

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MESTRADO

**ESTUDO DO PROCESSO ENZIMÁTICO DE PRODUÇÃO DE
BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE
FRITURA**

por

ALBANISE ENIDE DA SILVA

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Alagoas como requisito
para obtenção do grau de mestre

ESTUDO DO PROCESSO ENZIMÁTICO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA

ALBANISE ENIDE DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO E PESQUISA DE PROCESSOS
REGIONAIS

LINHA DE PESQUISA: III. PROCESSOS BIOQUÍMICOS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA

MACEIÓ-AL

2010

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586e Silva, Albanise Enide da.
 Estudo do processo enzimático de produção de biodiesel a partir de óleos e
 gorduras residuais de fritura / Albanise Enide daSilva, 2010.
 62 f. : il, tabs., grafs.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de
Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2010.

Bibliografia: f. 57-62.

1. Biodiesel 2. Alcoólise. 3. Lipase. 4. Óleo e gordura residual de frituras.
5. Energia – Fontes alternativas. I. Título.

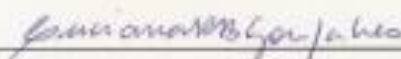
CDU: 662.756.3

**ESTUDO DO PROCESSO ENZIMÁTICO DE PRODUÇÃO DE
BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE
FRITURA**

por

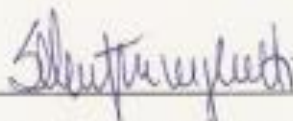
ALBANISE ENIDE DA SILVA

Dissertação defendida e julgada em sua forma final em março de 2010, pela
comissão examinadora, para obtenção de título de Mestre em Engenharia
Química.



Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Examinador Externo



Prof. Dr. Simoni M. Plentz Meneghetti

Examinador Interno



Prof. Dr. Wagner Roberto de Oliveira Pimentel

Examinador Interno



Prof. Dr. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Orientadora

MACEIÓ-AL

2010

DEDICATÓRIA

“Ao meu Deus, Senhor da minha vida e da minha salvação, por estar sempre comigo e por me amar incondicionalmente”.

“À minha mãe, pelo amor, compreensão e paciência em todos os momentos”.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela realização deste sonho, mais ainda, por Ele ter sonhado comigo cada momento já realizado e os que ainda vão se realizar. Obrigada Deus!

Aos meus pais, em especial a minha mãe, que sempre me ensinou a não desistir e me incentivou nos momentos difíceis e se alegrou comigo a cada batalha ganha. Obrigada por acreditar em mim.

Ao meu noivo, pela paciência e amor dedicado a mim, sei que não foi fácil, mas obrigada por sua perseverança e que Deus continue a abençoar o nosso amor!

Aos meus irmãos e familiares pelo incentivo e o apoio dedicados a mim.

À professora Renata Almeida pela orientação neste trabalho e pela compreensão e amizade.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFAL pelos ensinamentos e apoio.

Ao professor Wagner Pimentel pela grande colaboração com a parte estatística deste trabalho.

À professora Simoni Meneghetti pela contribuição na parte de caracterização das amostras e toda parte de cromatografia deste trabalho.

Ao professor Evandir Gonçalves, pois foi seu exemplo de dedicação, seriedade e amor pela pesquisa que me incentivaram a trilhar esse caminho.

À Livia Ribeiro e família, pelo amor e amizade. Vocês são mais uma família que Deus me deu de presente. Eu não consigo imaginar como seria difícil ter chegado até aqui sem seu apoio e fundamental colaboração no desenvolvimento desse trabalho, você tornou esse caminho mais fácil. Obrigada de coração e que Deus os abençoe!

À Magareti e aos colegas dos laboratórios da UFAL: LTBA, LABEN, LASSOP e GCAR pela colaboração na realização das análises de laboratório. Obrigada!

À FAPEAL e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste projeto e com meu desenvolvimento pessoal.

À todos vocês muito obrigada! Que Deus os abençoe!

*Pelo qual também temos
entrada
pela fé a esta graça,
na qual estamos firmes,
e nos gloriamos na esperança
da glória de Deus.
E não somente isto,
mas também
nos gloriamos nas tribulações,
sabendo que a tribulação
produz a paciência.
E a paciência a experiência,
e a experiência a esperança.
E a esperança não traz
confusão,
porquanto o amor de Deus
está derramado em nossos
corações
pelo Espírito Santo que
nos foi dado.
Romanos 5:2-5*

RESUMO

A utilização de biodiesel como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro. Apesar dos possíveis benefícios ambientais no emprego de óleos vegetais para conversão em biodiesel como substituto ao diesel, barreiras do ponto de vista econômico e ético, como concorrência do uso do solo e água com culturas alimentares e para outros fins técnicos, motivaram a busca de matérias-primas alternativas para produção deste biocombustível. Dentre as alternativas estudadas, a reutilização de óleos e gorduras vegetais e animais residuais de processos de fritura de alimentos tem se mostrado atraente, pois o consumo de alimentos fritos e pré-fritos tem aumentado nos últimos anos, provocando um aumento na produção de OGRF's (Óleos e Gorduras Residuais de Fritura).

Neste trabalho estudaram-se reações de alcoólise de óleos e gorduras comestíveis usados em frituras para produção de biodiesel catalisada por lipase imobilizada. As amostras de OGRF's foram coletadas em estabelecimentos comerciais da cidade de Maceió. Estas amostras foram então caracterizadas quanto aos índices de acidez e de iodo, viscosidade cinemática, massa específica e composições em ácidos graxos. Um estudo para se determinar a temperatura em que a enzima (Novozym 435) apresenta melhor atividade, na faixa compreendida entre 40-60°C, foi realizado. A reação de alcoólise foi catalisada pela lipase comercial imobilizada Novozym 435. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental fatorial fracionário 2^{4-1} onde as variáveis estudadas foram temperatura (40-60°C), tempo de reação (24-72h), concentração de enzimas (5-10%) e razão óleo:etanol (1:3-1:9). A determinação do rendimento em ésteres etílicos (biodiesel) foi realizada por cromatografia gasosa. Dentre os resultados, o maior rendimento (87,3%) foi obtido nas condições de maiores temperatura, concentração enzimas, tempo reacional e razão óleo:etanol.

Palavra-chave: biodiesel, alcoólise, lipase, óleos e gorduras residuais de fritura.

ABSTRACT

The use of biodiesel as a fuel has showed a high potential all over the world. In spite of the possible environmental benefits of the vegetable oil use to conversion into biodiesel as a substitute for the diesel, barrels in the economic and ethic points of view, as soil and water use in competition with food cultures and to other technical purposes, motivated the search of alternative raw material for biodiesel production. Among the studied alternatives, the reutilization of residual animal and vegetable oils and fats from food frying processes has shown to be attractive, because the consumption of fried and pre fried food has increased in the last years, causing rise in production of OGRF's (Fried Residual Fats and Oils).

In this work transesterification reactions of vegetables oils and fats used in frying processes was studied for biodiesel production with immobilized lipases. The samples of OGRF's were collected in commercial establishments in Maceió city. These samples were characterized concerning its acidity index, iodine index, cinematic viscosity, specific mass, fat acid composition. A study on temperature in which the lipase (Novozym 435) presents better enzymatic activity, in the range between 40-60°C, was carried out. The alcoholysis reaction was catalyzed by immobilized commercial lipase Novozym 435, the experiments were done according to an factorial experimental design 2^{4-1} where the variables study were: temperature (40-60°C), reaction time (24-72h), enzyme concentration (5-10%) and oil-ethanol rate (1:3-1:9). The determination of yield in ethyl esters (biodiesel) was accomplished by gas chromatography. Among these results, the higher yield was obtained in higher conditions of temperature, enzyme concentration, reaction time and oil: ethanol rate.

Key words: biodiesel, alcoholysis, lipase, oil and fat frying waste.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE EQUAÇÕES.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 - OBJETIVO GERAL	8
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	8
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DESTE ESTUDO.....	9
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
4.1 - BIODIESEL	10
4.1.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
4.1.2 – MÉTODOS DE OBTENÇÃO	12
4.2 – ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA.....	14
4.3 – ENZIMAS	16
4.3.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
4.3.2- LIPASES.....	17
4.3.3 – IMOBILIZAÇÃO	20
4.4 – ALCOÓLISE ENZIMÁTICA.....	22
4.5 – ALCOÓLISE DE ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA	26
5 – MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 – MATERIAIS	28
5.2 - MÉTODOS.....	28
5.2.1 – AMOSTRAGEM	28
5.2.2 – PRÉ-TRATAMENTO DOS ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA	29
5.2.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA	29
5.2.3.1 – ÍNDICE DE ACIDEZ	29

5.2.3.2 – ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS	30
5.2.3.3 – VISCOSIDADE CINEMÁTICA	32
5.2.3.4 – MASSA ESPECÍFICA.....	34
5.2.3.5 – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS.....	34
5.2.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	35
5.2.5 - REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA.....	37
5.2.6 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO EM BIODIESEL	39
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA.....	41
6.1.1 – ÍNDICE DE ACIDEZ.....	41
6.1.2 – ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS.....	42
6.1.3 – VISCOSIDADE CINEMÁTICA.....	43
6.1.4 – MASSA ESPECÍFICA	44
6.1.5 – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	45
6.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	46
6.3 – REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA	48
6.3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
6.3.2 REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	54
7 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	55
7.1 - CONCLUSÕES	55
7.2 – SUGESTÕES.....	56
8 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Craqueamento de triglicerídeos	12
Figura 2 -	Reação de esterificação	13
Figura 3 -	Reação de transesterificação do triglicerídeo	14
Figura 4 -	Representação esquemática das reações catalisadas por lipases	19
Figura 5 -	Métodos para imobilização de enzimas	21
Figura 6 -	Aspecto visual das amostras coletadas	28
Figura 7 -	Sistema para determinação da viscosidade cinemática	33
Figura 8 -	Sistema para determinação da massa específica	34
Figura 9 -	Esquema do procedimento experimental para a reação de alcoólise enzimática	37
Figura 10 -	Estudo da atividade enzimática em função da temperatura	47
Figura 11 -	Gráfico dos Valores Preditos x Observados	50
Figura 12 -	Diagrama de Pareto indicando os efeitos estimados das variáveis para rendimento em biodiesel	51
Figura 13 -	Superfície de resposta para rendimento em biodiesel em função da razão óleo:etanol e da concentração de enzimas	52
Figura 14 -	Superfície de resposta para rendimento em biodiesel em função da razão óleo:etanol e da temperatura	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel de petróleo	11
Tabela 2 -	Conversões obtidas na alcoólise enzimática dos óleos de mamona e de soja refinado em solvente orgânico (FACCIO, 2004)	24
Tabela 3 -	Intervalo das variáveis para Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} da alcoólise enzimática do OGRF's com etanol	38
Tabela 4 -	Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} realizado para a otimização das condições de alcoólise enzimática	38
Tabela 5 -	Condições de reação da alcoólise enzimática de OGRF's usando hexano como segundo solvente	39
Tabela 6 -	Índice de Acidez das amostras analisadas	41
Tabela 7 -	Índice de Iodo das amostras analisadas	42
Tabela 8 -	Viscosidade Cinemática a 40°C das amostras analisadas	43
Tabela 9 -	Massa Específica a 20°C das amostras analisadas	44
Tabela 10 -	Composição em Ácidos Graxos das amostras analisadas	45
Tabela 11 -	Composição em ácidos graxos óleo de soja virgem	46
Tabela 12 -	Rendimentos obtidos na alcoólise enzimática de OGRF's de acordo com o planejamento experimental	48
Tabela 13 -	Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo proposto	49
Tabela 14 -	Rendimentos obtidos na alcoólise enzimática de OGRF's usando hexano como segundo solvente	54

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Expressão para o cálculo do índice de acidez	30
Equação 2 – Expressão para o cálculo do índice de iodo	32
Equação 3 – Expressão para o cálculo da viscosidade	33
Equação 4 – Expressão para cálculo da atividade enzimática	36
Equação 5 - Expressão para cálculo do rendimento em biodiesel	40
Equação 6 - Modelo estatístico para rendimento em biodiesel	50

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁	Gordura vegetal hidrogenada residual de fritura, primeira coleta
A₂	Gordura vegetal hidrogenada residual de fritura, segunda coleta
B₁	Óleo de soja residual de fritura, primeira coleta
B₂	Óleo de soja residual de fritura, segunda coleta
AB₁	Mistura 50%(v/v) óleo soja e gordura vegetal residuais de fritura, primeira coleta
AB₂	Mistura 50%(v/v) óleo soja e gordura vegetal residuais de fritura, segunda coleta
AOCS	American Oil Chemists Society
NTA	Normas Técnicas de Alimentar
OGRF's	Óleos e Gorduras Residuais de Frituras

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biodiesel como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro, tanto pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, como por ser fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo.

As principais matérias-prima para produção de biodiesel são óleos e gorduras animais e vegetais, sendo o óleo de soja o mais utilizado no Brasil. Apesar de sua baixa produtividade em lipídeos, a soja corresponde hoje a aproximadamente 90% da produção brasileira de óleos, o que faz com que seja a matéria-prima preferencial da indústria do biodiesel. Conforme o Ministério de Minas e Energia, a produção de biodiesel de soja no país cresceu em 2008 de 78% em janeiro para 85% em novembro (SUAREZ *et al.*, 2009).

A produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras vegetais e animais pode ser realizada usando diferentes processos catalíticos. Nos últimos anos o estudo da catálise enzimática para síntese de biodiesel tem mostrado grande progresso, encorajado principalmente por problemas de poluição dos métodos convencionais e problemas de separação de produto. As dificuldades associadas ao controle do processo e ao aumento de escala, bem como ao elevado custo das lipases, têm reduzido a aplicação industrial desses catalisadores para modificação de óleos e gorduras. Para que a alcoólise enzimática possa competir com a produção química de biodiesel, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados: a imobilização da lipase, por exemplo, é um fator limitante na economia do processo. As lipases, devido à sua natureza protéica, podem sofrer ao longo de uma reação um processo de desnaturação com perda progressiva da atividade funcional. Todavia o procedimento de imobilização da lipase, possibilitando uma posterior reutilização do biocatalisador, pode tornar o processo viável sob os pontos de vista comercial e econômico (SHIMADA *et al.*, 2002; VILLENEUVE *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003).

