



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL A
PARTIR DE ÓLEO RESIDUAL DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.)**

YARA LINS ROCHA

MANAUS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

YARA LINS ROCHA

**ESTUDO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A
PARTIR DE ÓLEO RESIDUAL DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.)**

Orientador: Dr. Sergio Massayoshi Nunomura

MANAUS

2018

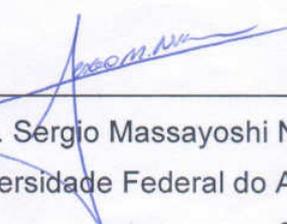
“Estudo da catálise enzimática para produção de Biodiesel a partir do óleo residual de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)”

Yara Lins Rocha

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 29 de agosto de 2018.

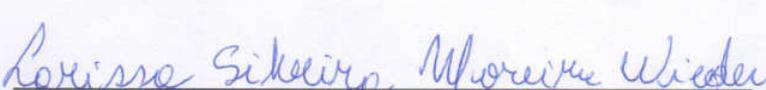
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Patricia Melchionna Albuquerque
Membro Externo



Prof.ª Dr.ª Larissa Silveira Moreira Wiedemann
Membro Ufam

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 29 de agosto de 2018.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R672e Rocha, Yara Lins
Estudo da catálise enzimática para a produção de biodiesel a partir de óleo residual de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) / Yara Lins Rocha. 2018
113 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Sergio Massayoshi Nunomura
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Carapa guianensis* Aubl. 2. *Candida rugosa*. 3. Biodiesel. 4. Planejamento fatorial. I. Nunomura, Sergio Massayoshi II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

À minha mãe, pelos esforços despendidos à minha formação acadêmica, por todo amor e apoio.

À minha família, por acreditarem no meu potencial, em especial durante esta fase, ao meu irmão Ygo Augusto e minha cunhada Érica Rocha, pelo apoio incondicional.

Aos amores da minha vida, meus irmãos, Samuel e Nayara.

Ao meu orientador Sergio Nunomura pela disponibilidade de ensinar, pelo acompanhamento durante a execução do trabalho e pelo conhecimento adquirido durante todos esses anos.

As minhas companheiras de grupo de pesquisa e amigas: Rita Cynara, Berna Almeida e Paula Suellen, por toda ajuda no desenvolvimento desde trabalho.

Aos meus amigos José Lamak, Renan Feitosa, Tatiana Marialva, Alcemir Félix, Victor Galvão, Nayara Nascimento, Tatianny Ribeiro, Dávila Cordeiro, Ariele Gama e Weider Henrique, por estarem ao meu lado durante esta fase e por serem as melhores pessoas que alguém poderia ter por perto como amigos.

Aos amigos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA): Magno Muniz, Henrique Alves, Andreia Montoia, Abraão, Diana Sangama, Marlene Camargo, Bruna Oliveira, Delmira e Marcos por estarem sempre dispostos a ajudar e pela agradável convivência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram realizadas todas as atividades experimentais.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) é a espécie oleaginosa nativa mais explorada na Amazônia Ocidental e uma grande quantidade de resíduos é gerada durante a extração do seu óleo. Levando em consideração o conceito de biorrefinaria, que se baseia no aproveitamento de matérias-primas e seus resíduos; este trabalho estudou alternativas para a utilização do óleo residual de andiroba. As tortas de prensagem mecânica de andiroba foram extraídos por maceração à frio com hexano e resultaram em 10% de óleo residual de andiroba com cerca de 2% de material insaponificável, principalmente limonoides. Esses constituintes tem valor agregado por suas propriedades biológicas. Para separar esses constituintes do óleo residual, empregou-se a cromatografia em coluna aberta com sílica e resina Diaion HP-20, obtendo uma fração com os limonóides em mistura com ácidos graxos livres; e outra com triacilglicerídeos. O óleo residual livre de limonoides foi então avaliado pelo processo de hidroesterificação, catalisado por lipases seguida da esterificação com catalisador heterogêneo tanto pela via metílica como etílica. A atividade hidrolítica de diferentes lipases foi avaliada frente ao óleo de andiroba e dentre elas destacou-se a lipase de *Candida rugosa*. Os parâmetros ótimos para uma maior taxa de hidrólise utilizando essa enzima foram determinados por um planejamento fatorial composto central e análise de superfície de resposta. Os parâmetros ótimos para uma taxa de conversão de 94% foram 50°C, pH=7,0 e 10% de óleo. Essas condições foram confirmadas experimentalmente em maior escala num reator de vidro. Reações sequenciais foram realizadas para avaliar a possibilidade de reutilizar a fração enzimática, verificou-se que essa fração consegue catalisar dois ciclos de reações com rendimento de 92%. O monitoramento de todas as reações de hidrólise foi realizado com quantificação dos triacilglicerídeos e ácidos graxos livres pela técnica de CCD-VideoScan para maior confiabilidade. As reações de esterificação foram realizadas com etanol e metanol, respectivamente a 70°C e 60°C, um a razão molar de óleo:álcool de 1:6 e com 2% de catalisador $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, resultando em rendimentos de 86% e 91% de ésteres, respectivamente para a via etílica e metílica. O processo de hidrólise enzimática associada à esterificação por catálise heterogênea apresentou resultados promissores, que podem permitir o uso desta matéria-prima residual para produção de biodiesel.

Palavras chave: *Carapa guianensis* Aubl, *Candida rugosa*, Hidrólise, Biodiesel

ABSTRACT

Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) is considered the most explored oilseed plant species in the Brazilian Amazon and a large amount of residues are generated due to its exploitation. In this work, we evaluated modern concepts adopted by biorefineries, in order to better use the raw materials and the residues of andiroba. The marc produced during the extraction of seeds of andiroba by mechanical pressing was chemically extracted by maceration with hexanes. We obtained 10% of andiroba residual oil that contained 2% of limonoids. These compounds have commercial value because of their biological properties. We were able to separate these compounds from the oil by open column chromatography over silica gel and DIAION HP-20. Two fractions were obtained, one containing the limonoids along with free fatty acids and a second mostly containing triacylglycerides. Then the andiroba residual oil (free of limonoids) was evaluated to produce biodiesel by a two-step process involving enzymatic hydrolysis with lipase and esterification by heterogeneous catalysis, with methanol and ethanol. First the hydrolytic activity of different commercial available lipases was assayed with andiroba residual oil as substrate. The lipase from *Candida rugosa* showed the best results. The best enzymatic conditions were determined by central composite and response surface design. The optimal conditions, considering a 94% rate conversion were determined at 50°C, pH=7,0 and 10% of substrate. These conditions were experimentally confirmed at larger scale in a glass-reactor. We have also evaluated the reuse of the enzymatic fraction in different reaction cycles and were able to reuse it twice with steady yield of 92%. The time-course and yield of all enzymatic reactions were determined by TLC-videoscan technique to ensure the reliability of results. The esterification step was achieved with 2% of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, a molar ratio of oil and alcohol of 1:6, at 70°C (ethanol) and 60°C (methanol). The yield obtained for biodiesel was 86% and 91% for ethanol and methanol, respectively. The obtained results for this two-step process (enzymatic hydrolysis followed by esterification by heterogeneous catalysis) with andiroba residual oil were very promising, especially to ethyl biodiesel production.

Keywords: *Carapa guianensis*, *Candida rugosa*, Hydrolysis, Biodiesel

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos do uso de óleos de oleaginosas nativas pra produção de biodiesel.....	20
Tabela 2: Vantagens e desvantagens de cada tipo de catálise para produção de biodiesel.....	26
Tabela 3: Algumas condições de catálise enzimática de lipases de <i>Candida rugosa</i> para produção de biodiesel.....	31
Tabela 4: Exemplo de matriz de coeficientes de contraste para um planejamento 2^3	35
Tabela 5: Caracterização físico-química dos óleos residuais de andiroba.....	58
Tabela 6: Composição da cadeia graxa por CG-DIC dos óleos residuais de andiroba.....	62
Tabela 7: Massa obtida em cada fração da coluna cromatográfica.....	63
Tabela 8: Quantidade de proteínas nas lipases comerciais.....	68
Tabela 9: Atividade hidrolítica de cada enzima comercial.....	69
Tabela 10: Matriz de planejamento composto central 2^3	71
Tabela 11: Valores de significância dos efeitos e seus coeficientes.....	72
Tabela 12: Valores de significância dos coeficientes de regressão dos fatores.....	74
Tabela 13: Valores da análise de variância (ANOVA).....	75
Tabela 14: Simulações realizadas para prever o valor do rendimento das reações com valores específicos de cada uma das variáveis.....	83
Tabela 15: Densidade e rendimento obtido dos biodieseis etílico e metílico....	97
Tabela 16: Substancias identificadas por CG-EM para amostra de biodiesel etílico.....	96
Tabela 17: Substancias identificadas por CG-EM para amostra de biodiesel metílico.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sementes de andiroba.....	21
Figura 2: Reação de transesterificação.....	23
Figura 3: Estrutura molecular dos principais constituintes de óleos vegetais....	23
Figura 4: Algumas reações mediadas por lipases.....	28
Figura 5: Molécula de triacilglicerideos.....	29
Figura 6: Estrutura de lipase pancreática indicando seus domínios.....	30
Figura 7: Representação do planejamento fatorial composto central, com um planejamento completo de dois níveis, os pontos axiais e os pontos centrais.....	34
Figura 8: A esquerda: Resíduo do processo de filtragem do óleo obtido por prensa mecânica. A direita: Resíduo do que é colocado dentro da prensa mecânica para realizar a extração.....	40
Figura 9: Processo de extração por maceração a frio com hexano em mariote.....	40
Figura 10: Fluxograma do tratamento das amostras com realização de duas colunas cromatográficas sequenciais.....	46
Figura 11: Sistema reacional adaptado para realizar avaliação de atividade hidrolítica das lipases.....	47
Figura 12: Processo de quantificação de ácidos graxos por Doc-It – LS.....	51
Figura 13: Processo de quantificação de triglicerideos por Doc-It – LS.....	52
Figura 14: A direita: sistema reacional adaptado para realização das reações de hidrólise em pequena escala, a esquerda: sistema reacional para reações em escala maior.....	53
Figura 15: Cromatograma análise por CG-DIC para o resíduo do processo de filtragem.....	61
Figura 16: Cromatograma análise por CG-DIC para o resíduo do processo de prensagem mecânica.....	61
Figura 17: As três frações correspondem a Fração 1 – Hexano 100%; Fração 2 – Hexano:Acetona (8:2); Fração 3 – Etanol.....	63
Figura 18: Placa de CCD de fase reversa, eluída com acetonitrila 100% e revelada com vanilina: 1 – Padrão de AGL, 2- Padrão de Limonoide, 3 – óleo	

de Andiroba (antes do processo cromatográfico), 4 – óleo de Andiroba (ápos processo cromatográfico), 5 – óleo de Andiroba refinado (processo de neutralização, baixa acidez).....64

Figura 19: Placa de CCD de fase reversa, eluída com acetonitrila 100% e revelada com vanilina: 1 – Padrão de TG, 2- Padrão de AGL, 3 – óleo de Andiroba (antes dos processos cromatográfico), 4 – Fração etanólica, 5 – Fração hexânica.....66

Figura 20: Colunas com DIAION HP-20 e placas de CCD fase reversa eluídas com acetonitrila 100% das frações etanólicas e hexânicas realizadas com os óleos provenientes do resíduo do processo de filtragem e do resíduo de prensagem mecânica.....67

Figura 21: Diagrama de pareto.....73

Figura 22: Dispersão de resíduos.....76

Figura 23: Distribuição normal para valores previstos e valores observados...77

Figura 24: Perfil das relações entre as variáveis em relação aos valores previstos e os valores observados para a resposta.....87

Figura 25: Sistema reacional pra realização das reações em escala maior.....88

Figura 26: Cromatograma de íons totais para amostra de biodiesel etílico.....94

Figura 27: Cromatograma de íons totais para amostra de biodiesel metílico....95

Figura 28: Proposta de fragmentação para íons com carga m/z 74 e 88.....95

Figura 29: Pico 1 – Hexadecanoato de etila.....96

Figura 30: Pico 2 – 9 - Octadecenoato de etila.....97

Figura 31: Pico 3 – Octadecanoato de etila.....98

Figura 32: Pico 1 – Hexadecanoato de metila.....98

Figura 33: Pico 2 – 9,12 – Octadecadienoato de metila.....99

Figura 34: Pico 3 – 9 - Octadecenoato de metila.....99

Figura 35: Pico 4 – Octadecanoato de metila.....99

GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de calibração para quantificação da quantidade de proteínas em lipases comerciais.....	48
Gráfico 2: Curva de calibração para quantificação de ácidos graxos.....	51
Gráfico 3: Curva de calibração para quantificação de triglicerídeos.....	52
Gráfico 4: Contorno para a relação entre pH e temperatura.....	78
Gráfico 5: Superfície para a relação entre pH e temperatura.....	78
Gráfico 6: Contorno para a relação entre pH e % de substrato.....	81
Gráfico 7: Superfície para a relação entre pH e % de substrato.....	81
Gráfico 8: Contorno para a relação entre temperatura e % de substrato.....	82
Gráfico 9: Superfície para a relação entre temperatura e % de substrato.....	82
Gráfico 10: Parâmetros: 20%, 35 °C, pH 7,0 Grau de hidrólise: 41,65%.....	84
Gráfico 11: Parâmetros: 60%, 35 °C, pH 7,0 Grau de hidrólise: 35,06%.....	84
Gráfico 12: Parâmetros: 20%, 45 °C, pH 7,0 Grau de hidrólise: 66,80%.....	86
Gráfico 13: Parâmetros: 60%, 45 °C, pH 7,0 Grau de hidrólise: 42,30%.....	86
Gráfico 14: Parâmetros: 20%, 35 °C, pH 8,0 Grau de hidrólise: 38,00%.....	86
Gráfico 15: Parâmetros: 60%, 35 °C, pH 8,0 Grau de hidrólise: 30,17%.....	86
Gráfico 16: Parâmetros: 20%, 45 °C, pH 8,0 Grau de hidrólise: 43,68%.....	86
Gráfico 17: Parâmetros: 20%, 45 °C, pH 8,0 Grau de hidrólise: 41,39%	86
Gráfico 18: Parâmetros: 40%, 40 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 29,00%	87
Gráfico 19: Parâmetros: 40%, 40 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 29,26%.....	87
Gráfico 20: Parâmetros: 40%, 40 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 28,65%.....	87
Gráfico 21: Parâmetros: 15%, 40 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 62,21%.....	87
Gráfico 22: Parâmetros: 65%, 40 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 41,10%.....	87
Gráfico 23: Parâmetros: 40%, 40 °C, pH 6,5 Grau de hidrólise: 22,35%.....	87
Gráfico 24: Parâmetros: 40%, 40 °C, pH 8,5 Grau de hidrólise: 39,65%.....	88

Gráfico 25: Parâmetros: 40%, 30 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 18,34%.....	88
Gráfico 26: Parâmetros: 40%, 50 °C, pH 7,5 Grau de hidrólise: 24,40%.....	88
Gráfico 27: Comparação dos rendimentos das reações de hidrólise do planejamento por grau de hidrólise e quantificação por CCD-VideoScan.....	90
Gráfico 28: Perfil da reação de hidrólise realizada com parâmetros otimizados pela metodologia de superfície de resposta: 10% de óleo, 50 °C, pH 7,0.....	91
Gráfico 29: Perfil de quantificação dos constituintes AGL e TG da reação de hidrólise com parâmetros de reação: 10% de óleo, 50 °C, pH 7,0, 1 h e 25 mg de enzima.....	91
Gráfico 30: Perfil de quantificação dos constituintes AGL e TG da reação de hidrólise com parâmetros de reação: 10% de óleo, 50 °C, pH 7,0, 1 h e 50 mg de enzima.....	93
Gráfico 31: Rendimento das reações dos cinco ciclos de hidrólise sequenciais com <i>Candida rugosa</i> , com comparação dos constituintes (AGL e TG) por quantificação por CCD-VideoScan.....	94
Gráfico 32: Rendimento das reações dos cinco ciclos de hidrólise sequenciais com <i>Candida rugosa</i> por cálculo de grau de hidrólise.....	94

ABREVIATURAS

AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Associação Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina de Soro Bovino
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DG	Diacilgliceróis
IA	Índice de acidez
II	Índice de Iodo
IP	Índice de Peróxido
MP	Material Insaponificável
MQR	Média Quadrática da Regressão
MQr	Média Quadrática do Resíduo
MG	Monoacilgliceróis
SQer	Soma Quadrática do Erro
SQfa	Soma Quadrática da Falta de Ajuste
SQR	Soma Quadrática da Regressão
SQr	Soma Quadrática do Resíduo
SQT	Soma Quadrática Total
TG	Triacilgliceróis
UH	Unidade de atividade hidrolítica

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivos gerais.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. Revisão bibliográfica.....	19
3.1. Biorrefinarias e a exploração sustentável de oleaginosas na Amazônia.....	19
3.2. O uso de oleaginosas nativas da Amazônia para produção de biodiesel.....	20
3.2.1. <i>Carapa guianensis</i> (Aubl.).....	21
3.3. Biodiesel.....	22
3.3.1. Matéria-Prima.....	23
3.3.2. Álcoois.....	24
3.3.3. Catalisadores.....	25
3.4. Hidroesterificação.....	27
3.5. Enzimas e Lipases.....	28
3.5.1. Variáveis operacionais das enzimas.....	32
3.6. Planejamento Fatorial de experimentos.....	33
3.6.1. Coeficientes dos efeitos e as estimativas de erro com repetições no ponto central.....	35
3.6.2. Efeitos significativos.....	37
3.6.3. Avaliação do modelo.....	38
3.6.4. Metodologia de superfície de resposta.....	40
4. Metodologia.....	41
4.1. Obtenção da matéria-prima e obtenção dos óleos.....	41
4.2. Caracterização físico-química dos óleos.....	42

4.2.1. Índice de acidez.....	42
4.2.2. Porcentagem de ácidos graxos livres.....	42
4.2.3. Índice de iodo.....	43
4.2.4. Índice de peróxidos.....	43
4.2.5. Material insaponificável.....	44
4.2.6. Massa específica.....	44
4.3. Determinação da cadeia graxa dos óleos por Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (CG-DIC).....	45
4.4. Tratamento do óleo para remover constituintes insaponificáveis.....	46
4.5. Determinação da atividade hidrolítica das enzimas.....	47
4.5.1. Determinação da concentração de proteínas.....	49
4.5.2. Dosagem de proteínas nas lipases.....	50
4.6. Quantificação por CCD-VideoScan de ácidos graxos (AGL) e triglicerídeos (TG).....	50
4.6.1. Quantificação por CCD-VideoScan de ácidos graxos (AGL) e triglicerídeos (TG) nas reações de hidrólise.....	54
4.7. Reações de hidrólise.....	54
4.7.1. Determinação do grau de hidrólise.....	55
4.8. Planejamento Experimental Composto Central.....	56
4.9. Reações de esterificação dos produtos de hidrólise.....	57
4.10. Identificação por Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) dos produtos esterificados.....	57
5. Resultados e Discussões.....	59
5.1. Obtenção da matéria-prima e extração dos óleos.....	59
5.2. Caracterização físico-química dos óleos.....	59
5.3. Determinação da composição cadeia graxa por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de ionização de chamas (CG-DIC).....	62

5.4. Tratamento do óleo para remover constituintes insaponificáveis.....	64
5.5. Atividade hidrolítica.....	70
5.6. Planejamento Composto Central.....	71
5.6.1. Quantificação por CCD-VideoScan.....	84
5.6.2. Reações em maior escala em reator encamisado.....	89
6. Ciclagem da enzima.....	92
7. Síntese de biodiesel por catálise heterogênea com produto de hidrólise enzimática do óleo residual de andiroba.....	94
7.1. Identificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM) dos produtos de esterificação.....	95
8. Conclusão.....	101
9. Referências bibliográficas.....	103

1. INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis de origem fóssil, além de ser uma fonte de energia não renovável, apresenta um impacto negativo ao meio ambiente, poluindo o ar e gerando resíduos tóxicos, sendo considerado um dos principais responsáveis pelos fenômenos de mudanças climáticas. O uso de combustíveis renováveis, como o biodiesel, é uma alternativa para a geração de energia, pois é menos tóxico e biodegradável. Adicionalmente, por se tratar de uma fonte renovável, o seu uso não aumenta a emissão de gases (ciclagem de carbono) relacionados com o efeito estufa (LEUNG *et al.*, 2010; SOARES, *et al.*, 2012; KNOTHE, 2010).

Além de reduzir a dependência em relação ao petróleo, o uso de biocombustíveis fortalece o agronegócio e cria um novo mercado para os óleos vegetais. Além disso, o seu uso em motores de ciclo diesel demanda pouca ou nenhuma adaptação (BRASIL, 2016).

Um conceito que vem ganhando importância na área de biomassa é o de biorrefinarias. De uma forma sucinta, uma biorrefinaria é uma instalação que congrega processos de conversão de biomassa em diferentes produtos como biocombustíveis, insumos químicos, alimentos, novos materiais, rações, entre outros; otimizando os recursos, empregando diferentes rotas de conversão e minimizando os resíduos e a quantidade de efluentes gerados. Os principais exemplos de biorrefinarias são as usinas de álcool e açúcar, e dos derivados de soja (RODRIGUES, 2011).

Na região amazônica, a exploração das espécies oleaginosas nativas, se realizada de forma sustentada e manejada, pode ter um importante impacto na economia regional com vantagens econômicas, sociais e ambientais (KULKARNI e DALAI, 2006).

A região da Amazônia brasileira abrange uma área que equivale a cerca de 42% do território nacional, que é caracterizada pelas grandes e pelo baixo adensamento populacional (ARAÚJO *et al.*, 2009). Em algumas comunidades isoladas da Amazônia, a produção de óleos vegetais por cooperativas já é uma importante atividade econômica, devido ao interesse desses óleos pelas indústrias de cosméticos. A produção é realizada com energia produzida por sistemas descentralizados de distribuição, uma vez que o atual modelo de

fornecimento de energia no Brasil que é representado por uma rede de distribuição de um sistema interligado, não é econômica e ambientalmente viável para atender regiões com baixa densidade populacional (CENBIO, 2003).

Desta forma, o conceito de biorrefinaria pode ser adotado, como modelo, pelas cooperativas na Amazônia que realizam esse tipo de produção. Uma vez que o emprego de unidades de geração de energia elétrica de pequeno porte, utilizando biocombustíveis, como o biodiesel obtido a partir de óleos residuais de espécies vegetais nativas, é uma alternativa ambientalmente viável para suprir as necessidades de abastecimento de energia elétrica, além de contribuir com o desenvolvimento econômico e social da região (DI LASCIO e BARRETO, 2009).

Um dos maiores entraves mundiais para a produção de combustíveis renováveis é ainda o seu elevado custo. No caso do biodiesel, o alto custo está relacionado com a fonte de óleo utilizada. Em razão disso, uma grande quantidade de óleos de baixo custo, como os óleos residuais, vem sendo estudados com o objetivo de substituir de forma econômica matérias-primas de maior valor agregado (KNOTHE, 2005).

Entretanto, existe uma grande dificuldade tecnológica, pois normalmente óleos de baixo custo também apresentam baixa qualidade seja pela degradação oxidativa ou elevada acidez, já que possuem grande quantidade de ácidos graxos livres (GUI *et al.*, 2008). O principal método de produção de biodiesel utilizado industrialmente e que é economicamente viável, é a transesterificação pela catálise básica homogênea. Por esse processo, o uso de óleos de baixo custo se mostra inviável, pelas reações secundárias de saponificação e dificuldade de purificar o biodiesel pela formação de emulsões (VYAS *et al.*, 2009).

Dentre as diferentes alternativas existentes para a produção de biodiesel utilizando óleos de baixo custo, o processo de hidrólise-esterificação é uma alternativa bastante interessante, em especial, com o emprego da catálise enzimática com lipases. A utilização das lipases apresenta, dentre outras vantagens, condições brandas de reação, ocorre sem geração de resíduos e apresenta fácil recuperação do produto, além da possibilidade de reutilizar o catalisador (SILVA *et al.*, 2010; KULKARNI e DALAI, 2006).

Este trabalho visou otimizar as condições de hidrólise enzimática do óleo residual de andiroba no processo de produção de biodiesel, a fim de contribuir para o aproveitamento dessa importante matéria-prima da região Amazônica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Estudar as condições de hidrólise enzimática para produção de biodiesel a partir de óleos residuais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) via hidrólise enzimática e esterificação química.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair os óleos obtidos de tortas residuais de andiroba;
- Avaliar as características físico-químicas dos óleos;
- Caracterizar a cadeia graxa dos óleos via cromatografia acoplada ao detector de ionização de chamas (CG-DIC);
- Realizar o refino do óleo para separação da fração insaponificável;
- Determinar a atividade hidrolítica das lipases disponíveis frente ao mesmo substrato;
- Realizar Planejamento Composto Central para otimizar as condições de hidrólise;
- Analisar o aproveitamento da fração enzimática em vários ciclos reacionais;
- Analisar e quantificar por CCD-VideoScan o curso das reações de hidrólise;
- Realizar a esterificação dos produtos hidrolisados pela via etílica e metílica;
- Identificar por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) o produto final de esterificação;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biorrefinarias e a exploração sustentável de oleaginosas na Amazônia

A crescente necessidade de encontrar alternativas para a produção de energia e novos materiais, tem forçado a mudança da economia baseada na utilização de derivados do petróleo, para uma bioeconomia circular sustentável, que exige fontes de alimentação renováveis que possam gerar uma variedade de produtos e produzir energia (DAHIYA *et al.*, 2017).

Um dos exemplos dessa nova vertente são as biorrefinarias, que têm sido propostas para produzir insumos químicos e energia a partir de biomassa, de forma análoga a uma refinaria de petróleo. Estratégias técnicas, econômicas e científicas ajudam a desenvolver uma biorrefinaria sustentável, tendo como objetivo a bioeconomia (DAHIYA *et al.*, 2017 e RODRIGUES, 2011). A biorrefinaria baseia-se na utilização de todos os elementos de entrada de biomassa e reciclagem de produtos secundários, valorizando todos os coprodutos e produzindo a própria energia que alimenta o processo (HUDMAN, 2016).

O objetivo de uma biorrefinaria é transformar os materiais oriundos da biomassa, incluindo os resíduos da cadeia, em produtos úteis através de uma combinação de tecnologias e processos verdes (RODRIGUES, 2011).

As cooperativas extrativistas de óleos do interior do Amazonas podem se beneficiar desse conceito ao implementar processos que possibilitem a utilização completa das fontes oleaginosas e seus resíduos, permitindo seu aproveitamento integral na produção de óleos vegetais e coprodução de compostos químicos e combustíveis, de maior valor agregado. Isso permitiria uma produção sustentável com melhores desempenhos ambientais e econômicos.

3.2. O uso de oleaginosas nativas da Amazônia para produção de biodiesel

Na Amazônia, existe uma grande variedade de espécies oleaginosas. Dessas espécies extraem-se óleos vegetais com inúmeras possibilidades de uso por apresentarem composição química e propriedades físico-químicas variadas, além de usos populares e tradicionais. Os principais mercados de

aplicação dos óleos vegetais estão nas indústrias alimentícias e de cosméticos (PESCE, 2009).

Por outro lado, existe uma grande necessidade de geração de energia elétrica em comunidades afastadas das principais cidades. O Ministério das Minas e Energia já desenvolveu vários projetos piloto que visavam estudar o atendimento dessa demanda. Dentre os diversos modelos estudados, avaliou-se a produção de biodiesel, a partir das oleaginosas nativas (BARRETO, GONZALEZ, 2008; CORREIA *et al.*, 2006;).

Algumas oleaginosas podem ser apontadas como precursoras deste modelo como o babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.), castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), cupuaçu (*Arachis hypogaea* L.), tucumã (*Astrocaryum tucuma* Mart.), açai (*Euterpe oleracea*), entre outras (KALTNER, 2004). A tabela 1 mostra alguns trabalhos descritos na literatura que estudaram o emprego do óleo de oleaginosas da Amazônia como matéria-prima para produção de biodiesel.

Tabela 1: Exemplos do uso de óleos de oleaginosas nativas pra produção de biodiesel

Óleo	Catalisador	Álcool	Conversão em ésteres (%)	Referência
andiroba	NaOH	Metanol	84,6	Stachiw et al, 2015
babaçu	NaOH	Metanol	98,3	Stachiw et al, 2015
castanha-do-Brasil	NaOH	Metanol	98,8	Stachiw et al, 2015
tucumã	NaOH	Metanol	94,2	Stachiw et al, 2015
cupuaçu	H ₂ SO ₄ / KOH	Metanol	83	Pantoja et al, 2013
Açai	H ₂ SO ₄ / KOH	Metanol	81	Pantoja et al, 2013
tucumã	HCl	Etanol	73,6	Barbosa et al, 2009
castanha-do-brasil	NaOH	Metanol	94	Gonçalves et al, 2014
castanha-do-brasil	KOH	Metanol	88,4	Santos et al, 2015
andiroba	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	Etanol	95,5	Carvalho et al, 2013
andiroba	Lipase de <i>Mucor circinelloides</i>	Etanol	93	Carvalho et al, 2015
babaçu	PS Amano IM	Etanol	96,9	Tiosso et al, 2014
andiroba	Novozym 435	Etanol	87	Tiosso et al, 2014

3.2.1. *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba)

A andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) pertence à família Meliaceae e é encontrada em toda a bacia amazônica. A árvore pode medir até 40 m de altura sendo muito utilizada na indústria madeireira, já que produz uma madeira parecida com o cedro, possuindo ainda um alto valor econômico como sucessora do mogno. Contudo em comparação com a exploração madeireira, a produção de óleo a partir das sementes, além de não ser destrutiva, assegura um retorno econômico para a população local. Uma árvore adulta pode produzir até 120 kg de sementes (Figura 1) a semente inteira seca contém 43% de óleo e na massa sem casca, 56% (PESCE, 2009).



Figura 1: Sementes de andiroba. Fonte: <http://www.amazonoil.com.br>

O óleo de andiroba e seus subprodutos são geralmente encontrados em feiras livres e são famosos por seus usos na medicina popular como analgésico, antiinflamatório, antibacteriano e antiparasitário. Também têm relevância para indústria de cosméticos, já que é composto principalmente de triacilgliceróis com níveis elevados de ácidos graxos insaturados tais como oleico (51,81%) e linoleico (8,3%). O seu conteúdo insaponificável varia de 2 a 5%, e é composto de esteroides, cumarinas, flavonoides e principalmente de limonoides (AMBROZIM *et al.*, 2006).

