. C.; TAFT C. A. **The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions**. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 22, p. 709-716, 2009.

BABICZ, I. **Produção de diacilglicerol via hidrólise enzimática do óleo de palma**. Dissertação de mestrado em ciências e tecnologia de processos químicos e bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

BARNEBEY, H. L.; BROWN, A. C. **Continuous fats plitting plants using the colgate-emery process**. *Journal Am. Oil Chem. Soc.*, n.25, p. 95–9.1948.

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

BIODIESEL BR. **Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel**. Disponível em <<https://www.biodieselbr.com>> Acesso em 6 de outubro de 2016.

BOBBIO, F. O.;BOBBIO, P. A. **Introdução à Química dos Alimentos**, Varela, 2ºed., São Paulo,1992.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximating response function.** Technical Report, n. 9, 1973.

BUENO, T. **Obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja.** Dissertação de mestrado, 120f, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Lorena- SP, 2005.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. **Aplicação de lípases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados.** Química Nova, v. 26, n. 1, 75-80, 2003.

CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. D.; AGUIAR, C. L. D. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v. 27, p. 146 – 156, 2004.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. A.; SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. **Study of soybean oil hydrolysis catalyzed By *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification.** Enzyme Research, v. 11, p.8, 2011.

CAVALCANTE, A. K.; SOUSA, L. B.; HAMAWAK, O. T. **Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância magnética nuclear e soxhlet.** Bioscience Journal, n.1, v. 27, 2011.

CAVALHEIRO, J. C. **Hidrólise de óleo de Canola catalisada por mistura de lípases imobilizadas.** Tese de conclusão de curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

CLAUSS, J. **Interesterificação do óleo de palma.** Óleos & Grãos, 5ª ed., 1996.

CHAPWANYA, M.; MISRA, N. N. **A Mathematical Model of Meat Cooking Based on Polymer–solvent Analogy.** Applied Mathematical Modelling, n. 39, p. 4033–43, 2015.

CHEN, G.; SHAN, R.; SHI, J.; YAN, B. **Transesterification of palm oil to biodiesel using rice husk ash-based catalysts.** Fuel Processing Technology, v. 133, p. 8 – 1, 2015.

CHEW, Y. H.; CHUA, L. S.; CHENG, K. K.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A.; LEE, C. T. **Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase.** Biochemical Engineering Journal, n.39, p.516–520, 2008.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, E. D. **Tecnologia Enzimática.** Ed. EPUB, v. 1, FAPERJ, Rio de Janeiro - RJ, 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Disponível em <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 16 de agosto de 2016.

CRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. **Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities.** Appl. Energy, n.119, p. 497–520, 2014.

DARIO, M. **Recuperação da glicerina oriunda do processo de produção de biodiesel – Um processo Quimúrgico.** Monografia de graduação em Química UFMT. Brasil. 2006

DEMIRBAS, A. **Progress and recent trends in biodiesel fuels.** Energy Conversion and Management, v. 50, n. 1, p. 14-34, 2009.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de Transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Rio de Janeiro. Rio de Janeiro - RJ, 2008.

FALCÃO, P. W. C. **Produção de biodiesel em meio supercrítico.** Dissertação de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2011.

FARIA, E. A. D.*et al.* **Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA.** Eclética Química, v. 27, 2002.

FARIA, L. A. **Hidrólise do óleo de amêndoa da macaúba com lipase extracelular de Colleto trichunglo esporioides produzida por fermentação em substrato líquido.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte- MG, 2010.

FEYISSA, A. H.; GERNAEY, K. V.; ADLER-NISSEM, J. **Uncertainty and Sensitivity Analysis: Mathematical Model of Coupled Heat and Mass Transfer for a Contact Baking Process.** Journal of Food Engineering, n. 109(2), p.281–90, 2012.

FEITEN, M. C. **Hidrólise enzimática do óleo de soja em banho de ultrassom.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim- RS, 2013.

FONTANA, J. D. **Biodiesel para leitores de 9 a 90 anos.** Ed. UFPR, n.172, p. 253, Curitiba - PR, 2011.

FU, X.; ZHENG, J.; YING, X; YAN, H.; WHANG, Z. **Investigation of Lipozyme TL IM - catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay.** Chinese Journal of catalysis, n. 35, p.553 – 559, 2014.

GASPARINI, F. **Avaliação e Adaptação das Condições da EN 14103 para Quantificação de Ésteres em Biodieséis Etilicos puros de Soja, Babaçu, Palma e Sebo Bovino e em suas Misturas.** Dissertação de Mestrado em Química pela Universidade Estadual Paulista, Araraquara- SP, 2010.