Atualmente, a reciclagem de resíduos agrícolas e agro-industriais vem ganhando espaço cada vez maior, não simplesmente porque os resíduos representam "matérias primas" de baixo custo, mas, principalmente, porque os efeitos da degradação ambiental decorrente de atividades industriais e urbanas estão atingindo níveis cada vez mais alarmantes. Vários projetos de reciclagem têm sido bem sucedidos no Brasil e dentre eles

destacam-se o aproveitamento de papel, plásticos, metais, óleos lubrificantes automotivos e industriais, soro de leite e bagaço de cana. Dentre os óleos vegetais, pode-se reciclar o óleo comestível utilizado em frituras para ser convertido em biodiesel. Os destinos desses óleos em cidades grandes incluem a produção de sabão, de massa de vidraceiro e de ração animal, mas também têm parte de seu volume descartado diretamente no esgoto doméstico. O óleo, depois de usado, torna-se um resíduo indesejado e sua reciclagem como biocombustível alternativo não só retiraria do meio ambiente um poluente, mas também permitiria a geração de uma fonte alternativa de energia. Assim, duas necessidades básicas seriam atendidas de uma só vez (COSTA NETO *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Neste trabalho estudou-se as reações de alcoólise de óleos e gorduras comestíveis usados em frituras para produção de biodiesel catalisada por lipases imobilizadas.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Adquirir amostras de OGRF's em estabelecimentos comerciais na cidade de Maceió e realizar tratamento de purificação.
- Caracterizar esses óleos e gorduras residuais de fritura.
- Determinar a atividade lipolítica da enzima em diferentes temperaturas.
- Estabelecer um planejamento de experimentos, visando determinar as condições experimentais, dentro de um intervalo de estudo, que maximizem a síntese de biodiesel (resultante da reação de alcoólise enzimática), bem como avaliar os efeitos das variáveis e de suas interações.
- Realizar reações de alcoólise enzimática, obtendo assim o biodiesel.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DESTE ESTUDO

Apesar dos possíveis benefícios ambientais no emprego de óleos vegetais para conversão em biodiesel como substituto ao diesel, barreiras do ponto de vista econômico e ético, como concorrência do uso do solo e água com culturas alimentares e para outros fins técnicos, motivaram a busca de matérias-primas alternativas para produção de biocombustíveis.

Dentre as alternativas estudadas, a reutilização de óleos e gorduras vegetais residuais de processos de fritura de alimentos tem se mostrado atraente, pois, o consumo de alimentos fritos e pré-fritos tem aumentado nos últimos anos, provocando um aumento na produção de óleos e gorduras residuais de fritura (OGRF's). Este resíduo geralmente é descartado diretamente no esgoto doméstico. Este descarte incorreto dos resíduos de óleo vegetal é um problema antigo. É sabido que cada litro de óleo despejado no esgoto tem capacidade para poluir cerca de um milhão de litros de água dos rios e lençóis freáticos. Ao ser jogado no esgoto encarece o tratamento dos resíduos em até 45%, e o que permanece nos rios cria uma barreira que dificulta a entrada de luz e a oxigenação da água, comprometendo assim, a base da cadeia alimentar aquática e contribuindo para a ocorrência de enchentes (FERNANDES *et al.*, 2008). Além disso, a decomposição do óleo de cozinha emite metano na atmosfera, uma espécie de gás inodoro, incolor, que quando adicionado ao ar atmosférico transforma-se em mistura de alto teor explosivo. Além do que, o metano é um dos principais gases que causam o efeito estufa contribuindo para o aquecimento da Terra.

Dentro desse contexto, o aproveitamento energético de óleos e gorduras residuais descartados nos processos de fritura é importante, sob o ponto de vista de saúde humana, bem como para o meio ambiente e para a economia do país. Sua utilização possibilita a produção de um combustível de alto valor energético. A reutilização de óleos e gorduras residuais resultantes de processos de frituras de alimentos tem se mostrado atraente, na medida em que aproveita o óleo vegetal como matéria-prima para fabricação de combustível após a sua utilização na cadeia alimentar, resultando assim num segundo uso, ou mesmo numa destinação alternativa a um resíduo de produção de alimentos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 - BIODIESEL

4.1.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o aumento da demanda por combustível e a crescente preocupação com o meio ambiente tem se buscado novas rotas alternativas de energia no Brasil e no mundo (SUAREZ *et al.*, 2009). Neste contexto, o biodiesel tem se apresentado como um substituto natural do diesel de petróleo, que além de ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos e gorduras vegetais e animais e óleos utilizados em frituras, proporcionam uma geração descentralizada de energia e um apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida em regiões carentes, valorizando potencialidades regionais e oferecendo alternativas a problemas econômicos e sócio-ambientais de difícil solução (RAMOS *et al.*, 2003).

Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas. Além disso, reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre. É importante frisar que o biodiesel pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação (LIMA *et al.*, 2004).

De um modo geral, o biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel)(COSTA NETO, 2002).

Porém no Brasil aceita-se a definição da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Essa lei define que biodiesel é o “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (ANP, 2009). Por essa definição, não existe nenhuma restrição quanto à rota tecnológica, sendo possível utilizar como biodiesel os produtos obtidos pelos processos de transesterificação, esterificação e craqueamento.

Enquanto combustível, o biodiesel necessita de algumas características técnicas que podem ser consideradas imprescindíveis. A reação de transesterificação, por exemplo, deve

ser completa, acarretando ausência total de ácidos graxos remanescentes e o biocombustível deve ser de alta pureza, não deve conter nem traços de glicerina livre, de catalisador residual ou de álcool excedente da reação (COSTA NETO, 2002).

Como combustível o biodiesel possui algumas características que representam vantagem sobre os combustíveis derivados de petróleo, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel de petróleo (COSTA NETO *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2008).

CARACTERÍSTICAS	PROPRIEDADES COMPLEMENTARES
Características químicas apropriadas	Livre de enxofre e compostos aromáticos, alto número de cetanos, ponto de combustão apropriado, excelente lubricidade, não tóxico e biodegradável
Ambientalmente benéfico	Nível de toxicidade compatível ao sal ordinário, com diluição tão rápida quanto a do açúcar (<i>Departamento de Agricultura dos Estados Unidos</i>)
Menos poluente	Reduz sensivelmente as emissões de: (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxidos sulfúricos e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Economicamente competitivo	Complementa todas as novas tecnologias do diesel com desempenho similar e sem a exigência da instalação de uma infra estrutura ou política de treinamento
Reduz o aquecimento global	O gás carbônico liberado é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera
Economicamente atraente	Permite a complementação do salário das classes de baixa renda
Regionalização	Pequenas e médias plantas para produção de biodiesel podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria-prima disponível em cada local

Deve-se ainda ressaltar que a inserção do biodiesel na matriz energética nacional representa um poderoso elemento de sinergia para o agronegócio da cana-de-açúcar, cujo efeito será extremamente benéfico para a economia nacional. A produção de etanol é expressiva em praticamente todas as regiões do nosso país. E com a evidente decadência

das fontes fósseis, nenhuma outra região tropical tem porte e condições tão favoráveis para assumir a posição de um dos principais fornecedores de biocombustíveis e tecnologias limpas para o século XXI (SAAD, 2005).

4.1.2 – MÉTODOS DE OBTENÇÃO

O biodiesel pode ser obtido por diferentes rotas tecnológicas: craqueamento, esterificação e transesterificação.

- Craqueamento

O craqueamento térmico ou pirólise é o processo que provoca a quebra de moléculas por aquecimento a altas temperaturas, isto é, pelo aquecimento da substância na ausência de ar ou oxigênio a temperaturas superiores a 350°C, formando uma mistura de compostos químicos com propriedades muito semelhantes às do diesel de petróleo. Em algumas situações esse processo é auxiliado por um catalisador para a quebra das ligações químicas, de modo a gerar moléculas menores (SUAREZ *et al.*, 2007; SUAREZ *et al.*, 2009).

A matéria-prima é submetida a altas temperaturas, decompondo termicamente os triglicerídeos, como demonstrado na Figura 1, com um rendimento de aproximadamente 60%, produzindo um combustível composto por uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, lineares ou cíclicos, tais como alcanos, alcenos, cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos, além de monóxido e dióxido de carbono e água (SUAREZ *et al.*, 2007; SUAREZ *et al.*, 2009).

Porém, as plantas para este processo têm custos elevados para uma produção em pequena escala e o rendimento é baixo se comparado com os da transesterificação e esterificação.

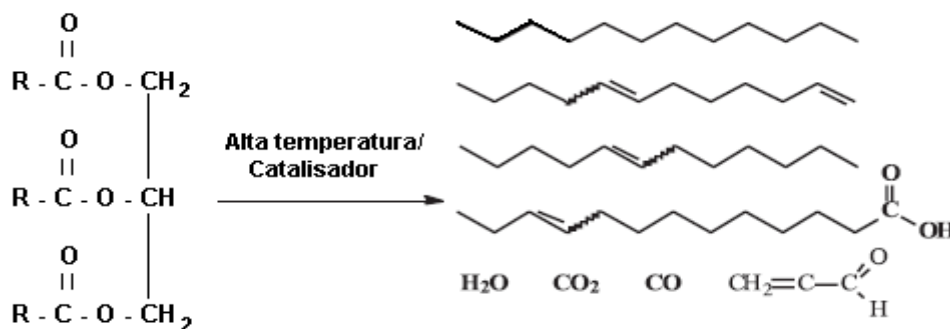


Figura 1 - Craqueamento de triglicerídeos (SUAREZ *et al.*, 2009).

- Esterificação

A esterificação consiste na reação entre os ácidos carboxílicos, encontrados nos óleos vegetais, com metanol ou etanol para formar ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente e água, de acordo com a Figura 2.

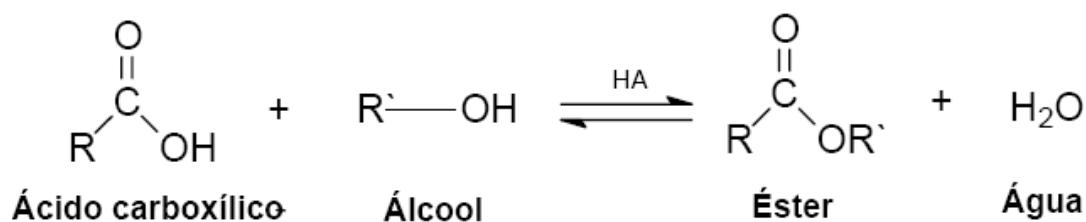


Figura 2 - Reação de esterificação.

Geralmente, a reação de esterificação é catalisada por ácidos inorgânicos como o ácido sulfúrico. A reação de esterificação é reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (a esterificação) como a reação inversa (a hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água; ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool.

O processo de esterificação ocorre preferencialmente com álcoois de baixo peso molecular, sendo metanol o mais usado devido seu baixo custo de aquisição. O etanol utilizado na esterificação não necessita ser anidro uma vez que a água pode ser retirada do sistema reacional. Entretanto, há uma grande dificuldade de encontrar na literatura dados termodinâmicos para a esterificação com os ácidos graxos, de alto peso molecular, e dos ésteres envolvidos nessas reações, importantes para a produção do biodiesel (SUAREZ *et al.*, 2007).

- Transesterificação

Transesterificação nada mais é do que a separação da glicerina do óleo vegetal (Figura 3). Cerca de 20% de uma molécula de óleo vegetal é formada por glicerina. A glicerina torna o óleo mais denso e viscoso. Durante o processo de transesterificação, a glicerina é removida do óleo vegetal, deixando o óleo mais fino e reduzindo a viscosidade (SANTOS, 2007; SUAREZ *et al.*, 2007).

A molécula de óleo vegetal é formada por três ésteres ligados a uma molécula de glicerina, o que faz dele um triglicerídeo (COSTA NETO, 2002).

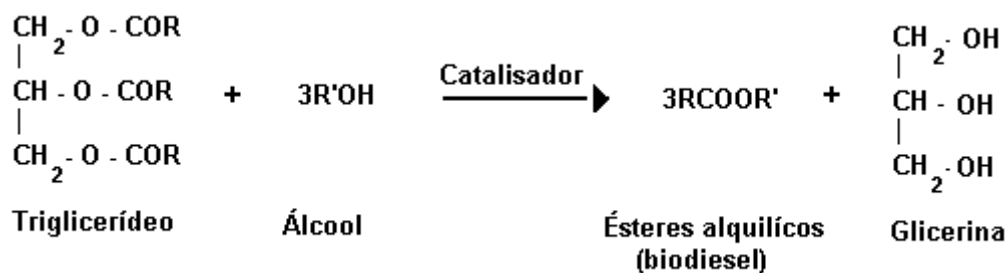


Figura 3 - Reação de transesterificação do triglicerídeo.

A transesterificação de óleos e gorduras animais ou vegetais, também denominada de alcoólise, pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados, como bases inorgânicas, ácidos minerais, resinas de troca iônica, argilominerais ativos, hidróxido duplo lamelares, superácidos, superbases e enzimas lipolíticas (lipases) (FUKUDA *et al.*, 2001; RAMOS, 2003; SANTOS, 2007).

A reação de transesterificação é uma reação reversível, e necessita de excesso de álcool para deslocar o equilíbrio para direita. Os álcoois de cadeia curta (de 1 a 4 carbono) são os mais utilizados na reação, sendo no Brasil, o uso do etanol o mais vantajoso, pois este é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido através da biomassa, tornando o processo totalmente independente de petróleo e totalmente agrícola (FERRARI *et al.*, 2005).

4.2 – ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA

Os óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água) que pertencem a classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. A diferença entre óleos e gorduras reside exclusivamente na sua aparência física. O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 20°C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo de tal temperatura (CÂMARA, 2006). Esta é a classe de maior abundância na natureza, sendo constituída por uma mistura de diversos

compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos graxos livres e seus derivados, como triacilglicerídeos e fosfatídeos.

A fritura tem contribuído para o aumento do consumo de óleos e gorduras, visto que é um processo de cocção de alimentos de grande palatabilidade em todas as idades e classes sociais, por gerar alimentos agradáveis sensorialmente e pela facilidade de manipulação e preparo desses alimentos (MENDONÇA *et al.*, 2008). Porém, os problemas associados ao meio ambiente têm se agravado significativamente e para garantir a sobrevivência no planeta deve-se concentrar o máximo esforço para reciclar a maior parte dos resíduos gerados, e dentre eles os óleos usados em frituras.

Os óleos e gorduras utilizados repetidamente em fritura por imersão sofrem degradação por reações tanto hidrolíticas quanto oxidativas. A hidrólise ocorre devido à presença de água, sendo mais rápida quando se submete alimentos com altos teores de umidade à fritura. A oxidação é o processo degradativo que acontece quando o oxigênio atmosférico, ou aquele que está dissolvido no óleo, reage com ácidos graxos insaturados presentes (FOLETTTO *et al.*, 2007). A oxidação, que é acelerada pela alta temperatura do processo, é a principal responsável pela modificação das características físico-químicas e organolépticas do óleo. O óleo torna-se escuro, viscoso, tem sua acidez aumentada e desenvolve odor desagradável, comumente chamado de ranço, tornando-se inadequado para o processamento de alimentos mesmo quando submetido a purificação (COSTA NETO, 2002; COSTA NETO *et al.*, 2008).