Iha e colaboradores (2013) relatam o uso do óleo de andiroba para produção de biodiesel via reação de transesterificação com catálise ácida, onde o produto obtido apresentou propriedades físico-químicas aceitáveis para o uso em máquinas a diesel. A fim de estudar a eficiência de alguns complexos metálicos como catalisadores, o óleo de andiroba foi convertido em biodiesel apresentando maior rendimento na presença do catalisador Sn(3-hidroxi-2-

metil-4-pirano)₂(H₂O)₂ quando comparado com o uso de ácido sulfúrico (ABREU *et al.*, 2003).

Utilizando enzimas do microrganismo *Burkholderia cepacia*, o óleo foi convertido em biodiesel com 95,5% de rendimento (CARVALHO *et al.*, 2013) e utilizando *Mucor circinelloides* de 93% (CARVALHO *et al.*, 2015). Um estudo de comparação entre a eficiência de conversão entre lipases, utilizando óleo de andiroba, mostrou que a reação utilizando a lipase Lipozyme TL IM® apresentou maior eficiência (TIOSSO *et al.*, 2013).

3.3. Biodiesel

Durante a última década, o biodiesel tem atraído atenção considerável por ser biodegradável, não-tóxico e derivado de uma fonte renovável. As propriedades do biodiesel, como o número de cetano, viscosidade e alterações de fase são semelhantes as do diesel de petróleo (RANGANATHAN *et al.*, 2008). Além disso, os motores abastecidos com biodiesel emitem significativamente menos partículas que prejudicam o meio ambiente.

Outro aspecto importante é que o biodiesel possui teor médio de oxigênio de 11%, e assim resulta em uma combustão mais completa e eficiente (ABBASZADEH e GHOBADIAN, 2012). O número de cetano do biodiesel varia entre 45 e 70, esse valor elevado confere ao biodiesel um alto poder de autoignição e combustão, além de proporcionar uma melhor lubrificação quando comparado ao diesel de petróleo (KNOTHE, 2014).

O biodiesel é definido como sendo uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e pode ser obtido através de três rotas básicas de produção: interesterificação, esterificação e transesterificação (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). A interesterificação é a transformação de triacilgliceróis em biodiesel na presença de um outro éster. Neste processo, um acilglicerol é formado como subproduto ao invés de glicerol. No processo conhecido como esterificação, o biodiesel é produzido pela reação de ácidos graxos livres com álcool, resultando em ésteres alquílicos e água como subproduto. A transesterificação consiste na reação de triacilgliceróis com álcoois de cadeias curtas, como metanol ou etanol, que produzem ésteres de ácidos graxos e glicerol, sendo este processo o mais utilizado para produção de biodiesel (Figura 2) (MA e HANNA, 1999; FREEDMAN, 1986).

Para determinar o melhor método de processo de produção de biodiesel, é importante analisar três pontos: a matéria-prima, o álcool e o catalisador.

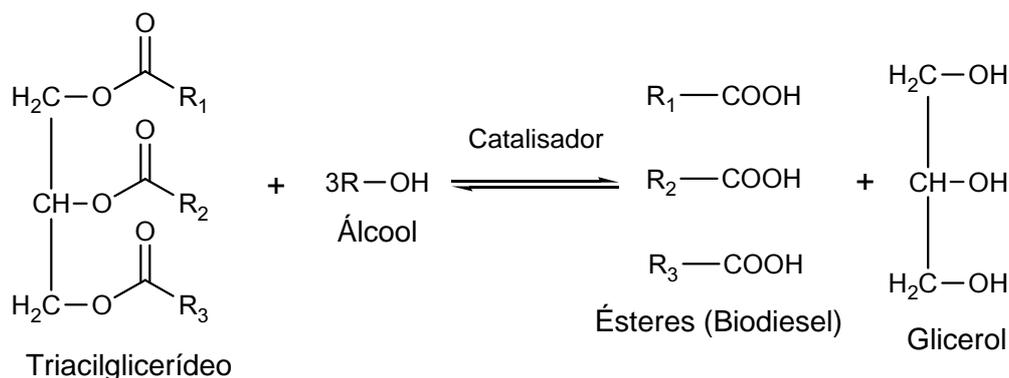


Figura 2: Reação de transesterificação

3.3.1. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada para produção de biodiesel são os lipídeos, que são os principais constituintes de óleos vegetais e gorduras animais, sendo produzidos também por microalgas e cianobactérias. Os óleos vegetais são mais amplamente utilizados e são constituídos majoritariamente por triacilgliceróis, além de di- e monoacilgliceróis em menor quantidade (ISSARIYAKUL e DALAI, 2014).

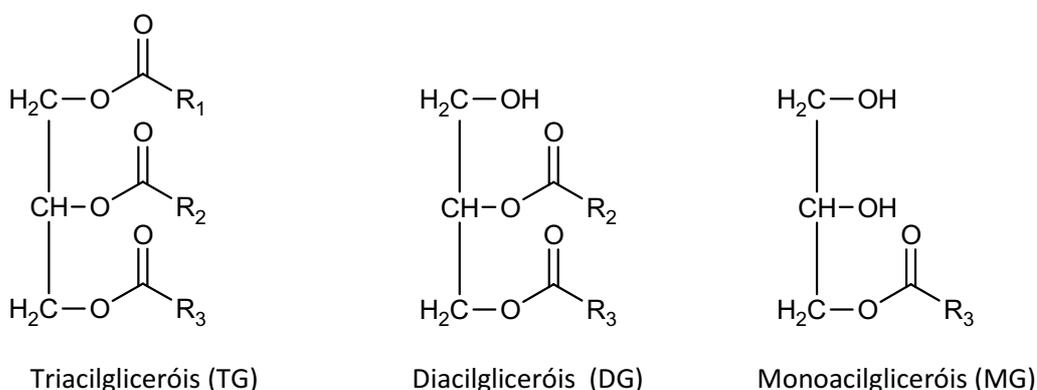


Figura 3: Estrutura molecular dos principais constituintes de óleos vegetais

Óleos comestíveis de plantas como óleo de milho, palma, canola, girassol e soja, são os mais utilizados para produção de biodiesel, correspondendo a 95% do total de biodiesel produzido no mundo, sendo o óleo de canola a principal fonte (GULDHE *et al.*, 2015; KINNEY e CLEMENTE, 2005). A escolha da matéria-prima depende da composição química da fração lipídica (características físico-químicas) e economia do processo. A escolha da

matéria-prima depende também da sua ocorrência, condições de cultivo e sua disponibilidade (GUI *et al.*, 2008; SHARMA e SINGH, 2009; FEOFILOVA *et al.*, 2010).

O custo da matéria-prima corresponde a cerca de 70 a 80% do valor total referente à produção de biodiesel. Como esses óleos são em sua maioria também utilizados na indústria alimentícia existe um grande debate entre a necessidade de geração de alimentos e de energia, a partir dessa matéria-prima (KRAWCZK, 1996; ROBLES *et al.*, 2009; GUI *et al.*, 2008).

Uma resposta para esse problema são os estudos envolvendo outras matérias-prima, de baixo custo, como óleos residuais utilizados em cozinhas ou gorduras animais (KNOTHE, 2005). Esses óleos, que são denominados óleos de 2º geração, têm como principal entrave para o seu uso o aspecto tecnológico causado normalmente pelo elevado índice de acidez (GUI *et al.*, 2008). Assim, a investigação de diferentes métodos e tecnologias que utilizem essas matérias-primas de 2º geração produzindo um biodiesel de qualidade torna-se necessária (ABBASZADEH e GHOBADIAN, 2012; GUI *et al.*, 2008).

3.3.2. Álcoois

Alcoois de cadeia curta, como propanol, butanol, metanol e etanol, são utilizados nas reações que produzem biodiesel. Normalmente utiliza-se o metanol e o etanol. O metanol é frequentemente utilizado por possuir uma maior reatividade química. Além disso, possui uma cadeia menor e maior polaridade, quando comparado aos outros alcoois, essas características tornam a separação dos esteres e da glicerina mais fácil (MARCHETTI *et al.*, 2007).

No entanto, ele é produzido principalmente a partir de fontes não renováveis e é tóxico (CHEN e WU, 2003). Portanto o etanol possui mais vantagens do ponto de vista ambiental já que é gerado a partir de fontes renováveis, sendo também menos tóxico. O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol do mundo. Cerca de 90% da oferta mundial é originária desses dois países. Ao longo das últimas décadas, o Brasil tem sido visto como referência mundial na produção sustentável e eficiente do biocombustível, utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar (ANP, 2016).

Um aumento da velocidade de reação pode ocorrer com o aumento da concentração de álcool, dependendo das condições de operação, tais como o

tipo e quantidade de álcool, o tipo de catalisador e temperatura. As reações catalisadas por enzimas necessitam de uma quantidade menor de álcool que as realizadas por catálise química (TAMALAMPUDI *et al.*, 2008; NARASIMHARAO *et al.*, 2007), a razão molar entre óleo e álcool é de 3:1 e 6:1, em geral, para reações enzimáticas (MATA *et al.*, 2012; BERNARDES *et al.*, 2007). Entretanto, os álcoois atacam o sítio catalítico das enzimas diminuindo o seu grau de conversão (CHEN e WU, 2003).

3.3.3. Catalisadores

Existem dois tipos de catálise. A catálise heterogênea, onde o catalisador está em uma fase diferente dos reagentes. Geralmente, são sólidos finamente divididos ou porosos, usados em reações em fase líquida ou gasosa. Já na catálise homogênea, o catalisador e os reagentes são solúveis (ARANSIOLA *et al.*, 2014). A transesterificação pode ser realizada por catálise homogênea ou heterogênea. Os catalisadores podem ser ácidos, básicos (catalisadores químicos) e enzimáticos (catalisadores biológicos). A tabela 2, mostra as vantagens e desvantagens de cada tipo de catálise.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens de cada tipo de catálise (Adaptada de GULDHE, 2015)

Tipo de catálise	Vantagens	Desvantagens
<p>BÁSICA HOMOGÊNEA</p>	<p>Alto rendimento, menores custos, alta velocidade de reação, requer quantidade média de energia.</p>	<p>Reação de saponificação dos ácidos graxos livres, geração de águas residuais, difícil recuperação do catalisador, purificação do produto final é necessária.</p>
<p>ÁCIDA HOMOGÊNEA</p>	<p>Médio rendimento, menores custos, velocidade de reação média, conversão de ácidos graxos livres.</p>	<p>Geração de águas residuais, difícil recuperação do catalisador, purificação do produto final é necessária, corrosão de equipamentos, requer altas quantidades de energia.</p>
<p>BÁSICA HETEROGENEA</p>	<p>Alto rendimento, custos médios, pode ser reutilizado, alta velocidade de reação, pode ser utilizado em processo contínuo.</p>	<p>Requer altas quantidades de energia, exige preparo do catalisador, reação de saponificação de ácidos graxos livres.</p>
<p>ACIDA HETEROGENEA</p>	<p>Alto rendimento, pode ser reutilizado, custos médios, alta velocidade de reação, conversão de ácidos graxos livres, pode ser utilizados em processo contínuo.</p>	<p>Requer altas quantidades de energia, exige preparo do catalisador, causa corrosão dos equipamentos.</p>
<p>ENZIMÁTICA</p>	<p>Requer baixa energia, conversão de ácidos graxos livres, produtos de alta pureza, sem geração de águas residuais, reutilizáveis, pode ser utilizados em processo contínuo, utilizados em diversas matérias-primas, elevada seletividade e especificidade.</p>	<p>Menores taxas de reação causadas pela inibição por álcoois, altos custos.</p>

Os catalisadores químicos apresentam problemas significativos e para minimiza-los processos catalisados por enzimas têm sido propostos (FJERBAEK *et al.*, 2009). A catálise enzimática em biodiesel é realizada especificamente pelas lipases, que possuem a capacidade de mediar reações de transesterificação para produção de biodiesel (LEUNG *et al.*, 2010), entretanto apresentam menores taxas de conversão neste processo, uma vez que ocorre a inibição das enzimas pelos álcoois utilizados. Outro grande problema do uso de enzimas para produção de biodiesel é o alto custo de enzimas específicas (KUSS *et al.*, 2015). Uma alternativa para o uso desse tipo de matéria-prima é a produção de biodiesel a partir do processo de hidroesterificação (SANTOS *et al.*, 2015).

3.4. Hidroesterificação

A hidroesterificação é um processo integrado que combina dois processos essenciais, hidrólise e esterificação. O processo de hidrólise seguido de esterificação é uma alternativa para o uso de métodos convencionais de produção de biodiesel utilizando óleos com alto teor de acidez (SANTOS *et al.*, 2015 e POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016).

Por esse processo, as matérias-primas com elevado índice de acidez sofrem hidrólise por catalisadores homogêneos ou por lipases, que oferece vantagens significativas em relação à hidrólise química (Tabela 2), além de proporcionar um produto final livre de resíduos químicos (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016).

A esterificação utilizando catalisadores ácidos heterogêneos proporciona vantagens econômicas associadas a reutilização do catalisador, facilidade de separação do catalisador e um produto final menos corrosivo e poluente. Além disso para o uso de catalisadores heterogêneos, em geral, têm-se um maior rendimento reacional e uma maior pureza do produto (SEMWAL *et al.*, 2011). No caso específico de biodiesel, outra vantagem significativa é a facilidade de se empregar o etanol no lugar do metanol.

3.5. Enzimas e lipases

Enzimas são catalisadores das reações que ocorrem em sistemas biológicos e normalmente são proteínas com extraordinária eficiência catalítica em diferentes tipos de reações, devido à sua capacidade de se ligarem especificamente a uma grande variedade de moléculas (LEHNINGER, 1995).

As lipases são enzimas que efetuam a hidrólise de triacilgliceróis (Figura 5) para formar diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres, além de catalisarem a esterificação e interesterificação (Figura 4), sendo assim classificadas como hidrolases, chamadas lipases de triacilglicerol e recebem a nomenclatura E.C.3.1.1.3 pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NELSON *et al.*, 1996; AL-ZUHAIR, 2005; SCHMIDT, 1999; IUBMB, 1992).

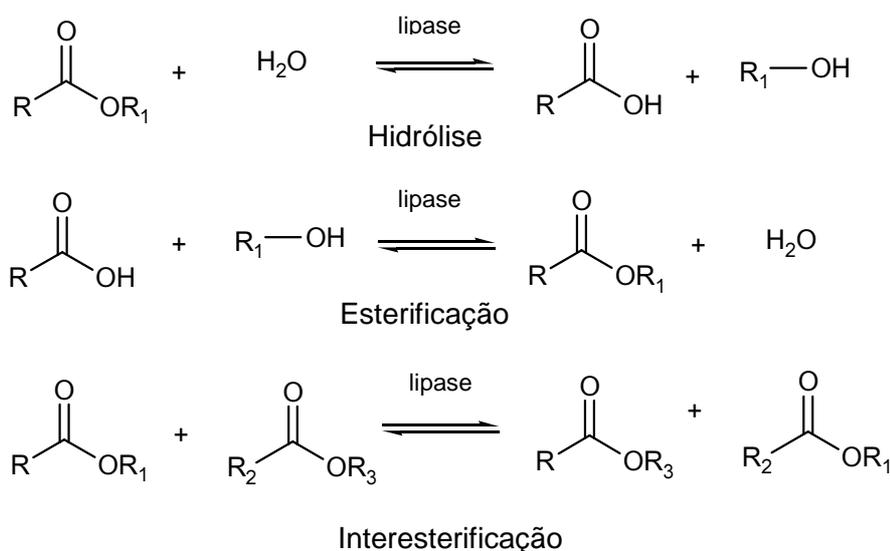


Figura 4: Algumas reações mediadas por lipases

As características individuais das lipases dependem principalmente das características do organismo produtor (VAKHLU e KOUR, 2006; SCHMIDT, 1999; SHARMA *et al.*, 2001).

Os principais organismos produtores de lipases são:

- Bactérias como *Pseudomonas*, *Thermoactinomyces*, *Bacillus*, *Actinomyces*;
- Leveduras como *Candida rugosa* e *C. antartica*;
- Fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* e *Mucor*;

Desses destacam-se as lipases isoladas das leveduras *Candida* sp., as bactérias *Pseudomonas* sp. e os fungos filamentosos *Rhizopus* sp. (BENJAMIN e PANDEY, 1998).

As lipases podem ser classificadas em dois grupos: as lipases 1,3 específicas que catalisam a liberação de ácidos especificamente nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis, a exemplo das lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger*, *Mucor miehei* e *Pseudomonas* sp., e as lipases que não possuem seletividade posicional, como as de *Candida rugosa* (YUZBASHEVAA *et al.*, 2014; SAXENA *et al.*, 1999).

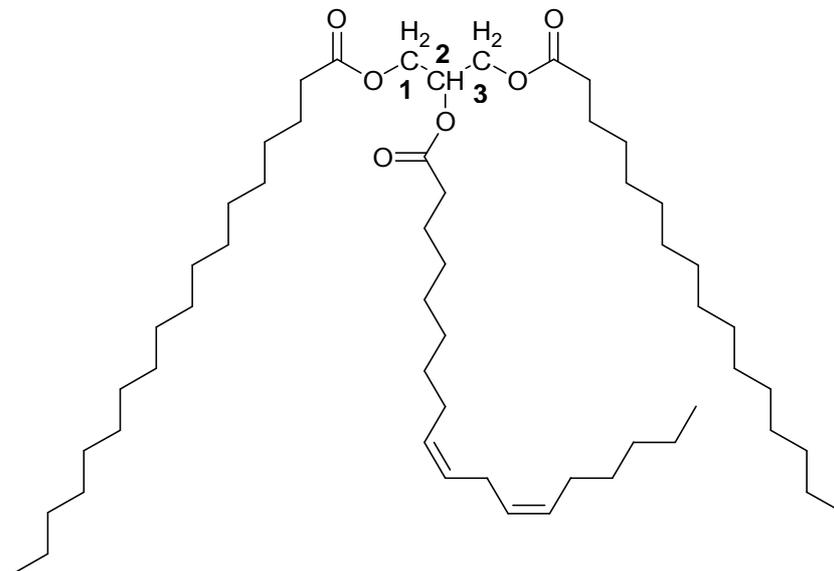


Figura 5: Molécula de triacilglicerídeo (glicerato de 1-estearil,2-linoleil,3-palmitoíla)

O sítio catalítico das lipases é constituído por três resíduos de aminoácidos, que são um nucleófilo de serina, um de sítios ácidos (aspartato e glutamato) e um resíduo de histidina (SCHMIDT, 1999; RUA *et al.*, 1997). A catálise pode ser feita utilizando lipases extracelulares (a enzima é extraída da

célula) e intracelulares (a célula inteira é utilizada), o processo extracelular emprega lipases livres ou imobilizadas (RANGANATHAN *et al.*, 2008).

A lipase pancreática apresenta dois domínios distintos em sua estrutura, cada proteína tem um domínio amino-terminal globular (N-terminal), que contém o sítio catalítico e um domínio carboxi-terminal (C-terminal), que inclui a colipase. O domínio N-terminal apresenta ainda uma estrutura chamada de “tampa” que é hidrofóbica e que cobre o sítio catalítico impedindo esteroquimicamente o acesso do substrato ao mesmo. Em uma interface lípidica-aquosa a tampa se move para abrir e configurar o acesso ao sítio catalítico (LOWE, 2002).

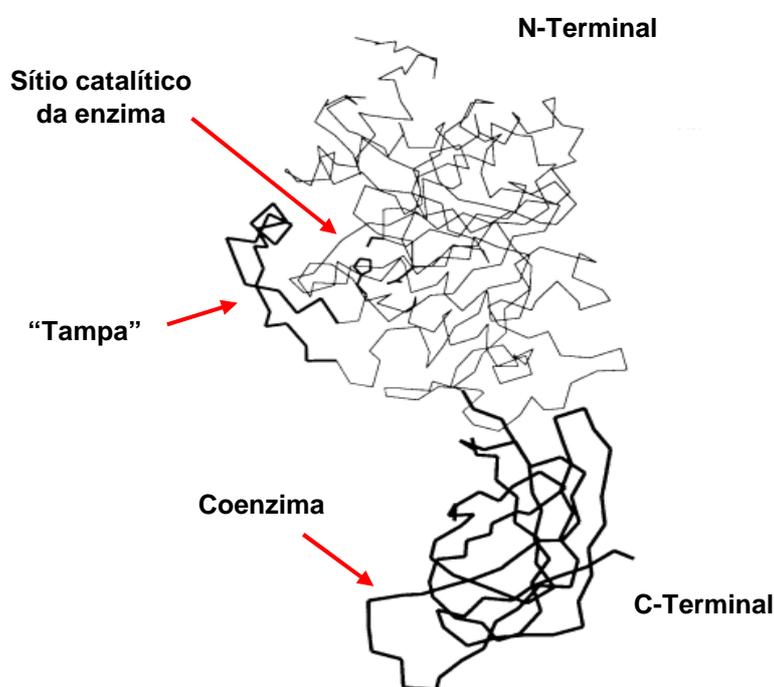


Figura 6: Estrutura de uma lipase e seus diferentes domínios

As lipases são aplicadas em diversos processos de biotransformação, especialmente as lipases de *Candida rugosa* (LCR), que são amplamente mencionados na literatura. Entre os processos que utilizam hidrolases, as LCR foram descritas pela primeira vez nos anos 60, quando foram isoladas de leveduras do solo. Hoje, sabe-se que as LCR comerciais são, na verdade, composta por uma mistura de várias isoenzimas em diferentes proporções, e cada isoenzima possui propriedades biocatalíticas diferentes (YAMADA e MACHIDA, 1962 e FERRER *et al.*, 2001).

Assim, encontramos trabalhos onde os parâmetros reacionais ótimos para o uso de lipase de *Candida rugosa* podem apresentar valores distintos, como mostra a tabela 3. É importante resaltar que o uso de lipases para processos de hidrólise exige ainda uma afinidade com o substrato. A *Candida rugosa* é uma lipase não-específica em relação a sua regioespecificidade e não é tipo-seletiva com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturações (MARÍA *et al.*, 2006).

Tabela 3: Algumas condições em catálise enzimática de lipases de *Candida rugosa* para produção de biodiesel (Adaptada de POURZOLFAGHAR, *et al.*, 2016)

Substrato	Óleo:Tampão	Temperatura	pH	Tempo	Agitação	% Rendimento	Enzima	Referencia
Óleo de Soja	2:1 (v/v)	40 °C	8,0	5 h	“agitação constante”	88	Livre	TING <i>et al.</i> , 2008
Óleo residual de cozinha	1:1 (v/v)	30 °C	6,8 – 7,4	10 h	250 rpm	100	Livre	TALUKDER <i>et al.</i> , 2010 a
Óleo de soja	40% (m/v)	45 °C	7,0	3 h	*	71	Imobilizada	NAGESHA <i>et al.</i> , 2004
“Óleo ácido”	60% (m/v)	30 °C	7,0	24 h	500 rpm	66	Livre	WATANABE <i>et al.</i> , 2007
Óleo de Palma	0,1 g / mL	45 °C	7,5	90 min	200 rpm	97	Livre	SERRA <i>et al.</i> , 2008
Óleo de Soja	2:1 (m/v)	30 °C	7,0	24 h	300 rpm	92	Livre	ADASHI <i>et al.</i> , 2013
Óleo de Palma	1:1 (v/v)	30 °C	7,0	4 h	250 rpm	100	Livre	TALUKDER <i>et al.</i> , 2010 b
Óleo de Pinhão Manso	50% (m/v)	40 °C	9,5	*	200 rpm	78	Livre	KABASHI <i>et al.</i> , 2014
Óleo de oliva	1:4 (v/v)	45 °C	6,5	12 h	120 rpm	90	Imobilizada	FADILOGLU & SOYLEMEZ, 1998
Óleo de amendoa de Tucumã	1:1 (v/v)	40 °C	7,5	2 h	250 rpm	94,5	Livre	CARVALHO 2014

3.5.1. Variáveis operacionais da enzima

Enzimas são proteínas e portanto estão sujeitas a todas as reações que as proteínas podem sofrer, podendo ser coaguladas quando expostas ao calor, álcoois ou ácidos fortes, por exemplo (LEHNINGER, 1995). As propriedades estruturais da lipase diferem de acordo com as suas fontes. Isso explica atividades diferentes em substratos diferentes, surgindo a necessidade de

otimizar o processo com base na enzima selecionada e nos substratos (BISEN *et al.*, 2010).

Algumas variáveis devem ser levadas em consideração para que a enzima não perca sua atividade e mantenha a sua taxa de conversão.

A velocidade de todas as reações químicas é afetada pela temperatura, quanto maior a temperatura mais rápida é a reação. Valendo também para as reações envolvendo enzimas. Contudo, se a temperatura é exageradamente elevada a enzima será desativada por desnaturação e será incapaz de funcionar. A melhor temperatura para o funcionamento de uma enzima, a temperatura na qual a velocidade de reação envolvendo uma enzima é máxima, é chamada de temperatura ótima para uma enzima em particular. Quando exposta a temperaturas mais elevadas, a enzima irá coagular e será incapaz de catalisar. Em temperaturas inferiores da temperatura ótima, a velocidade será menor que a velocidade máxima. Muitas enzimas apresentam a temperatura ótima em torno de 40°C (LEHNINGER, 1995).

No geral, nas reações de produção de biodiesel via catálise enzimática a temperatura ótima da enzima é influenciada pela sua estabilidade, razão molar de álcool/óleo e o tipo de solvente orgânico utilizado (ANTCZAK *et al.*, 2009). Diferentes temperaturas operacionais têm sido empregadas, variando de acordo com a fonte da enzima. No geral, lipases bacterianas exibem uma termoestabilidade maior do que outras lipases microbianas (GUPTA *et al.*, 2004).

Cada enzima apresenta uma faixa de pH na qual o seu funcionamento é ótimo, denominado de pH ótimo (LEHNINGER, 1995). Lipases bacterianas têm pH ótimo entre neutro e alcalino (SUNNA *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2004), enquanto que lipases de leveduras e fungos são mais ativas em pH entre neutro a ligeiramente ácido (SHARMA *et al.*, 2001). No entanto, algumas lipases são ativas e estáveis ao longo de uma faixa de pH mais ampla, de 3 a 12 (BRADDOO *et al.*, 2002).

A velocidade das reações são determinadas pelas concentrações dos reagentes, com uma maior concentração de substrato a velocidade da reação aumentará até que a enzima tornar-se saturada com o substrato. A velocidade também sofrerá aumento com o aumento da quantidade de enzima, supondo um suprimento ilimitado de substrato (LEHNINGER, 1995). O tempo de reação

necessário para a catálise enzimática é geralmente mais longo, do que aquelas catalisadas por reagentes químicos (PARAWIRA, 2009).

No caso específico das lipases, é necessária a formação de uma interface lipídeo/água para que a enzima seja capaz de catalisar nesta interface no processo de hidrólise enzimática de lipídeos (CASTRO *et al.*, 2004). A água mantém a estrutura tridimensional da enzima e pode afetar diretamente a sua estrutura e atividade (LU *et al.*, 2009). Geralmente, a quantidade mínima de água necessária para manter a atividade biocatalítica da enzima é específica para cada lipase (JEGANNATHAN *et al.*, 2008).

3.6. Planejamento Fatorial de Experimentos

Muitos experimentos que dependem de vários fatores reacionais, como é o caso da catálise enzimática, faz-se necessário previamente otimizar cada um dos fatores e esse é um processo que pode levar muito tempo e envolver gastos de reagentes.

Nesses casos, empregando os planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, pode-se extrair do sistema em estudo o máximo de informações sobre as variáveis mais significativas no processo, fazendo um número mínimo de experimentos, uma vez que num planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação, na resposta (NETO *et al.*, 2007 e FERREIRA e TEOFILO, 2006).

Quando os fatores significativos são selecionados, uma metodologia de superfície de resposta pode ser realizada para otimizar o experimento, ou seja, é possível encontrar os valores das variáveis que produzirão a melhor resposta, encontrando uma região ótima na superfície definida pelos fatores (FERREIRA, e TEOFILO, 2006). No caso da reação de hidrólise enzimática, o emprego desse tipo de análise é interessante, uma vez que o objetivo é encontrar os valores dos parâmetros reacionais que possibilitam um maior rendimento (NETO *et al.*, 2007).

Para uma análise utilizando a metodologia de superfície de resposta, o planejamento experimental realizado deve proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigir poucos experimentos e fornecer condições de avaliação do planejamento fatorial dos coeficientes e do modelo, analisando a

regressão e falta de ajuste. Assim, pode-se realizar um planejamento como o planejamento composto central, que é uma alternativa para realizar planejamentos que demandam muitos experimentos para um pequeno número de fatores; diminuindo assim, a quantidade de ensaios que serão realizados (FERREIRA e TEOFILLO, 2006).

Esses planejamentos são constituídos por: um planejamento fatorial de dois níveis 2^k , onde k representa o número de fatores, e para cada fator tempos um nível mais alto e um nível mais baixo, representados por + e -. Dessa forma, é necessário definir quais fatores serão analisados e qual tipo de planejamento fatorial será empregado. Experimentos no ponto central, onde os valores para cada variável são uma média dos níveis mais altos e mais baixos, representados por 0; e experimentos nos pontos axiais que estão situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância de $\pm \alpha$ da origem, os valores desses níveis precisam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis, entretanto é aceitável um ajuste nesses valores, caso necessário, desde que não ocorram grandes distorções em comparação com o valor original. A figura 7 mostra os pontos experimentais deste planejamento no sistema de coordenadas, onde para $k = 2$, no sistema a esquerda temos $\alpha = 1,414$ e para $k = 3$, na direita temos $\alpha = 1,6282$ (FERREIRA e TEOFILLO, 2006).

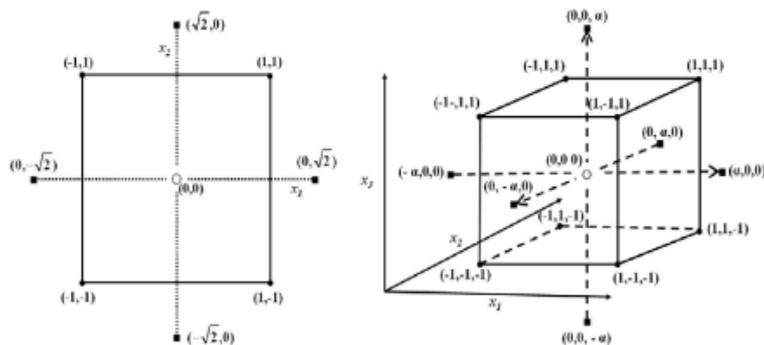


Figura 7: onde ● representa o planejamento fatorial (níveis em +1 e - 1); ■ os pontos axiais e ○ os pontos centrais.