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

GRAMONE, M. A. **Óleos & Grãos,** n. 2, v. 5, 1993.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. **Em Lipid Biochemistry: An Introduction;** 4 ed., p. 162-243, Chapman & Hall, London, 1996.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. **Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase.** Process Biochemistry, v. 40, p. 1525–1530, 2005.

KARCHER, V. **Determinação da Energia Interfacial de Emulsões de Água em Óleo Pesado**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Ciências e Engenharia do Petróleo. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2008.

KARLESKIND, A.; **Oils and Fats: Manual, Lavoisier Publishing**.v.2, p. 1432-1572, Paris, 1996.

KATSURAGI, Y.; YASUKAWA, N.; MATSUO, N.; FLICKINGER, B. D.; TOKIMITSU, I.; MATLOCK, M. G. **Diacylglycerol Oil**. AOCS Press, Champaign, 2004

KIATSIMKUL, P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. **Selective hydrolysis of epoxidized soybean oil by commercially available lipases: Effects of epoxy group on the enzymatic hydrolysis**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 41, p. 55–60, 2006.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo:EdgardBlücher, v 16 , p 340 , 2006.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. **Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components**. Fuel, v. 84, n. 9, p. 1059-1065, 2005.

KOLAKOWSKA, A.; SIKORSKI, Z.E. **Chemical and functional properties of food lipids**.CRC Press, p. 38-68, 2002.

KHOR, G. K.; SIM, J. H.; KAMARUDDIN, A. H.; UZIR, M. H. **Thermodynamics and inhibition studies of Lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification**. Bioresource Technology, n. 101, p. 6558–6561, 2010.

HAUMANN, B.F. **Tools: hydrogenation, interesterification**.Champaign, v.5, n.6, p.668-678, 1994.

HASAN, F.; SHAH, A. A., HAMEED, A. **Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review**. Biotechnol Adv., n. 27, p.782–98, 2009.

HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. **Food Biotechnology**, Kling, R. D.; Cheetham, P. S. J.; Elsevier Publishers Limited, v. 2, p. 173-217,1988.

HAYES,D.**Enzyme-catalyzed modification of oil seed materials to produce eco-friendly products**.J. Am.Oil Chem. Soc., n.81, p.1077–103, 2004.

HERMANSYAH, H.; WIJANARKO, A.; DIANURSANTI, A.; GOZAN, M.; WULAN, P.; **kinetic model for triglyceride hydrolysis is using lipase:areview**.Makara Journal Technology, n.11, p.30-5, 2007.

HUANG, J.; LIU, Y.; SONG, Z.; JIN, Q., LIU, Y.; WANG, X. **Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 17,p. 521–525, 2010.

ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. K. **Biodiesel from vegetable oils**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 31, p. 446–471, 2014.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZO, G.; FERNANDEZ-SERRANO, M.; GARCIA-ROMAN, M. **Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions: Study of the initial rates and the reaction time course.** Biochemical Engineering Journal, n. 40, p. 473–484, 2008.

LAFUENTE, F. R. **Lipase from *Thermomyceslanuginosus*: Uses and prospects as industrial biocatalyst.** Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic.v.62, p.197- 212, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.**Ed. Savier,2 ed., 839 p., São Paulo, 2000.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica.**Savier, 7ª Ed., São Paulo – SP, 1991.

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

LEONG, T. S. H. et al. **Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification.**Ultrasonics Sonochemistry, v. 16, n. 6, p. 721–727, 2009.

LI, S.F.; WU, W. T. **Lipase immobilized electros pun PAN nano fibrous membranes for soybean oil hydrolysis.**JournalBiocheminalEngineering, v. 45, p. 48–53, 2009.

LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. **The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system.**UltrasonicsSonoChemistry, n. 15, p. 402- 407, 2008.

MA, F., HANNA, M. **Biodiesel production: a review.** Bioresource Technology, v.70, p.1-15, 1999.

MARX, S. **Glycerol-free biodiesel production through transesterification: a review.**Processing Technology, n. 151, p. 139–147, 2016.

MATOS, L.M.C. **Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol.** Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química - IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ - RJ, 2010.

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

MIRILLEN, A. L.; WISSINGER, J. C.; GOTTUMUKALA, V.; SCHALL, C. A. **Kinetics of soybean oil hydrolysis in subcritical water.**Fuel, n. 208, p. 277 – 281, 2013.