A fritura por imersão é um processo que utiliza óleos ou gorduras vegetais como meio de transferência de calor, cuja importância é indiscutível para a produção de alimentos em lanchonetes e restaurantes comerciais ou industriais a nível mundial. Em estabelecimentos comerciais, utilizam-se fritadeiras elétricas descontínuas com capacidades que variam de 15 a 350 litros, cuja operação normalmente atinge temperaturas entre 180-200°C. Já em indústrias de produção de empanados, salgadinhos e congêneres, o processo de fritura é normalmente contínuo e a capacidade das fritadeiras pode ultrapassar 1000 litros. O tempo de utilização do óleo varia de um estabelecimento para outro, principalmente pela falta de legislação que determine a troca do óleo usado. (COSTA NETO *et al.*, 2008)

O Brasil ainda não tem regulamento que monitora o descarte de óleos e gorduras no processo de fritura. Alguns indicadores utilizados por restaurantes e *fastfoods*, para determinar o ponto de descarte do óleo ou da gordura são: alteração de cor, a presença de fumaça em temperaturas de fritura, presença de espuma e alterações do aroma e do sabor, o que torna a avaliação subjetiva. (O'BRIEN,1998 *apud* SANIBAL e MANCINI FILHO, 2008)

As Normas que regulamentam a adequação de um óleo para o consumo no Brasil, as NTA 50, provém alguns itens físico-químicos para controle da adequação do óleo, assim como: índice de iodo, valor de peróxido e índice de acidez, no entanto não se referem aos óleos e gorduras de fritura. O índice de acidez apesar de não ser o melhor índice analítico para avaliar a qualidade do óleo ou gordura de fritura, é o parâmetro químico escolhido pela norma brasileira. O índice de acidez utilizado como ponto de referência pela NTA 50 é de 0,3% de ácido oléico para óleos e gorduras vegetais refinados (SANIBAL e MANCINI FILHO, 2008; ANVISA, 2008).

4.3 – ENZIMAS

4.3.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Produtos naturais encontrados em abundância nos seres vivos e na natureza, as enzimas são proteínas capazes de promover e acelerar reações químicas, que regulam grande número de processos biológicos. Presentes em microrganismos, animais e vegetais, elas são usadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos (COELHO *et al.*, 2008). No organismo, atuam em alta velocidade, controlando várias funções vitais do metabolismo dos seres vivos, permitindo que estas funções tornem-se mais eficientes. Por exemplo, no processo de mastigação e digestão dos alimentos, são enzimas como as amilases, as proteases e as lipases que permitem a transformação dos alimentos de modo que sejam corretamente absorvidos e transformados em energia.

As enzimas são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações, que ocorrem sob condições suaves, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo à neutralidade. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem ser até 10^{12} vezes maiores do que as não catalisadas. Uma enzima geralmente catalisa uma única reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Reações colaterais que levam ao desperdício de formações de produtos secundários raramente ocorrem. O grau de especificidade para o substrato é normalmente alto e, às vezes, absoluto. A velocidade de uma reação enzimática é influenciada pela concentração do substrato, pH, concentração da enzima, temperatura e presença de ativadores ou inibidores (COSTA NETO, 2002; CASTRO *et al.*, 2004).

As proteínas são formadas por quatro níveis de estrutura. A estrutura primária, que é definida como a sequência de aminoácidos e pontes de sulfetos, quando existirem, dando uma completa descrição das ligações covalentes da proteína. A estrutura secundária refere-

se às formas de cadeias polipeptídicas, α -hélice ou β -hélice. A terciária pode ser descrita como uma estrutura secundária que apresenta configuração tridimensional devido às interações não-covalentes entre os aminoácidos das cadeias polipeptídicas; porém, é constituída por apenas uma unidade de cadeia polipeptídica. A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial das sub-unidades, ligadas por ligações não covalentes (HENDRIX *et al.*, 1998 *apud* FEIRHMANN, 2005). Segundo Scriban (1985) *apud* Feirhmann (2005) a atividade das enzimas é função direta das estruturas terciária ou quaternária. Sendo assim, todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento, modificação do pH, pressão), dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento.

Grande parte do poder catalítico das enzimas deve-se à capacidade delas em interagirem com o substrato em orientações favoráveis no complexo enzima-substrato (ES). O substrato liga-se ao centro ativo da enzima e parte da especificidade catalítica da mesma depende em parte da natureza das ligações envolvidas. As enzimas possuem um “centro ativo”, onde se processam as reações químicas. Este é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia da proteína que se encontram em íntima e mútua proximidade espacial (COSTA NETO, 2002).

Acredita-se que os aminoácidos que constituem o centro ativo formam na superfície da enzima uma espécie de “fenda”, na qual o substrato pode ajustar-se. Esta fenda deve possuir um formato definitivo, que acomoda algumas moléculas, como os substratos e inibidores, mas rejeita outras espécies que impeça-os de entrar em contato ativo com a enzima. Para adaptar-se ao centro ativo, um substrato deve ter uma forma complementar a este. O modelo mais ilustrativo é o de Emil Fischer da chave e fechadura, reportado em 1890. No entanto, é evidente que as formas dos centros ativos de algumas enzimas são altamente modificadas pela interação com o substrato, como foi postulado por Daniel E. Koshland Jr. em 1958. Os centros ativos dessas enzimas têm formas que são complementares à do substrato, mas somente depois de ligado. Esse processo de reconhecimento dinâmico é chamado de encaixe induzido (COSTA NETO, 2002).

4.3.2- LIPASES

As lipases são as enzimas que catalisam a hidrólise de acilgliceróis em ácidos graxos, diacil gliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (OBREGÓN, 2004 *apud* ALVES *et al.*, 2006). São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes

animais, vegetais e microbianas. Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microorganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Em geral, os microorganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucos* (FACCIO, 2004; RODRIGUES, 2009).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. Atualmente, o maior consumidor de lipase é a indústria de formulação de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases vêm deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais (RODRIGUES, 2009).

Mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases (proteases, carbohidrolases e lipases), por serem extremamente versáteis, pois catalisam várias reações e diferentes substratos quando comparada às outras hidrolases (GANDHI, 1997 *apud* FACCIO, 2004). O potencial de aplicação de lipases em processos biotecnológicos para modificação de óleos e gorduras tem sido objeto de grande interesse nos meios científico, econômico e industrial, pois apresentam vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos, como a especificidade, regioseletividade e a enantioseletividade, que permitem a catálise de reações com número reduzido de subprodutos, baixo custo no tratamento de resíduos e necessitando de condições brandas de temperatura e pressão (PRAZERES *et al.*, 1993 *apud* FACCIO, 2004).

As lipases atuam na interface óleo/água de emulsões e são ativas inclusive em solventes orgânicos. O fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, que relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, que formam emulsão. A determinação da estrutura tridimensional da lipase fornece uma explicação elegante para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa. Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e,

ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; RODRIGUES, 2009; URIOSTE, 2004). Entretanto, recentemente, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, pois as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (FACCIO, 2004; RODRIGUES, 2009).

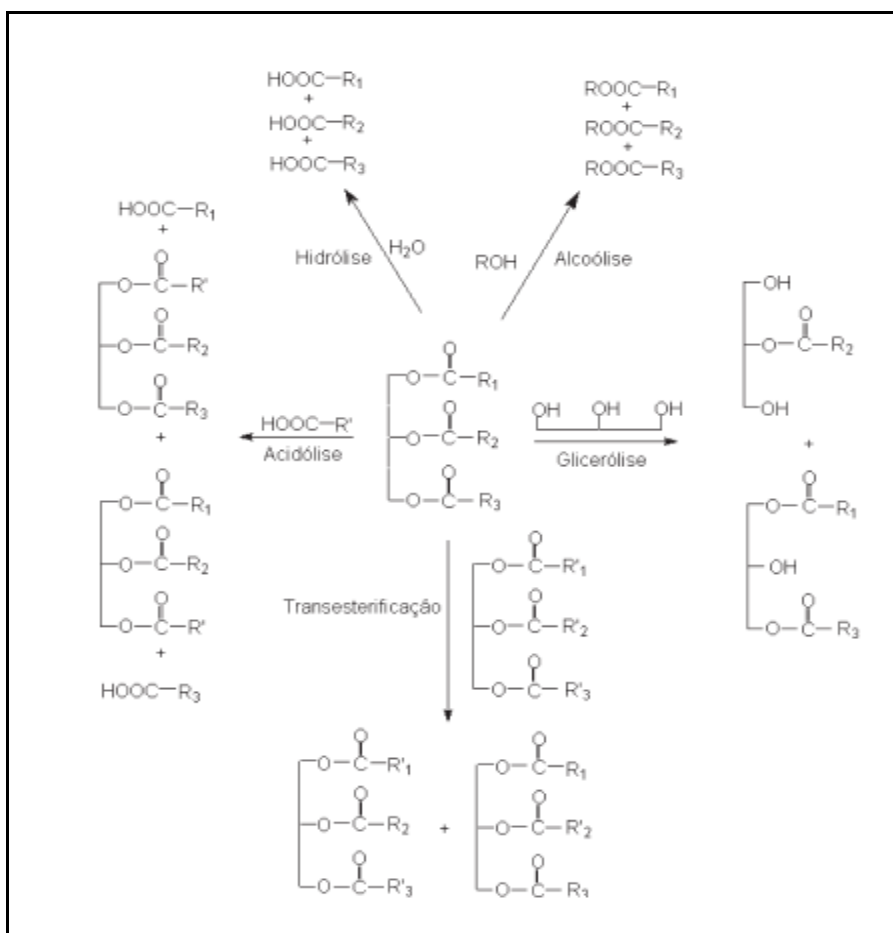


Figura 4 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (RODRIGUES, 2009)

Quanto às propriedades físico-químicas, as lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. A maioria delas apresenta atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C, sendo que sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem. E em geral são ativas em uma ampla faixa de valores de pH, apresentando uma alta atividade da faixa de pH 5-9 (COSTA NETO, 2002; MACRAE e HAMOND, 1985 *apud* FACCIO, 2004).

4.3.3 – IMOBILIZAÇÃO

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las, frente a este problema, o desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (COSTA NETO, 2002; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; FACCIO, 2004; SAAD, 2005; WATANABE *et al.*, 2002).

A imobilização pode ocorrer de diferentes maneiras. No caso de lipases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico quando ligações covalentes com formação de ligação cruzada são formadas com a lipase, e o método físico, quando interações fracas ou retenção mecânica é utilizada. No método físico a lipase pode ficar retida ou microencapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). A escolha do suporte é dependente de diversas características que são importantes para aplicações em processos industriais. Entre esses fatores estão a resistência microbiológica, estabilidade térmica, durabilidade química e funcional, caráter hidrofóbico e hidrofílico, facilidade de regeneração, capacidade de carga e baixo custo (COSTA NETO, 2002).

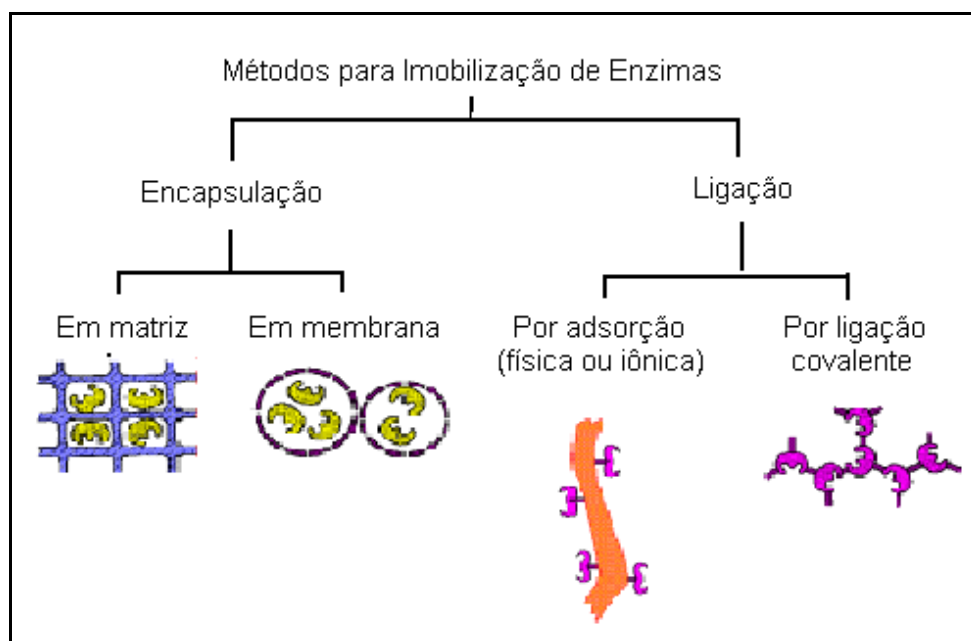


Figura 5 - Métodos para Imobilização de Enzimas (Adaptada de COSTA NETO, 2002; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A utilização de lipases imobilizadas facilita o desenvolvimento de processos contínuos e também conduz a um decréscimo no potencial para a contaminação do produto com lipase residual, o que facilita a separação do biocatalizador do sistema de reação para posterior reutilização, resultando em processos mais econômicos. A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, podendo aumentar a resistência aos efeitos desnaturantes de vários solventes orgânicos, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto (MALCATA *et al.*, 1990 *apud* FACCIO, 2004).

Portanto, o uso de enzimas imobilizadas como catalisadores de reações de alcoólise apresenta uma série de vantagens, tais como: maior estabilidade, necessidade de baixos teores de água, menor interferência de inibidores e/ou ativadores da reação, facilidade de recuperação dos produtos, possibilidade de reutilização das enzimas em processos contínuos ou em bateladas, maior facilidade de controle e de operação e a minimização de produção de efluentes. Além disso, muitas vezes com o processo de imobilização, as propriedades enzimáticas são alteradas, produzindo-se biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de suporte e da enzima (PAIVA *et al.*, 2000).

4.4 – ALCOÓLISE ENZIMÁTICA

A obtenção de biodiesel por meio da catálise enzimática ocorre através da alcoólise dos triacilglicerídeos a partir da reação com um álcool, que pode ser metanol ou etanol, na presença de um catalisador enzimático (lipases), resultando na produção de alquilésteres dos ácidos graxos presentes na mistura que compõe o óleo ou gordura vegetal ou animal utilizado.

Recentemente, o interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regioseletividade e enantiosseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial de poluentes (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

As plantas industriais de biodiesel em funcionamento no Brasil utilizam catálise básica, entretanto, por tratar-se de uma catálise homogênea, os produtos não saem com grau de pureza tão alto devido aos elevados custos de purificação dos produtos da reação. Por este motivo a aplicação de catalisadores enzimáticos tem sido muito estudada e, uma vez otimizado, o processo enzimático poderá apresentar algumas vantagens em relação ao químico (COSTA NETO, 2002; VILLENEUVE *et al.*, 2000):

- Temperatura de reação mais branda;
- Menor influência de água na matéria-prima e nos reagentes;
- Não é necessária a remoção do catalisador (quando na forma livre)
- Possibilidade de reutilização do catalisador (quando imobilizadas);
- Produtos com maior grau de pureza.

O elevado custo das lipases tem reduzido a aplicação industrial desses catalisadores para modificação de óleos e gorduras. A possibilidade de separação da enzima do produto final para posterior reutilização, através da imobilização das enzimas, tem tornado a catálise enzimática mais viável economicamente.

Embora os processos de alcoólise enzimática para obtenção de biodiesel, ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados tem sido reportados em artigos e patentes. De um modo geral, estes estudos consistem na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microorganismo que gera a enzima, novas tecnologias em imobilização, etc.), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais (COSTA NETO, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003).