3.6.1. Coeficientes dos efeitos e as estimativa de erro com repetições no ponto central

Planejamentos fatoriais com três níveis, ou seja, incluindo o ponto central, podem estimar o grau de curvatura na resposta. Polinômios são utilizados para descrever o modelo. Considerando três variáveis (X_1 , X_2 e X_3), teríamos, por exemplo, a equação 1, para estimar os coeficientes das variáveis principais:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + e$$

Equação 1: estimativas de coeficientes de efeitos principais

Onde o coeficiente b_0 é o valor populacional da média de todas as respostas obtidas, b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes relacionados com as variáveis X_1 , X_2 e X_3 ; e “e” é o erro associado ao modelo. E para as interação entre as variáveis, teríamos:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + e$$

Equação 2: estimativas de coeficientes de efeitos de interação

Onde, além dos coeficientes relacionados as variáveis temos os coeficientes relacionados as interações de segunda ordem (X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3) e o coeficiente b_{123} relacionado a interação de terceira ordem, $X_1X_2X_3$.

Quando o modelo é montado, é necessário construir uma matriz de coeficientes de contraste (X).

Tabela 4: Exemplo de matriz de coeficientes de contraste para um planejamento 2^3

Média	Variáveis			Interações			
	X_1	X_2	X_3	X_{12}	X_{13}	X_{23}	X_{123}
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

Esta matriz é utilizada para o cálculo dos coeficientes do modelo (vetor de regressão), junto com o vetor de respostas y . Assim, o modelo pode ser representado matricialmente pela equação 3, onde y é o vetor das respostas estimadas pelo modelo e b o vetor de regressão.

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{b}$$

Equação 3: Representação da matriz

Utiliza-se o método dos quadrados mínimos para determinar o vetor de regressão b , como mostra a equação 4, onde X^t indica a transposta de X e $(X^t X)^{-1}$ é a matriz inversa do produto da transposta da matriz X com ela mesma.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y}$$

Equação 4: Representação da matriz

Com os experimentos incluídos no centro do planejamento é possível obter uma boa estimativa dos erros. Assim, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes. Além disso é possível estimar um modelo apropriado e verificar a falta de ajuste já que a relação não linear entre os intervalos é minimizada (FERREIRA e TEOFILO, 2006).

Normalmente são necessárias apenas de 3 a 5 repetições no ponto central e a partir dessas repetições é possível obter a média e a variância, conforme as equação 5 e 6, respectivamente, onde: r é o número de replicatas, y_i é o valor das observações individuais, y é o valor da média e S^2 a variância (NETO *et al.*, 2007)

$$\text{Média } (y) = \frac{\sum_{i=1}^r y_i}{r}$$

Equação 5: Média amostral

$$\text{Variância } (S^2) = \frac{\sum_{i=1}^r (y_i - y)^2}{(r - 1)}$$

Equação 6: Variância amostral

A matriz $(X^t X)^{-1}$ tem grande influência na variância dos parâmetros de regressão. O produto desta matriz, juntamente com o valor da variância obtida

através das repetições no ponto central, de acordo com a equação 6, fornece a matriz $V_{(b)}$ (matriz de variância-covariância), obtida pela equação 7.

$$V_{(b)} = (X^t X)^{-1} S^2$$

Equação 7: Matriz de variância-covariância

Os elementos da diagonal da matriz $V_{(b)}$ são as variâncias dos parâmetros de regressão. Os elementos de fora da diagonal são a covariância entre os parâmetros de regressão. Assim, a raiz quadrada dos elementos da diagonal principal determina os valores correspondentes dos erros padrão dos coeficientes calculados (FERREIRA e TEOFILO, 2006).

3.6.2. Efeitos significativos

Inicialmente formula-se uma hipótese estatística com o objetivo de avaliar se aceitamos ou não aceitamos certa condição. Formula-se a hipótese de que não existe, por exemplo, efeitos ou interações entre efeitos significativos em um dado planejamento. Esta hipótese é chamada de hipótese nula (H_0). Qualquer hipótese diferente desta é chamada hipótese alternativa (H_1). Se uma hipótese é rejeitada quando deveria ser aceita, comete-se um erro tipo I. Se uma hipótese é aceita quando deveria ser rejeitada, comete-se um erro tipo II. Para que um teste de hipótese seja adequado, ele deve ser planejado de modo que os erros de decisão sejam mínimos.

Ao analisar uma hipótese estabelecida, a probabilidade máxima de ocorrer um erro do tipo I é chamada de nível de significância, representada por α . Se o nível de significância for de 5%, existe 5 chances em 100 da hipótese nula ser rejeitada, quando deveria ser aceita, ou seja, existe uma confiança de 95% de que se tomou a decisão correta.

As avaliações de significância para a decisão estatística, tanto para efeitos como para coeficientes de um modelo, podem ser realizadas empregando o teste t (distribuição de Student), através do valor p, comparando este valor do teste estatístico amostral com o nível de significância α . Se o valor $p \leq \alpha$, rejeita-se H_0 , caso contrário H_0 é aceito. Logo, se estabelecemos como H_0 que não existe efeitos, ou interações entre efeitos, significativos em um dado planejamento, se p for $\leq 0,05$ rejeitamos H_0 e concluímos que o efeito, ou a interação entre dados efeitos, é significativa para o modelo.

O valor p representa a probabilidade de validade do erro envolvido no resultado observado, é um representativo da população. Assim, levando em consideração o valor de um efeito ou da interação entre efeitos, se o valor do teste estatístico calculado apresentar um grande desvio da distribuição de Student, ele descreve algo mais que o resíduo experimental. Desta maneira, será significativo dentro de um intervalo de confiança e assim, $p \leq \alpha$, para o número de graus de liberdade em questão (FERREIRA e TEOFILO, 2006).

3.6.3. Avaliação do modelo

A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando a análise de variância (ANOVA), uma vez que o modelo em questão pode não descrever a região estudada do sistema. Na ANOVA a variação total da resposta é definida pela soma quadrática de regressão e resíduos. A soma quadrática da regressão (SQ_R) representa a soma dos desvios das previsões feitas pelo modelo, em relação à média global. Já a soma quadrática residual (SQ_r) representa a soma das diferenças entre os valores observados e os valores previstos. Assim, a soma quadrática total (SQ_T) representa a soma dos desvios dos valores observados, em relação à média global.

Quando temos um modelo bem ajustado, a soma quadrática residual (SQ_r) deve ser pequena de forma que os valores observados e os valores previstos sejam próximos, ou seja, que a soma quadrática total seja aproximadamente igual à soma quadrática da regressão.

A divisão da soma quadrática de cada fonte de variação pelo seu respectivo número de graus de liberdade fornece a média quadrática (MQ). A razão entre a média quadrática da regressão (MQ_R) pela média quadrática residual (MQ_r), pode ser usada para avaliar a significância da regressão, através do teste F (distribuição de Fisher), levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade. Considerando que o valor calculado de F (MQ_R/MQ_r) seja maior que o valor tabelado de F, para o nível de significância escolhido, ou seja, $F_{cal} > F_{tab}$, a significância da regressão é estatisticamente significativa. Descarta-se a possibilidade de H_0 e se tem a evidencia estatística para acreditar na existência de uma relação linear entre as variáveis.

A soma quadrática residual, equivale a soma quadrática do erro puro (SQ_{er}), que está relacionada aos erros aleatórios das repetições, mais a soma quadrática da falta de ajuste (SQ_{fa}). A falta de ajuste é uma medida da discrepância entre a resposta do modelo com as respostas de previsão e a média das replicatas. Quando dividimos essas somas quadráticas pelos seus respectivos graus de liberdade temos medias quadráticas, cujos valores quando comparados são utilizados para avaliar a falta de ajuste do modelo. Podemos, então, usar um teste F da razão MQ_{fa}/MQ_{ep} para avaliar se o modelo está bem ajustado. Quando F_{cal} ao nível de significância estabelecido, for maior que MQ_{fa}/MQ_{ep} significam falta de ajuste.

Outros parâmetros também importantes para observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão, são o valor do coeficiente de variação R^2 e gráficos de resíduos. O valor de R^2 representa a fração da variação que é explicada pela falta de ajuste do modelo, o valor máximo de R^2 é 1, e só ocorrerá se não houver resíduo nenhum e portanto toda a variação em torno da média for explicada pela regressão. Quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas. Em geral, expressamos o R^2 em termos de porcentagem, ou seja, significa quanto em porcentagem nos resultados podem ser explicados (NETO *et al.*, 2007).

3.6.4. Metodologia de superfície de resposta

Para um planejamento composto central realizado com três variáveis, a superfície de resposta pode ser estimada de acordo com a equação 9, onde temos: X_1 , X_2 e X_3 que são as variáveis referentes aos fatores; e apresentam os seguintes coeficientes calculados a partir do método dos mínimos quadrados, são eles: b_0 , ponto de interseção; b_1 , b_2 , b_3 , referentes aos efeitos lineares; b_{11} , b_{22} , b_{33} , referentes aos efeitos quadráticos; e b_{12} , b_{13} , b_{23} , referentes aos efeitos de interação de segunda ordem; e e_i ($i=1,2,\dots$) é o erro experimental correspondente a y_i .

$$y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{12}X_2^2 + b_{13}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + e_i$$

Equação 9: Estimativa de superfície de resposta

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção da matéria-prima e extração dos óleos

Resíduos da extração de óleo de andiroba gerados na Agroindústria de extração de óleos de Manaquiri - AM, foram utilizados como matéria-prima para extração dos óleos. O processo de extração em cooperativas extrativistas é realizado por prensagem mecânica. Foram recebidos, o óleo obtido da prensagem não filtrado e a torta residual (Figura 8).

Normalmente o processo de prensagem mecânica é seguido por uma filtração em sistema do tipo filtro-prensa, que separa o óleo da torta. Como o laboratório não tinha esse sistema disponível, decidiu-se pela separação do óleo e da torta com solvente orgânico (hexano). Por outro lado, a torta residual também foi extraída por maceração à frio com hexano, sempre por 3 dias (Figura 9).



Figura 8: À esquerda, o resíduo do processo de filtragem do óleo obtido por prensa mecânica e à direita o resíduo do que é colocado dentro da prensa mecânica para realizar a extração.



Figura 9: Processo de extração por maceração a frio com hexano em Mariote.

Ao final do período, o óleo foi separado por filtração com papel de filtro e o extrato foi concentrado em rotaevaporador até remoção completa do hexano. Foi realizada uma nova extração com os resíduos até que o rendimento da extração posterior fosse considerado baixo. Para o óleo não filtrado foram necessárias três extrações sequenciais e para a torta residual apenas duas.

4.2. Caracterização físico-química dos óleos

As propriedades físico-químicas, índices de acidez, iodo, peróxidos, porcentagem de ácidos graxos livres, material insaponificável e massa específica; foram determinadas pelos métodos descritos pela AOAC (HORWITZ, 2000) e por MORETTO e FETT, 1989.

4.2.1. Índice de acidez

O índice de acidez (IA) é definido como o número de mg de hidróxido de sódio necessárias para neutralizar os ácidos livres de uma grama da amostra (MORETTO e FETT, 1989). Em um erlenmeyer de 125 mL, pesou-se 2 g de óleo, em seguida adicionou-se 25,0 mL de uma mistura de éter e álcool etílico (2:1) e agita-se. Adicionaram-se 2 gotas de solução de fenolftaleína e titulou-se a amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada até a coloração rósea. O cálculo para o IA é mostrado na equação 10. Onde, V é o volume de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação da amostra (mL), F é o fator de correção da solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 N e m é a massa de óleo (g).

$$IA \left(\frac{mg \text{ NaOH}}{g \text{ óleo}} \right) = \frac{V.F.5,61}{m}$$

Equação 10: Índice de Acidez

4.2.2. Porcentagem de ácidos graxos livres

A porcentagem de ácidos graxos livres (AGL%), é expressa em relação a quantidade de ácido oleico (MORETTO e FETT, 1989). Pesou-se 2 g de óleo em um erlenmeyer de 125 mL adicionaram-se 50,0 mL de álcool etílico 95% e em seguida 2 gotas de fenolftaleína. A solução foi aquecida até a ebulição e posteriormente titulada ainda quente com solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada, até coloração rósea por 15 segundos. A equação 11 mostra o cálculo para obtenção de AGL%. Onde, V é o volume de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação da amostra (mL), N é a normalidade da solução padronizada de NaOH (0,1 N) e m é massa da amostra (g).

$$AGL \% = \frac{V.N.28,2}{m}$$

Equação 11: Porcentagem de ácidos graxos livres

4.2.3. Índice de iodo

O índice de iodo (II) é a medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no óleo, determinado pela quantidade de halogênio absorvido e é expresso como o peso de iodo absorvido por 100 g de amostra (HORWITZ, 2000). Em um erlenmeyer de 250 mL, pesou-se 0,25 g de óleo e adicionou-se 10,0 mL de cloro hexano e ácido acético glacial (1:1) (POCKLINGTON, W.D 1990). Em seguida, adicionaram-se 25,0 mL da solução de Wijs. Agitou-se cuidadosamente e deixou-se em repouso por 30 min ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Posteriormente adicionaram-se 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água. Titulou-se com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 N até uma coloração amarela. Adicionaram-se então de 1 a 2 mL de solução de amido 0,5% e continuou-se a titulação até a cor azul desaparecer. Em seguida, foi realizado um teste em branco. O cálculo para este índice é mostrado na equação 12. Onde, A é o volume de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto no teste com amostra (mL), B é o volume de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto no teste em branco (mL), F é fator de correção da solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 N e m é massa da amostra (g).

$$II \left(\frac{g \text{ I}_2}{100g \text{ de amostra}} \right) = \frac{(A - B) \cdot F \cdot 1,27}{m}$$

Equação 12: Índice de Iodo

4.2.4. Índice de peróxidos

O índice de peróxido (IP) é definido como sendo a medida do conteúdo de oxigênio reativo em termos de miliequivalentes de oxigênio por 1.000 g de óleo (MORETTO e FETT, 1989). Pesaram-se 5,00 g de óleo num erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 30,0 mL de uma mistura de ácido acético e clorofórmio (3:2) e agitou-se até a dissolução da amostra. Em seguida, adicionaram-se exatamente 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Posteriormente adicionaram-se 30,0 mL de água destilada e titulou-se com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 N, até atingir uma coloração levemente alaranjada. Posteriormente adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de amido 1% continuando a titulação até o desaparecimento da coloração azul. O índice de peróxido é calculado através da equação 13. Onde, A é o volume

de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto no teste com amostra (mL), B é o volume de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto no teste em branco (mL), N é normalidade da solução de tiosulfato de sódio 0,1 e m é a massa da amostra (g).

$$IP \left(\frac{meq}{Kg \text{ de óleo}} \right) = \frac{(A - B). N. 1000}{m}$$

Equação 13: Índice de peróxido

4.2.5. Material Insaponificável

Em um balão de fundo chato pesaram-se 2,00 g do óleo e adicionaram-se 25,0 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 0,5N. Um sistema de refluxo foi adaptado a este balão e a amostra foi aquecida até a ebulição, por um período de 30 min. Em seguida esperou-se o resfriamento e o conteúdo foi transferido para um funil de separação de 250 mL, adicionou-se 50 mL de éter etílico. Em seguida a fase etérea foi retirada. Este processo foi realizado três vezes, obtendo 150 mL de fase etérea, a mesma foi transferida para pra um funil de separação de 250 mL, adicionou-se 50 mL de água destilada. Após retirar a fase aquosa, adicionou-se 20 mL de hidróxido de potássio 0,5N. Coletou-se a fase aquosa e em seguida a fase etérea foi novamente lavada com água destilada até que não apresentasse mais alcalinidade frente a fenolftaleína. A fase etérea foi transferida para um frasco tarado, após evaporação do solvente, pesou-se o frasco com a amostra até peso constante.

$$\% \text{ de material insaponificável} = \frac{\text{peso do material}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

Equação 14: porcentagem de material insaponificável

4.2.6. Massa específica

Essa determinação é dada pela razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume (HORWITZ, 2000). Transferiu-se a amostra em um balão volumétrico de 5 mL e realizou-se a pesagem. Realizaram-se três medições para uma dada temperatura. A massa específica média foi calculada através da equação 15. Onde, d_m é a densidade média, m_m é massa média e V foi o volume (5,0 mL).

$$dm = \frac{mm}{V}$$

Equação 15: Massa específica

4.3. Determinação da composição da cadeia graxa dos óleos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC)

Inicialmente realiza-se a derivatização das amostras de óleo em seus respectivos ésteres metílicos. A derivatização das amostras foi realizada utilizando o método oficial modificado descrito pela AOAC 969.33 (HORWITZ, 2000). Pesa-se 50,0 mg da amostra de óleo em um tubo de ensaio com tampa, adiciona-se 4,00 mL de hidróxido de potássio metanólico 0,5 N, em seguida deixa-se em banho-maria por 15 min á 60 °C. Adiciona-se 5,00 mL de trifluoreto de boro metanólico e deixa-se novamente em banho-maria por 3 min. Posteriormente são adicionados 4,00 mL de hexano e agita-se por 1 min.

Logo após, são acrescentados 7,5 mL de solução aquosa de cloreto de sódio saturada, agita-se vigorosamente por alguns segundos. A fase hexânica é retirada e filtrada em uma pequena coluna contendo sulfato de sódio anidro para remoção de água, e alumina (óxido de alumínio 90,0,063-0,200 mm) para a remoção de material graxo não convertido. Em seguida, a coluna é eluída com 5,0 mL do sistema hexano:acetato de etila (95:5). Utiliza-se cromatografia em camada delgada para monitorar a derivatização, com padrões de ésteres metílicos para fins comparativos. Ao final, a amostra é seca em nitrogênio e prepara-se uma solução na concentração de 1 mg/mL que é analisada por cromatografia gasosa.

Posteriormente, foi realizada a análise da composição da cadeia de ácidos graxos, utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC). Um cromatógrafo gasoso da marca Agilent, modelo HP 6890 *Plus*, configurado com duas colunas cromatográficas, em paralelo, uma coluna polar (HP INNOWAX-20) e outra apolar (HP-5) de idênticas dimensões (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 mm), detectores de ionização de chama (DIC) e sistema de injeção automático e software Chemstation, foi utilizado. Modo do injetor Split (20:1), temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector 260 °C, hidrogênio como gás de arraste com fluxo de 3,6 m L/min, fluxo do gás de nitrogênio 30 m L/min, volume de injeção de 1 µL, para a programação do forno tem 120 °C com uma rampa de 3 °C/min até 220 °C, isoterma de 6,67 min, tempo de análise de 50 min.

Os ésteres metílicos das amostras foram identificados com auxílio de padrões comerciais de ésteres (Sigma-Aldrich e Carlo Erba), que foram injetados nas mesmas condições. A quantificação foi realizada pelo método de normalização de área.

4.4. Tratamento do óleo para remover constituintes insaponificáveis

Considerando a necessidade de se desenvolver um processo que permitisse o aproveitamento integral das matérias-primas e seus resíduos (conceito de biorrefinaria) decidiu-se por desenvolver um método que permitisse separar a fração lipídica da fração não lipídica (insaponificável). O óleo de andiroba tem um elevado teor de limonóides (derivados de triterpenos altamente oxigenados) que possuem um valor agregado devido as suas propriedades biológicas (anti-inflamatória e repelente).

Os óleos obtidos a partir de extração por maceração a frio com hexano, de cada uma das amostras (óleo não filtrado e torta residual) foram submetidos a um processo de separação cromatográfica para remoção de constituintes insaponificáveis. Para realizar essa separação utilizou-se uma coluna cromatográfica com fase estacionária de sílica gel com tamanho de partícula de (0,063 – 0,200 mm) e como fase móvel as seguintes misturas de solventes: hexano, seguido de hexano:acetona (8:2) e posteriormente etanol (purga), sendo coletadas apenas três frações, referentes a cada uma das fases móveis. Após análise da separação por cromatografia em camada delgada (CCD) em fase reversa, eluidas com acetonitrila 100%, utilizando padrões, verificou-se que ainda existia a presença de constituintes polares, como limonoides na fração hexânica.

Assim, outro processo de separação cromatográfica foi realizado com a fração hexânica com o objetivo de separar esses constituintes. Colunas cromatográficas com fase estacionária de resina Diaion-HP20 e fase móvel etanol 100% seguido de hexano 100% foram realizadas. A fração hexânica (fração lipídica) obtida a partir desta coluna cromatográfica foi utilizada nos procedimentos posteriores. O fluxograma a seguir, figura 10, mostra o processo de separação cromatográfica para tratamento do óleo.

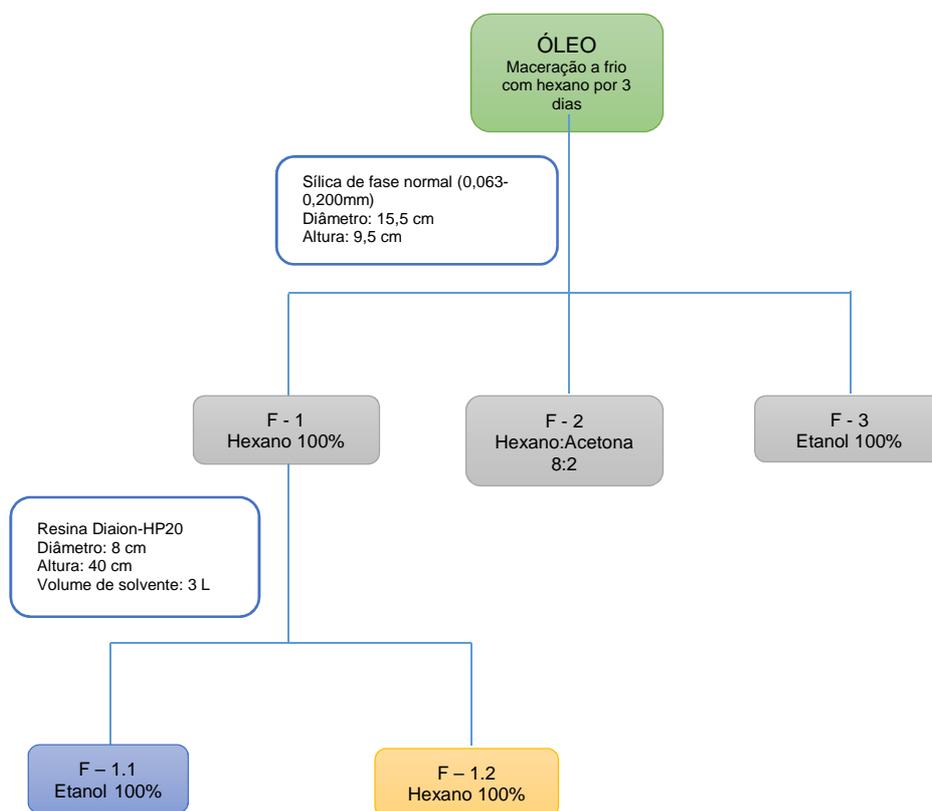


Figura 10: Fluxograma do tratamento das amostras com realização de duas colunas cromatográficas sequências

4.5. Determinação da atividade hidrolítica das enzimas

A dosagem de atividade hidrolítica foi baseada na reação de hidrólise de um substrato padrão catalisada pela lipase a ser analisada. Uma unidade de atividade de hidrólise (UH) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácidos graxos livres por minuto nas condições de ensaio (SOUSA *et al.*, 2010; RIGO *et al.*, 2008). O substrato utilizado foi o óleo de andiroba livre de limonóides (amostra F-1.2, fluxograma 10) a 5% p/v, emulsionada com uma solução de goma arábica 5% (p/v), em tampão fosfato de sódio 0,10 M e pH 7,0. Para preparar a emulsão, adiciona-se a goma arábica ao tampão e realiza-se a homogeneização com mixer Black and Decker. Posteriormente adicionou-se o óleo previamente pesado à mistura e a emulsão foi formada pela agitação vigorosa com o mixer por 3 min.

Os ensaios foram realizados utilizando 19,0 mL da emulsão e 1,0 mL de solução enzimática. Utilizou-se balões de fundo redondo de três bocas de 100,0 mL em banho termostizado à temperatura constante de 37 °C; e agitação a 700 rpm em um agitador mecânico Fisatom, modelo 713D com haste hélice

basculante (Figura 8). Realizou-se a reação por 30 min, posteriormente interrompeu-se a reação através da adição de uma solução de acetona:etanol (1:1 v/v) e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,05 N previamente padronizada com um titulador automático Eppendorf, modelo Top Buret M, até alcançar o pH 11,0, monitorado num aparelho de pHmetro, da marca Digmed, modelo DM-20. O cálculo para determinar a atividade hidrolítica é mostrado na equação 16. Onde, AH é a atividade hidrolítica em $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$, B é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra (mL), A é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação do branco (mL), N é a normalidade da solução titulante padronizada, m é a massa da enzima (mg) e t é o tempo da reação (min).

$$AH = \left(\frac{(B - A) \cdot N \cdot 10}{m \cdot t} \right)$$

Equação 16: Atividade Hidrolítica



Figura 11: Sistema reacional adaptado para realizar as reações de avaliação da atividade hidrolítica

4.5.1 Determinação da concentração de proteína

Para determinar a atividade hidrolítica específica das enzimas, foi necessário calcular a concentração de proteína total presente em cada amostra de enzima. A quantificação de proteína foi realizada utilizando o método de Bradford com reagente de Comassie Blue (BRADFORD, 1976). Para o preparo do reagente de Bradford dissolveram-se 25,0 mg de Comassie Brilliant Blue (BG-250) em 12,5 mL de etanol a 95%, e em seguida adicionaram-se 25,0 mL de ácido fosfórico 85%. A solução obtida foi avolumada para 250,0 mL com água deionizada e em seguida filtrada.

Uma curva de calibração para quantificação de proteína foi gerada utilizando como solução-padrão a albumina de soro bovino (BSA) preparada em tampão fosfato de sódio salino a 0,1 M e pH 7,0. A partir dessa solução-padrão prepararam-se cinco diluições de concentrações conhecidas, na faixa de 0,0313-0,5000 mg/mL (n=5). A proporção entre a solução com proteínas e o reagente de Bradford foi de 1:10, respectivamente. O tempo de reação para cada concentração a ser analisada foi de 5 min, uma alíquota de 100 μ L foi retirada e adicionada na microplaca para análise em leitor de multiplacas UV-Vis a leitura em absorbância foi feita a 630 nm. A análise foi realizada em triplicata e o ensaio em branco foi realizado utilizando somente tampão e reagente de Bradford.

O método de Bradford é baseado na interação entre o corante “Comassie Brilliant Blue” e macromoléculas de proteínas que contém resíduos de aminoácidos de cadeias laterais, principalmente arginina, lisina e histidina (BRADFORD, 1976). A curva analítica, gráfico 1, apresentou coeficiente de regressão linear R^2 de 0,9978 o que indica boa linearidade nas faixas de concentrações analisadas, sendo possível então determinar a quantidade de proteínas em cada mg de enzima analisada.

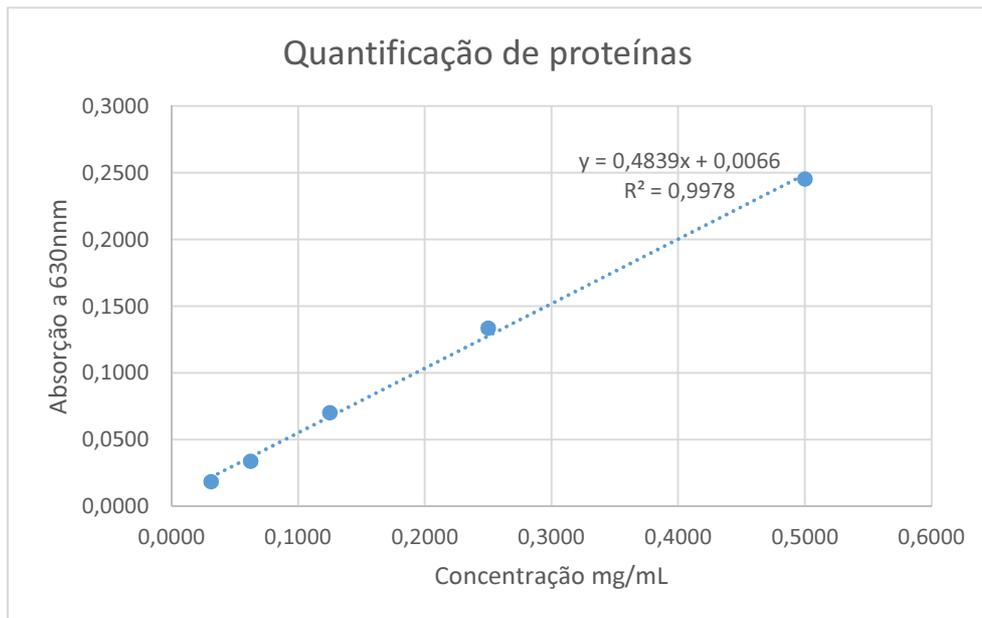


Gráfico 1: Curva de calibração para quantificação da quantidade de proteínas em lipases comerciais

4.5.2. Dosagem de proteínas em lipases

Através da curva de calibração (gráfico 1) foi possível determinar a concentração de proteína presente em cada amostra de lipase. Nessa determinação foi necessário preparar as lipases na concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio salino pH 7,0 0,1 M. Em seguida foram retirados 100 μ L dessa solução que reagiu por 5 min com 1.000 uL de reagente de Bradford. Uma alíquota de 100 uL foi retirada após o fim da reação para que a leitura da absorbância fosse analisada a 630 nm em UV-Vis microplaca, assim como descrito na seção anterior. A determinação da quantidade de proteínas foi realizada para 8 lipases comerciais livres em triplicata.

4.6. Quantificação por CCD-VideoScan de ácidos graxos livres (AGL) e triacilglicerídeos (TG)

A quantificação de ácidos graxos e triglicerídeos para avaliar o curso das reações de hidrólise enzimática foi realizada também pelo método de quantificação por CCD-VideoScan. Diferente do método de titulação, pelo CCD-VideoScan é possível monitorar tanto a formação de ácidos graxos como o decaimento da concentração de triacilglicerídeos pela hidrólise enzimática.

Na análise por CCD, as amostras foram aplicadas sobre uma placa de CCD de gel de sílica 60 F₂₅₄ da marca Merck com 10 cm de comprimento. O volume de aplicação foi de 5 µL para todas as amostras utilizando um capilar com volume calibrado. As placas foram eluídas em hexano:éter etílico:ácido acético (80:16:4). É importante observar que a CCD consegue separar os lipídeos em sub-classes (TG, DG, MG e AGL) todos em spots bem resolvidos entre si.

Após a eluição, revelou-se com solução de ácido fosfomolibdico a 20% em etanol, com aquecimento a 50 °C em chapa elétrica. A documentação foi feita no sistema ChromaDoc-It, da marca UVP Ltd, que é um sistema de digitalização de imagens contendo uma câmara de iluminação modelo C-75, equipado com lâmpadas de UV 254 e 366 nm, além de luz branca todas de 8W. A fotodocumentação foi obtida com a câmera digital do equipamento, da marca Canon, modelo DigiCa 125, com resolução de 12,1 megapixels, filtro EtBr (brometo de etídio). Os resultados foram editados no software de aquisição e quantificação Doc-It LS.