MOQUIN, P. H.; TEMELLI, F. **Kinetic modeling of hydrolysis of canola oil in supercritical media.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 45, n. 1, p. 94–101, 2008.

MOLINARI, D. **Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de crambe utilizando lipase lecitase ultra (*fosfolipasea1*)**. Tese de mestrado em Bioenergia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo - PR, 2015.

MORETO, E.; ALVES, R. F.; **Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 1986.

MORETTO, E., FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Varela Editora e Livraria, São Paulo, 1998.

MPAGALILE, J.J., HANNA, M.A., WEBER, R. **Design and testing of a solar photovoltaic operated multi-seeds oil press**. Renewable Energy, v. 31, p. 1855-1866, 2006.

MUSA, I. A. **The effects of alcohol to oil molar ratios and the type of alcohol on biodiesel production using transesterification process**. Egyptian Journal of Petroleum, n. 25, p. 21- 31, 2016.

NAGAO, T.; WATANABE, H.; GOTO, N.; ONIZAWA, K.; TAGUCHI, H.; MATSUO, N.; YASUKAWA, T.; TSUSHIMA, R.; SHIMASAKI, H.; ITAKURA, I. **Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial**, Journal Nutr. v.130, p.792–797, 2000.

NELDER, J. A.; MEAD, R. **A simplex method for function minimization**. Comput.Journal, n.7, p.308 – 313, 1964.

NGAOSUWAN, K.; LOTERO, E.; SUWANNAKARN, K. Jr. J. G.; PRASERTHDAM, P. **Hydrolysis of triglycerides using solid acid catalysts**. Ind. Eng. Chem. Res., n. 48, p. 4757–67, 2009.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. **Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase**. Process Biochemistry, n. 39, p. 13 – 20, 2003.

NOVOZYMES. **Ficha técnica da enzima comercial Lipozyme TL IM**. Disponível em <https://secure.strem.com/uploads/technical_notes/06-3120tech.pdf> . Acesso em 14 de novembro de 2016.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G **Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis**. Química Nova, v. 29, n. 3, p. 593-599, 2006

OLIVEIRA, A.G.;SCARPA, M. V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ T.P. **Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos**.Química Nova, n. 7(1), p. 131-138, 2004

PALUDO, N.; ALVES, J. S.; ALTMANN, C.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. **The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized Thermomyceslanuginosus lipase**. UltrasonicsSonochemistry, v. 22, p. 89-94, 2015.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica em um país engraçado.** Tecbio, v.1, 2003.

PATEL, R. N. **Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** Enzyme Microb. Technol., v. 31, n. 6, p. 804–826, 2002.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. **Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PIGHINELLI, A. L. M. T.; PARK K. J.; RAUEN, A. M.; BEVILAQUA, G.; GUILLAUMON FILHO, J. A. **Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller.** Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, 2011.

PINNARAT, T.; SAVAGE, P. **Assessment of non-catalytic biodiesel synthesis using supercritical reaction conditions.** Industrial Engineering Chemistry Research, v. 47, p. 6801- 6808, 2008.

PROENÇA, K. S.; ROMA, R. M.; OLIVEIRA, R. V. M.; GONÇALVES, M. M.; VILA, M. M. D. **Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência.** Revista Brasileira Farmacêutica. 3º Ed., n. 87, p. 74 – 77, 2006

POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. **A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, n.61, p. 245–257, 2016.

POPPE, J. K. **Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de Candida antartica imobilizada em suportes hidrofóbicos.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 2012.

PHUAH, E.; LAI, O.; CHOONG, T. S.; TAN, C.; LO, S. **Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by Rhizomucormiehei lipase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic , n. 78, p. 91– 97, 2012.

RAMPIN, M. A.; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2007.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M., **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil.** Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, v.31, p.28-37, 2003.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. **A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino.** Revista Virtual de Química, v.5, p.2-15, 2013.

REINEHR, T. O.; RAIZER, E.; MOLINARI, D.; AWADALLAK, J.; RANUCCI, C. R.; SILVA, C.; SILVA, E. A. **Influência da fração água/óleo sobre o processo de Hidrólise Enzimática do Óleo de Girassol assistido por Ultrassom.** II Simpósio de Bioenergia e Biocombustíveis do Mercosul. Parque Tecnológico de Itaipu. Foz do Iguaçu – PR, 2014.

RODRIGUES, R.C. e AYUB, M.A.Z. **Effects of the combined use of *Thermomyceslanuginosus* and *Rhizomucormiehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil.** *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** Casado Pão Editora. Campinas – SP, 2005.