Estudos realizados observaram que na alcoólise enzimática, as lipases apresentam sensibilidade a alcoóis de cadeia curta (metanol e etanol), isso porque eles não possuem boa solubilidade nos óleos usados como substrato da reação, diminuindo assim o contato dos óleos com as enzimas, levando a uma desativação das mesmas e consequente decréscimo no rendimento em biodiesel. Para minimizar este problema foram apontadas algumas estratégias, tais como a adição sucessiva do álcool em pequenas quantidades e o uso de solventes orgânicos, tais como dioxano, éter de petróleo e hexano (CHEN *et al.*, 2009; ROYON *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2002; SUAREZ *et al.*, 2007).

Portanto, o álcool utilizado como substrato na reação de alcoólise influencia na necessidade do uso do solvente orgânico. Alcoóis de cadeia menor, como metanol e etanol, apresentam uma solubilidade menor aos óleos normalmente usados para obtenção de biodiesel. Alcoóis com cadeia maior, como propanol e butanol, apresentam melhor solubilidade ao óleo e dispensam o uso do solvente orgânico na reação (RODRIGUES, 2009).

A catálise enzimática em meio orgânico apresenta uma série de vantagens (MONOT, 1994 *apud* FACCIO, 2004):

- Aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água;
- Deslocamento do equilíbrio das reações;
- Diminuição do número de reações indesejáveis;
- Simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador;
- Controle da estereoseletividade das reações enzimáticas;
- Diminuição do risco de contaminação microbiana;
- Redução de eventuais inibições por substratos e produtos;
- Aumento da estabilidade da enzima.

Mas também apresentam algumas desvantagens como: desnaturação e/ou inibição do catalisador pelo solvente orgânico, aumento da complexidade do sistema de reação e o

aumento dos custos adicionais com os solventes e com a remoção posterior dos mesmos, já que uma alta razão (geralmente 1:40) do solvente é usada na reação.

Oliveira *et al* (2004) estudaram a etanólise enzimática de óleo de mamona com lipase comercial (Lipozyme IM) usando n-hexano como solvente. Os experimentos foram realizados variando a temperatura, as concentrações de água e enzima no meio reacional e a razão molar óleo:etanol, conversões de 100% foram alcançadas em diversas condições experimentais para os tempo de 6 e 8 horas de reação.

Faccio (2004) estudou a alcoólise enzimática do óleo de mamona e de soja refinado usando hexano como solvente orgânico e as lipases Lipozyme Im e Novozym 435. Quatro sistemas foram estudados: mamona-Lipozyme IM, mamona-Novozym 435, soja-Lipozyme IM e soja-Novozym 435. As reações de alcoólise foram realizadas nas mesmas condições de temperatura (T), concentração de enzimas (E), concentração de água (H) e razão óleo:etanol (R) para os quatro sistemas, o que lhe permitiu concluir que a composição do óleo, o nível de saturação ou insaturação, bem como as propriedades físico-químicas podem interferir na atividade enzimática e, conseqüentemente, na conversão do processo. Os resultados obtidos por Faccio (2004) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Conversões obtidas na alcoólise enzimática dos óleos de mamona e de soja refinado em solvente orgânico (FACCIO, 2004)

Condições experimentais					Conversão (%)			
Experimento	T (°C)	E (% p/p)	H (% p/p)	R	Mamona	Mamona	Soja	Soja
					Lipozyme IM	Novozym 435	Lipozyme IM	Novozym 435
1	35	5	0	1:3	41,7	47,5	23,0	1,0
2	35	5	10	1:10	0,65	1,6	0,3	0,3
3	35	20	0	1:10	70,4	67,0	37,7	1,8
4	35	20	10	1:3	85,0	34,0	95,6	0,8
5	65	5	0	1:10	19,7	52,0	13,4	11,8
6	65	5	10	1:3	33,0	16,5	25,3	6,2
7	65	20	0	1:3	98,0	60,0	30,2	9,8
8	65	20	10	1:10	40,6	73,0	1,9	5,8
9	50	12,5	5	1:6,5	60,6	23,0	25,4	1,0

Chem *et al.* (2009) estudaram o efeito da concentração de hexano, num intervalo de 0–20% em relação a massa do óleo, na alcoólise enzimática de óleos residuais de cozinha com a lipase imobilizada derivada de *Candida sp.* 99-125 e chegou a conclusão de que o acréscimo de até 15% de hexano na reação apresenta um aumento no rendimento em metil ésteres, possivelmente porque o solvente promove um maior contato entre a molécula do substrato com a enzima imobilizada e porque a concentração do álcool de cadeia curta (metanol) foi diminuída pelo solvente diminuindo assim o efeito tóxico do mesmo na lipase. Porém, para concentrações maiores que 15% houve uma redução no rendimento isso porque decresce a oportunidade de contato entre as moléculas do substrato e a lipase imobilizada.

Dossat *et al.* (2002) analisaram a transesterificação realizada em sistemas usando solvente e livre de solvente. Utilizaram como substratos o ácido oléico (óleo de girassol) e butanol e lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*, concluíram que no sistema livre de solvente somente 60% do ácido oléico foi convertido em éster, já no sistema com n-hexano 95% foi convertido.

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente não apenas afeta a atividade e estabilidade da enzima, como também modifica a sua especificidade (FACCIO, 2004).

Os solventes menos nocivos as enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (KNEZ e ABULIN, 2001 *apud* DALLA ROSA, 2009)

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é usado em meio orgânico. O controle de água é importante, pois ela atua como “lubrificante” mantendo a enzima na sua conformação ativa, participa de mecanismos de inativação da enzima, promove agregação de partículas de enzima, limita difusão de substrato e também a hidrólise do substrato. Pequenas variações no conteúdo de água podem provocar várias modificações na atividade enzimática, com o aumento de adição de água, a quantidade de gotículas óleo/água formadas aumenta, e assim aumenta a área interfacial para a enzima. Entretanto, como usualmente as lipases catalisam hidrólise em meio aquoso, um excesso de água pode estimular esta reação competitiva do substrato na reação de alcoólise. As enzimas são praticamente inativas em sistemas completamente anidros. Admite-se que a

enzima requer uma pequena camada de água, que atua como componente primário do microambiente da mesma, atuando como um tampão entre a superfície da enzima e seio do meio reacional, assim sendo, a biocatálise em meio orgânico é possível desde que se conserve esta pequena quantidade de água indispensável à enzima. O ótimo conteúdo de água é um compromisso entre minimizar a reação de hidrólise e maximizar a atividade da enzima para a reação de alcoólise. (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; FACCIO, 2004; NOURENDINI *et al.*, 2005).

4.5 – ALCOÓLISE DE ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA

O biodiesel pode ser produzido a partir de qualquer tipo de óleo vegetal, mas nem todo óleo vegetal deve ser usado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Isso porque, alguns óleos vegetais apresentam propriedades físicas e químicas, como alta acidez e alta viscosidade, não ideais que são transferidas para o biocombustível tornando-o inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel. E ainda tem a questão da viabilidade econômica e sócio-ambiental e os aspectos agrônômicos (RAMOS *et al.*, 2003).

O óleo residual tem se apresentado como uma possibilidade entre as matérias-primas do Biodiesel, devido sua disponibilidade e a viabilidade em não descartá-lo como resíduo ao meio ambiente. A pesquisa feita por Costa Neto *et al.* (2008) mostra que somente nos restaurantes industriais da cidade e região metropolitana de Curitiba, são mensalmente geradas cerca de 100 toneladas de óleos de fritura, cujos destinos incluem a produção de sabão, de massa de vidraceiro e de ração animal, mas que também têm parte de seu volume descartado diretamente no esgoto doméstico por falta de legislação específica e fiscalização rígida, fato que se repete em todas as cidades brasileiras. Sendo assim, a reutilização de óleo para produção de biodiesel torna-se uma alternativa para eliminação deste resíduo.

Por ser o óleo residual uma matéria-prima reciclada de baixo custo de aquisição, seu uso na produção de biodiesel tem se tornado muito atraente já que 80% do custo de produção do biodiesel é proveniente da matéria-prima, e ainda traz consigo vários benefícios ambientais como diminuição das poluições das águas e redução dos gases emitidos pelo uso do diesel convencional. Portanto, vários estudos estão sendo realizados para otimizar a produção de biodiesel de óleo de fritura.

Nye *et al.* (1983), investigaram a reação de transesterificação de óleos de fritura com metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol e 2-etoxietanol em meios ácido e básico. O maior rendimento foi obtido com o metanol em meio alcalino, utilizando hidróxido de potássio como catalisador. Nesse mesmo estudo, alguns dos ésteres de menor viscosidade foram selecionados para a realização de testes preliminares em motores do ciclo diesel. O éster metílico obtido em meio básico, e os ésteres etílico e butílico obtidos em meio ácido, não apresentaram problemas de ignição e desempenho, apresentando pouca ou nenhuma fumaça na exaustão. Os demais ésteres não foram testados por critérios de viscosidade e o rendimento da reação não serviu como parâmetro para a seleção dos ésteres a serem utilizados nos testes.

Segundo Mittelbach e Tritthart (1988), a utilização de biodiesel de óleos de fritura em motores do ciclo diesel apresentou bons resultados. Os testes foram realizados em bancada dinamométrica e em veículo de carga média com motor turbinado a diesel. Por outro lado, a avaliação da emissão de gases demonstrou que houve um aumento relativo na liberação de gases nitrogenados, particularmente quando o biocombustível foi comparado ao diesel convencional.

Costa Filho *et al.* (2008), estudaram as variáveis que interferem na produção enzimática de biodiesel obtido a partir da alcoólise de óleo de fritura com etanol, utilizando uma lipase comercial de *Candida antártica* tipo B (Novozym 435) como catalisador. As variáveis estudadas foram temperatura, razão molar álcool:óleo e tempo reacional, obtendo uma conversão máxima de 82,66% em 72 horas de reação nas condições de menor temperatura (30°C) e na menor razão molar álcool:óleo (3:1). Os autores concluíram que a razão molar álcool:óleo e o tempo reacional foram as variáveis que tiveram efeito significativo na conversão de ésteres e que apesar de não significativa a temperatura teve um efeito negativo, indicando que esta enzima tem um comportamento ótimo em condições brandas de temperatura.

Para produzir biodiesel através de óleos residuais de fritura faz-se necessária a união de atividades econômicas ao desenvolvimento de ações que possam contribuir para a melhoria do meio ambiente e bem estar da comunidade. Sem dúvida, as vantagens sociais unem-se as ambientais e econômicas, uma vez que a gestão ambiental além de combater os impactos ambientais decorrentes do descarte incorreto de óleos residuais de fritura, contribui para o incremento salarial de famílias de baixa renda (FERNANDES *et al.*, 2008).

5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – MATERIAIS

Os óleos e gorduras residuais de frituras foram cedidos por dois estabelecimentos comerciais localizados na cidade de Maceió.

A enzima utilizada foi uma lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym 435), gentilmente cedida pela Novozymes Latin América Ltda – Araucária/PR.

O etanol utilizado nas reações foi etanol 5% hidratado.

Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2 - MÉTODOS

5.2.1 – AMOSTRAGEM

Foram definidos dois pontos de coletas: um para gordura hidrogenada residual, que foi denominado de ponto **A**; e outro para óleo de soja residual, denominado de ponto **B**; para um terceiro ponto, foi feito uma mistura 50% em volume da amostra A mais a amostra B, que foi então denominado de ponto **AB**.

Em cada ponto foram feitas duas coletas, o que nos deu um total de seis amostras, a saber: A₁, A₂, B₁, B₂, AB₁ e AB₂. As amostras foram armazenadas em garrafas PET de 2L. O aspecto visual das amostras pode ser visto na Figura 6.



Figura 6 – Aspecto visual das amostras coletadas.

5.2.2 – PRÉ-TRATAMENTO DOS ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA

O pré-tratamento para purificação dos óleos de fritura adquiridos foi realizado através do processo de filtração à vácuo utilizando fibra vegetal (algodão) como meio filtrante. Com o objetivo de reter os resíduos sólidos em suspensão.

5.2.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA

Foram determinados, nos óleos e gorduras residuais, os seguintes parâmetros:

5.2.3.1 – ÍNDICE DE ACIDEZ

O índice de acidez é definido como sendo o número de miligramas de hidróxido de potássio ou sódio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama da amostra.

Os ácidos graxos livres são responsáveis pela degradação dos óleos e também de ésteres, ocasionando uma maior oxidação das cadeias, alterando a sua composição e propriedades (BUENO, 2007). Altos índices de acidez têm um efeito bastante negativo sobre a qualidade do óleo, a ponto de torná-lo impróprio para alimentação humana ou até mesmo para fins carburantes, pois tem ação corrosiva sobre os componentes metálicos do motor.

O procedimento adotado para determinação do índice de acidez é descrito a seguir de forma simplificado estando o mesmo, de acordo com o método oficial da AOCS (REAPPROVED, 1997 *apud* SILVA, 2008).

Reagentes:

- Solução (1:1) álcool etílico e tolueno P. A.;
- Indicador fenolftaleína 1%;
- Hidróxido de potássio ou de sódio 0,1mol/L ou 0,01 mol/L (padronizado);

TÉCNICA:

Pesou-se 1 grama do óleo em dois erlenmeyers com capacidade de 125 mL.

Adicionou-se 10 mL da solução (1:1) álcool etílico (C_2H_5OH) e tolueno (C_7H_8) nos erlenmeyers contendo óleo e a um terceiro sem amostra (para que se faça a prova em branco).

Em seguida, adicionou-se 4 gotas de fenolftaleína 1% (indicador de viragem), em todos os erlenmeyers.

Realizou titulação com hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) numa concentração de 0,01 mol/L ou 0,1 mol/L.

Para os cálculos de índice de acidez, utilizou a seguinte expressão:

$$I.A. = \frac{(V - PB) \times F \times M \times 56,1}{P}$$

Equação 1 – Expressão para o cálculo do índice de acidez.

Onde:

V = volume de NaOH ou KOH gasto pela amostra (mL);

P = massa pesada da amostra (g);

F = fator de correção;

PB = volume gasto na prova em branco (mL);

M = molaridade do NaOH ou KOH (mol/L);

5.2.3.2 – ÍNDICE DE IODO PELO METÓDO DE WIJS

É uma propriedade relacionada diretamente com a insaturação das cadeias que compõem a amostra. É definido como a quantidade de iodo gasto para quebrar as ligações duplas e triplas da amostra, pois cada dupla ligação de um ácido graxo pode incorporar dois átomos de halogênio. Por essa razão, quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo, maior será o índice.

Insaturações em ésteres e ácidos graxos expostos a altas temperaturas podem proporcionar a polimerização das cadeias e levar à formação de goma, deixando resíduos no interior dos motores, principalmente derivados do ácido linolênico. Por isso a importância de se avaliar essa propriedade (BUENO, 2007).

O procedimento adotado para determinação do índice de iodo é descrito a seguir de forma simplificada e está de acordo com o método oficial da AOCS (REAPPROVED, 1997 *apud* SILVA, 2008).