Foi empregado o método de quantificação por padrão externo. Duas curvas analíticas foram construídas, a fim de observar o curso das reações, tanto a formação de AGL como o decaimento de TG nas amostras analisadas. Os padrões foram escolhidos com base nas características das amostras a serem quantificadas e na disponibilidade dos mesmos. Foram utilizados padrões do ácido oleico e da trioleína (Sigma). A partir de uma solução-mãe de 10,0 mg/mL, foram preparados outras 6, por diluições sucessivas na faixa de 10,0 a 0,156 mg/mL (n=7).

As curvas de calibração foram construídas a partir das medidas das intensidades de emissão de luz de cada spot *versus* a concentração do padrão analisado, conforme esquema mostrado a seguir.

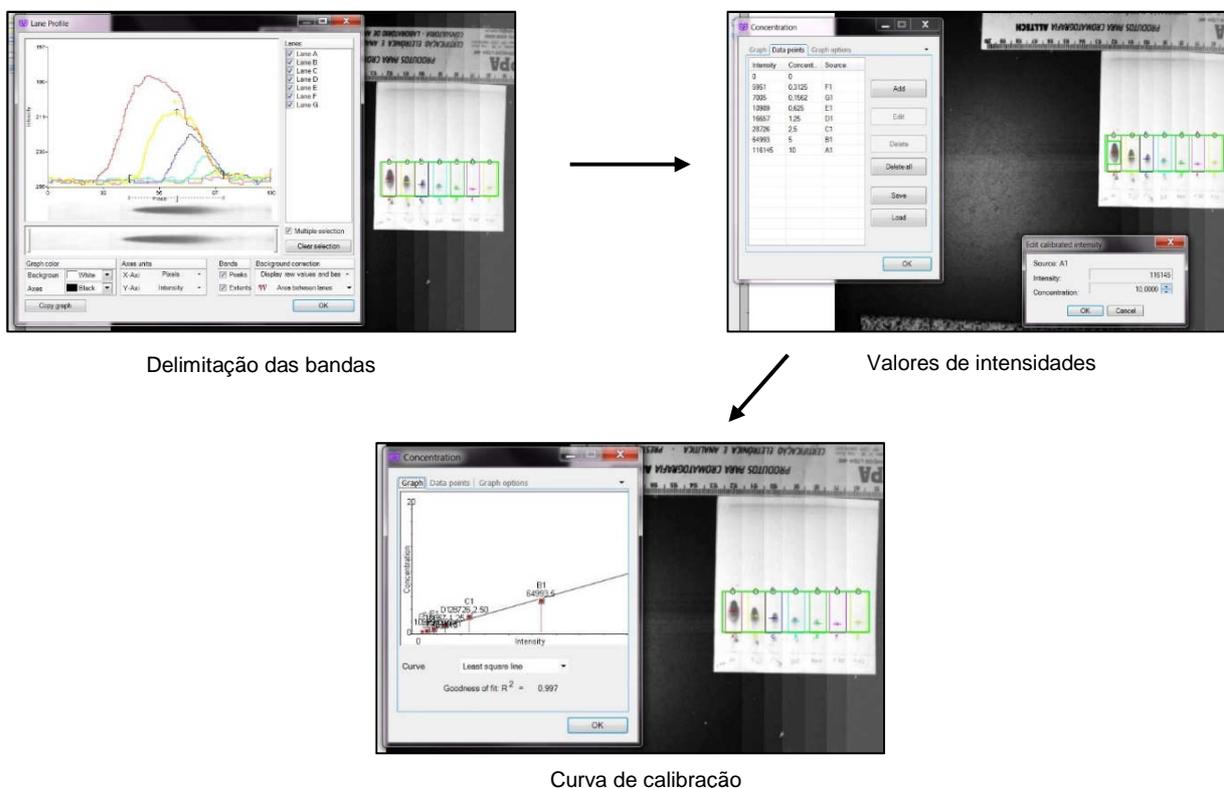


Figura 12: Processo de quantificação de ácidos graxos por Doc-It - LS

O coeficiente de regressão linear de 0,9967 foi satisfatório e pode ser observado no gráfico 2. Sendo possível então calcular a concentração de ácidos graxos livres em cada reação.

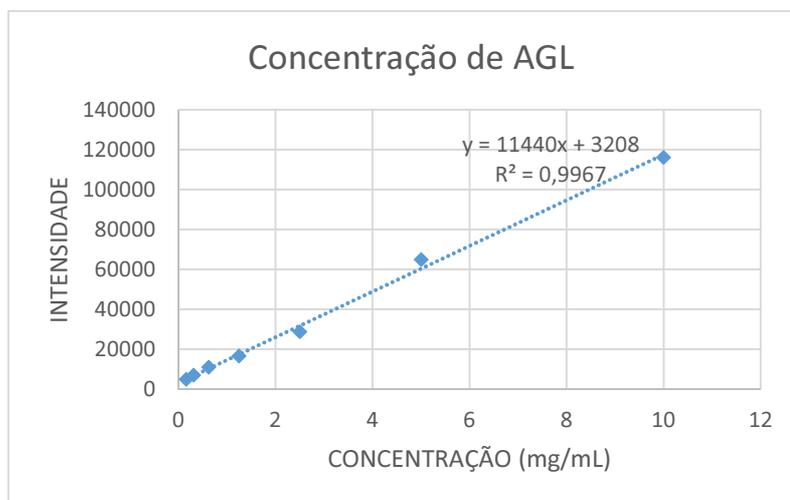


Gráfico 2: Curva de calibração para quantificação de

O esquema a seguir, mostra o processo de construção da curva analítica que relaciona as intensidades de emissão de luz para diferentes concentrações do padrão de TG, a trioleína pelo software Doc-It LS.

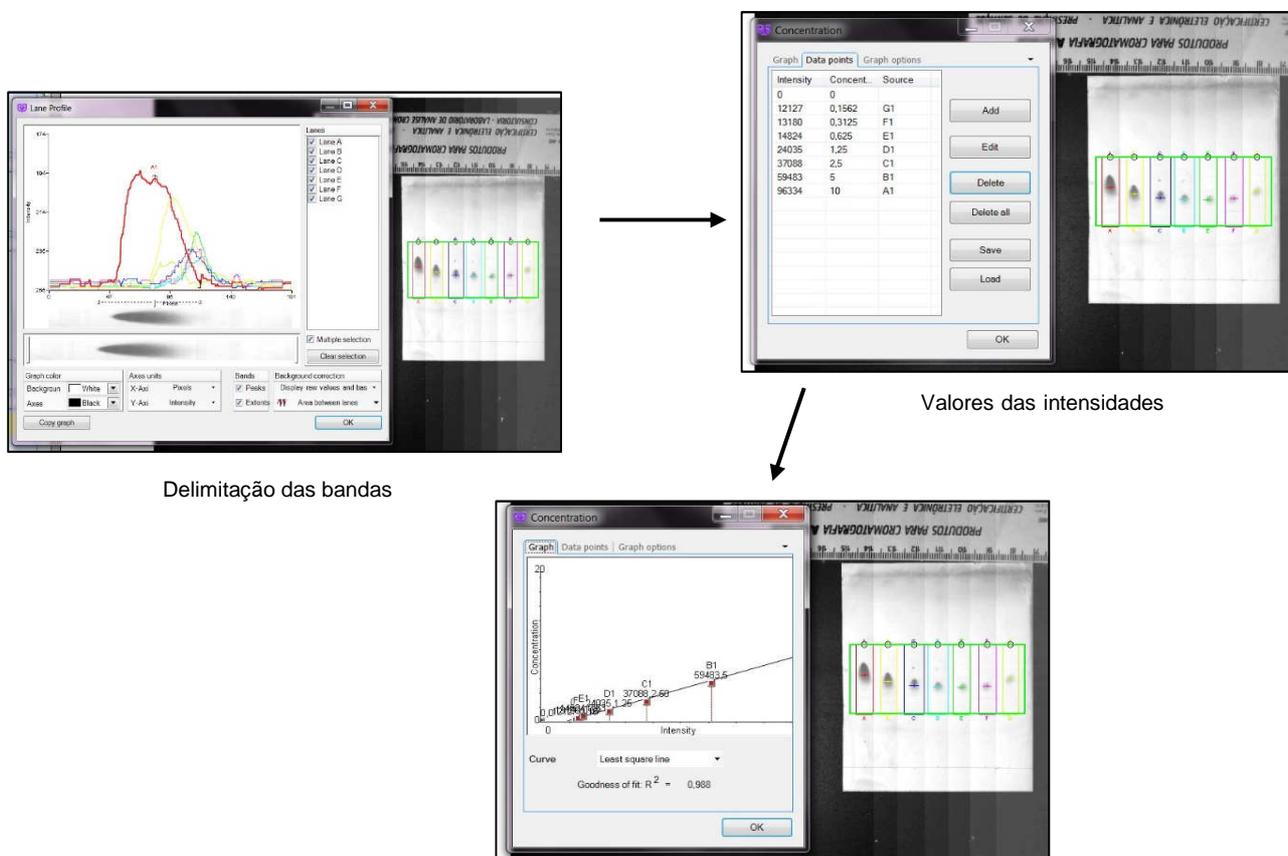


Figura 13: Processo de quantificação de triglicerídeos por Doc-It - LS

O coeficiente de regressão linear de 0,9922 foi satisfatório (Gráfico 3). Sendo possível então calcular a concentração de triglicerídeos.

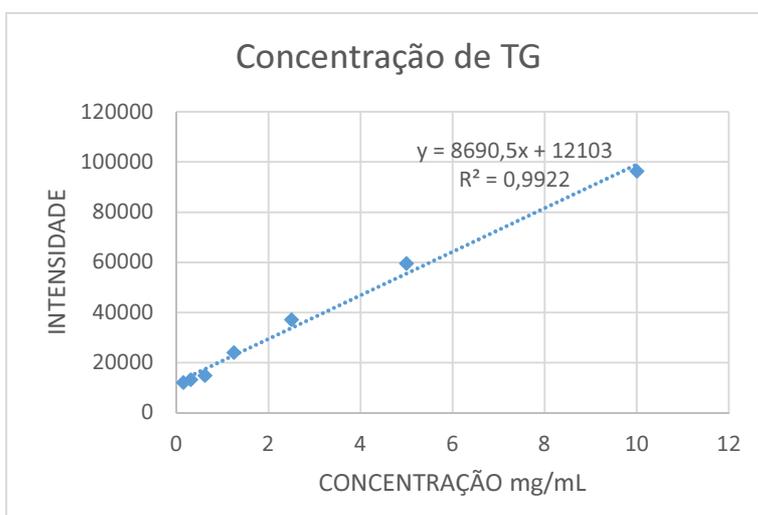


Gráfico 3: Curva de calibração para quantificação de triglicerídeos

4.6.1. Quantificação por CCD-VideoScan de ácidos graxos livres (AGL) e triacilglicerídeos (TG) das reações de hidrólise

Para realizar a quantificação nas diferentes reações de hidrólise e analisar a conversão realizada pelas lipases, retirou-se uma alíquota de 1,00 mL, durante e/ou no término de cada reação, e transferiu-se a um frasco tipo Eppendorf de 2 mL, ao qual adicionou-se o mesmo volume de hexano. O frasco foi agitado num aparelho de Vortex da marca Phoenix e em seguida a amostra foi centrifugada por 3 min para a separação das fases. Retirou-se a fase superior e após seco, preparou-se uma solução na concentração de 5 mg/mL. Essas amostras foram analisadas pelo método de CCD-VideoScan.

4.7. Reações de hidrólise enzimática

As reações de hidrólise foram realizadas utilizando balões de fundo redondo de três bocas de 100,0 mL em banho termostaticado, com regulador de temperatura, agitador mecânico modelo 713D Fisatom e haste que possui hélice basculante adaptada. Após definir as melhores condições reacionais, as reações de hidrólise foram realizadas em escala maior, em um reator encamisado de vidro com capacidade de 1 L da Aceglass, com circulação de água, agitação mecânica e regulador de temperatura (Figura 14)

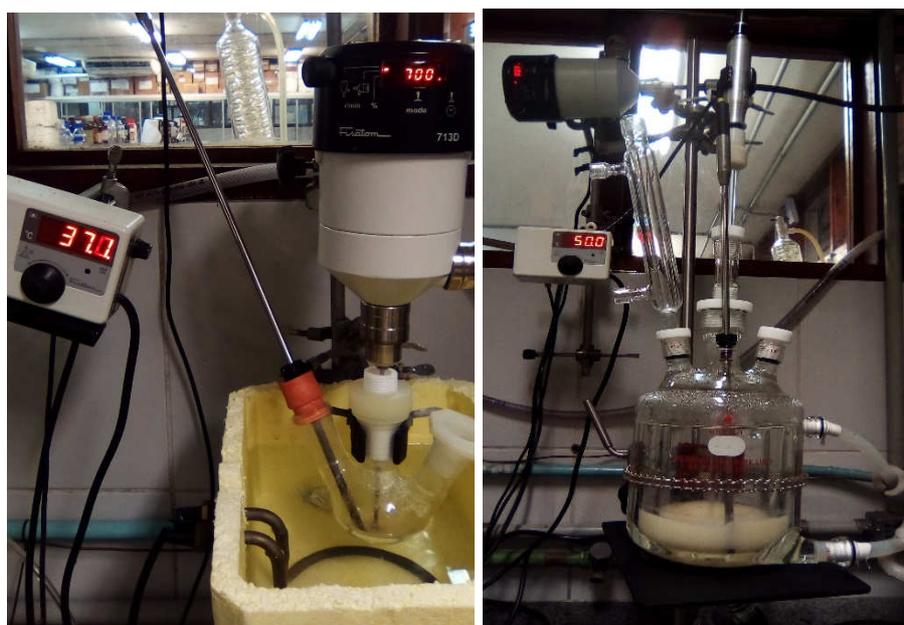


Figura 14: A esquerda: sistema reacional adaptado para realização das reações de hidrólise; a direita: sistema reacional para reações em escala maior.

4.7.1. Determinação do grau de hidrólise

A conversão realizada pelas lipases foi avaliada pela determinação da quantidade de ácidos graxos formados durante as reações de hidrólise dos triacilglicerídeos. O grau de hidrólise foi calculado utilizando a metodologia modificada de SOUSA *et al.*, 2010, onde o grau de hidrólise é expresso como o percentual de ácido graxos obtidos em cada reação enzimática, conforme é mostrado na equação 17. Onde, N é a molaridade da solução de hidróxido de sódio padronizada, A é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra (mL), B é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação do branco (mL), PM é a média do peso molecular dos ácidos graxos que constituem o substrato e m é massa da amostra (g).

$$\% \text{ Hidrólise} = \frac{N \cdot (A - B) \cdot PM}{10 \cdot m}$$

Equação 17: Grau de hidrólise

4.8. Planejamento Experimental Composto Central

O Planejamento experimental foi realizado com base em FERREIRA e TEOFILLO 2006 e NETO *et al.*, 2007. Um planejamento experimental estatístico composto central foi realizado. Através de um levantamento bibliográfico, foram selecionadas as variáveis que mais influenciam no processo de hidrólise, assim como os valores específicos dos níveis utilizados no planejamento. Foram escolhidos como parâmetros para otimização o pH, a temperatura e a porcentagem de substrato.

Assim, um planejamento 2^3 com um total de 17 ensaios foi realizado, sendo eles oito fatoriais, seis pontos axiais e três pontos centrais. Utilizou-se o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., EUA) para planejar o experimento e realizar a análise dos dados. Para cada experimento do item 4.7 foram adquiridas duas respostas: o grau de hidrólise (item 4.7.1) e a porcentagem dos constituintes em cada reação pela quantificação por CCD VideoScan (item 4.6), a nível de comparação. O grau de hidrólise foi definido com a variável resposta do planejamento composto central.

Foram calculados os efeitos das variáveis com os respectivos erros, analisando estatisticamente a 95% de limite de confiança ($p < 0,05$). A análise de resíduos, que consiste no teste de significância do ajuste do modelo, foi baseado na análise de variância com objetivo de verificar a qualidade do ajuste, além da análise do valor do coeficiente de determinação (R^2), que fornece a medida da proporção de variação e no teste F, que avalia se a análise de regressão foi significativa, assim como a falta de ajuste do modelo. Por fim, curvas de contorno e superfície de respostas foram geradas através de metodologia de superfície de resposta e analisadas para definir as faixas ótimas de cada variável para o processo de hidrólise.

Outros parâmetros reacionais que não entraram no planejamento permaneceram os mesmos em todos os ensaios, devido à experiência do grupo de pesquisa tem estudo realizados anteriormente com uso de hidrólise enzimática de gordura de tucumã mediada por lipase de *Candida rugosa* (CARVALHO, 2014). A agitação, o tempo de reação, a quantidade de enzima e de emulsificante foram mantidas constantes em 800 rpm, 2 h, 25 mg e 1%, respectivamente.

4.9. Esterificação dos produtos de hidrólise

As reações de esterificação foram realizadas utilizando balões de fundo redondo de três bocas de 100,0 mL em banho termostatizado, com regulador de temperatura, agitador mecânico modelo 713D Fisatom e haste do tipo hélice basculante adaptada. Partindo de 10 g de ácidos graxos, utiliza-se álcool etílico na razão molar óleo: álcool 1:6. O catalisador heterogêneo utilizado nas reações de esterificação foi o sulfato férrico, na concentração 1,5 % em relação à massa de óleo. A temperatura reacional foi de 70 °C em sistema de refluxo e agitação constante por 3 h. Ao final da reação, filtrou-se a mistura reacional, a fim de separar o catalisador. Posteriormente, concentrou-se os ésteres alquílicos (biodiesel), sob vácuo, a 80 °C, para eliminar o excesso de álcool contido. Em seguida, lavou-se a amostra três vezes com água destilada a ± 70 °C para retirar resíduo de catalisador; centrifugou-se por 25 min. a 20 °C para remover o volume de água residual. O rendimento do biodiesel obtido foi

determinado pela fórmula descrita na equação 9. Onde, m_f corresponde a massa final de biodiesel e m_0 é a massa de óleo utilizada no início da reação.

$$R = \left(\frac{m_f}{m_0} \right) \cdot 100$$

Equação 18: Rendimento

4.10. Identificação do produto das reações de esterificação por Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

Analizou-se o produto final (biodiesel) de cada reação de esterificação por CG-EM, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, marca Thermo Scientific, modelo TRACE-DSQ II. A separação cromatográfica ocorreu numa coluna polar da Phenomenex (Zebron, ZB-FFAP, com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 μm). As condições de análise foram as seguintes: volume de injeção de 1 μL ; modo split 10:1; temperatura do gás do injetor: 250 $^{\circ}\text{C}$; gás de arraste: hélio (fluxo de 2,0 mL/min); programação: 70 $^{\circ}\text{C}$, subindo 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 220 $^{\circ}\text{C}$, isoterma de 10 min e tempo de análise de 50 min.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons (IE) a 70 eV, a temperatura da fonte de íons foi de 200 $^{\circ}\text{C}$, no modo de varredura de íons com faixa entre 40-650 (m/z). As análises dos espectros de massas obtidos foram comparados também com os disponíveis nas bibliotecas Adams e NIST 2.0, disponíveis no equipamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Obtenção do material e extração dos óleos

Para o resíduo do processo de filtragem (Figura 3) foram realizadas três extrações sequenciais com hexano, cada uma durante 3 dias. Um total de 4.370 g de material foi purificado. A primeira extração apresentou rendimento de 31%, a segunda de 12% e a terceira de 9%. Um total de aproximadamente 50% de rendimento desse material pode ser obtido a partir da extração com solvente. Obtendo assim um total de 2.260 g de óleo. Apesar do baixo rendimento, as extrações não foram seguidas devido ao tempo e quantidade de solvente que seria necessário.

Para a torta residual obtida da prensagem mecânica (Figura 3) foram realizadas apenas duas extrações sequenciais com hexano, cada uma por 3 dias. Um total de 4.074 g de material foi utilizado. A primeira extração apresentou rendimento de 9%, a segunda de 3%. Um total de aproximadamente 11% de rendimento desse material pode ser obtido a partir da extração com solvente. Obtendo assim um total de 448 g de óleo. Esperava-se um rendimento bem inferior neste caso, por se tratar de uma torta residual. Contudo verifica-se o grande potencial de extração de óleo residual das tortas obtidas por prensagem mecânica.

Cada amostra de óleo foi caracterizada separadamente para se avaliar diferenças em sua composição.

5.2. Caracterização físico-química

A tabela 5 mostra os valores obtidos para cada análise físico-química realizada as duas amostras residuais Para fins de comparação, uma amostra de óleo de andiroba filtrado e comercializado pela mesma cooperativa (obtido por prensagem mecânica) também foi submetido às mesmas análises. Também para fins de comparação, foram inseridos na tabela os dados limítrofes adotados pela ANVISA para óleo comestível de soja refinado.

Tabela 5: Caracterização físico-química

Caracterização físico-química	Óleo de Andiroba			Óleo de soja refinado (ANVISA)
	Filtrado	Prensagem	Comercial	
Índice de acidez (mg NaOH/g óleo)	36,7 ± 0,04	39,6 ± 0,03	2,40 ± 0,13	máximo 0,3
Índice de peróxido (meq / Kg de óleo)	2,89 ± 0,04	19,46 ± 0,14	0,31 ± 0,04	máximo 10
Índice de iodo (g I ₂ /100g de óleo)	103,50 ± 0,02	100,30 ± 0,06	99,81 ± 0,04	120 – 143
Material insaponificável (%)	1,15 ± 0,11	2,06 ± 0,10	0,86 ± 0,22	máximo 1,5%
Ácidos graxos livres (%)	17,63 ± 0,02	19,11 ± 0,09	1,34 ± 0,04	*
Densidade (g/mL)	0,880 ± 0,001	0,900 ± 0,002	0,900 ± 0,007	0,91 - 0,92

O índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres estão relacionados com a qualidade da matéria-prima, uma vez que refletem o grau de degradação de óleos e gorduras. A qualidade da matéria-prima depende da natureza, o grau de pureza do óleo, o processamento e as condições de conservação (BARRETO e GONZALES, 2008). Dessa forma, tratando-se de óleos residuais resultantes de um processo de prensagem mecânica, temos uma elevada porcentagem de ácidos graxos livres nas amostras e conseqüentemente um alto índice de acidez, com valores de 17,63 % de ácidos graxos livres e 36,27 mg NaOH/g de óleo para o resíduo da filtragem do óleo, e 19,63 % de ácidos graxos livres e 39,27 mg NaOH/g de óleo para o óleo obtido da torta residual. Os óleos que possuem acidez elevada possuem menor valor agregado, já que não são interessantes para indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica, pois demandariam ser submetidas a um processo de refino. Por outro lado, óleos que não tem demanda são uma alternativa interessante para produção de biocombustíveis.

O óleo de andiroba é constituído também por outros constituintes químicos como limonoides, esteroides, triterpenos e cumarinas (PESCE, 2006) dessa forma a porcentagem de material insaponificável observada foi de cerca de 2%, entre os dois resíduos. Como descrito no item 4.4, as amostras de óleo passaram por um tratamento cromatográfico. Assim, após o tratamento, foram feitas novas determinações de índices de acidez, porcentagem de ácidos graxos livres e de material insaponificável. Observou-se, conseqüentemente, uma redução da porcentagem de material insaponificável para quase 0% nas amostras de óleo dos dois resíduos. Assim como valores menores de porcentagem de ácidos graxos livres, de 1,74% e 3,04 NaOH/g de óleo de acidez para o resíduo de filtragem e 1,71% e 3,27 mg NaOH/g de óleo de acidez para o resíduo de prensagem.

O índice de iodo indica o grau de insaturação do óleo, onde cada ligação dupla contida na cadeia de ácido graxo irá reagir com o iodo molecular. Assim, quanto maior o índice de iodo, maior será o grau de insaturação da cadeia carbônica da amostra (NEDER e LEAL, 2006). O resultado do índice de iodo 103,5 e 100,3 g I₂/100g de óleo para o resíduo de filtragem e da torta residual, respectivamente indica a presença, em sua maioria, de ácidos graxos de cadeias insaturadas e assim exhibe um valor aproximado de resistência à

oxidação quando comparado ao óleo de soja (120 a 143 g I₂/100 g) que apresenta em sua composição mais que 80% de cadeias de ácidos graxos insaturados (GUSTONE, 2008).

O índice de peróxido indica o grau de oxidação apresentado por óleos e gorduras e reflete o grau de degradação oxidativa do óleo (MORETTO e FETT, 1989) para a amostra obtida do resíduo de filtragem o valor foi de 2,89 meq/kg e para a torta residual de 19,46 meq/kg. O óleo da torta residual era mais degradado e oxidado, que era esperado pelo processo de extração adotado que aquece a matéria-prima a altas temperaturas.

A determinação da massa específica da matéria-prima é realizada previamente, visto que é tido como parâmetro comparativo entre o óleo de origem e o produto final, no caso o biodiesel. Segundo Resolução 14 da Agência Nacional de Petróleo (ANP) de 25/08/2014, a massa específica do biodiesel necessariamente deve ser menor que a densidade da matéria-prima de origem e entre 0,850 e 0,900 g/mL. A massa específica do óleo residual de andiroba, em ambos os casos foi de aproximadamente 0,900 g / mL.

5.3. Caracterização da cadeia graxa por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC)

A determinação da cadeia graxa do óleo residual de andiroba foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (CG-DIC). Os padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos, foram injetados nas mesmas condições das amostras e os cromatogramas foram comparados para avaliar o tempo de retenção de cada um dos constituintes.

Os perfis cromatográficos das amostras podem ser observados nas figuras 15 e 16, onde os cromatogramas provenientes das colunas polar e apolar são apresentados para o resíduo de filtragem e para a torta residual.

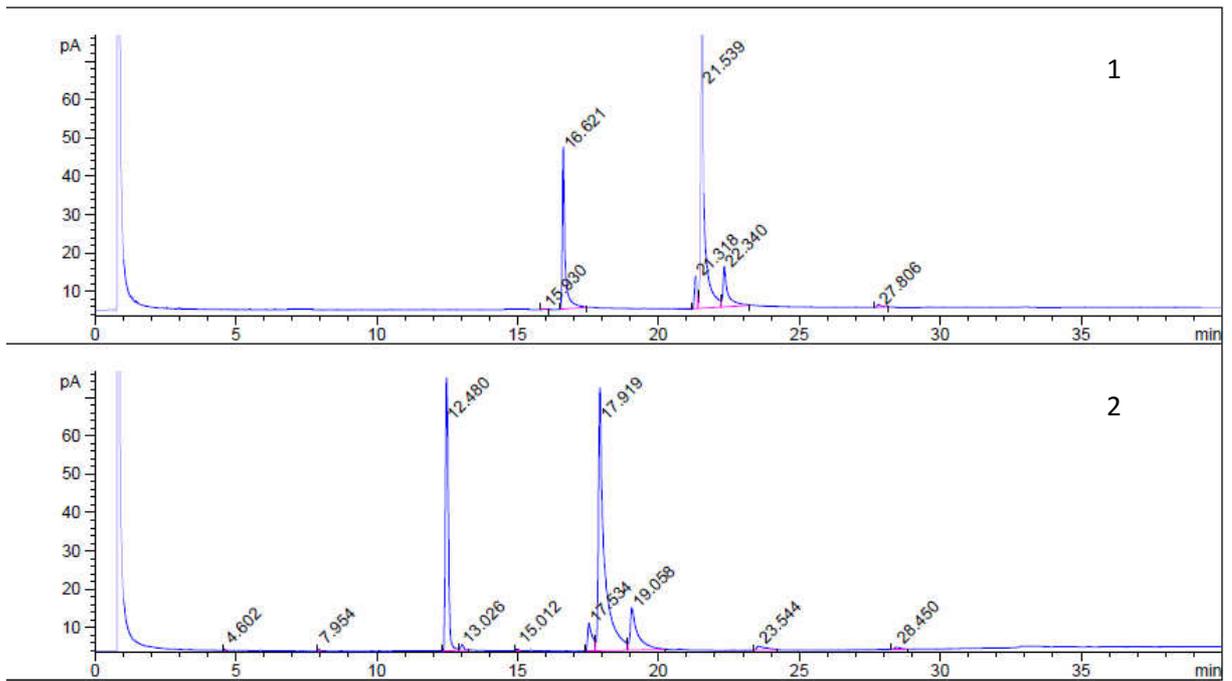


Figura 15: Cromatograma análise por CG-DIC para a amostra do resíduo do processo de filtragem: 1 - Coluna apolar e 2 - Coluna polar.

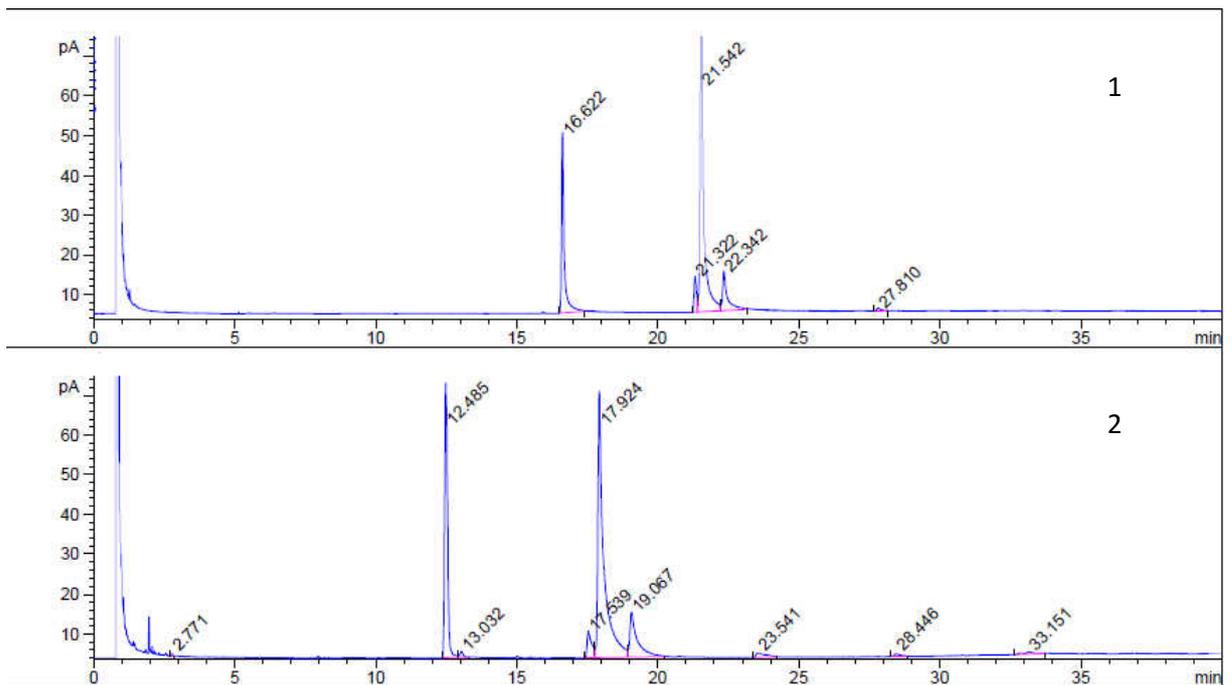


Figura 16: Cromatograma análise por CG-DIC para a amostra da torta residual: 1 - Coluna apolar e 2 - Coluna polar.