SANTOS, L. K. **Avaliação da Aplicação do Processo de Hidroesterificação na Produção de Biodiesel a partir de Matérias-Primas de Baixa Qualidade.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2016.

SANTOS, L. V. **Emulsificantes: modo de ação e utilização em alimentos.** Trabalho acadêmico do curso de Química em Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, 2008.

SARDA, L., DESNUELE, P. **Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 58, p. 513-521, 1958.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y. **Chemistry and Biochemistry of palm oil.** *Progress in Lipid Research*, n. 39, p. 507-558, 2000.

SCRIMGEOUR, C. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6th ed., John Wiley & Sons, 2005.

SILVA, A. S. **Avaliação de Catalisadores de NiO e MoO₃ suportados em MCM-41, na obtenção de Biodiesel de Óleo de Algodão.** Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande - PB, 2011.

SHARMA, S.; GANGAL, S.; RAUF, A. **Lipase mediated hydrolysis of *Mimusopselengi* and *Parkin Sonia aculeate* a seed oils for the determination of positional distribution of fatty acids.** *Ind. Crops.Prod.*, v. 30, p. 325–8, 2009.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. **Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing.** *Journal Mol CatalB:Enzymatic*, v.17, p.133–42, 2002.

SILVEIRA, A. S. **Aproveitamento das Cinzas da Casca de Arroz como Suporte Catalítico Heterogêneo na Síntese do Biodiesel por Reação de Hidroesterificação.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande, Pombal – PB, 2014.

SINGH, J., BARGALE, P.C. **Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression.** *Journal of food engineering*, v. 43, p. 75-82, 2000.

SODERLUND. **Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces (humicola) lanuginosa* lipase.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.26, p.75- 83, 2002.

SORENSEN, R.; NOVAK, N. **The use of Michaelis – Menten kinetics in cell biology and physiology teaching laboratories.** Biochemical education, v.24, n.1, p.26- 628, 1996.
SUAREZ, P. A. Z. I; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica.** Química Nova, v. 30, n.3, p. 667 - 676, 2007.

TAVARES, F. **Hidroesterificação do óleo de Crambe empregando Catálise enzimática.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo- PR, 2014.

TEIXEIRA, E. V. **Produção de Biodiesel através da Hidroesterificação do Óleo de Andiroba (Carapaguianensis, Aubl.) via Catálise Heterogênea Ácida.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará ,Belém – PA, 2011

TIMMS, R.E. **Fractional crystallisation: the fat modification process for the 21st century.** Eur. Journal Lipid Sci. Technol., v.107, n.1, p.48-57, 2005.

ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. O. **The stability of enzymes after sonication.** Process Biochemistry, v. 35, n. 9, p. 1037–1043, 2000.

VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems.** Bioresource Technology, v. 92, n. 3, p. 297-305, 2004.

VULFSON, E. N. **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application;** Woolley, P.; Petersen, S. B., Cambridge University Press: Great Britain, p. 271,1994.

WATANABE, H.; ONIZAWA, K.; NAITO, S.; TAGUCHI, H.; GOTO, N.; NAGAO, T.; MATSUO, N.; TOKIMTSU, I., YASUKAWA, T.; TSUSHIMA, R.; SHIMASAKI, H. **Fat-soluble vitamin status is not affected by diacylglycerol consumption.** Annals of Nutrition and Metabolism, v. 45, p. 259-264, 2001.

YAHYA, N. Y.; NGADI, N.; JUSOH, M.; HALIM, N. A. A. **Characterization and parametric study of mesoporous calcium titanate catalyst for transesterification of waste cooking oil into biodiesel.** Energy Conversion and Management, v. 129, p. 275-283, 2016.

YANAI, H.; TOMONO, Y.; ITO, K.; FURUTANI, N.; YOSHIDA, H.; TADA, N. **Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome.** Nutr.Journal, v. 6, p. 43, 2007.
YANG, H.; MU, Y.; CHEN, H.; SU, C.; YANG, T.; XIU, Z. **Sn-1,3-specific Interesterification of Soybean Oil with Medium-chain Triacylglycerol Catalyzed by Lipozyme TL IM.** Journal Chines de Eng. Quim, n.22, p. 1016-1020, 2014.

ZENEVICZ, M. C. P. **Hidroesterificação Enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom.** Dissertação de Doutorado. Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2015.
ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO, A. F. J.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. **Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system.** Industrial Crops and Products, n.80, p. 235–241, 2016.