Reagentes:

- Solução de Wijs (iodo, ácido acético);
- Solução de iodeto de potássio 10%;
- Clorofórmio;
- Solução indicadora amido 1%;
- Solução de tiosulfato de sódio 0,1mol/L, padronizado;

TÉCNICA:

Filtrou a amostra com papel de filtro (agente dessecante).

Pesou-se 0,05g da amostra em erlenmeyers de 125 mL.

Adicionou-se 3 mL de clorofórmio nos erlenmeyers contendo óleo e a um terceiro sem amostra (para que se faça a prova em branco), para solubilizar as amostras.

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram adicionados 10 mL de solução de Wijs.

Após agitação, os frascos foram ser reservados em local escuro, com temperatura entre 20 e 30°C. (o tempo de repouso das amostras é de 2 horas se o índice de iodo esperado for acima de 150, e de 1 hora se for abaixo de 150).

Decorrido o tempo, foram removidos os frascos do local de repouso e, então adicionados 8 mL de iodeto de potássio (KI) 10% e 60 mL de água destilada para que sejam feitas as titulações com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, sob vigorosa agitação até que a coloração da amostra quase desapareça.

Após a coloração amarelada ter se tornado mais clara, foi adicionado aproximadamente 1 mL de indicador amido e a titulação foi continuada até que a fase inferior mude de coloração rosa para incolor.

Para se calcular o índice de iodo na amostra, utilizou-se a seguinte expressão:

$$I. I. = \frac{(PB - A) \cdot M \cdot F \cdot 12,69}{P}$$

Equação 2 – Expressão para o cálculo do índice de iodo.

Onde:

PB = volume gasto na prova em branco (mL);

A = volume gasto do titulante (mL);

M = Molaridade [0,1 mol/L de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)];

F = fator de correção;

P = peso da amostra de óleo (g);

5.2.3.3 – VISCOSIDADE CINEMÁTICA

Essa propriedade caracteriza a resistência do líquido ao escoamento e é inversamente proporcional a temperatura do fluido.

A viscosidade cinemática das amostras foi determinada com viscosímetro de Ostwald marca Cannon-Fenske, na temperatura 40°C, mantida constante por um banho de viscosidade cinemática, como mostrado na Figura 7.



Figura 7 – Sistema para determinação da viscosidade cinemática (SILVA, 2008).

Foram colocados cerca de 7 mL de amostra no viscosímetro e determinado o tempo de escoamento desta amostra (em segundos) através de um capilar. Admite-se um erro relativo de 2% para essa metodologia.

Cálculo:

$$\text{Viscosidade (St)} = T \times C$$

Equação 3 – Expressão para o cálculo da viscosidade.

Onde:

T = tempo de escoamento indicados no viscosímetro (segundos);

C = constante do viscosímetro

5.2.3.4 – MASSA ESPECÍFICA

É a relação entre a massa e o volume da substância. Depende da composição da matéria-prima, e no caso dos óleos é ainda dependente da variação nas cadeias dos ácidos graxos que o compõem, quanto menores as cadeias e mais saturadas, maior será a massa específica (BUENO, 2007).

A massa específica das amostras foi determinada segundo a norma ASTM D-4052, utilizando-se um densímetro digital, como mostrado na Figura 8. A leitura foi realizada diretamente no visor do equipamento a 20°C em g/cm^3 . Para cada amostra foram tomados três valores de massa específica e obtida a média.



Figura 8 – Sistema para determinação da massa específica.

5.2.3.5 – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

Os principais componentes de óleos e gorduras são os ácidos graxos que podem estar livres ou esterificados com glicerol nas formas de mono-, di- ou triacilglicerídeos, sendo que a variação da composição em ácidos graxos depende da origem do óleo e/ou gordura.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono. Em alguns esta cadeia é totalmente saturada e não ramificada, em outros contem uma ou mais duplas ligações.

Conhecer a composição química detalhada do óleo ou gordura, seja qual for a sua origem, é muito importante, isso porque o biodiesel obtido deve obedecer algumas especificações que é função direta da composição química do óleo ou gordura usado como matéria-prima. Por exemplo, ésteres monoalquílicos de ácidos graxos com cadeias acima de C20 e também os com cadeias saturadas de C16 e C18, têm uma tendência maior a se solidificarem a baixa temperatura do que as cadeias de até 18 carbonos com uma ou mais insaturações podendo, portanto, tornar o biodiesel impróprio para uso em climas frios, o que não elimina a possibilidade de uso de ésteres obtidos de cadeias saturadas, apenas limita seu uso na forma pura e em misturas maiores que B20 a climas tropicais. Em contrapartida, o índice de iodo será mais baixo, ajudando no cumprimento do limite máximo de 120g I₂/100g de amostra. Percebe-se, portanto, que a simples análise da composição química dos óleos é suficiente para se inferir sobre possibilidades, potenciais e adequação do uso de uma determinada matéria-prima quanto à produção de um biodiesel de alta qualidade (DABDOUB *et al.*, 2009).

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa após utilização da técnica de derivatização, que consiste em transformar os óleos em seus respectivos ésteres metílicos de forma analítica para possibilitar sua detecção por cromatografia gasosa (ISO 5509-78), utilizando uma coluna polar. O cromatógrafo usado foi um VARIAN CP 3800 e uma coluna Stabil Wox (Varian) de 30m. A temperatura do detector foi de 250°C e a do injetor de 240°C. A temperatura do forno foi programada de 160 até 260°C, onde de 160 a 225°C a uma taxa de aquecimento de 15°C/min, de 225 a 245°C a uma taxa de aquecimento de 3°C/min e de 245 a 260°C a uma taxa de aquecimento de 23°C/min. O volume de amostra injetada foi de 0,7µL.

5.2.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade lipolítica da enzima imobilizada foi determinada espectrofotometricamente acompanhando-se o aumento na absorbância a 410nm, devido à liberação de *p*-nitrofenol resultante da hidrólise do *p*-nitrofenil-laurato (*p*-NPL), segundo método descrito por Pinto *et al* (2009).

Foi estudada a atividade lipolítica da enzima imobilizada em três temperaturas diferentes, 40°C, 50°C e 60°C em pH 7,0.

Preparo do Reagente:

Para preparar 100mL de solução, inicialmente pesou-se 0,018g de p-nitrofenil laurato (pNL) e dissolveu em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida adicionou-se a 99 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7.

TÉCNICA:

Após o preparo do reagente, adicionou-se 30mL em um bécker, colocou sob agitação e adicionou 0,03g da enzima imobilizada. A reação foi acompanhada através da retirada de 2 mL da amostra a cada 1,5 minutos de reação durante 7,5 minutos. A absorbância foi então lida imediatamente após a retirada da alíquota.

Cálculo:

Para o cálculo da atividade, utilizou a equação 4.

$$A = \frac{\Delta \text{Abs} \times D \times f \times V_R}{\Delta t \times m_A}$$

Equação 4 – Expressão para cálculo da atividade enzimática.

Sendo:

A – atividade da enzima (U/g), onde uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições propostas;

ΔAbs – variação de absorbância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorbância;

D – diluição da amostra realizada para a leitura da solução enzimática;

f – fator de conversão dos valores de absorbância para a concentração de p-nitrofenol.

Δt – tempo decorrido de análise (min);

V_R – volume reacional (L);

m_A – massa de enzima imobilizada utilizada no ensaio, em gramas;

$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ – coeficiente angular da reta obtida.

5.2.5 - REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA

As reações foram realizadas em erlenmeyers fechados de 250 mL e incubados em uma câmara rotativa, com controle de temperatura, a 200 rpm. A quantidade de OGRF's foi mantida fixa em 25g. Após decorrido o tempo de reação, a amostra foi filtrada (com o objetivo de reter as enzimas para posterior recuperação e reutilização) e então levada a evaporação do álcool em evaporador rotativo à 90°C numa rotação de 40 rpm. Adotado este procedimento, a mistura reacional resultante foi então levada a um funil de separação, onde a fase superior estava concentrada em ésteres etílicos (biodiesel) e a fase inferior continha os demais produtos da reação (mono e diglicerídeos, glicerol e impurezas) bem como os substratos não reagidos (etanol e óleo).

Os ensaios foram realizados apenas com uma das amostras, a amostra AB₁, por ser essa, uma amostra que representa bem um sistema de coleta de OGRF's, já que seria difícil, operacionalmente, um sistema de coleta fazer a separação do óleo e da gordura.

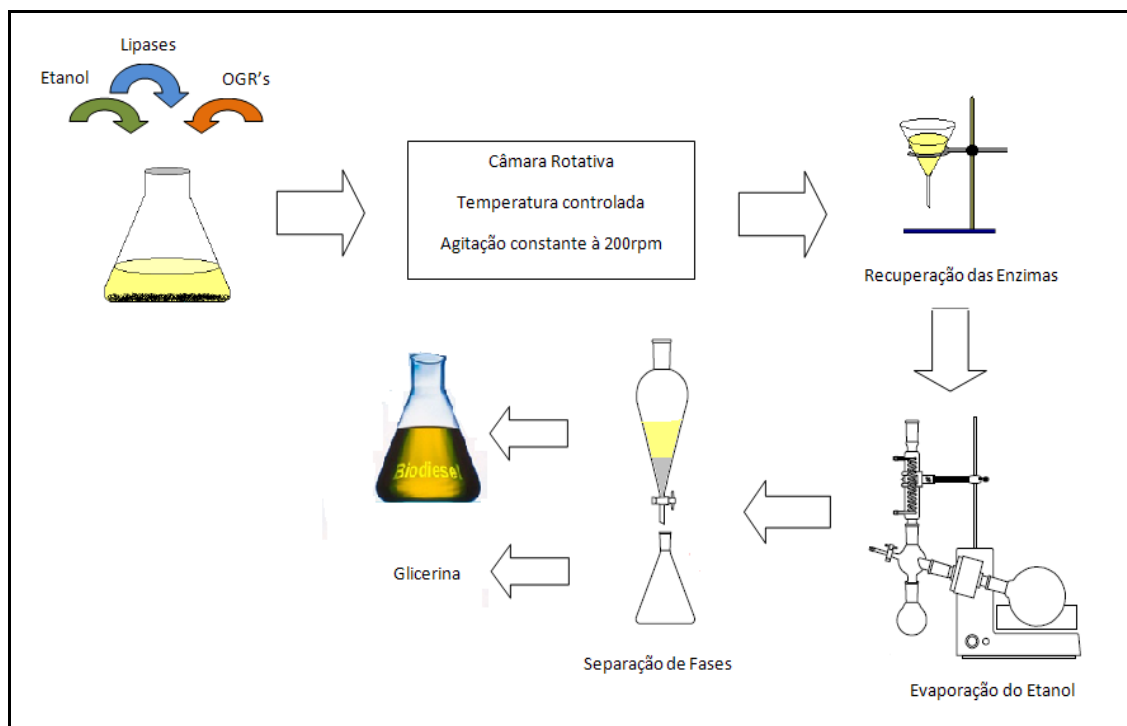


Figura 9 – Esquema do procedimento experimental para a reação de alcoólise enzimática.

Visando determinar condições experimentais que maximizem a síntese de ésteres, resultante da reação de alcoólise enzimática, um planejamento experimental fatorial fracionário com dois níveis e quatro variáveis foi realizado. Planejamentos fatoriais permitem a avaliação simultânea do efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número

reduzido de ensaios experimentais sem prejuízo da qualidade da informação. São extremamente úteis para medir as influências de uma ou mais variáveis, sujeita a todas as combinações das demais, na resposta de um processo.

As variáveis estudadas foram: razão molar óleo-álcool, concentração de enzimas, tempo e temperatura de reação. O intervalo de estudo das variáveis foi determinado de modo a abranger a maioria dos estudos da literatura. Estes valores são fornecidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Intervalo das variáveis para Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} da alcoólise enzimática do OGRF's com etanol.

VARIÁVEL	INTERVALO
Razão molar óleo:etanol [R]	1:3 - 1:9
Temperatura [T] (°C)	40 - 60
Tempo reacional [t] (h)	24 - 72
Concentração enzimas [E] (%p/p)	5 - 10

A matriz experimental para o planejamento fatorial fracionário é mostrado na Tabela 4. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 4 – Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} realizado para a otimização das condições de alcoólise enzimática.

ENSAIO	R (O:EtOH)	T (°C)	t (h)	E (%p/p)
1	1:3	40	24	5
2	1:9	40	24	10
3	1:3	60	24	10
4	1:9	60	24	5
5	1:3	40	72	10
6	1:9	40	72	5
7	1:3	60	72	5
8	1:9	60	72	10
9	1:6	50	48	7,5
10	1:6	50	48	7,5

Encontra-se na literatura vários estudos (ISO *et al.* , 2001; CHEN *et al.*, 2009; FACCIO, 2004; FACCIO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004) que demonstram que a adição de um solvente orgânico na reação de alcoólise enzimática pode reduzir o tempo reacional, que por ser geralmente longo, é uma das principais desvantagens do uso de lipases na síntese de biodiesel, e ainda reduz o efeito tóxico dos alcoóis de cadeia curta nas lipases, fato já discutido anteriormente. Diante disso, realizamos um breve estudo da reação de alcoólise enzimática de OGRF's em presença de hexano (solvente orgânico). A reação foi realizada nas condições máximas, dentro do intervalo estudado - 60°C, 10% Enzima, razão O:EtOH 1:9, e nas condições mais amenas – 40°C, 5% Enzima, razão O:EtOH 1:3 – mantendo fixa a variável tempo de reação em 8 horas e variando a concentração do solvente, em 0(zero), 20 e 40 mL do solvente por cada 1(um) grama de óleo. Os ensaios foram realizados de acordo com as condições expostas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições de reação da alcoólise enzimática de OGRF's usando hexano como solvente orgânico.

Ensaios	T (°C)	R (O:EtOH)	%E (p/p)	HEXANO (mL/g óleo)
1H0	40	1:3	5	0
1H20	40	1:3	5	20
1H40	40	1:3	5	40
2H0	60	1:9	10	0
2H20	60	1:9	10	20
2H40	60	1:9	10	40

1-Condições no nível -1 do planejamento experimental

2- Condições no nível +1 do planejamento experimental

H-Utilização de hexano

5.2.6 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO EM BIODIESEL

O rendimento em estéres etílicos de ácidos graxos (FAEEs), obtidos da reação de alcoólise, foi determinado através da técnica de cromatografia gasosa (CG), usando um cromatógrafo VARIAN CP 3800 com detector FID (Flame Ionization Detection) e uma coluna capilar curta de 2,2m. A temperatura do detector foi de 250°C e a do injetor de 240°C. A temperatura do forno foi programada de 150 até 260°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. O padrão interno usado foi o trioctanoato de glicerila (tricaprilina) e o gás de

arraste foi o hidrogênio de alta pureza (99,95%). Alíquotas de amostras de 1μL foram injetadas e os ésteres etílicos quantificados usando um método de padrão interno conforme a Equação 5.

$$\%FAEEs = \frac{m_{\text{tricaprilina}} \times A_B \times f_{\text{tricaprilina}}}{A_{\text{tricaprilina}} \times m_s}$$

Equação 5 – Expressão para cálculo do rendimento em biodiesel.