As porcentagens médias de área obtida nas duas colunas, apolar e polar, estão na tabela 6. Observa-se que as informações obtidas através da caracterização físico-química foram confirmadas, as amostras de óleo são majoritariamente constituídas por ácidos graxos insaturados e de cadeia longa (PESCE, 2006).

Tabela 6: Composição da cadeia graxa por CG-DIC

Ácido graxo	Cadeia	Residuo de filtragem (%)	Torta residual (%)
Palmitico	C16:0	25,75	25,99
Palmitoleico	C16:1	0,36	0,36
Estearico	C18:0	7,20	6,88
Oleico	C18:1	56,88	58,80
Linoleico	C18:2	7,81	7,92
Eicosanóico	C20:0	0,94	0,96
Σ		98,97	99,02

5.4. Tratamento do óleo

As amostras de óleo de andiroba apresentaram cerca de 2% de material insaponificável, havendo a necessidade de realizar um tratamento prévio para retirar tais constituintes, que são os limonoides, esteroides dentre outros. Esses constituintes que não formam a composição graxa dos óleos podem interferir diretamente na eficiência das reações enzimáticas de hidrólise, alterando o sitio ativo da enzima (PETERSEN e WOOLLEY, 1994). Além disso, conforme mencionado anteriormente, os limonoides são constituintes químicos de alto valor agregado de interesse medicinal e biológico. Baseado no conceito de biorrefinaria, a separação desses constituintes da fração lipídica é altamente desejável.

A fim de que esses constituintes fossem então separados, as amostras de óleo, obtida pela filtração de resíduos e da extração da torta residual, foram purificadas por coluna cromatográfica, conforme condições descritas no item 4.4. e apresentadas na figura 17.



Coluna cromatográfica



Frações obtidas (1, 2 e 3)
(Resíduo de filtragem)

Figura 17: As três frações foram eluídas com: Fração 1 – Hexano 100%; Fração 2 – Hexano:Acetona (8:2); Fração 3 - Etanol

Para cada amostra de óleo residual, foram obtidas três frações, onde a fração hexânica de cada uma delas foi utilizada para empregada nos estudos de hidrólise enzimática. Os rendimentos obtidos para cada fração podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7: Massa obtida em cada fração da separação cromatográfica

	Resíduo de filtragem	Torta residual
Material inicial	2.202 g	426 g
Fração 1 (Hexano)	1.983 g	361 g
Fração 2 (Hex/Acetona 8:2)	149 g	54 g
Fração 3 (Etanol)	54 g	7 g

Ao iniciar o procedimento para determinar a atividade hidrolítica de cada enzima frente ao substrato específico, como descrito no item 4.5, verificou-se que não era possível emulsificar o óleo residual de andiroba. Como esse processo necessita de uma interface lipídeo/água para que ocorra a interação com a enzima e, conseqüentemente, uma maior taxa de hidrólise, foi necessário investigar o motivo.

Inicialmente, realizou-se tentativas de melhorias no processo de emulsão, como aumento da agitação, alteração de temperatura e ordem de mistura. Não foram obtidos resultados satisfatórios. Por outro lado, observou-se que a amostra do óleo de andiroba refinado, comercializado pela cooperativa, que passou por um processo de neutralização química, a fim de diminuir o índice de acidez e viabilizar seu uso na indústria de cosméticos; emulsionava com facilidade nas condições adotadas, diferente das duas amostras de óleo residual (resíduo de filtragem e torta residual).

Inicialmente foram feitas avaliações por CCD em fase normal e reversa, utilizando padrões de limonoides (principal constituinte polar do óleo de andiroba), triglicerídeos e ácidos graxos livres; a fim de verificar a possibilidade de remover os limonoides via cromatografia em coluna.

Após diversas tentativas usando diferentes sistemas de eluição, foi possível uma melhor visualização dos três constituintes acima citados, quando era usado o solvente acetonitrila (100%) como fase móvel em fase reversa (Figura 18). Observou-se que nas amostras de óleo residual, os limonoides estão presentes nos óleos, enquanto no óleo refinado não, explicando, o fato de não ser possível realizar um boa emulsão com as duas amostras residuais.

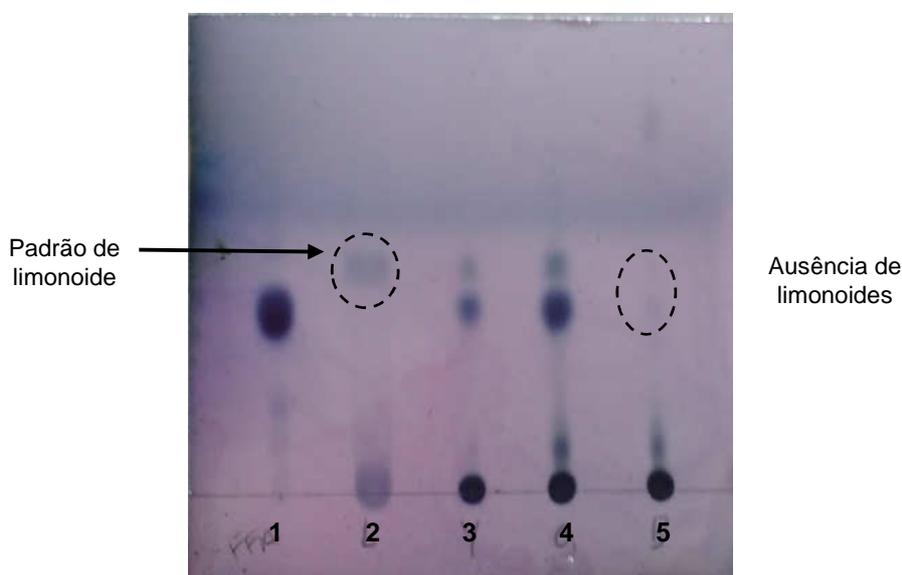


Figura 18: Placa de CCD de fase reversa, eluída com acetonitrila 100% e revelada com vanilina. 1 – Padrão de AGL, 2- Padrão de Limonoide, 3 – óleo de Andiroba (antes do processo cromatográfico), 4 – óleo de Andiroba (ápos processo cromatográfico), 5 – óleo de Andiroba refinado (processo de neutralização, baixa acidez).

A fim de encontrar uma forma eficiente de realizar a separação entre limonoides da fração lipídica saponificável, inúmeros testes cromatográficos foram realizados. A primeira tentativa consistiu no uso de colunas cromatográficas com sílica de fase normal, utilizando diferentes proporções entre hexano:acetona e hexano:acetato como fase móvel. Estas condições, entretanto, não forneceram a separação desejada entre os constituintes, uma vez que seria necessária a obtenção de uma quantidade significativa em massa de óleo para realizar os procedimentos posteriores. Assim, testes com outras fases estacionárias foram realizados. Utilizou-se alumina, celulose e Diaion-HP20, com diversas fases móveis. Apesar de todas essas condições testadas, não foi possível separar os limonoides dos ácidos graxos livres.

O resultado mais promissor foi obtido ao utilizar a resina Diaion-HP20, entre os materiais utilizados como fase estacionária esta resina é o mais economicamente viável e é reutilizável. Empregando essa fase foi possível separar na fração etanólica, ácidos graxos livres e limonoides; enquanto que na fração hexânica foram obtidos os triglicerídios (Figura 19). Dentre os outros processos de separação este foi o mais eficiente e prático para ser realizado com uma maior quantidade de óleo.

Entretanto, ainda na tentativa de obter um óleo com as características iniciais com alta porcentagem de ácidos graxos livres e conseqüentemente alto teor de acidez, sem limonoides testou-se a separação via partição líquido-líquido, e ainda reações de neutralização. Nenhum deles mostrou resultado satisfatório, pois ocorria pouca recuperação dos ácidos graxos livres.

Decidiu-se, então, realizar colunas cromatográficas com dimensões descritas no item 4.4, com a resina Diaion-HP20 como fase estacionária, eluídas com etanol 100% seguido de hexano 100%. O óleo obtido na fração hexânica formou boa emulsão, sendo utilizado nos estudos de catálise enzimática.

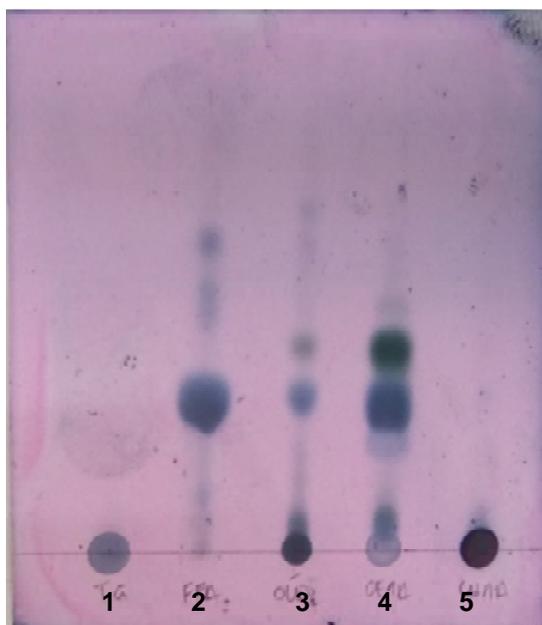


Figura 19: Placa de CCD de fase reversa, eluída com acetonitrila 100%. 1 – Padrão de TG, 2- Padrão de AGL, 3 – óleo de Andiroba (antes dos processos cromatográfico), 4 – Fração etanólica, 5 – Fração hexânica.

Foram realizadas ao todo, 8 colunas cromatográficas, a resina foi lavada com acetona em Soxhlet por 2 h, que foi reutilizada;. Para o resíduo de filtragem realizou-se 6 colunas (1,2,3,4,5 e 6) e para a amostra de torta residual, apenas 2 (7 e 8), devido a quantidade de material. Após reunião de todas as frações, do resíduo de filtragem obteve-se um total de 925,6 g de óleo e 400 g da fração etanólica, e do resíduo de prensagem 277 g de óleo e 109 g da fração etanólica. O esquema a seguir, figura 20, mostra a coluna cromatográfica e as placas de CCD de cada uma das frações.

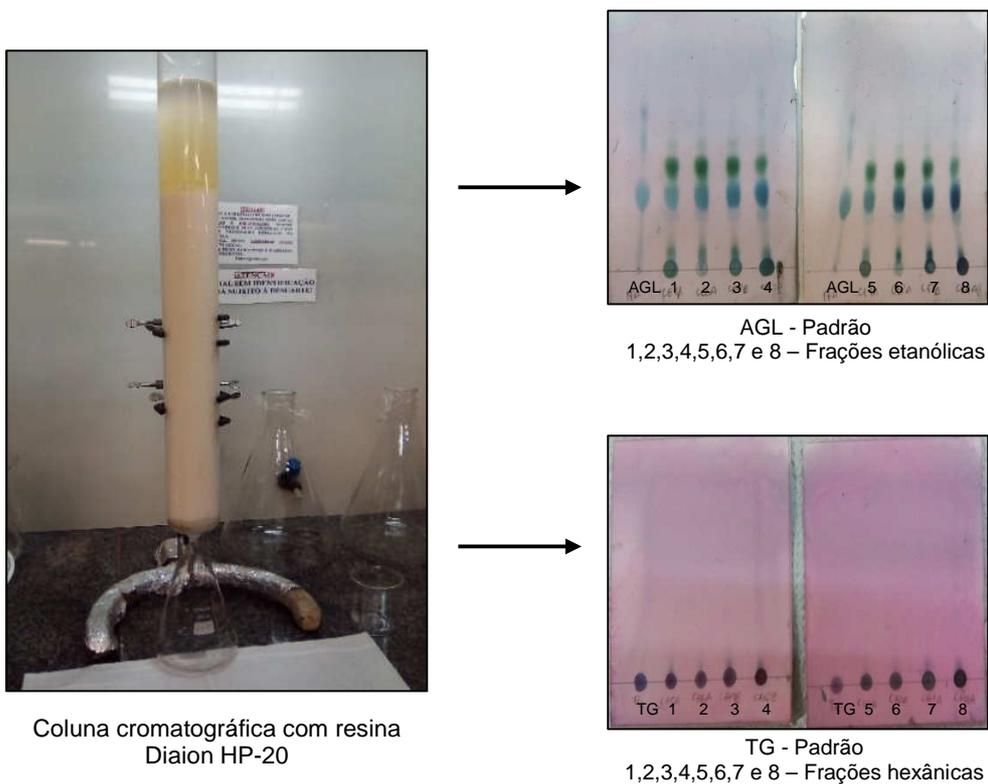


Figura 20: Coluna de Diaion HP-20 e placas de CCD fase reversa, eluídas com acetonitrila 100%. Frações etanólicas e hexânicas das 8 colunas cromatográficas realizadas com os óleos provenientes do resíduo do processo de filtragem e da torta residual.

As frações hexânicas de cada um dos resíduos foram reunidas e geraram apenas duas amostras, essas passaram por novas análises físico-químicas. Conforme o esperado, obteve-se um índice de acidez bem mais baixo e uma porcentagem de material insaponificável igual a zero, mostrando que todos os limonoides foram removidos do óleo (item 5.2). Outras análises cromatográficas em CG-DIC também foram realizadas para confirmar os resultados. Observou-se que as duas amostras possuíam, após tratamento, as mesmas características físico-químicas e a mesma constituição de cadeia graxa. Após essas análises, essas frações foram reunidas, gerando uma única amostra de óleo que foi utilizada para realizar os estudos das reações de hidrólise enzimática.

5.5. Atividade hidrolítica

A determinação da atividade hidrolítica foi realizada utilizando diferentes lipases, para selecionar aquela com maior atividade frente ao óleo de andiroba. Todas as lipases utilizadas foram adquiridas comercialmente. O grau de pureza dessas enzimas comerciais variou bastante. A maioria das preparações enzimáticas industriais contém além de enzima ativa, estabilizantes, sais diluentes e resíduos associados à etapa de purificação (MARÍA *et al.*, 2006) Para permitir a comparação entre esses resultados, determinou-se a quantidade de proteínas totais de cada lipase pelo método de Bradford.

A concentração total de proteínas em cada lipase comercial foi determinada, permitindo realizar o cálculo de atividade hidrolítica de cada uma delas. A tabela 8, mostra a quantidade em mg de proteínas presente em 1 mg de enzima.

Tabela 8: Quantidade de proteínas nas lipases comerciais

Fonte de lipase		mg de proteínas em 1 mg de amostra
Bactéria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,041 ± 0,002
	<i>Aspergillus sp.</i>	0,031 ± 0,007
Fungos	<i>Mucor miehel</i>	0,172 ± 0,018
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,212 ± 0,013
	<i>Rhizopus niveus</i>	0,104 ± 0,011
	<i>Candida antarctica</i>	0,102 ± 0,008
Leveduras	<i>Candida rugosa</i> type VII	0,040 ± 0,009
	<i>Candida rugosa</i>	0,032 ± 0,003
Animal	<i>Pâncreas suíno</i>	0,038 ± 0,008
	<i>Pâncreas suíno</i> type II	0,092 ± 0,006

Uma unidade de atividade hidrolítica (UH) é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de ácidos graxos por min. As condições de ensaios (item 4.5) foram determinadas após levantamento bibliográfico, além do conhecimento prévio do grupo de pesquisa (CARVALHO, 2014). A tabela 9 mostra os resultados dos cálculos de atividade específica de cada uma das enzimas analisadas.

Tabela 9: Atividade hidrolítica e específica de cada enzima

Fonte de Lipase	Atividade hidrolítica (mmol/mg.min)	Atividade específica (U _H /mg de proteínas)
<i>Candida rugosa</i>	85,05	2.656,25
<i>Candida rugosa VII</i>	1,50	37,5
<i>Candida Antarctica</i>	0,52	5,09
<i>Porcine pancreas</i>	40,83	1074,2
<i>Porcine pancreas II</i>	1,39	15,10
<i>Rhizopus niveus</i>	14,62	140,57
<i>Rhizopus arrhizus</i>	13,80	65,09
<i>Mucor mieher</i>	2,27	13,19

As lipases de *Candida rugosa* e pâncreas de porco apresentaram maior atividade em relação às demais lipases para o óleo de andiroba. Vários fatores podem explicar esse resultado, tais como a estabilidade térmica, especificidade ao substrato, integridade de todas as estruturas da enzima (primária, secundária, terciária ou quaternária) ou perda da atividade, resultante de processos de purificação total ou parcial de uma enzima (MARÍA *et al.*, 2006)

Foi selecionada a lipase comercial *Candida rugosa* para realizar as reações de hidrólise enzimática posteriores, com o objetivo estabelecer as condições ótimas de reação de hidrólise e os melhores rendimentos.

5.6. Planejamento Composto Central

Para otimizar um experimento tem se empregado uma abordagem envolvendo o planejamento fatorial pela análise de superfícies de respostas. Por essa abordagem é possível encontrar valores referentes a cada variável que irão produzir a melhor resposta desejada. Essa otimização foi baseada no planejamento composto central.

Dessa forma, um planejamento composto central 2^3 foi realizado, com 17 ensaios, 8 fatoriais, 6 axiais e 3 repetições no ponto central. As variáveis analisadas foram pH (X3), temperatura (X2) e porcentagem de substrato (X1). Os valores dos diferentes níveis foram escolhidos com base no levantamento bibliográfico realizado.

Outros parâmetros relacionados ao processo permaneceram constantes em todas as reações realizadas que foram o tempo de reação 2 h, 5% de tensoativo (em relação ao volume total) e 800 rpm. A quantidade de *Candida rugosa* disponível e empregada nos experimentos foi de 25 mg.

A tabela 10 mostra os valores codificados e não codificados de todos os níveis do planejamento, assim como os valores da variável resposta, o grau de hidrólise. O rendimento final de cada reação também foi analisado pela quantificação por CCD-VideoScan a nível de comparação.

Todas as interpretações de dados obtidos no Software Statistica 7.0 foram realizadas de acordo com NETO e colaboradores (2007). As avaliações de significância dos coeficientes para cada efeito foram realizadas empregando o teste t (distribuição de Student), através do valor "p". Para que os valores calculados sejam estatisticamente significativos, o valor de "p" correspondente deve ser menor que 0,05, ao nível de significância de 95 %. Assim, de acordo com a tabela 11 todos os fatores do modelo linear e quadrático, assim como as interações entre fatores são estatisticamente significativos no limite de confiança de 95%.

Tabela 10: Matriz de planejamento composto central 2³ (X1 - % substrato, X2 – temperatura, X3 – pH)

Ordem	Variáveis codificadas			Variáveis independentes			Variável Dependente	Rendimento de AGL
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	Grau de hidrólise (%)	CCD – VideoScan (%)
1	-1	-1	-1	20	35	7,0	41,65	42,10
2	1	-1	-1	60	35	7,0	35,06	36,60
3	-1	1	-1	20	45	7,0	66,80	66,60
4	1	1	-1	60	45	7,0	42,30	43,20
5	-1	-1	1	20	35	8,0	38,00	38,80
6	1	-1	1	60	35	8,0	30,17	32,50
7	-1	1	1	20	45	8,0	43,68	41,20
8	1	1	1	60	45	8,0	41,39	39,30
9	0	0	0	40	40	7,5	29,00	31,20
10	0	0	0	40	40	7,5	29,26	31,90
11	0	0	0	40	40	7,5	28,65	31,40
12	-1,682	0	0	15	40	7,5	62,21	62,10
13	+1,682	0	0	65	40	7,5	41,10	42,90
14	0	0	-1,682	40	40	6,5	22,35	22,00
15	0	0	+1,682	40	40	8,5	39,65	40,00
16	0	-1,682	0	40	30	7,5	18,34	21,80
17	0	+1,682	0	40	50	7,5	24,30	23,20

Tabela 11: Valores de significância dos efeitos e seus coeficientes

Fatores	Coeficientes	Erro Puro	t(2)	P	-95,% Lim. Conf.	+95,% Lim. Conf.
Média	28,91877	0,175276	164,9898	0,000037	28,16462	29,67292
Efeitos principais						
pH (L)	-1,27813	0,153052	-16,7018	0,003566	-1,60739	-0,94886
pH (Q)	-1,85288	0,133379	-27,7837	0,001293	-2,13983	-1,56594
% de substrato (L)	-6,07618	0,183548	-66,2081	0,000228	-6,47105	-5,68131
% de substrato (Q)	14,77602	0,276010	107,0687	0,000087	14,18224	15,36981
Temperatura (L)	5,39562	0,153052	70,5070	0,000201	5,06636	5,72489
Temperatura (Q)	0,40212	0,133379	6,0297	0,026420	0,11517	0,68906
Interações						
pH (L) % de substrato (L)	2,62125	0,216449	24,2205	0,001700	2,15560	3,08690
pH (L) por Temperatura (L)	-1,93625	0,216449	-17,8911	0,003110	-2,40190	-1,47060
% de substrato (L) por Temperatura (L)	-1,54625	0,216449	-14,2875	0,004863	-2,01190	-1,08060

*(L) corresponde ao modelo linear e (Q) ao modelo quadrático

O diagrama de Pareto mostra esses dados em forma de gráfico, apresentando a significância dos resultados, com 95 % de confiança. Uma linha tracejada vermelha estabelece o limite correspondente ao valor de $p = 0,05$, confirmando os resultados obtidos. As alturas das barras fornecem os resultados dos efeitos das variáveis e estão dispostas de modo decrescente, o cálculo dos efeitos lineares e quadráticos indica o quanto deve ser grande o efeito para ter significado estatisticamente.

Assim, de acordo com a figura 21 observa-se que a % de substrato, ou seja, a razão mássica entre óleo e tampão tem maior influência no grau de hidrólise. A temperatura também constitui um parâmetro com grande influência no grau de hidrólise.

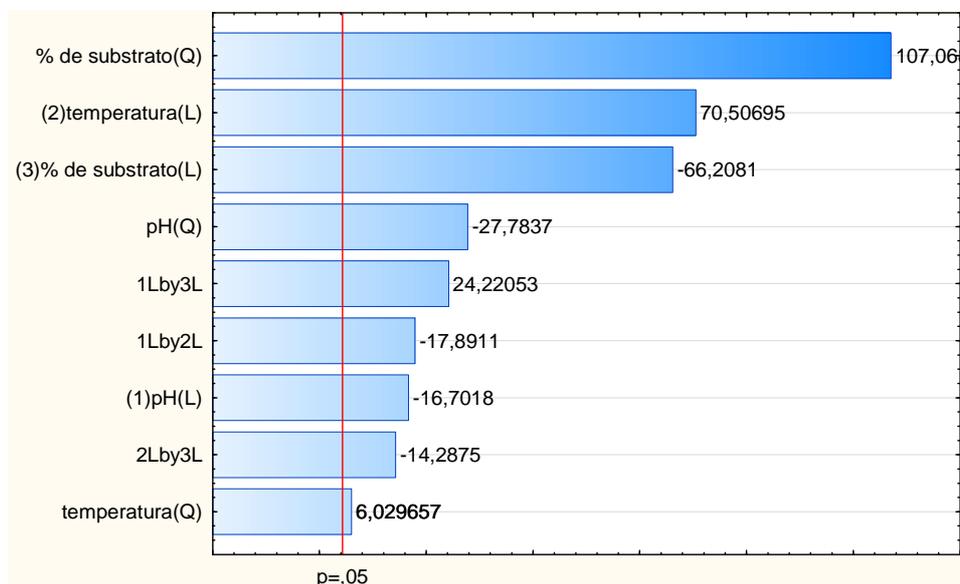


Figura 21: Diagrama de Pareto

Os coeficientes de regressão dos fatores e suas interações são observados na tabela 12.

Tabela 12: Valores de significância dos coeficientes de regressão dos fatores

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Puro	t(2)	P	-95,% Lim. Conf.	+95,% Lim. Conf.
Média	-493,434	21,75071	-22,6859	<i>0,001937</i>	-587,020	-399,848
Efeitos principais						
pH (L)	129,112	4,38409	29,4501	<i>0,001151</i>	110,249	147,975
pH (Q)	-7,412	0,26676	-27,7837	<i>0,001293</i>	-8,559	-6,264
% de substrato (L)	-460,645	9,61517	-47,9081	<i>0,000435</i>	-502,016	-419,274
% de substrato (Q)	369,401	3,45013	107,0687	<i>0,000087</i>	354,556	384,245
Temperatura (L)	6,220	0,39123	15,8975	<i>0,003933</i>	4,536	7,903
Temperatura (Q)	0,016	0,00267	6,0297	<i>0,026420</i>	0,005	0,028
Interações						
pH (L) % de substrato (L)	26,212	1,08224	24,2205	<i>0,001700</i>	21,556	30,869
pH (L) por Temperatura (L)	-0,774	0,04329	-17,8911	<i>0,003110</i>	-0,961	-0,588
% de substrato (L) por Temperatura (L)	-1,546	0,10822	-14,2875	<i>0,004863</i>	-2,012	-1,081

Na tabela de análise de variância pode ser observada na tabela 13, dentro do nível de confiança desejado, verificando que a média quadrática da regressão dividida pela média quadrática residual é de 8,31; e é maior que o valor tabelado de $F_{7,9}$ que é de 3,29. O que indica uma regressão significativa, uma vez que temos o valor de $F_{cal} > F_{tab}$, e também que temos uma faixa de variação coberta pelos fatores estudados muito pequena e talvez o efeito sobre a resposta esteja mascarado pela extensão do erro experimental.

Tabela 13: Valores da análise de variância (ANOVA)

Fatores	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Valor de p
pH (L)	26,138	1	26,138		0,003566
pH (Q)	72,330	1	72,330		0,001293
% de substrato (L)	465,804	1	465,804		0,000201
% de substrato (Q)	3,407	1	3,407		0,026420
Temperatura (L)	410,735	1	410,735		0,000228
Temperatura (Q)	1074,148	1	1074,148		0,000087
pH (L) % de substrato (L)	29,993	1	29,993		0,003110
pH (L) por Temperatura (L)	54,968	1	54,968		0,001700
% de substrato (L) por Temperatura (L)	19,127	1	19,127		0,004863
Regressão (R)	2436,06	9	270,673	8,317	
Resíduo (r)	227,974	7	32,541		
Falta de ajuste (FA)	227,787	5	45,557	486,20	0,002054
Erro Puro (EP)	0,187	2	0,094		
Total	2664,034	16			
R^2	0,91443				

Temos também um valor alto de média quadrática da falta de ajuste frente à média quadrática do erro puro, ou seja, o F_{cal} referente a MQ_{fa}/MQ_{ep} é maior que o F_{tab} , o que indica falta de ajuste no modelo. Significa que nem toda variação em torno da média é explicada pela regressão, o que pode ser observado pelo valor do coeficiente de variação R^2 , que representa a fração da variação que é explicada pela falta de ajuste. Quanto mais próximo de 1 o valor estiver melhor estará o ajuste do modelo, o valor de R^2 de 0,9144 significa que 91,44% da variação total em torno da média é explicada pela regressão.

A figura 22, apresenta a distribuição dos resíduos, onde temos os valores previstos pelo modelo versus valores observados. De acordo com esse gráfico, verifica-se que os valores calculados em média estão próximos da reta vermelha e os desvios entre eles estão distribuídos normalmente, sem um comportamento tendencioso.

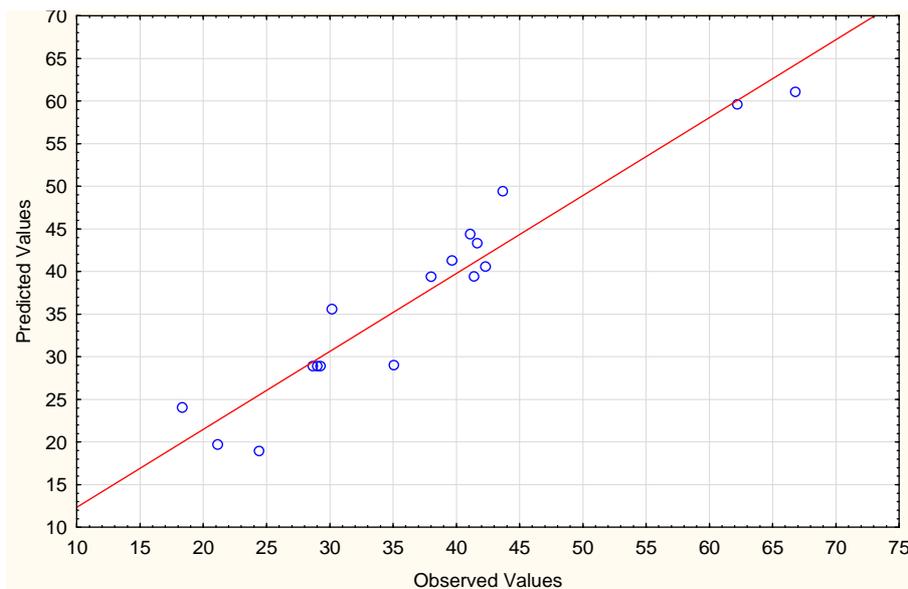


Figura 22: Gráfico de distribuição normal para valores previstos e valores observados

O gráfico de resíduos de dispersão versus os resíduos preditos (Figura 23) mostra que os mesmos estão dispersos aleatoriamente, indicando o comportamento esperado da distribuição de erros, com variância constante. Também observamos que não existe uma relação linear entre as variáveis explicativas, com a variável resposta, por meio de tendência nos pontos, o que indica um bom ajuste.