Onde:

$m_{\text{tricaprilina}}$ – massa do padrão interno;

A_B – área dos picos dos FAEEs;

$f_{\text{tricaprilina}}$ – fator de resposta;

$A_{\text{tricaprilina}}$ – área do pico do padrão interno;

m_s – massa da amostra.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS E GORDURAS RESIDUAIS DE FRITURA

6.1.1 – ÍNDICE DE ACIDEZ

Segundo a metodologia descrita no item 5.2.3.1 obtemos os valores de índice de acidez para cada amostra, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Índice de Acidez das amostras analisadas.

AMOSTRA	IA (mgKOH/g óleo)
A ₁	4,708
A ₂	5,774
B ₁	0,144
B ₂	0,198
AB ₁	3,368
AB ₂	4,252
Óleo Virgem	<0,6*

*ANVISA.

Como pode-se observar, as amostras A₁ e A₂, que são amostras de gorduras hidrogenadas residuais, apresentaram altos índices de acidez, que corresponde à formação de ácidos graxos livres, através da reação de hidrólise. Esse índice pode aumentar devido à vários fatores tais como, a temperatura de fritura, o número de vezes de aquecimento e resfriamento dos óleos e gorduras, tempo de uso e a quantidade de água liberada pelo alimento que esta sendo frito (LIMA e GONÇALVES, 1994; MENDONÇA *et al.*, 2008).

Já as amostras de óleos residuais, B₁ e B₂, apresentaram baixo índice de acidez, provavelmente devido ao pouco tempo de uso dos óleos, isso baseado no aspecto visual das amostras que se apresentam com cor clara e quase nenhuma presença de sólidos em suspensão. As amostras AB₁ e AB₂ apresentaram índices de acidez intermediários as amostras que lhe deram origem, como era esperado, porém ainda elevados. Mas de acordo com Ferrari *et al.* (2005), para se obter resultados satisfatórios na reação de transesterificação com catalisadores básicos, o ideal é que o teor de ácidos graxos livres seja inferior a 3% de ácido oléico (aproximadamente 6mg KOH/ g da amostra), pois os

ácidos graxos livres podem reagir com o catalisador básico formando produtos saponificados, diminuindo então a eficiência do processo reacional. Portanto nossas amostras poderão ser utilizadas para obtenção do biodiesel, pois além dos valores estarem inferior a 6mg KOH/g da amostra, nossa reação será catalisada por enzimas, não apresentando risco de formação de sabão durante a reação. Porém o biodiesel gerado por matérias-primas com altos índices de ácidos graxos livres possui geralmente altos valores de acidez, gerando discussões a respeito da viabilidade do processo do ponto de vista da qualidade do biodiesel produzido (DABDOUB *et al.*, 2009; SUAREZ *et al.*, 2009).

6.1.2 – ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS

Os seguintes valores para índice de iodo (Tabela 7) foram obtidos conforme a metodologia descrita no item 5.2.3.2.

Tabela 7 – Índice de Iodo das amostras analisadas.

AMOSTRA	II (g I ₂ /100g óleo)
A ₁	101,97
A ₂	107,37
B ₁	120,74
B ₂	118,24
AB ₁	115,99
AB ₂	116,42
Óleo virgem	120-143*

*ANVISA

O índice de iodo relaciona-se com a quantidade de duplas ligações presentes na amostra e a variação observada neste índice se deve a quebra de duplas ligações resultantes de reações de polimerização, ciclização e oxidação, principalmente pela incorporação de gorduras saturadas ao óleo ou gordura de fritura, proveniente dos próprios alimentos fritos e também pela adição de óleo novo ao óleo já utilizado na fritadeira (LIMA e GONÇALVES, 1994; MENDONÇA *et al.*, 2008). Segundo Sanibal e Mancini Filho (2008), alguns parâmetros analíticos podem ser utilizados na avaliação da característica da qualidade de óleos e gorduras, porém o índice de iodo depende da composição do óleo, sendo útil apenas em óleos não processados. Óleos interestificados ou hidrogenados têm seus índices de iodo alterados, de modo que a caracterização do óleo através do índice de

iodo se torna muito difícil, sendo necessário um ajuste da metodologia para cada tipo de óleo, tipo de interestificação e grau de hidrogenação.

No entanto, os resultados determinados nas amostras estão de acordo com os valores encontrados na literatura (LIMA e GONÇALVES, 1994; GOMES *et al.*, 2003; SILVA, 2005; SANTOS *et al.*, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2008; SILVA, 2008).

6.1.3 – VISCOSIDADE CINEMÁTICA

A Tabela 8 mostra os valores de viscosidade cinemática das amostras analisadas segundo a metodologia descrita no item 5.2.3.3.

Tabela 8 – Viscosidade Cinemática a 40°C das amostras analisadas.

AMOSTRA	ν (cSt)
A ₁	37,485
A ₂	41,332
B ₁	28,642
B ₂	28,170
AB ₁	34,177
AB ₂	34,357
Óleo virgem	31,323**

* **Santos *et al.* (2007).

Em relação ao diesel convencional, os óleos vegetais apresentam valores de viscosidade bastante elevados, podendo excedê-lo em até 100 vezes, como no caso do óleo de mamona (MARCINIUK *et al.*, 2008).

A viscosidade está diretamente relacionada às interações intermoleculares e intramoleculares, como a força de Van der Waals, existente entre as moléculas, e ao tamanho das cadeias carbônicas e ao número de insaturações e das conformações presentes nos ácidos graxos. A viscosidade cinemática dos ácidos graxos aumenta com o aumento da cadeia carbônica e é inversamente proporcional ao número de insaturações nela presentes. O empacotamento das moléculas de ácidos graxos e as interações das forças de Van der Waals são dificultadas devido a conformação *cis* que diminui a área de contato entre as moléculas e as interações de força de dispersão, diminuindo a agregação molecular e por consequência a viscosidade. Já a presença de insaturações diminui ainda mais a viscosidade, pois a força de dispersão e o empacotamento serão menores, causadas

pelo impedimento e pelas conformações que dificultam as interações. Já os ácidos graxos saturados e insaturados com conformação trans, por possuírem uma cadeia linear, a área de contato para a interação das forças de Van der Waals, como a força de dispersão, aumenta a viscosidade, pois o agrupamento das cadeias são maiores por não possuir nenhum impedimento da conformação (MARCINIUK *et al.*, 2008; IHA e SUAREZ, 2010).

Em óleos e gorduras residuais de fritura, o aumento da viscosidade pode ser explicada pela incorporação de gorduras saturadas, de maior ponto de fusão, provenientes dos alimentos utilizados para fritura. Nos resultados apresentados nota-se que os valores estão próximos ao da literatura para óleo de soja virgem e as gorduras e misturas tem valores apenas um pouco superior ao dos óleos, mostrando que as amostras de gorduras apresentam um maior percentual de cadeias saturadas. Esse resultado será melhor analisado na análise da composição em ácidos graxos.

6.1.4 – MASSA ESPECÍFICA

Os resultados de massa específica, Tabela 9, foram determinados conforme metodologia descrita no item 5.2.3.4.

Tabela 9 – Massa Específica a 20°C das amostras analisadas.

AMOSTRA	μ (g/cm ³)
A ₁	0,920
A ₂	0,916
B ₁	0,916
B ₂	0,916
AB ₁	0,918
AB ₂	0,919
Óleo virgem	0,919-0,925*

*ANVISA.

A importância desta medida é devido ao fato dos motores serem projetados para operar com combustíveis em uma determinada faixa de massa específica, tendo em vista que a bomba injetora dosa o volume injetado. Variações na massa específica levam a uma significativa variação na massa de combustível injetada, impossibilitando a obtenção de uma mistura de ar\combustível o que aumenta a emissão de poluentes como hidrocarbonetos,

monóxido de carbono e material particulado. Valores baixos para a massa específica reduzem o desempenho dos motores pela formação de uma mistura pobre, o que leva a uma perda de potência do motor e a um aumento do consumo de combustível. Segundo a resolução 7 da ANP o limite para massa específica do biodiesel esta entre 850 – 900kg/m³ (0,850 - 0,900g/cm³) (ANP, 2009).

6.1.5 – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

Foi determinada nas amostras suas composições em ácidos graxos, de acordo com metodologia descrita no item 5.2.3.5. Os resultados podem ser vistos na Tabela 10. A Tabela 11 mostra a composição em ácidos graxos para o óleo de soja virgem.

Tabela 10 – Composição em Ácidos Graxos das amostras analisadas.

ÁCIDOS GRAXOS (g/100g)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	AB ₁	AB ₂
Lauríco (C12:0)	0,3	0,4	0,1	0,1	0,3	0,5
Mirístico (C14:0)	0,8	0,8	0,2	0,3	0,5	0,6
Palmitico (C16:0)	19,4	20,1	11,6	11,5	15,1	15,7
Palmitoléico (C16:1)	0,4	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4
Estereárico (C18:0)	2,8	3,2	3,0	2,9	2,8	3,2
Oléico (C18:1)	33,9	35,5	20,5	20,2	26,7	27,6
Linoléico (C18:2)	42,1	39,3	56,9	57,2	50,3	48,1
Linolênico (C18:3)	0,3	0,4	7,5	7,6	4,0	3,9
Araquídico (C20:0)	-	-	0,1	-	-	-

Tabela 11 – Composição em ácidos graxos do óleo de soja virgem (ANVISA).

ÁCIDO GRAXO	NOMENCLATURA	COMPOSIÇÃO (g/100g)
C<14	-	<0,1
C14:0	Mirístico	<0,5
C16:0	Palmítico	7,0 – 14,0
C16:1	Palmitoléico	<0,5
C18:0	Estereárico	1,4 – 5,5
C18:1	Oléico	19,0 – 30,0
C18:2	Linoléico	44,0 – 62,0
C18:3	Linolênico	4,0 – 11,0
C20:0	Araquídico	<1,0
C20:1	Eicosenóico	<1,0
C22:0	Behênico	<0,5

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 10, podemos atestar que as amostras adquiridas são realmente de óleo de soja (B_1 e B_2) e de gordura vegetal hidrogenada (A_1 e A_2), como dito pelos fornecedores no momento da coleta. Isso porque, os resultados obtidos para as amostras de óleo de soja residual estão bem próximo dos valores de referência para o óleo de soja virgem (Tabela 11). Para as amostras de gorduras vegetais nota-se, um maior percentual na composição em ácidos graxos saturados, como já era esperado devido ao processo de hidrogenação, que é a entrada forçada de átomos de hidrogênio nos locais de insaturações nas cadeias de ácidos graxos, fazendo com que essas cadeias passem a ser parcialmente saturados.

6.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para determinação da temperatura ótima para a atividade lipolítica da enzima imobilizada estudada (Novozym 435), foram realizados testes experimentais variando-se a temperatura para pH 7. Os resultados são apresentados na Figura 10.

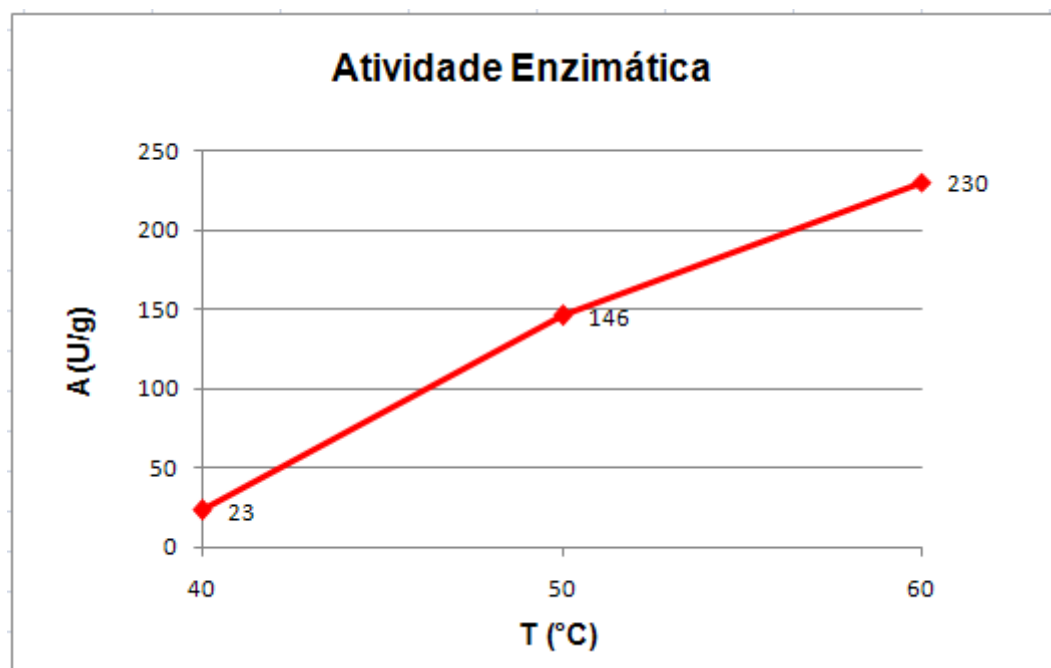


Figura 10 – Estudo da atividade enzimática, por meio da hidrólise do p-nitrofenil-laurato (p-NPL) em pH 7, em função da temperatura.

Existe uma faixa de temperatura, às vezes estreita, para a qual a atividade enzimática é máxima, por esse motivo fez-se necessário o estudo desta. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é determinada em condições de operações bem definidas. A variação da atividade enzimática resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima; de outro a desnaturação da proteína enzimática (FEIHRMANN, 2005). Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. De fato, na desnaturação das enzimas pelo calor, o que conta, sobretudo, é o binômio tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico. Os resultados mostrados na Figura 10 mostram que a atividade desta enzima aumenta com o aumento da temperatura dentro da faixa estudada, porém nem sempre a temperatura com maior atividade enzimática é a melhor temperatura para o processo de alcoólise, pois outros fatores podem influenciar nessa atividade tais como: presença de água, ação do álcool sobre o suporte de imobilização, presença de um segundo solvente orgânico, entre outros.

6.3 – REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA

6.3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As reações de alcoólise de OGRF's foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 5.2.5, a média dos resultados obtidos dos experimentos podem ser vistos na Tabela 12.

Tabela 12 – Rendimentos obtidos na alcoólise enzimática de OGRF's (amostra AB₁) de acordo com o planejamento experimental

ENSAIO	R (O:EtOH)	T (°C)	Tempo (h)	E (%p/p)	Rendimento (%Biodiesel)
1	1:3	40	24	5	22,5
2	1:9	40	24	10	66,6
3	1:3	60	24	10	29,9
4	1:9	60	24	5	80,6
5	1:3	40	72	10	69,8
6	1:9	40	72	5	86,1
7	1:3	60	72	5	18,9
8	1:9	60	72	10	87,3
9	1:6	50	48	7,5	51,3
10	1:6	50	48	7,5	52,5

A partir dos resultados apresentados na Tabela 12, pode-se observar que o maior rendimento em biodiesel foi conseguido na condição de maior razão óleo:etanol (1:9), maior temperatura (60°C), maior tempo reacional (72h) e maior concentração de enzimas (10%).