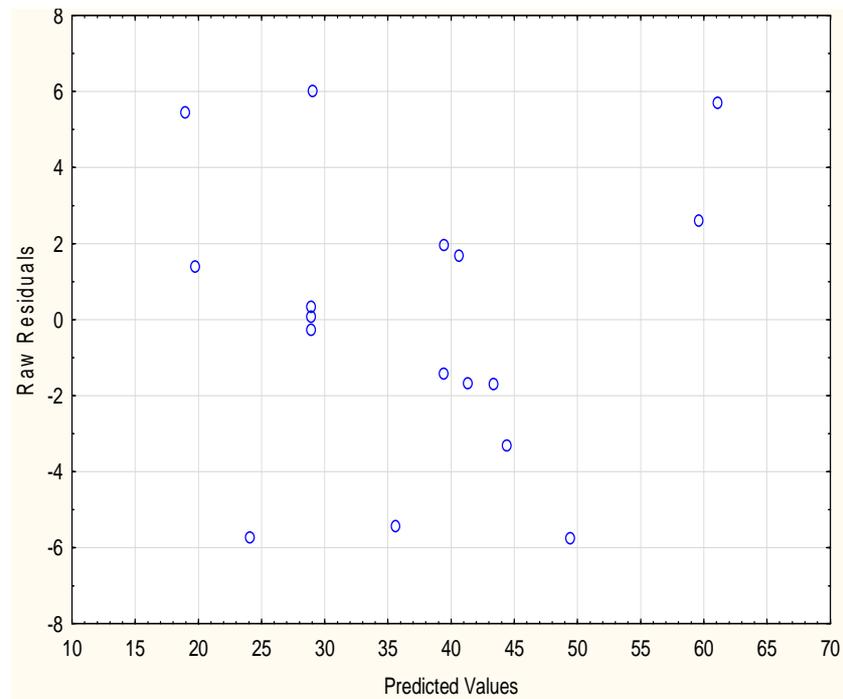


Figura 23: Dispersão de resíduos

A superfície de resposta define as condições mais adequadas que maximizam o rendimento das reações de hidrólise, as equações z, referente à y_i , é obtida em função dos coeficientes de regressão e ajustada aos dados experimentais.

Para cada uma das relações entre dois fatores a equação e os gráficos de contorno e superfície, são apresentados as seguir:

. Para a relação entre pH e temperatura, temos:
 $Z = -493,43 + 6,21 \cdot y + 0,016 \cdot y^2 + 129,11 \cdot x - 7,41 \cdot x^2 - 1,54 \cdot 0,4 \cdot y + 26,21 \cdot 4 \cdot x - 0,77 \cdot y \cdot x - 125,15$

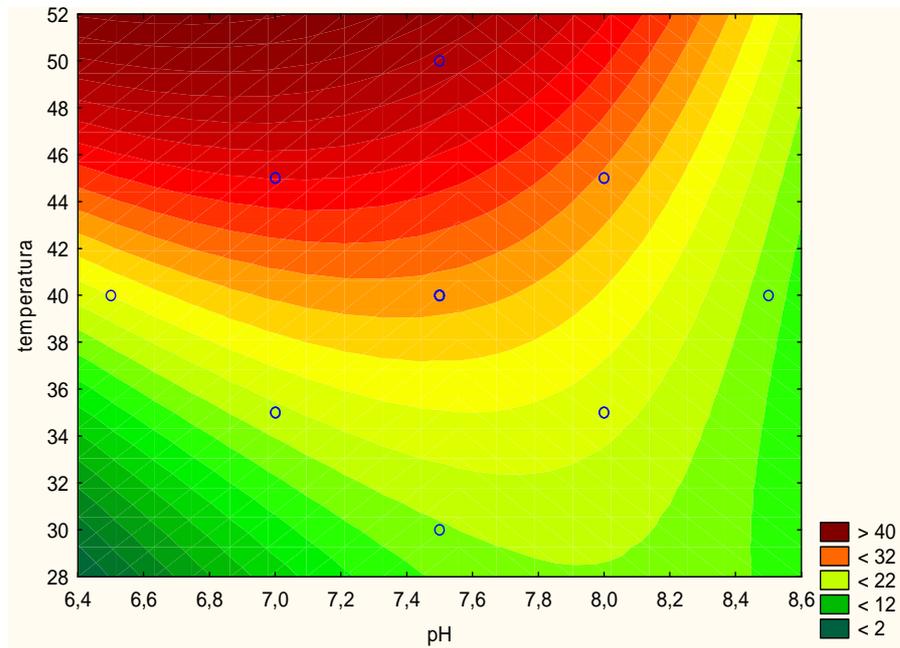


Gráfico 4: Contorno para a relação entre pH e temperatura

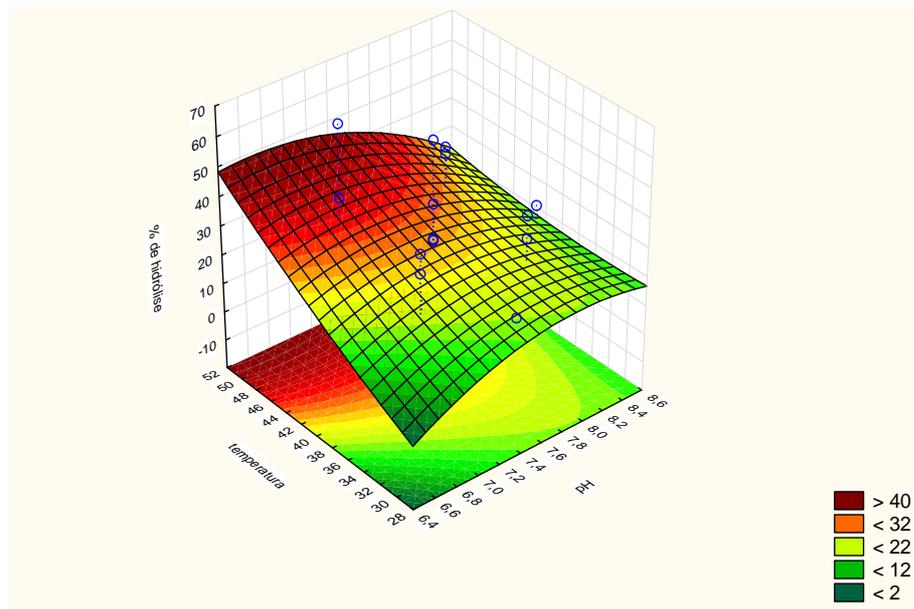


Gráfico 5: Superfície para a relação entre pH e temperatura

. Para pH e % de substrato, temos:

$$Z = -493,43 - 460,64 \cdot y + 369,40 \cdot y^2 + 129,11 \cdot x - 7,41 \cdot x^2 - 1,54 \cdot 40 \cdot y + 26,21 \cdot y \cdot x + 0,77 \cdot 40 \cdot x + 274,51$$

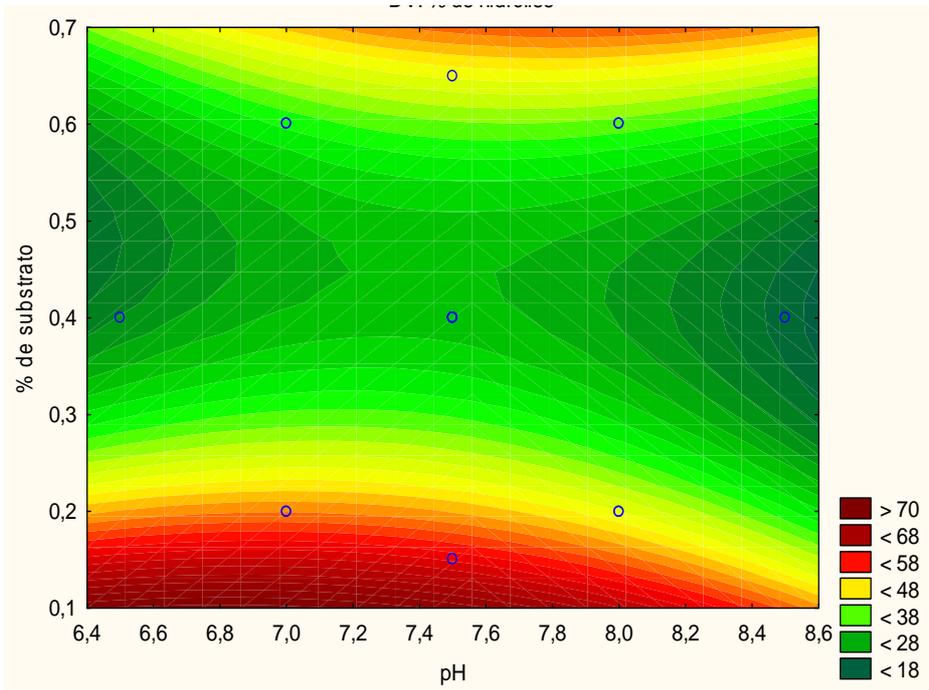


Gráfico 6: Contorno para a relação entre pH e % de substrato

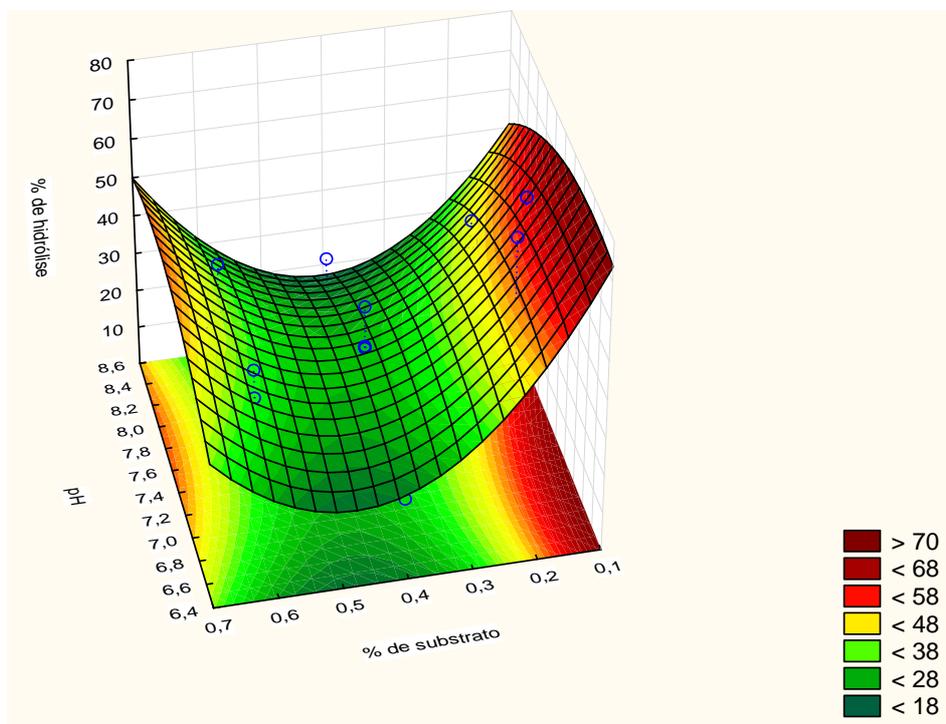


Gráfico 7: Superfície para a relação entre pH e % de substrato

. Para temperatura e % de substrato, temos:
 $Z = -493,43 - 460,64 \cdot y + 369,40 \cdot y^2 + 6,21 \cdot x + 0,016 \cdot x^2 - 1,54 \cdot y \cdot x + 26,21 \cdot 7,5 \cdot y$
 $0,77 \cdot 7,5 \cdot x + 551,43$

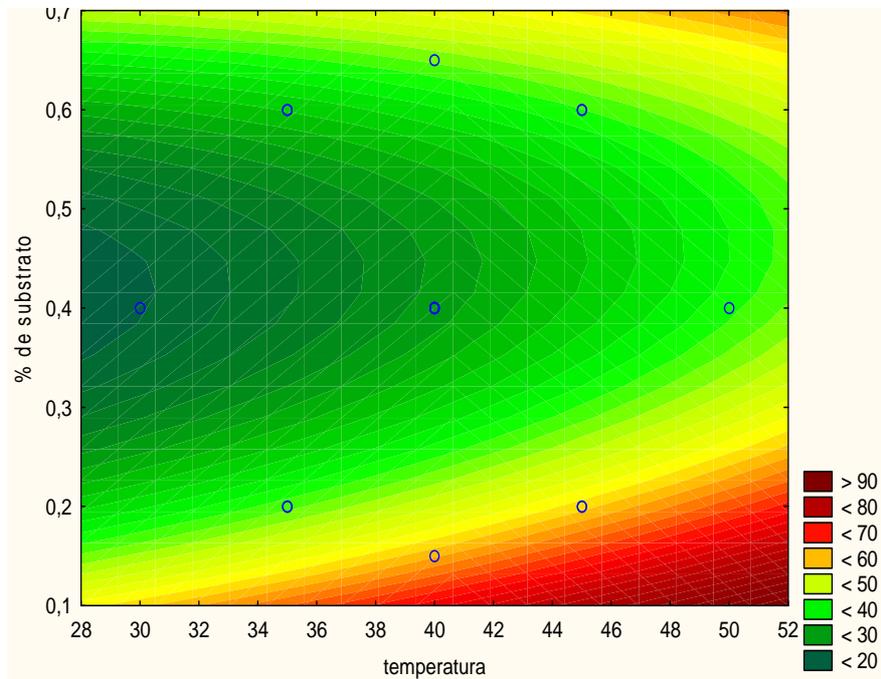


Gráfico 8: Contorno para a relação entre Temperatura e % de substrato

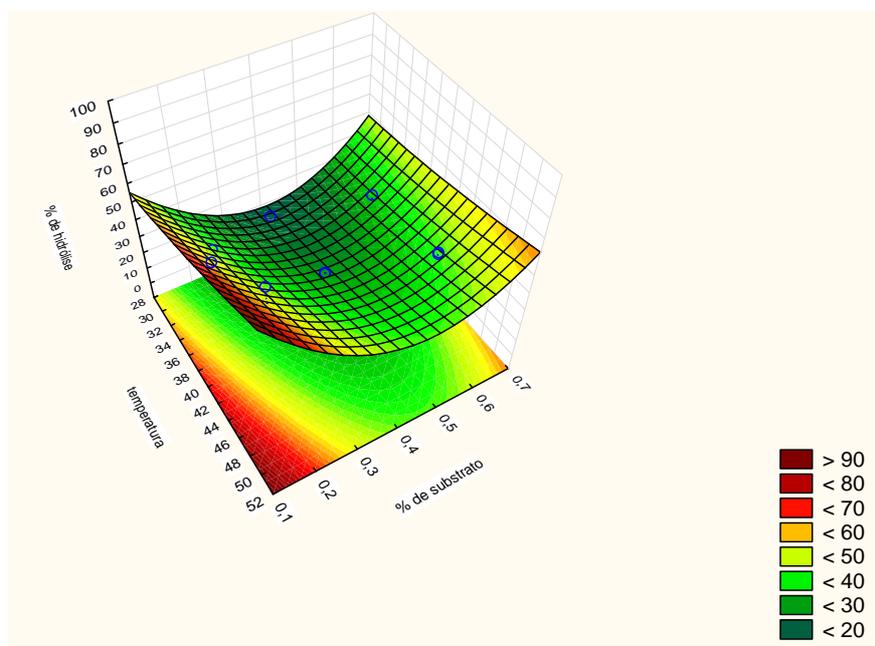


Gráfico 9: Superfície para a relação entre Temperatura e % de substrato

A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para atividade máxima entre 40 e 60°C, essas propriedades entretanto podem variar significativamente dependendo da origem, do método, do substrato utilizado e das condições gerais de ensaio, tornando difícil a comparação apenas com dados disponíveis na literatura ou fornecidos pelos fabricantes (CRISTOPHER *et al.*, 2014).

De acordo com a análise da metodologia de superfície de resposta, o grau de hidrólise aumentou em faixas de pH de 6,5 a 7,5 e temperaturas entre 45 e 50°C, em relação a porcentagem de substrato observou-se que as reações apresentam maior rendimento com menos de 15% de óleo.

O óleo de soja que também possui, uma composição de cadeia graxa com quantidade significativa de ácidos graxos insaturados, foi utilizado como substrato em reações de hidrólise enzimática mediadas com tampão em pH 7,0 com *Candida rugosa* apresentando rendimentos satisfatórios (ADASHI *et al.*, 2013 e NAGESHA *et al.*, 2004). Além disso, a *Candida rugosa* também apresentou bons rendimentos de hidrólise quando mediada em tampão com pH 7,0 – 7,5 com outros substratos, como óleo de palma (TALUKDER *et al.*, 2010) e de tucumã (CARVALHO, 2014).

A estabilidade térmica das lipases varia consideravelmente em função da origem, as lipases de origem microbianas são as que possuem maior estabilidade térmica (MESSIAS *et al.*, 2011). Observou-se que um maior rendimento pode ser obtido com reações realizadas entre 45 e 50°C. A *Candida rugosa* apresentou grande estabilidade térmica frente a substratos como óleo de babaçu, palma e girassol quando as reações foram realizadas com temperaturas de 35 a 65°C (AL-ZUHAIR *et al.* 2004 e QUEIROZ *et al.*, 1996).

Observou-se que quanto menor a quantidade de óleo, dentro das condições estudadas, maior foi o rendimento de reação de hidrólise. Reações de hidrólise e gorduras mediadas por lipases de diferentes fontes têm sido realizadas na presença de emulsificantes para aumentar a área interfacial óleo/água que, por sua vez, favorece a atividade catalítica da enzima (TISS *et al.*, 2002). Dessa forma, uma emulsão eficiente reflete um maior rendimento nas reações de hidrólise. Quanto maior a quantidade de substrato maior a agregação de gotas de óleo para formação de gotas maiores o que reduz a área superficial na interface óleo/água (McCLEMENTS, WEISS, 2005) Sendo

necessário, então, realizar uma otimização da quantidade de tensoativo frente ao volume de tampão e quantidade de substrato.

De acordo com as tendências observadas com auxílio da metodologia de superfície de resposta foi possível prever o rendimento das reações com valores específicos dos três parâmetros analisados, a figura 24 indica o perfil de cada uma das relações entre valores previstos e desejados, de acordo com o modelo analisado.

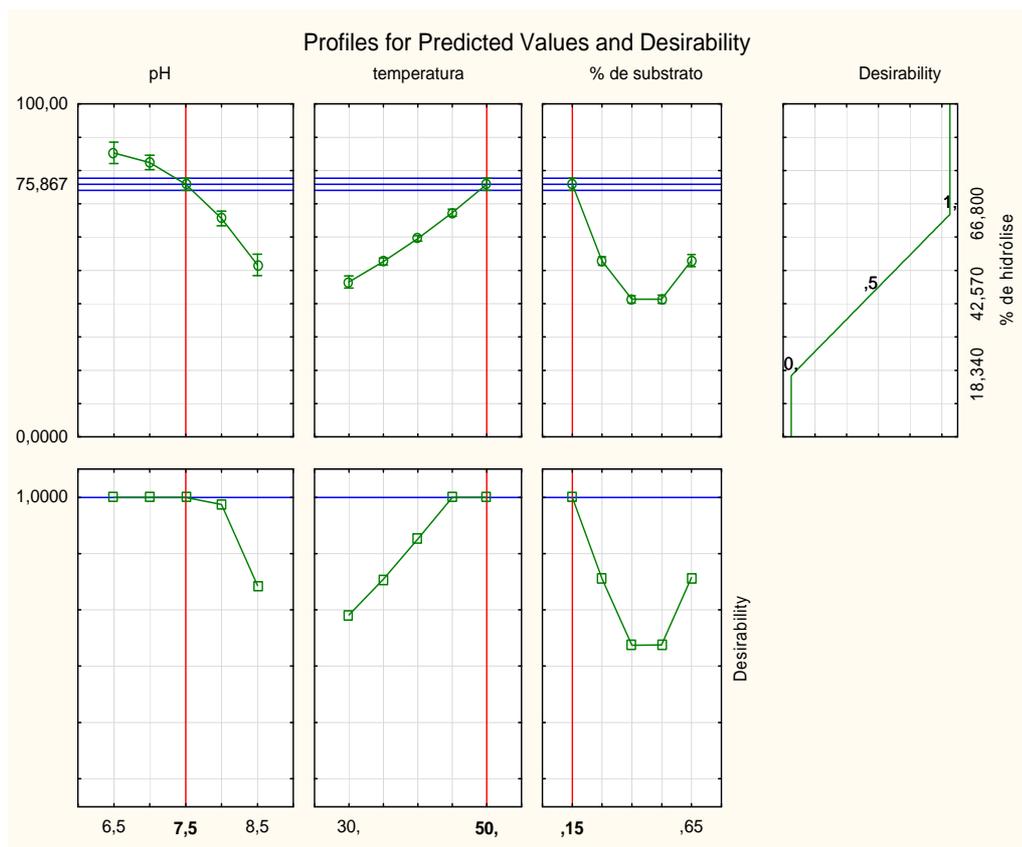


Figura 24: Perfil das relações entre as variáveis em relação aos valores previstos e os valores observados para a resposta.

Assim algumas simulações foram realizadas, para encontrar os valores de cada variável que aumentaria consideravelmente o valor da resposta, o rendimento de reação (Tabela 14). Observou-se o indicativo de que o aumento do rendimento seria alcançado com a diminuição do pH, logo, o pH foi alterado de 7,5 para 7,0 obtendo então 82% de rendimento. Outro indicativo observado foi o de diminuição da % de substrato, diminuindo então de 15% para 10% obteve-se teoricamente, 85% de rendimento. O aumento da temperatura também indica aumento do rendimento, de 50 °C para 55 °C observamos 107%

de rendimento. Considerando que 107% de rendimento para uma reação química não é um valor coerente, os parâmetros escolhidos para realizar as reações foram: pH 7,0 ; 10% de substrato e 50 °C.

Tabela 14: Simulações realizadas para prever o valor do rendimento das reações com valores específicos de cada uma das variáveis.

Fatores	1	2	3	4
Ph	7,5	7,0	7,0	7,0
% de substrato	15%	15%	10%	10%
Temperatura	50	50	50	55
Rendimento predito	75,86	82,44	95,54	107,20
-95% de confiança	73,94	80,25	93,00	103,22
+95% de confiança	77,87	84,63	98,41	111,19

5.6.1. Quantificação por vídeo por CCD – VideoScan

Todas as reações realizadas foram analisadas por CCD-VideoScan e as quantificações foram feitas para determinar o rendimento das reações com o decorrer do tempo. Cada um dos gráficos a seguir mostra simultaneamente o decaimento de TG e a formação de AGL. Em comparação com o grau de hidrólise obtido a partir de titulação ácido-base, temos uma resposta complementar e coerente entre os dois procedimentos. Os valores de grau de hidrólise para cada uma das 17 reações realizadas podem ser observados na tabela 9, referentes aos valores da variável resposta para o planejamento composto central. Cada gráfico representa, então, uma das 17 reações numeradas na mesma tabela.

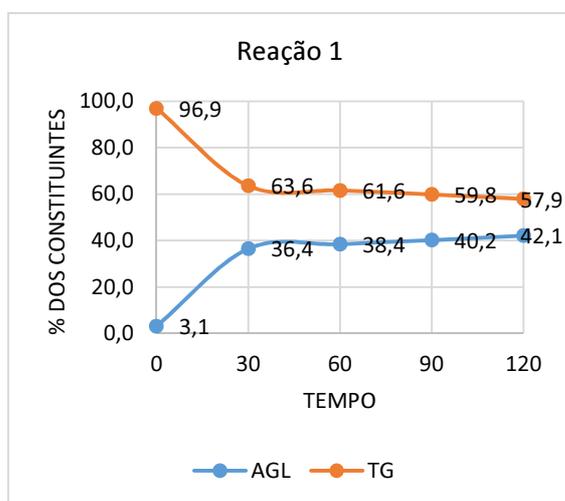


Gráfico 10: Parâmetros: 20% de óleo, 35 °C, pH 7,0
Grau de hidrólise: 41,65%

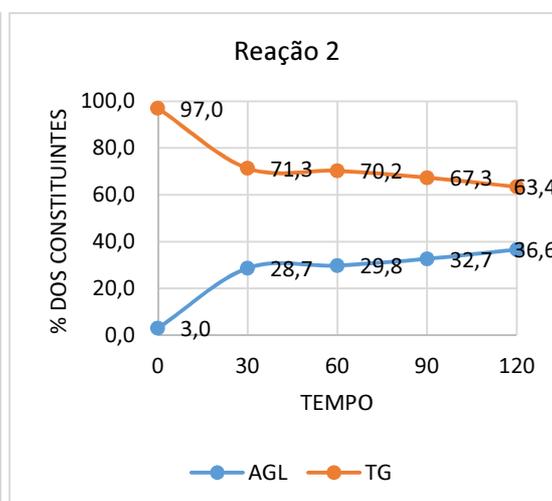


Gráfico 11: Parâmetros: 60% de óleo, 35 °C, pH 7,0
Grau de hidrólise: 35,06%



Gráfico 12: Parâmetros: 20% de óleo, 45 °C, pH 7,0
Grau de hidrólise: 66,80%

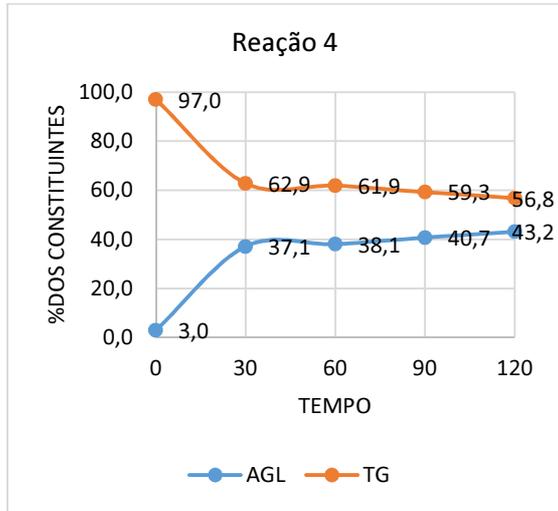


Gráfico 13: Parâmetros: 60% de óleo, 45 °C, pH 7,0
Grau de hidrólise: 42,30%



Gráfico 14: Parâmetros: 20% de óleo, 35 °C, pH 8,0
Grau de hidrólise: 38%

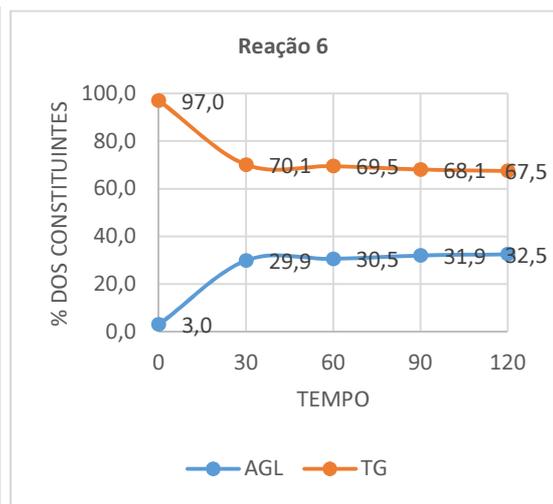


Gráfico 15: Parâmetros: 60% de óleo, 35 °C, pH 8,0
Grau de hidrólise: 30,17%

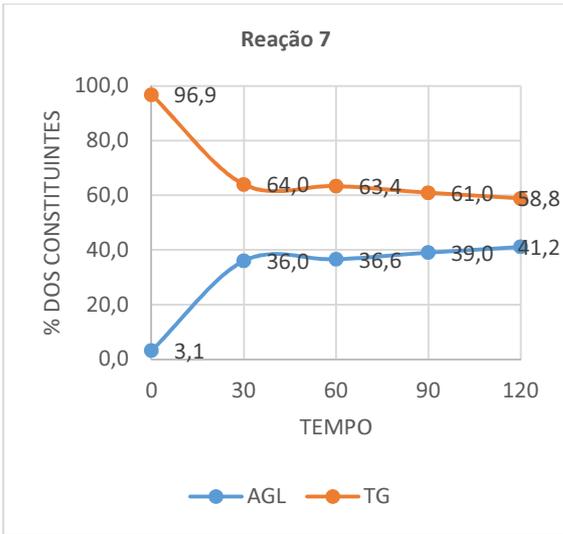


Gráfico 16: Parâmetros: 20% de óleo, 45 °C, pH 8,0
Grau de hidrólise: 43,68%

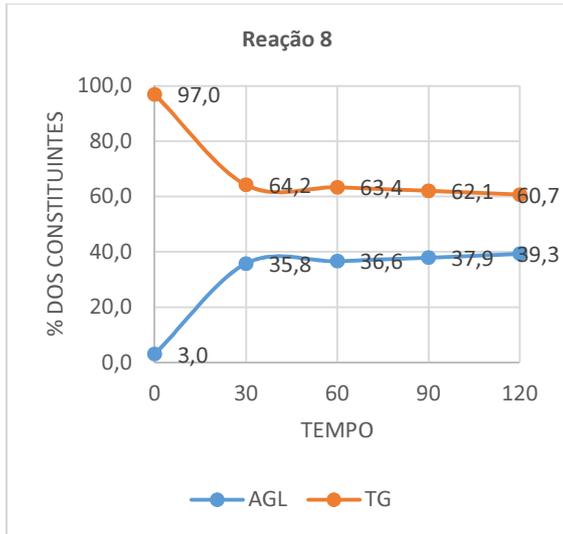


Gráfico 17: Parâmetros: 60% de óleo, 45 °C, pH 8,0
Grau de hidrólise: 41,39%

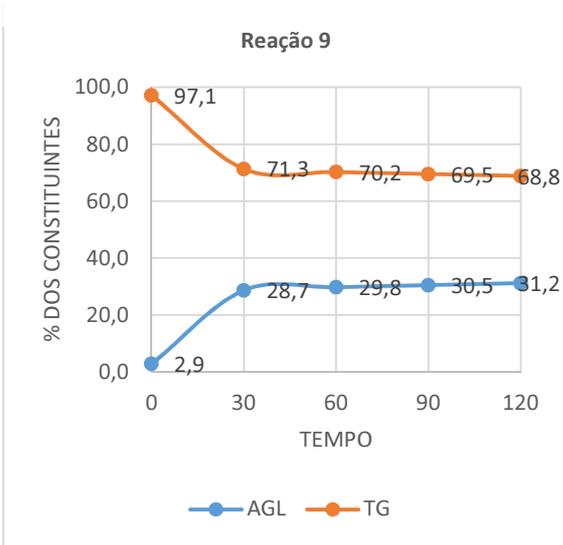


Gráfico 18: Parâmetros: 40% de óleo, 40 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 29,00%

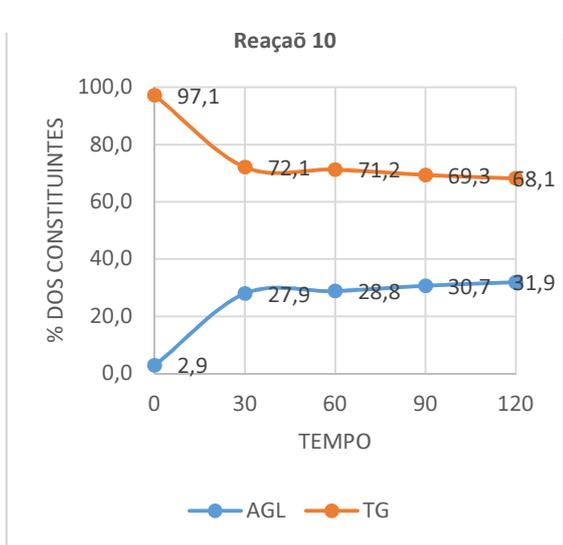


Gráfico 19: Parâmetros: 40% de óleo, 40 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 29,26%

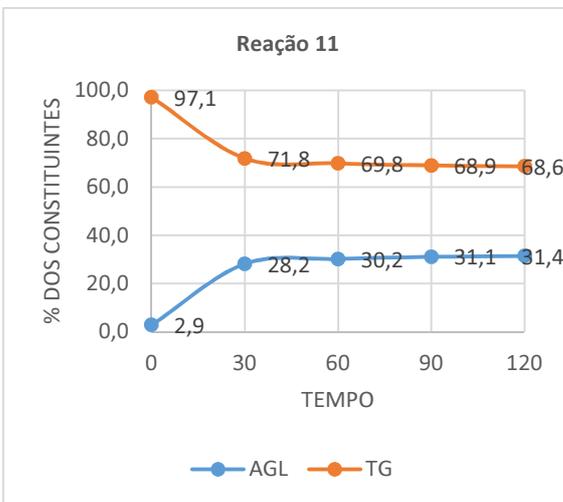


Gráfico 20: Parâmetros: 40% de óleo, 40 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 28,65%



Gráfico 21: Parâmetros: 15% de óleo, 40 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 62,21%

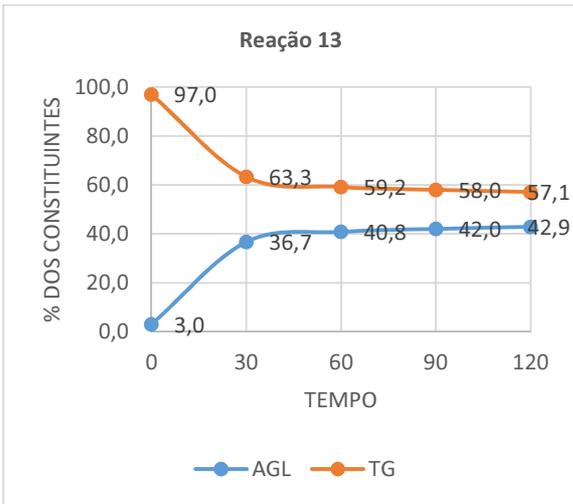


Gráfico 22: Parâmetros: 65% de óleo, 40 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 41,10%

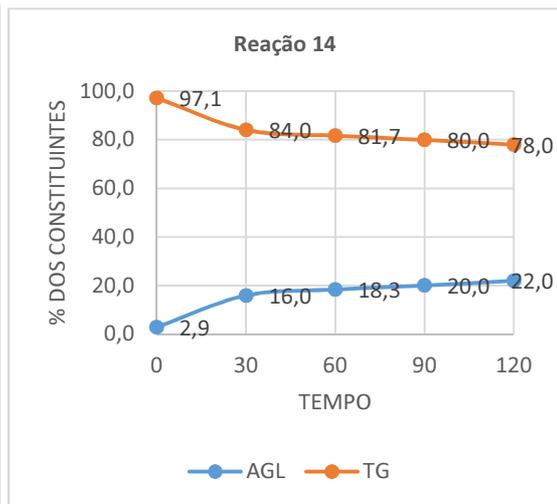


Gráfico 23: Parâmetros: 40% de óleo, 40 °C, pH 6,5
Grau de hidrólise: 22,35%

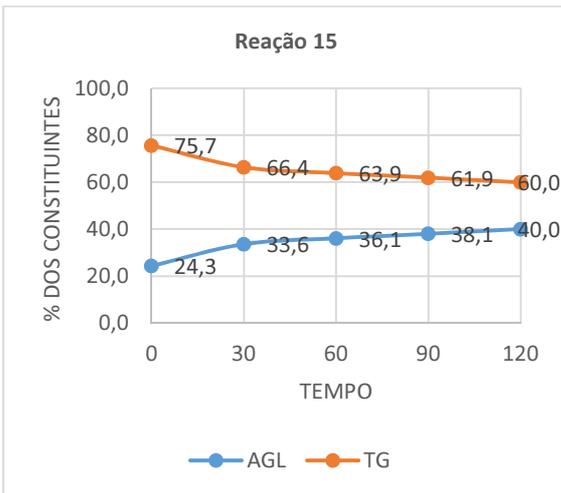


Gráfico 24: Parâmetros: 40% de óleo, 40 °C, pH 8,5
Grau de hidrólise: 39,65%

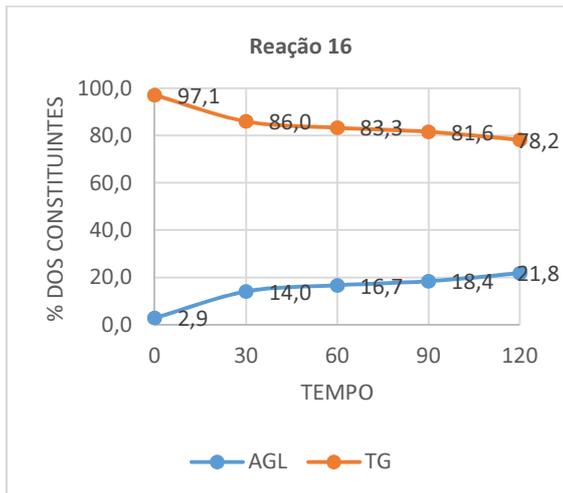


Gráfico 25: Parâmetros: 40% de óleo, 30 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 18,34%

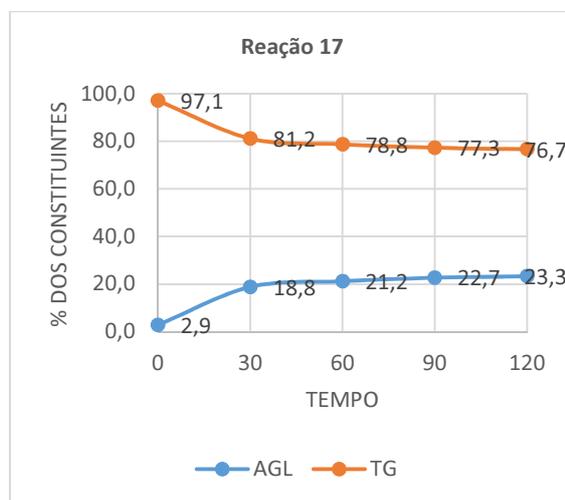


Gráfico 26: Parâmetros: 40% de óleo, 50 °C, pH 7,5
Grau de hidrólise: 24,40%

O gráfico 27 mostra um resumo dos valores de porcentagem e hidrólise de cada reação realizada no planejamento composto central. As reações 3 (20% de óleo, 45 °C, pH 7,0) e 12 (15% de óleo, 40 °C, pH 7,5) apresentam maior porcentagem de hidrólise

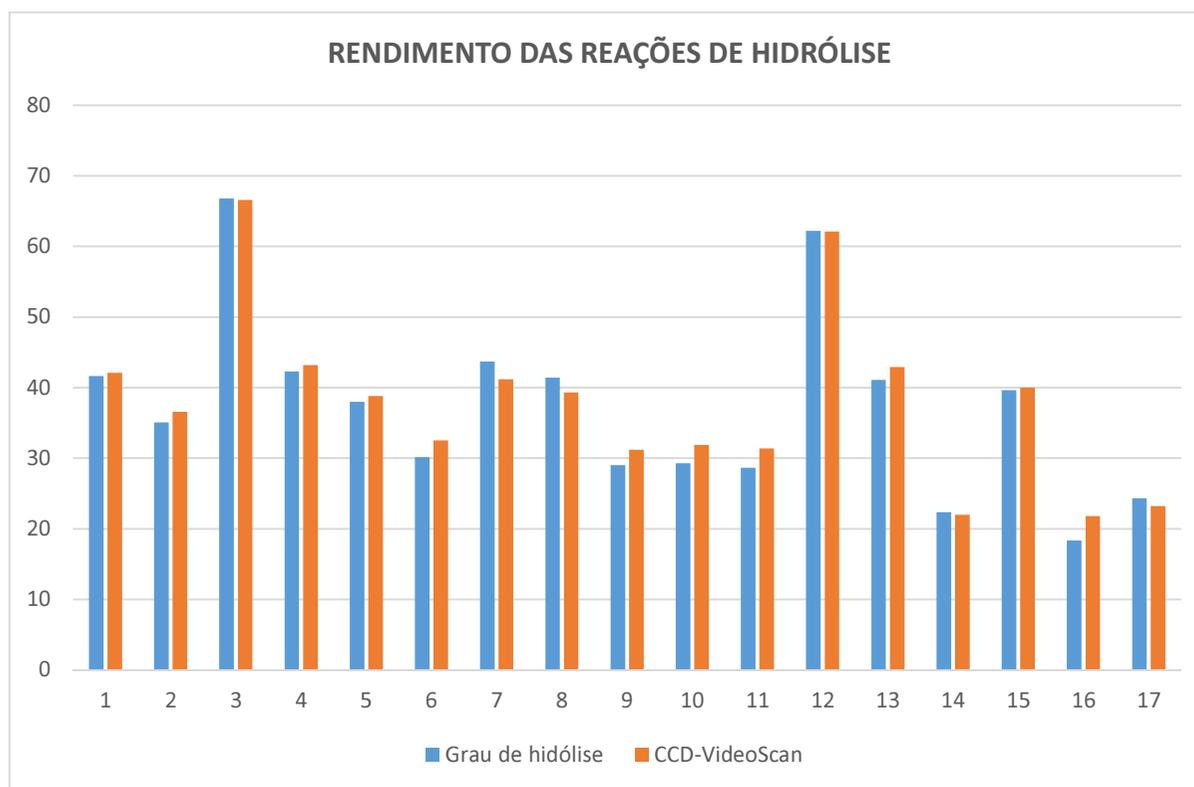


Gráfico 27: Comparação dos rendimentos das reações de hidrólise do planejamento CDDR, por grau de hidrólise e quantificação por CCD-VideoScan

5.7.2. Reações em maior escala em reator encamisado

De acordo com o planejamento composto central realizado, os parâmetros para uma reação com rendimento de aproximadamente 96%, considerando o limite de confiança em -95%, um rendimento de 93% e em +95% um rendimento de 98%; os parâmetros ótimos são: pH 7,0, 50 °C e 10% de substrato. Assim com esses parâmetros definidos, foi realizada uma reação teste. A figura 25, mostra o sistema em que as reações foram realizadas.

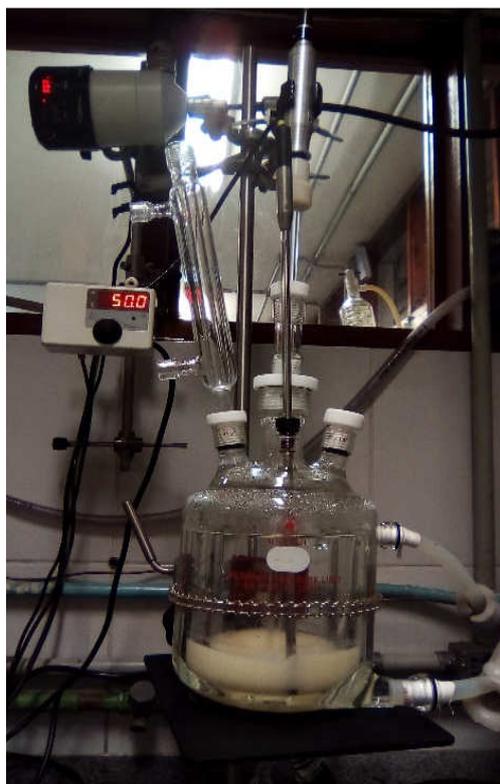


Figura 25: Sistema reacional pra realização das reações em uma escala maior.

O perfil da reação quantificada por CCD-VideoScan é apresentada no gráfico 28 e foi obtido um rendimento de 93,6%. Por titulação, o grau de hidrólise determinado foi de 94,1%. Os resultados corroboram com o esperado pelo planejamento estatístico realizado.

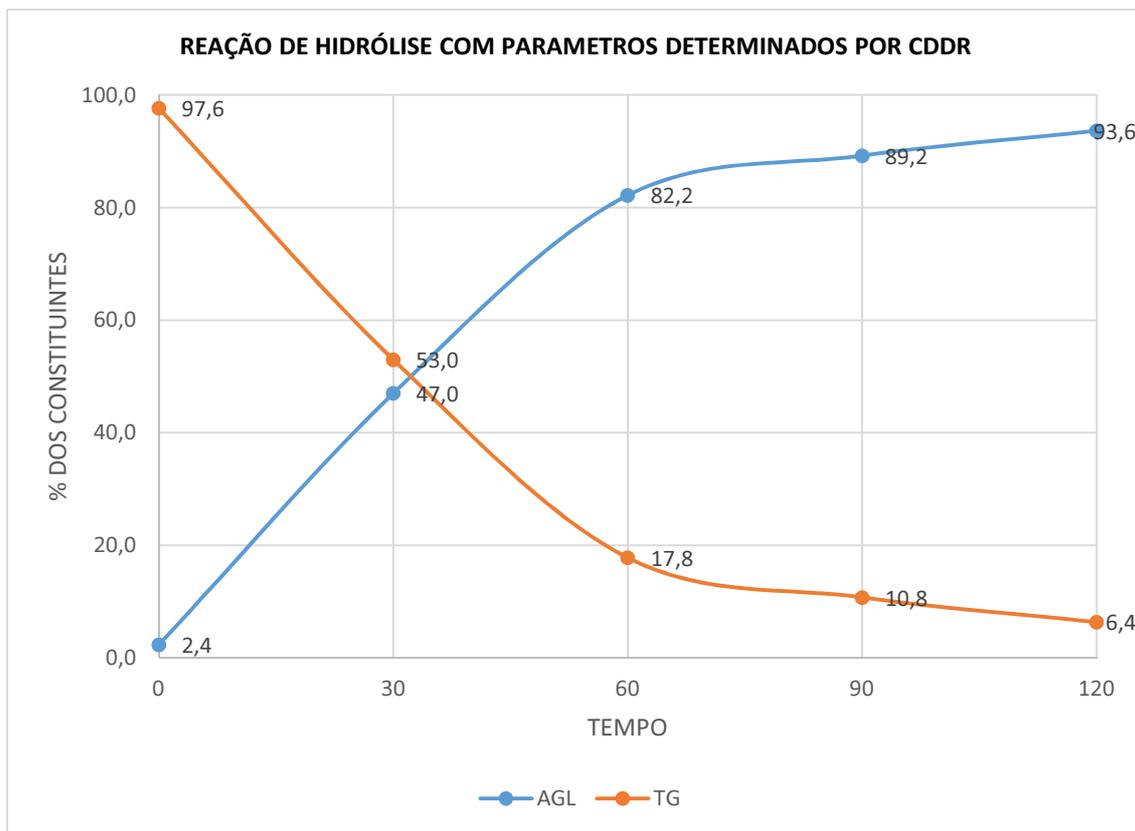


Gráfico 28: Perfil da reação de hidrólise realizada com parâmetros otimizados pela metodologia de superfície de resposta, que são: 10% de óleo, 50 °C e pH 7,0

Para determinar o real poder catalítico da enzima, outras reações foram realizadas. Uma reação diminuindo o tempo de reação pela metade, ou seja, realizada em 1 h. Outra reação dobrando a quantidade de enzima, utilizou-se 50 mg, que foi realizada também por 1 h. Todos os outros parâmetros foram mantidos invariáveis.

Observou-se que a reação com metade do tempo, mas com a mesma quantidade de enzima, 25 mg, o rendimento foi de 41,54% determinado pelo cálculo do grau de hidrólise e 40,8% pela quantificação por CCD-VideoScan; Esse valor era esperado, pois corresponde a aproximadamente metade do rendimento alcançado em 2 h de reação.

Ao dobrar a quantidade de enzima, mas realizando a reação em metade do tempo, foi obtido um rendimento reacional de 92,64% determinado pelo cálculo do grau de hidrólise e 90,7% pela quantificação por CCD-VideoScan. Novamente obteve-se um resultado coerente com os obtidos anteriormente, onde dobrando a quantidade de enzima a velocidade da reação também

dobrou. Esses resultados são apresentados nos gráficos 29 e 30, que mostram o perfil de quantificação dessas reações.

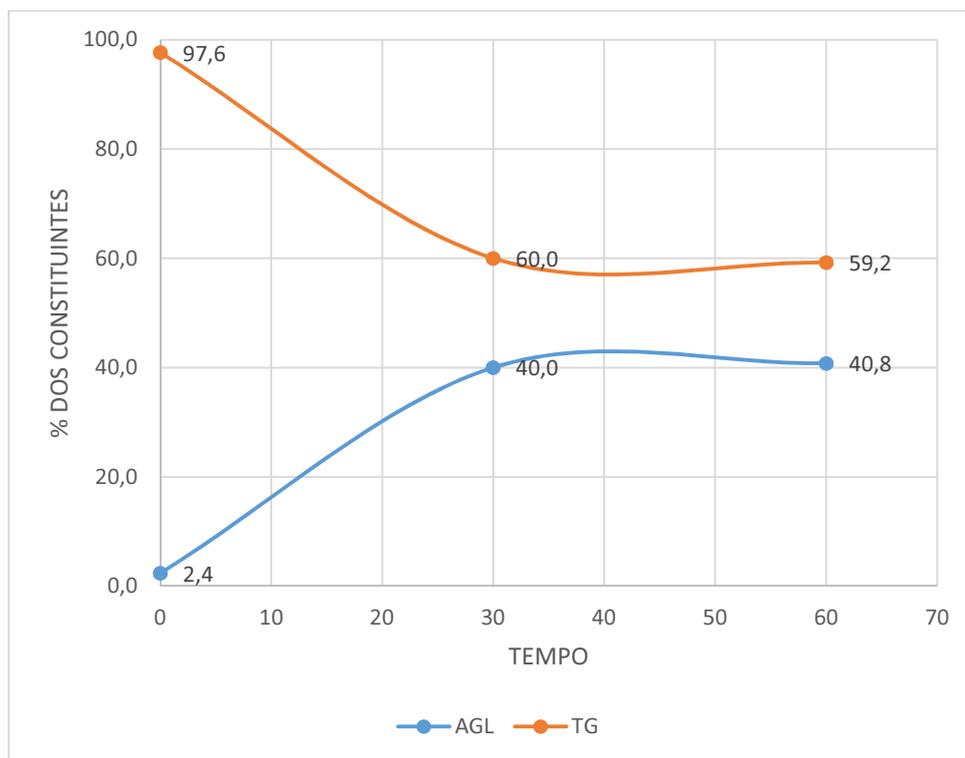


Gráfico 29: Perfil da quantificação dos constituintes (AGL e TG) da reação de hidrólise com parâmetros de: pH 7,0, 50°C, 10% de substrato, 1h de reação, 25mg de enzima

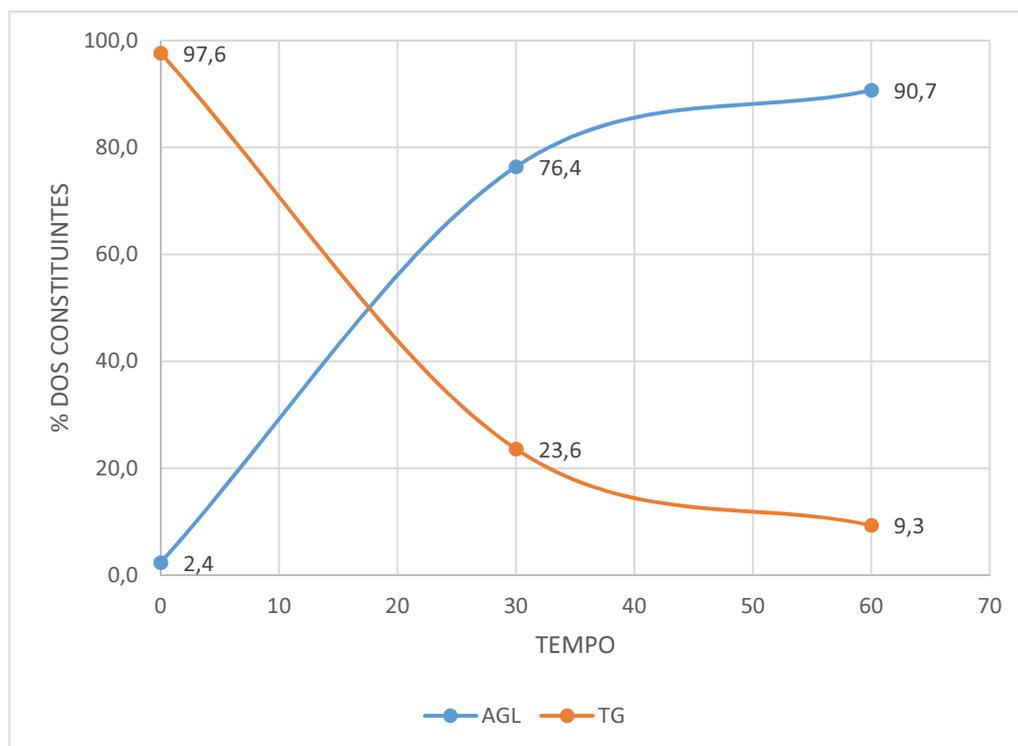


Gráfico 30: Perfil quantificação dos constituintes (AGL e TG) da reação de hidrólise com parâmetros de: pH 7,0, 50°C, 10% de substrato, 1h de reação, 50mg de enzima

6. Ciclagem da enzima

A fim de verificar a possibilidade de reutilizar a fração enzimática (tampão contendo as lipases livres de *Candida rugosa*) foram realizados experimentos sequenciais com a mesma fração enzimática. A reação teve início com as seguintes condições: tampão fosfato de sódio pH 7,0; 0,1 M, 10% de substrato, lipase de *Candida rugosa* 25 mg, tensoativo 5 %, temperatura 50° C, agitação a 800 rpm e 2 h de reação. Foram realizadas cinco reações consecutivas, após cada ciclo, a mistura reacional foi extraída com hexano por partição líquido-líquido, onde a fase orgânica concentrada e analisada para obter a concentração de AGL, enquanto que a fase aquosa contendo glicerol e a lipase foi transferida novamente ao reator sem nenhum pré-tratamento. Ao final de cada reação, uma alíquota do produto final foi titulada para obter o grau de hidrólise, assim como a quantificação por CCD-VideoScan.

O rendimento ao longo de dois ciclos apresentou conversão de aproximadamente 92%. A partir do terceiro ciclo observou-se um decaimento no rendimento da reação.

As lipases extraídas de microrganismos permitem utilizar condições reacionais mais agressivas, possibilitando maiores conversões. As lipases de origem microbiana são altamente termoestáveis e vantajosas em aplicações biotecnológicas, uma vez que pode ser produzido com baixo custo e apresentam melhor estabilidade em tempos longos de reação e suportam temperaturas elevadas em processos biológicos (HASSAN *et al.*, 2006; SAXENA *et al.*, 2003).

Além disso, a lipase pode ser estabilizada através da manutenção da concentração de glicerol na fase aquosa ao longo da hidrólise de óleos ou gorduras. Portanto, o glicerol, subproduto pode ter um efeito positivo sobre a reciclagem da lipase de *Candida rugosa* (TALUKDER *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2009). Assim, foi possível empregar a fração enzimática em dois ciclos reacionais mantendo-se o rendimento da reação.

As reações com vários ciclos apresentaram, em geral, resultados satisfatórios associado à economicidade no processo e excelentes conversões. De acordo com trabalho anterior do grupo de pesquisa (CARVALHO, 2014), esperava-se que a atividade enzimática permanecesse inalterada por mais ciclos. Observou-se um decaimento do rendimento a partir do segundo ciclo,

talvez pela utilização de solvente orgânico (hexano) para extrair os ácidos graxos no final de cada processo. Não se evaporou o hexano residual na fração enzimática, após a partição. O solvente pode ter influência no meio reacional interferindo no comportamento da enzima dentro do processo enzimático, diminuindo seu poder catalítico, uma vez que a enzima possui suas atividades catalíticas dentro de um sistema aquoso e a presença do hexano poderia alterar a estrutura 3D da enzima e conseqüentemente a sua atividade catalítica.

O gráfico 31, mostra a porcentagem dos constituintes (AGL e TG) de cada ciclo mostrando o rendimento total das reações, por CCD-VideoScan. O gráfico 32, mostra o valor do cálculo do grau de hidrólise de cada ciclo. Foi possível observar que as informações são coerentes e complementares.

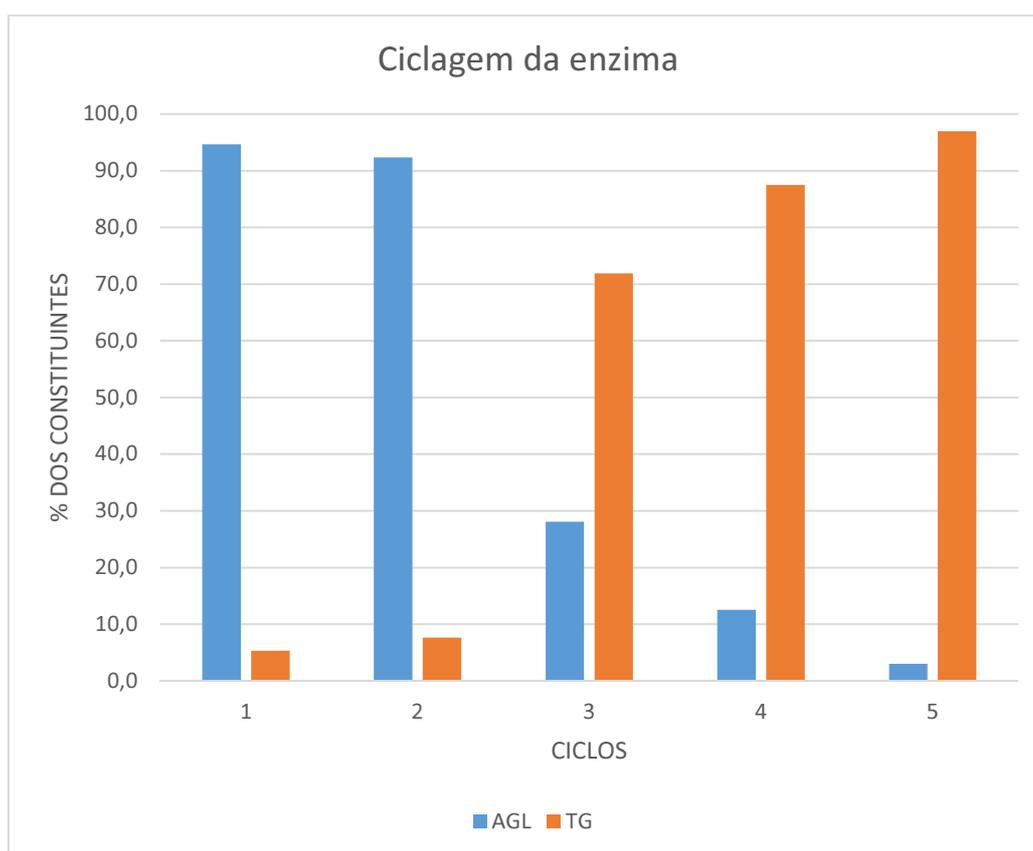


Gráfico 31: Rendimento dos cinco ciclos reacionais de hidrólise realizadas com *Candida rugosa*, pela quantificação dos constituintes (AGL e TG) por CCD-VideoScan.

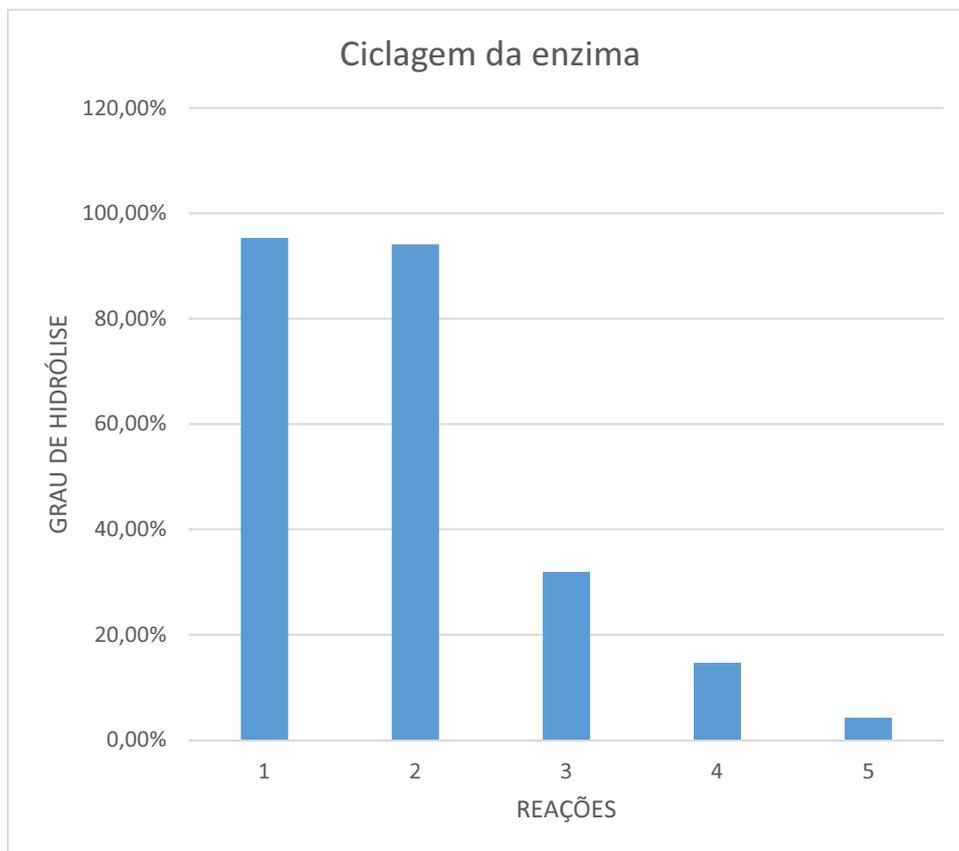


Gráfico 32: Rendimento dos cinco ciclos reacionais de hidrólise realizadas com *Candida rugosa* pelo cálculo de grau de hidrólise.

7. Síntese de biodiesel por catálise heterogênea com produto de hidrólise enzimática do óleo residual de andiroba por *Candida rugosa*.

Após definir as melhores condições hidrolíticas, a síntese de biodiesel foi realizada com os produtos da hidrólise obtidos nas reações realizadas em maior escala (reator encamisado de vidro) com a lipase de *Candida rugosa*. As condições empregadas foram as mesmas definidas por Carvalho em 2014: temperatura reacional de 70° C, 1,5% de sulfato férrico $Fe_2(SO_4)_3$ e proporção AGL: álcool 1:6. Foi utilizado tanto o metanol como o etanol hidratado para avaliar a produção de biodiesel tanto pela via metílica como etílica.

A tabela 14 mostra o rendimento e a densidade dos biodieseis obtidos. A nível de comparação a densidade do óleo de andiroba é de 0,89 g/cm³. Segundo a resolução ANP 14/2012, o biodiesel deve ter densidade entre 0,85-0,90 g/cm³, e a densidade do biodiesel necessariamente deve ser menor que a densidade da matéria-prima de origem.