É importante salientar que o número de ensaios em um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com o número de variáveis estudadas, porém muitas vezes é possível obter a informação desejada com uma fração do número de ensaios do planejamento completo, isso porque à medida que o número de fatores cresce, o número de termos de ordem superiores cresce, cuja importância é menor do que termos de ordens inferiores. Se esses efeitos não são tão significativos, determinar o seu valor não é motivo bastante para nos levar a fazer todos os ensaios de um planejamento completo. Cabe

ressaltar que há um preço a ser pago por reduzir o número de ensaios. No caso do nosso planejamento, um fatorial fracionário de resolução quatro, os efeitos principais encontrados são na verdade a soma dos efeitos principais, de um fatorial completo, com interações de terceira ordem, que em princípio são menos significativas, nos fornecendo assim boas aproximações dos efeitos principais. Porém os efeitos de segunda ordem são combinações de pares de interações de duas variáveis, dificultando assim sua interpretação (BARROS NETO *et al.*, 2002; CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Os efeitos principais e as interações das variáveis foram obtidos usando o *software* Statistica 7.0. Os dados experimentais foram submetidos a uma análise de variância e análise de regressão através do teste F. Verificou-se através dos dados contidos na Tabela 13, que o modelo apresenta uma regressão estatisticamente significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), ao nível de 95% de confiança. E que o modelo obtido, consegue explicar 98% da variabilidade dos resultados experimentais.

Tabela 13 – Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo proposto

Fonte de variação	SS	df	MS	F	p
(1)Razão	8145,06	1	8145,06	452,7956	0,000000
(2)Temperatura	213,16	1	213,16	11,8499	0,004873
(3)Tempo	1006,48	1	1006,48	55,9514	0,000007
(4)Enzima	498,41	1	498,41	27,7071	0,000200
1 by 2	889,53	1	889,53	49,4503	0,000014
1 by 3	30,25	1	30,25	1,6816	0,219088
1 by 4	1228,50	1	1228,50	68,2942	0,000003
Erro	215,86	12	17,988		
Total SS	12227,25	19			

$R^2 = 0,98$

O modelo estatístico, com as variáveis codificadas, para rendimento em biodiesel, dentro do intervalo estudado, em função da razão O:EtOH (R), da temperatura (T), do tempo reacional (t) e da concentração de enzimas (E) esta apresentado na Equação 6.

$$Y(\%) = 56,37 + 22,56R - 3,65T + 7,93t + 5,58E + 7,46RT - 8,76RE$$

Equação 6 – Modelo estatístico para rendimento em biodiesel

Onde Y é o rendimento em biodiesel em percentagem.

O gráfico dos valores preditos pelo modelo *versus* observados pelos experimentos, mostrado na Figura 11, indica que o modelo proposto descreve os dados experimentais de forma satisfatória, pois os pontos correspondentes a esses valores estão próximos da reta que indica um bom ajuste.

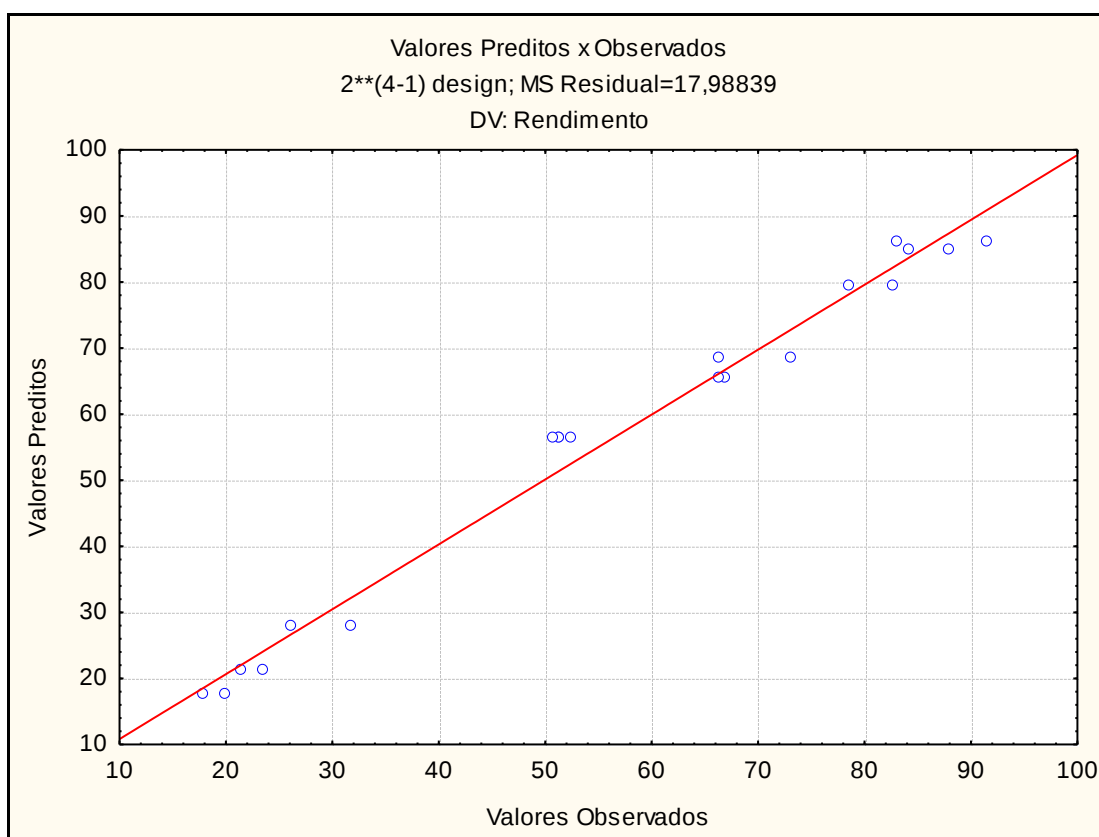


Figura 11 – Gráfico dos Valores Preditos x Observados

Através do Diagrama de Pareto, Figura 12, observamos que, dentro do intervalo estudado, apenas a interação de segunda ordem, razão-tempo (1 by 3) não apresentou efeito estatisticamente significativo para uma confiança de 95%, o que vem confirmar os dados apresentados na Tabela 13, onde apenas o p da interação razão-tempo é maior que 0,05.

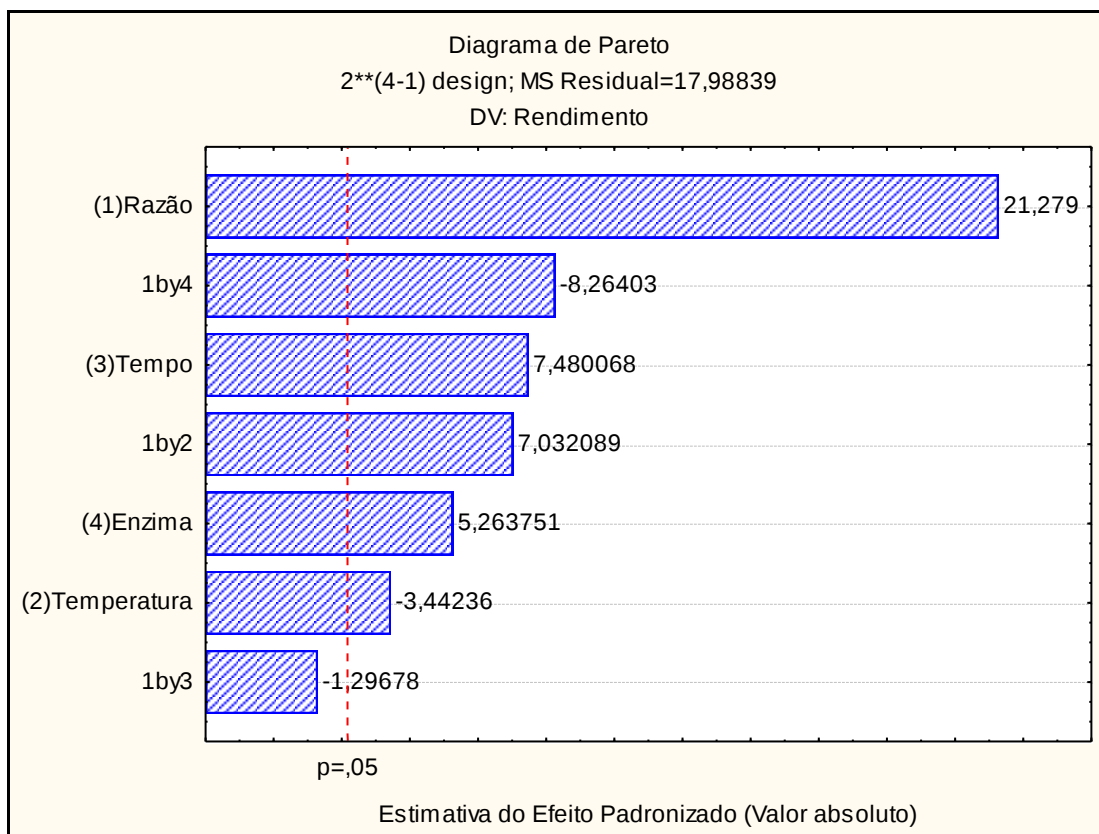


Figura 12 – Diagrama de Pareto indicando os efeitos estimados das variáveis para rendimento em biodiesel.

Ainda observando o diagrama de Pareto, notamos que entre as variáveis estudadas e dentro do intervalo estudado, a razão molar óleo:etanol foi quem apresentou maior significância, mostrando que nesse estudo, o excesso de álcool desloca equilíbrio da reação no sentido de síntese de biodiesel, aumentando assim o rendimento desta. Apesar de alguns estudos mostrarem que o excesso de álcool pode vir a desativar algumas enzimas, acredita-se a quantidade de enzimas utilizada neste trabalho foi suficiente para que essa inativação não fosse tão significativa para o processo. Esse resultado corrobora com os de Faccio *et al.* (2003) onde a razão molar óleo:etanol apresentou uma efeito positivo na conversão de biodiesel.

O efeito da concentração de enzimas é estatisticamente significativo e positivo o que quer dizer que com o aumento da concentração de enzimas aumenta também o rendimento em biodiesel, dentro do intervalo estudado. Esse efeito já era esperado, já que quando aumentamos a concentração de enzimas estamos aumentando também a quantidade de sítios catalíticos no meio, permitindo um maior contato destes com o substrato. Por outro lado, a interação da concentração de enzimas com a razão molar óleo:etanol apresentou um efeito significativo negativo. Porém dentro do intervalo estudado essa influência não é tão

evidenciada e o rendimento é mantido praticamente constante com o aumento da quantidade de enzimas, como pode ser visto na Figura 13.

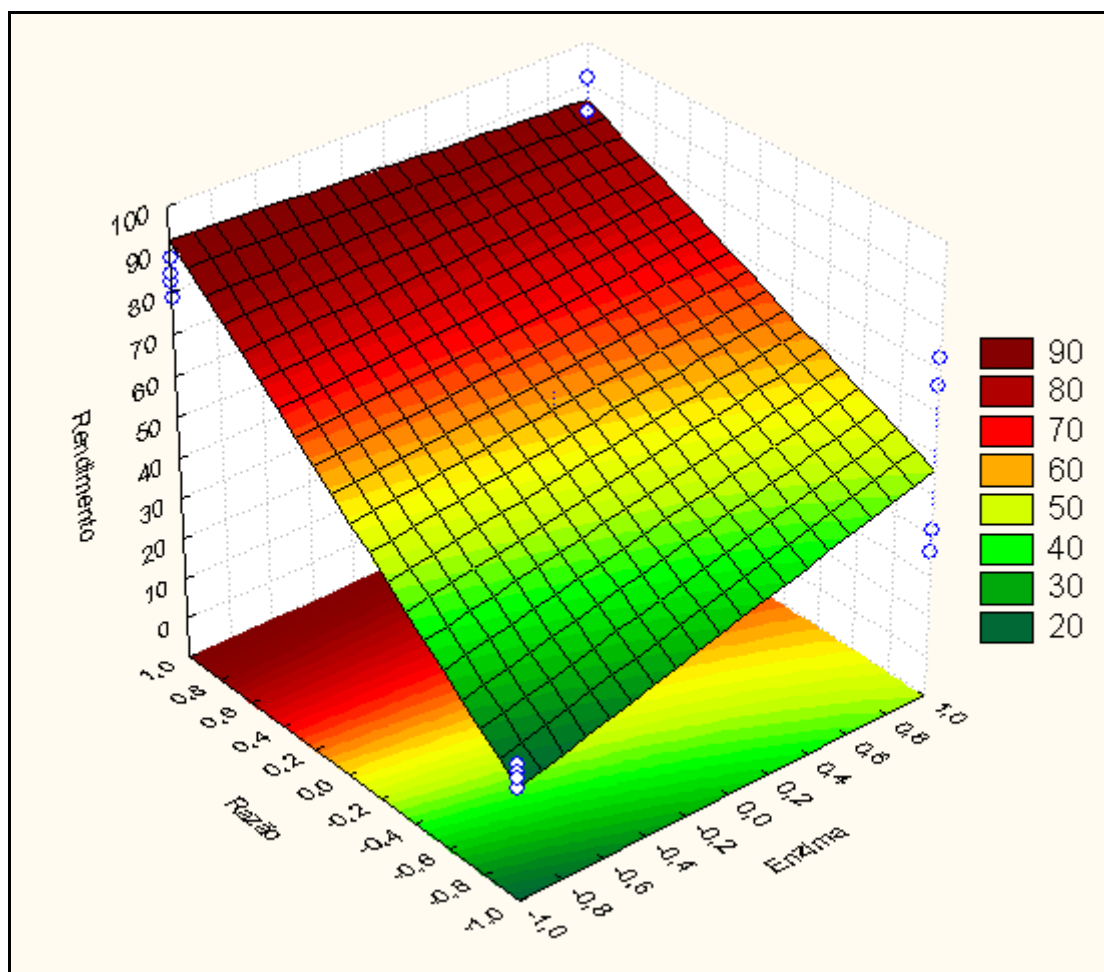


Figura 13 – Superfície de resposta para rendimento em biodiesel em função da razão óleo:etanol e da concentração de enzimas.

A Figura 13 mostra a superfície de resposta para a concentração de enzimas e a razão molar óleo:etanol quando as variáveis tempo de reação e temperatura estão fixas no nível máximo. Essa superfície indica a direção da região de maior rendimento, onde para encontrar o ponto ótimo mais experimentos deveriam ser realizados.

Continuando a observar o Diagrama de Pareto (Figura 12), vemos que quanto ao tempo de reação, este, apresentou efeito positivo dentro do intervalo estudado. Pois, quanto mais tempo os substratos da reação permanecem em contato, maior é a formação de produtos. E observamos ainda, que dentro do intervalo estudado, a temperatura influencia negativamente no rendimento em biodiesel sugerindo haver algum tipo de inibição ou inativação das enzimas em temperaturas mais altas. Porém sua interação com a razão óleo:etanol apresentou um efeito positivo, como mostra a Figura 14, indicando que há um

aumento no rendimento com o aumento da temperatura e da razão molar óleo:etanol dentro do intervalo estudado, provavelmente porque o aumento da temperatura favorece a solubilização do óleo no excesso de álcool, aumentando assim as oportunidades de contato dos substratos com os as enzimas, resultados semelhantes foram obtidos por Costa Filho *et al.* (2008).

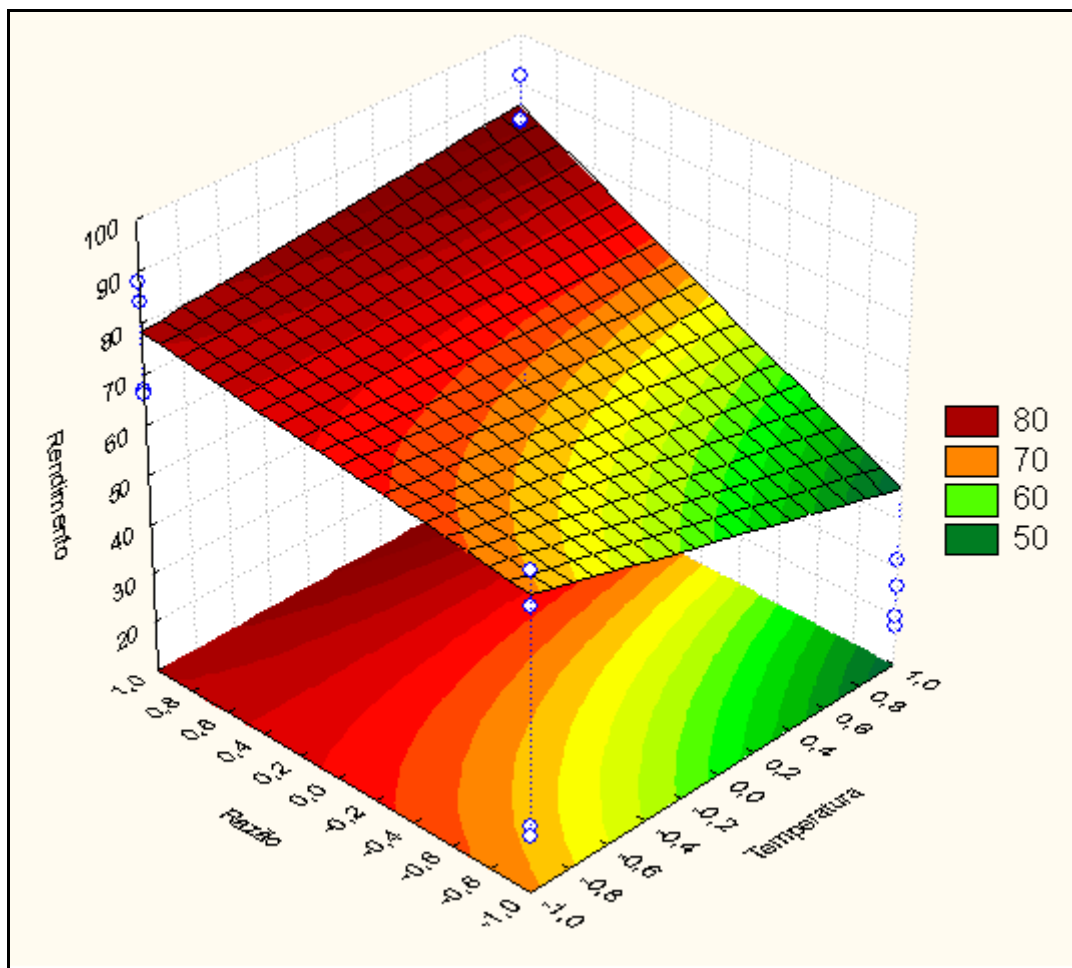


Figura 14 - Superfície de resposta para rendimento em biodiesel em função da razão óleo:etanol e da temperatura.

O planejamento fatorial fracionário usado neste estudo para avaliar os efeitos das variáveis (razão óleo:etanol, temperatura, tempo reacional e concentração de enzimas), dentro do intervalo estudado, e de suas interações no processo de obtenção de biodiesel por catálise enzimática se mostrou eficiente, visto que o uso principal do planejamento fatorial fracionário é selecionar quais variáveis apresentam maiores efeitos.

6.3.2 REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA EM SOLVENTE ORGÂNICO

Os resultados do estudo de alcoólise enzimática de OGRF's em hexano estão apresentados na Tabela 14. Pode-se observar que o rendimento obtido não foi o esperado, porém esses resultados concordam com os de Faccio (2004) que alcançou uma conversão máxima de 11,8% na reação de etanolise enzimática de óleo de soja usando hexano como solvente orgânico e a lipase Novozym 435, nas seguintes condições: 65°C, 5% de enzimas, 0% de água e razão óleo:etanol 1:10 em 8 horas de reação.

Tabela 14 – Rendimentos obtidos na alcoólise enzimática de OGRF's usando hexano como solvente orgânico em 8 horas de reação.

Ensaio	T (°C)	R (O:EtOH)	%E (p/p)	HEXANO (mL/g óleo)	RENDIMENTO (%Biodiesel)
1H0	40	1:3	5	0	21,8
1H20	40	1:3	5	20	11,4
1H40	40	1:3	5	40	9,9
2H0	60	1:9	10	0	35,1
2H20	60	1:9	10	20	11,0
2H40	60	1:9	10	40	10,5

Observa-se também que as reações onde não se usou o hexano (ensaio 1H0 e 2H0) foram as que obtiveram os maiores rendimentos, indicando que houve uma redução deste com a adição do solvente, possivelmente pelo fato do volume de solvente adicionado ter sido alto, diminuindo a probabilidade de reação/contato entre as moléculas do substrato e a lipase imobilizada, como sugere Chem *et al* (2009).

A concentração de água adicionada ao meio também pode ter colaborado para o baixo rendimento obtido, pois segundo Illanes (1994) *apud* Faccio (2004) a quantidade de água requerida para catálise orgânica depende da enzima utilizada, por isso cada enzima em particular deve ser analisada em vários níveis de hidratação em solventes orgânicos.

Diante desses resultados, tem-se a necessidade de realizar novos estudos para realização de alcoólise enzimática de OGRF's em solventes orgânicos, objetivando obter as condições de operação que maximizem o rendimento em biodiesel.

7 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

7.1 - CONCLUSÕES

Os OGRF's coletados em estabelecimentos comerciais da cidade de Maceió foram interessantes para a pesquisa sobre a produção de biodiesel, uma vez que foram coletadas amostras tanto de óleo de soja quanto de gordura vegetal hidrogenada que são os principais agentes de frituras de alimentos.

Pelas análises realizadas para caracterização destas amostras pode-se constatar que a origem das amostras estava de acordo com o que informaram os fornecedores, ou seja, a amostra A era realmente gordura residual e a amostra B era óleo soja residual. Ainda quanto as análises das características das amostras pode-se concluir que os parâmetros analisados: índices de acidez e de iodo, viscosidade cinemática, massa específica e composições em ácidos graxos estavam de acordo com a literatura disponível e semelhantes aos de óleo de soja virgem.

O planejamento fatorial fracionário usado neste estudo mostrou-se satisfatório para avaliar os efeitos das variáveis (razão óleo:etanol, temperatura, tempo reacional e concentração de enzimas). As condições que maximizaram o rendimento em biodiesel, dentro do intervalo estudado, foram: maior razão óleo:etanol (1:9), maior temperatura (60°C), maior tempo reacional (72h) e maior concentração de enzimas (10%).

Os rendimentos máximos obtidos em torno de 87% mostram que os OGRF's tem potencial para produção de biodiesel, conseguindo assim, além de eliminar um problema ambiental de descarte inadequado de OGRF's, produzir um combustível mais limpo que o óleo diesel e de origem renovável.

Os resultados dos ensaios com segundo solvente não se mostraram satisfatórios necessitando de mais estudos para maximizar a síntese de biodiesel de OGRF's por via enzimática.

7.2 – SUGESTÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, para se dar continuidade e complementar o estudo de obtenção de biodiesel de OGRF's por etanólise enzimática, sugere-se:

1. Otimizar as condições de operações visando a maximização do rendimento em biodiesel na região de maior rendimento dos experimentos realizados;
2. Estudar a reutilização da lipase avaliando diferentes tratamentos para aumentar o número de ciclos em que a enzima imobilizada possa ser reutilizada sem perda considerável da atividade;
3. Realizar um estudo cinético detalhado da alcoólise enzimática afim de verificar o melhor tempo reacional para obtenção de biodiesel;
4. Otimizar, através de um planejamento experimental, o uso de solventes orgânicos na etanólise enzimática de OGRF's, onde as influências da concentração de água e de solvente orgânico no meio devem ser avaliadas, bem como as influências da agitação orbital da câmara rotativa, do tempo reacional e do tipo de solvente;
5. Caracterização do biodiesel obtido, quando esses apresentarem um teor mínimo em ésteres de 96,5% em massa, especificação par biodiesel segundo a ANP.

8 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Disponível em www.anvisa.gov.br/alimentos/informes acessado em 01/09/2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO – ANP. Disponível em www.anp.gov.br acessado em 14/07/2009.

ALVES, A. C.; CARDOSO, J. J.; ALMEIDA, M. A. P.; MELO, C. K.; LOUZEIRO, H. C.; CÁRDIAS, H. T. C. Reaproveitamento de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu, 2006. (Disponível em www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006 acessado em 06/08/2008)

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ªEd, Editora UNICAMP, Campinas – SP, 2002.

BUENO, L. R. S. Estudo da influência da composição do óleo vegetal sobre algumas propriedades do biodiesel. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica do Paraná, Curitiba – PR, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando o statistica. Editora e-papers, 260p, Rio de Janeiro - RJ, 2003.

CÂMARA, G. M. S., Biodiesel Brasil – Estado atual da arte. Disponível em www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil.pdf acessado em 06/02/2009, Piracicaba - SP, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, pp.146-156, 2004.

CHEN, Y.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P.; WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, vol 50, pp 668 – 673, 2009.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.

COSTA FILHO, E. H.; SANTOS, J. R.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Alcoólise enzimática de óleo de fritura com etanol, XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2008.

COSTA NETO, P. R. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2002.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Transesterificação de óleo comestível usado para a produção de biodiesel e uso em transportes. (Disponível em <http://www.biodieselecooleo.com.br/biodiesel/estudos/biocombustivel%20alternativo.htm> acessado em 25/02/2008).

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

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAPIM, M. A. Biodiesel: Visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, pp. 776-792, 2009.

DALLA ROSA, C. Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 136 p., 2009.

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

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n.1, pp. 90-94, 2002.

FACCIO, C. Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Dissertação de mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Erechim – RS, 99 p., 2004.

FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGISKI, C.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V. Produção de ésteres etílicos através da reação enzimática de óleo de mamona em *n*-hexano. **Revista de pesquisa e pós-graduação Santo Ângelo**, 2003.

FEIHRMANN, A. C. Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados. Dissertação de mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Erechim – RS, 90 p., 2005.

FERNANDES, R. K. M.; PINTO, J. M. B.; MEDEIROS, O. M.; PEREIRA, C. A. Biodiesel a partir de óleo residual de fritura: alternativa energética e desenvolvimento sócio-ambiental. XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Rio de Janeiro – RJ, 2008.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja - taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v.28, n.1, pp. 19-23, 2005.

FOLETTTO, T. C.; BUENO, F. M.; TORRES, G.; NUNES, F. Estudo da estabilidade dos óleos de soja e arroz utilizados em frituras sucessivas de pastilhas de trigo. XVI CIC, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2007.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, pp. 405-416, 2001.

GOMES, J. C.; SOARES, L. F.; PEREIRA, C. A. S.; JHAM, G. N. Efeito do dessecante paraquat na qualidade da fração lipídica da soja. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 27, n. 1, pp. 178 – 184, 2003.

IHA, O. K.; SUAREZ, P. A. Z. Composição e análises físico-químicas das diversas oleaginosas para a produção de combustíveis alternativos, disponível em <http://egroups.unb.br/ig/pg/resumo/osvaldo> acessado em 17/01/2010.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHERESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, pp. 53 – 58, 2001.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, A. G. Parâmetros de avaliação da qualidade do óleo de soja utilizado para fritura. **Química Nova**, v. 17, n. 5, pp. 392 – 396, 1994.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, pp. 65-71, 2004.

MARCINIUK, L. L.; OLIVEIRA, M. G.; RODRIGUES, N. C.; NNOCENTINI, M. L.; CARDOSO, D. Quantificação do biodiesel etílico por análise de sua viscosidade e de seus óleos vegetais. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, 2008.

MENDONÇA, M. A.; BORGIO, L. A.; ARAÚJO, W. M. C.; NOVAES, M. R. C. G. Alterações físico-químicas de óleos de soja submetido ao processo de fritura em unidades de produção de refeições no Distrito Federal. **Com. Ciências Saúde**, v. 19, n. 2, pp. 115 – 122, 2008.

MITTELBACH, M. T.; TRITTHART, P. Diesel fuel derived from vegetable oils, III. Emission test using methyl esters of used frying oil, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65 , n.7, pp. 1185–1187, 1988.

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

NYE, M. J.; WILLIAMSON, T.W.; DESHPANES, E.; SCHRADER J. H.; SNIVELY, W. H.; YURKEWICH, T. P.; FRENCH, C. L. Conversion of used frying oil to diesel fuel by transesterification: preliminary tests. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 60, n. 8, pp. 1598, 1983.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p. 178 – 182, 2004.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme Microbiol. Technol.** v. 27, pp. 187-204, 2000.

PINTO, D. S.; BRIGIDA, A. I. S.; COELHO, M. A. Z. Influência do pH no processo de imobilização de lipase em fibra de casca de coco verde tratada quimicamente. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.

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

RODRIGUES, R. C. Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 183 p., 2009.

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

SAAD, E. B. Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 88 p., 2005.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas** (Disponível em www.feg.unesp.br/~rioparaiba/biodiesel acessado em 20/08/2008).

SANTOS, R. B.; SERRATE, J. W.; CALIMAN, L. B.; LACERDA Jr, V.; CASTRO, E. V. R. Avaliação do uso de óleo residual usado em fritura para a produção de biodiesel e estudo da transesterificação de óleo de soja com alcoóis de até quatro carbonos, 2007 (Disponível em www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/produção/10.pdf acessado em 21/10/2008).

SANTOS, M. A. Inserção do biodiesel na matriz energética brasileira: aspectos técnicos e ambientais elacionados ao seu uso em motores de combustão. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 117 p., 2007.

SHIMADA, Y.; WATANABE, H.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, pp. 133–142, 2002.

SILVA, C. L. M. Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol. Dissertação de mestrado, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2005.

SILVA, L. L. Estudo da qualificação de óleos residuais visando a obtenção de biodiesel. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Maceió – Al, pp. 54, 2008.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. e WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

URIOSTE, D. Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com alcoóis de cadeia curta. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena – SP. pp 124, 2004.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catalalysis B: Enzymatic**, v. 9, pp. 113–148, 2000.

WATANABE, H.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, pp. 151–155, 2002.

ZHANG, Y.; DUBE, M.A.; MCLEAN, D.D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technol.** 89, pp. 1–16, 2003.