Tabela 15: Densidade e rendimento obtido dos biodieseis obtidos

	Biodiesel etílico	Biodiesel metílico
Massa específica (g/cm ³)	0,857 ± 0,005	0,862 ± 0,007
Rendimento (%)	86,45%	91,36%

Os rendimentos observados foram bem próximos, assim como a qualidade do biodiesel, baseado na análise da massa específica.

7.1 Identificação do produto final de esterificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As amostras do produto final de esterificação foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) para confirmar a formação de biodiesel metílico e principalmente etílico. A determinação da composição de cada amostra foi possível através das análises dos espectros de massas e a consulta à biblioteca disponível.

As amostras de biodiesel foram analisadas e assim foram gerados espectros de massas correspondentes às fragmentações de cada pico identificado no cromatograma de íons totais, que podem ser observados nos anexos deste trabalho.

Os cromatogramas gerados para as duas amostras, biodiesel etílico e metílico, de íons totais gerados podem ser observados nas figuras 26 e 27.

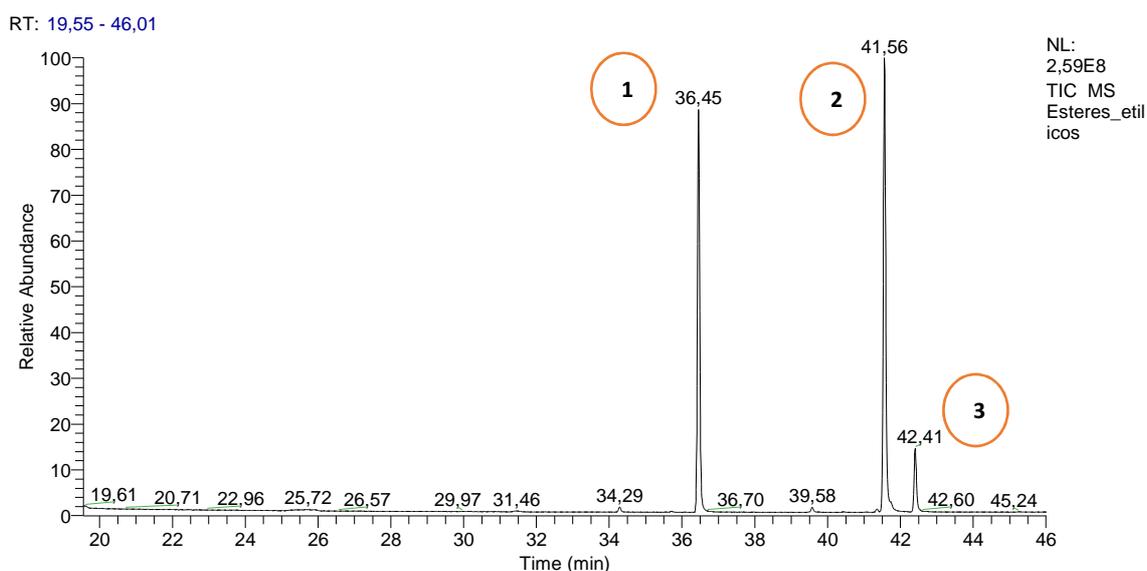


Figura 26: Cromatograma de íons totais para amostra de biodiesel etílico

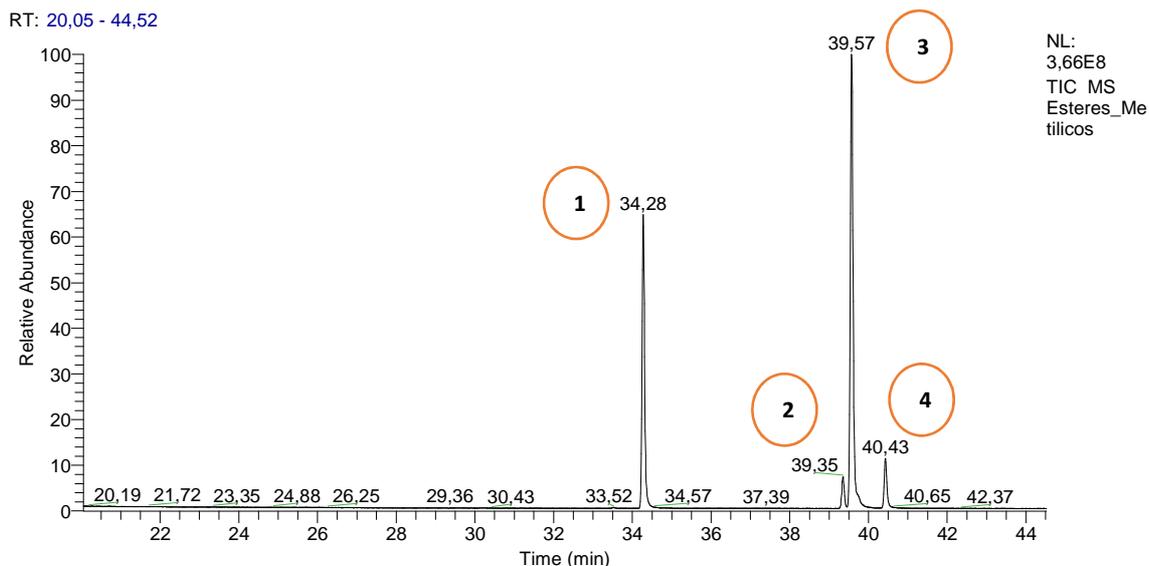


Figura 27: Cromatograma de íons totais para amostra de biodiesel metílico

As substâncias correspondentes a cada pico dos cromatogramas de íons totais para as amostras de biodiesel metílico e etílico estão relacionadas nas tabelas 16 e 17, respectivamente.

Os espectros de massas para biodiesel apresentam picos referentes ao íon formado através de um rearranjo de McLafferty, para ésteres metílicos: m/z 74 e para ésteres etílicos: m/z 88, neste tipo de rearranjo um átomo de hidrogênio presente no carbono γ é transferido para o cátion radicalar da carbonila através de um estado de transição de seis membros, em seguida ocorre à clivagem homolítica da ligação sigma dos carbonos α e β , que irá gerar um novo cátion radicalar. A proposta de fragmentação para esses dois fragmentos, estão apresentados na figura 28.

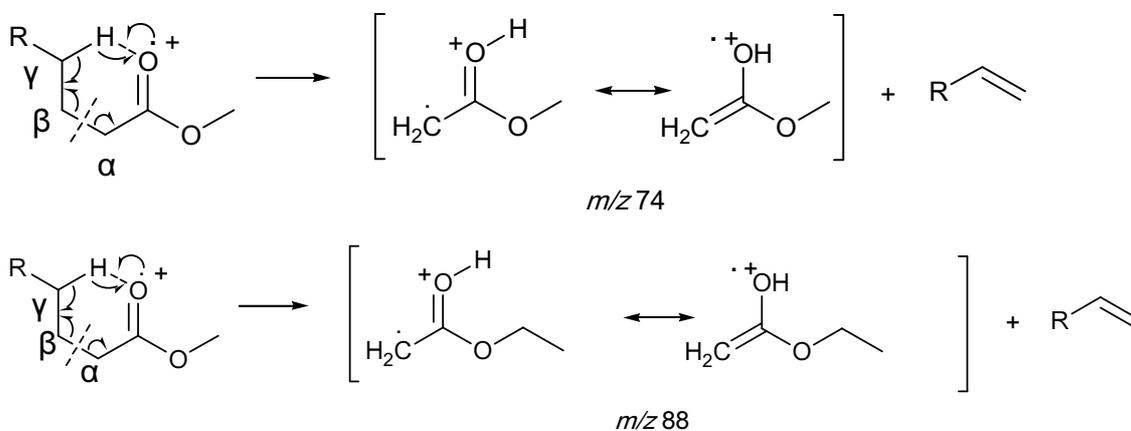


Figura 28: Esquema de fragmentação por EM por impacto eletrônico de ésteres metílicos e etílicos

A amostra etílica constituiu em uma mistura de ésteres etílicos (C16:0; C18:1; C18:0). Os espectros correspondentes a cada pico do cromatograma podem ser observados nas figuras as seguir:

Tabela 16: Substancias identificadas por CG-EM para amostra de biodiesel etílico

Pico	t _R (min)	Substancias	Massa Molar	Biblioteca
1	36,45	Hexadecanoato de etila	284 g/mol	NIST 2.0
2	41,56	9-Octadecenoato de etila	310 g/mol	NIST 2.0
3	42,41	Octadecanoato de etila	312 g/mol	NIST 2.0

Esteres_etilicos #3864 RT: 36,45 AV: 1 SB: 402 36,73-38,55 , 34,65-36,18 NL: 4,80E7
T: {0;0} + c EI Full ms [40,00-650,00]

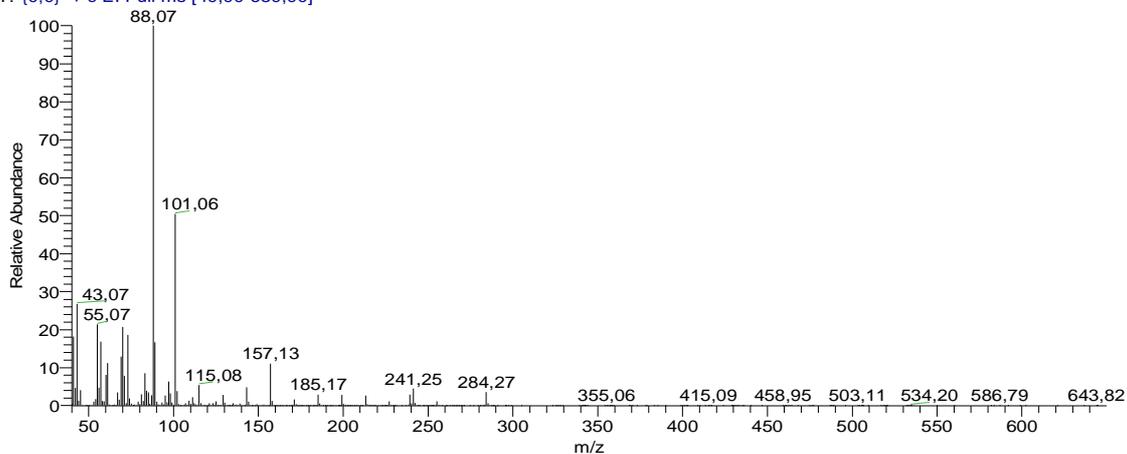


Figura 29: Pico 1 – Hexadecanoato de etila (C16:0)

Esteres_eticos #4463-4483 RT: 41,49-41,65 AV: 21 SB: 265 41,77-43,06 , 40,49-41,41 NL: 7,79E6
T: {0:0} + c EI Full ms [40,00-650,00]

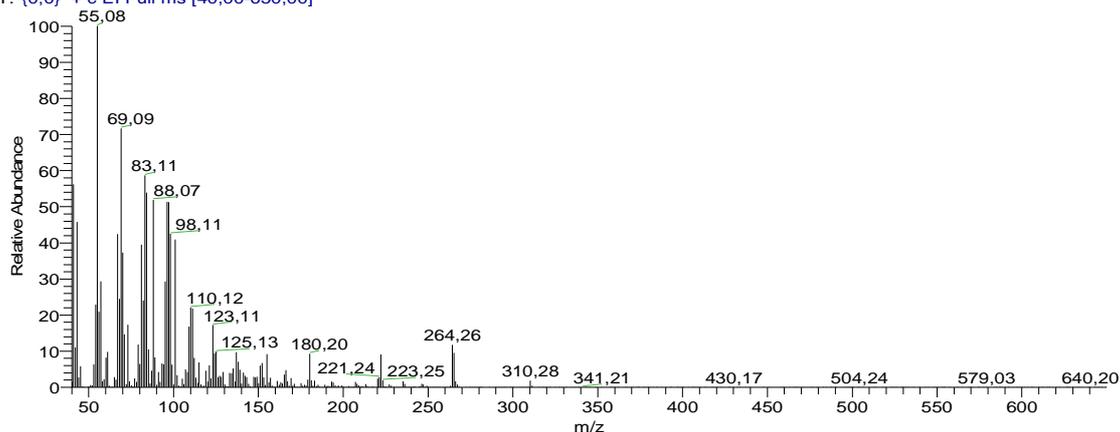


Figura 30: Pico 2 - 9-Octadecenoato de etila – (C18:1)

Esteres_eticos #4565-4580 RT: 42,34-42,47 AV: 16 SB: 82 42,52-42,85 , 41,96-42,30 NL: 3,91E6
T: {0:0} + c EI Full ms [40,00-650,00]

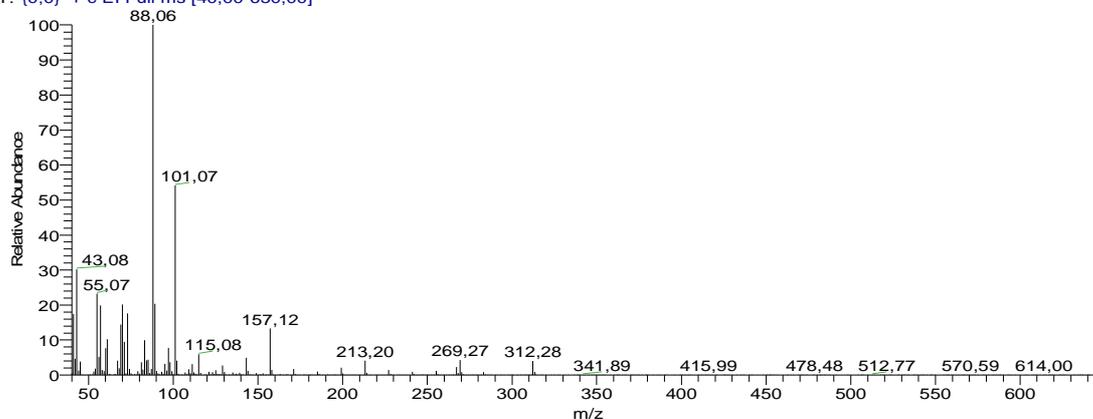


Figura 31: Pico 3 - Octadecanoato de etila – (C18:0)

A amostra metílica constituiu em uma mistura de ésteres metílicos (C16:0; C18:2; C18:1; C18:0).

Tabela 17: Substancias identificadas por CG-EM para amostra de biodiesel metílico

Pico	t _R (min)	Substancias	Massa Molar	Biblioteca
1	34,28	Hexadecanoato de metila	270 g/mol	NIST 2.0
2	39,35	9 – Octadecenoato de metila	296 g/mol	NIST 2.0
3	39,57	9,12–Octadecadienoato de metila	294 g/mol	NIST 2.0
4	40,43	Octadecanoato de metila	298 g/mol	NIST 2.0

Os espectros de massas dos picos identificados são apresentados nas figuras a seguir:

Esteres_Metilicos #3604 RT: 34,27 AV: 1 NL: 5,27E7
T: (0:0) + c EI Full ms [40,00-650,00]

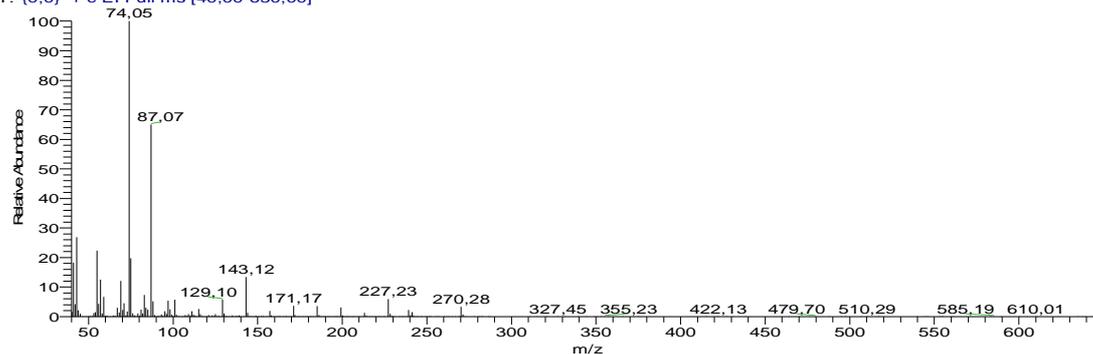


Figura 32: Pico 1 - Hexadecanoato de metila

Esteres_Metilicos #4210 RT: 39,36 AV: 1 NL: 2,42E6
T: (0:0) + c EI Full ms [40,00-650,00]

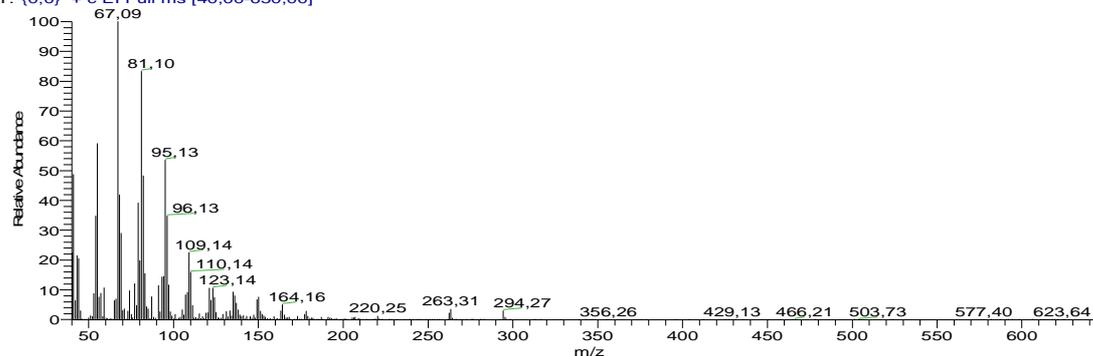


Figura 33: Pico 2 – 9,12 - Octadecadienoato de metila

Esteres_Metilicos #4222-4244 RT: 39,46-39,65 AV: 23 NL: 1,14E7
T: (0:0) + c EI Full ms [40,00-650,00]

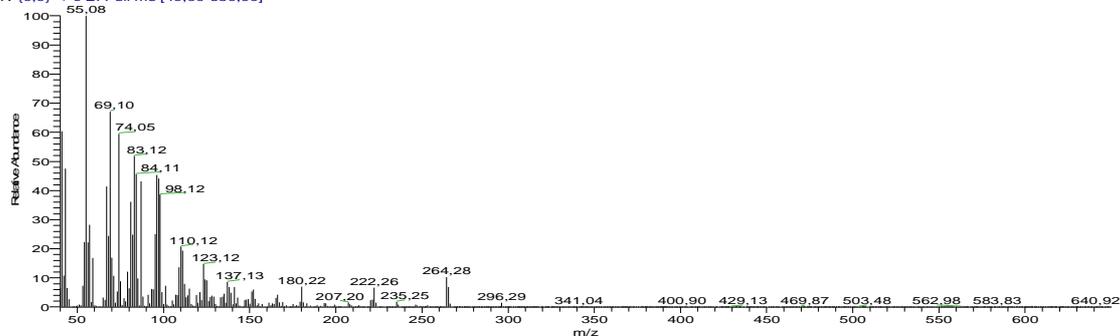


Figura 34: Pico 3 – 9 – Octadecanoato de metila

Esteres_Metilicos #4336 RT: 40,42 AV: 1 NL: 8,51E6
T: (0:0) + c EI Full ms [40,00-650,00]

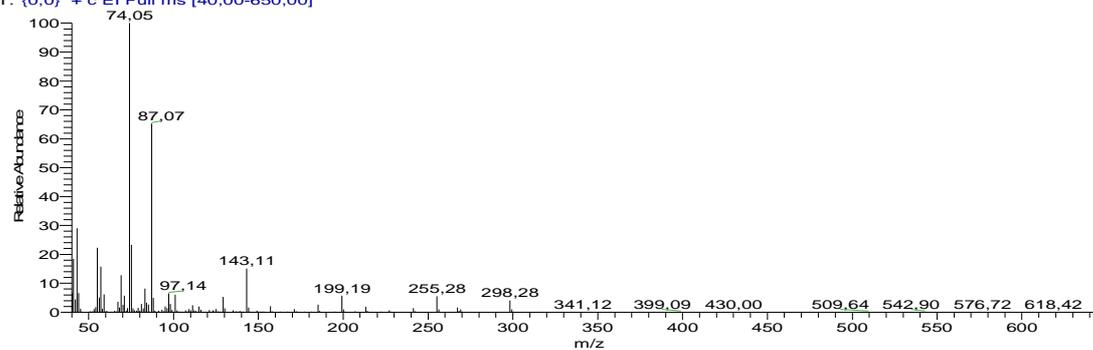


Figura 34: Pico 4 - Octadecanoato de metila

A reação com metanol foi um pouco mais eficiente com rendimento superior com etanol. É possível observar um pico de conversão de FAME C18:2, que não aparece no cromatograma da amostra de ésteres etílicos. Entretanto, a reação com etanol apresenta um resultado bem próximo que foi considerado satisfatório, com rendimento de 86%, tendo em vista que foi realizada com etanol 92GL.

Atualmente a maioria do biodiesel produzido no mundo ocorre através da via metílica, ou seja, o biodiesel produzido mundialmente não é totalmente de fonte renovável (GULDHE *et al.*, 2015). Isso ocorre principalmente devido as barreiras tecnológicas que a via etílica impõe, principalmente para a produção de biodiesel pela catálise básica homogênea, que é o principal processo adotado até o momento. Porém, a utilização de etanol em vez de metanol além de ser ambientalmente mais interessante, já que o etanol é produzido a partir de recursos renováveis; também possui menor toxicidade, quando comparado ao metanol. Além disso, o emprego de etanol favoreceria a economia nacional, já que o Brasil é um dos maiores produtores de etanol do mundo (KUSS *et al.*, 2015).

Os resultados aqui apresentados e em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (CARVALHO, 2014) demonstram a viabilidade técnica de se empregar o processo de hidrólise enzimática via lipase de *Candida rugosa*, seguido de esterificação por catálise heterogênea com sulfato férrico.

6. Conclusão

A andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. é a oleaginosa mais explorada na região Amazônica, e uma grande quantidade de resíduos são gerados por cooperativas extrativistas anualmente. Foi demonstrado que a torta residual da produção de óleo de andiroba pelo processo de prensagem mecânica, apresenta um potencial grande para a produção de óleo.

Apesar da baixa qualidade desse óleo, que não são interessantes para as indústrias cosmética e farmacêutica, podem ser utilizados para produção de biocombustíveis, dentre um conceito de biorrefinaria.

Nesse sentido, foi demonstrado que é possível separar desse óleo residual de andiroba por processos cromatográficos e por processos de neutralização, seus limonoides que constituem um elevado valor agregado por suas propriedades medicinal e cosmética.

A fração lipídica, livre de limonoides, foi então convertida pelo processo de hidrólise seguido de esterificação, que é um processo alternativo à transesterificação por catálise básica homogênea. Após triagem de lipases comerciais, foi selecionada a lipase *Candida rugosa*. Após a realização do planejamento estatístico composto central e análise de superfície de resposta, foi possível estabelecer a melhor condição catalítica da enzima com poucos experimentos. As condições foram 10% de óleo (substrato), tampão fosfato de sódio pH 7,0, 0,1 M, a 50° C, realizadas com 25 mg de enzima, 5% de goma arábica (emulsificante), agitação a 800 rpm, por 2 horas de reação. Foi alcançado um rendimento de 95%. Experimentos em maior escala confirmaram as condições reacionais.

A partir dos produtos hidrolisados obtidos, foram feitas as reações de esterificação etílica e metílica pela catálise heterogênea com sulfato férrico. Observou-se um bom rendimento em teor de ésteres, de 86% e 91% de biodiesel etílico e metílico, respectivamente. O biodiesel etílico apresentou um rendimento satisfatório, esse resultado foi considerado bastante promissor já que não existem processos a via etílica, principalmente com etanol hidratado.

O processo de hidrólise enzimática com lipase de *Candida rugosa* seguido de esterificação por catálise heterogênea com sulfato férrico é um processo bastante interessante para as fontes oleaginosas da Amazônia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B. Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, 63, 138–148, 2012.

ABREU, F.R.; LIMA, D.G.; HAMÚA, E.H.; WOLF, C.; SUAREZ, P.A.Z.; Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 209, 29–33, 2004.

ADASHI, D.; HAMA, S.; NAKASHIMA, K.; BOGAKI, T.; OGINO, C.; KONDO, A.; Production of biodiesel from plant oil hydrolysis using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst thightly expressing *Candida Antarctica* lipase. *Bioresource Technology*, 135, 410–6, 2013.

AFFLECK, R.; XU, Z.F.; SUZAWA, V.; FOCHT, K.; CLARK, D.S.; DORDICK, J.S. Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 1100–4, 1992.

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study. *Biotechnology Progress*, 21, 1442–8, 2005.

AMBROZIM, A.R.P.; LEITE, A.C.; BRUNO, F.C.; VIEIRA P.C.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C.; SILVA, G.F.; PAGNOESA, F.C.; HEBLING, M.J.A.; JUNIOR, M.B.J.; Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *Journal Brazilian Chemical Society*, 17 (3), 542 – 547, 2006.

Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução ANP N. 14, de 11.05.2012 (DOU 18.5.2012).

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis—key factors affecting efficiency of the process. *Renew Energy*, 34, 1185–94, 2009.

ARANSIOLA, E.F.; OJUMU, T.V.; OYEKOLA, O.O.; MADZIMBAMUTO, T.F.; IKHU-OMOREGBE, D.I.O. A Review of corrente technology for biodiesel production: state of the art. *Biomass and Bioenergy*, 61, 276-297, 2014.

ARAÚJO, M.S.M.; SILVA, C.; CAMPOS, C.P. Land use change sector contribution to the carbon historical emissions and the sustainability—case study of the Brazilian Legal Amazon. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 696–702, 2009.

BARBOSA, B.S.; BARRETO, A. C., KOOLEN, H. H. F.; FIGLIUOLO, R.; SILVA, J. D.; NUNOMURA, S. M. Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do Amazonas na produção de biodiesel. *Acta Amazônica*, 39(2), 371-376, 2009.

BARRETO, A. C. *Óleo e biodiesel de uricurí (Scheelea phalerata Mart. Ex Spreng)*, p.174. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

BARRETO, E. J. F.; GONZALES, W. A.; Biodiesel e óleo vegetal in natura: Soluções energéticas para Amazônia. MME. Brasília, 170 p., 2008.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A.; *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14,1069–87, 1998.

BERNARDES, O.L.; BEVILAQUA, J.V.; LEAL, M.C.; FREIRE, D.M.; LANGONE, M.A. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 105–14, 2007.

BISEN, P.S.; SANODIYA, B.S.; THAKUR, G.S.; BAGHEL, R.K.; PRASAD, G.; Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*, 32, 1019–30, 2010.

BRADDOO, S.; RATHI, P.; SAXENA, R.; GUPTA, R.; Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51, 115–20, 2002.

BRASIL, Ministério de Minas e Energia. *Programa Nacional de Produção e uso de biodiesel*. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/>> Acesso em: 02.04.2016

CARVALHO, A.K.F.; FARIA, E. L.P.; RIVALDIA, J.D.; ANDRADEB, G.S.S.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. *Industrial Crops and Products*, 67, 287–294, 2015.

CARVALHO, A.K.F.; RÓSA, P.C.M.; TEIXEIRA, L.F.; ANDRADEB, G.S.S.; ZANIC, G.M.; CASTRO, H.F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. *Industrial Crops and Products*, 50, 485– 493, 2013.

CARVALHO, K.M.G. Hidrólise enzimática do óleo de amêndoas de tucumã na síntese de biodiesel etílico via processo hidrólise-esterificação. p. 130. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2014.

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

CENBIO, Centro Nacional de referência em biomassa (Brasil). *Relatório projeto GASEIFAMAZ*: São Paulo, 2003.

CHEN, J.W.; WU, W.T.; Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 466–9, 2003.

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

CORREIA, J. C.; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, L. P.; MENDES, N.B.; COSTA, M. S. T.; BARRETO, A.C.; CUNHA, T. M.F.; KOOLEN, H.H.F. 2006, Brasília. Livro de resumos. 1º Congresso da rede brasileira de biodiesel. Produção sustentável de biodiesel a partir de oleaginosas amazônicas em comunidades isoladas. P. 285-289.

DAHIYA, S.A.; KUMAR, N.J.; SRAVAN, S.; CHATTERJEE, S.; SARKAR, O.; MOHAN, S.V. Food waste biorefinary sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 248, 2 – 12, 2018.

DI LASCIO, M. A.; BARRETO, E. J. F. *Energia e Desenvolvimento Sustentável para a Amazônia Rural Brasileira*. Kaco Gráfica e Editora: Brasília, p. 192, 2009.

FADILUOLU, S.; SOYLEMEZ, S. Olive oil hydrolysis by Celite immobilized *Candida rugosa* lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3411-3414, 1998.

FEOFILOVA, E.; SERGEEVA, Y.E.; IVASHECHKIN, A. Biodiesel-fuel: content, production, producers, contemporary biotechnology (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 369–78, 2010.

FJERBAEK, L.; CHISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1298–315, 2009.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R.O.; PRYDE, E.H.; Transesterification kinetics of soybean oil 1. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 1375–80, 1986.

GONÇALVES, J.D.; AZNAR, M.; SANTOS, G.R. Liquid–liquid equilibrium data for systems containing Brazil nut biodiesel + methanol + glycerin at 303.15 K and 323.15 K *Fuel*, 133, 292–298, 2014.

GUI, M.M.; LEE, K.T.; BATHIA, S.; Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, 33, 1646–53, 2008.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1447–1464, 2015.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHAI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 763–81, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2), 235-251, 2006.

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKES, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of chromatography A*, 858, 13–31, 1999.

HOMMA, A.K.O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? *Estudos avançados*, 26 (74), 167-186, 2012.

HORWITZ, W. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. V. 2, 17^a ed. Gaithersburg, Md, EUA, 2 (17), 2000.

HUDMAN, P. Energy from waste: Valorising the biorrefinery concept. *Renewable Energy Focus*, 17, 4, 2016.

IHA, O.K.; ALVES., F.C.S.C.; SUAREZ, P.A.Z.; SILVA, C.R.P.; MENEGHETTI, M.R.; SIMONI, M.P. Potential application of *Terminalia catappa* L. and *Carapa guianensis* oils for biofuel production: Physical-chemical properties of neat

vegetable oils, their methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). *Industrial Crops and Products*, 52, 95– 98, 2014.

IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Academic Pres, Orlando, Florida, 1992.

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

JEGANNATHAN, K.R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E.S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase – a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 253–64, 2008.

KABBASHI, N.A.; MOHAMMED, N.I.; ALAM, M.D.Z.; MIRGHANI, M.E.S. Hydrolysis of Jatropha curcas oil for biodiesel synthesis using immobilized *Candida cylindracea* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 116, 95–100, 2015.

KALTNER, F. J. Geração de energia elétrica em pequenas comunidades da amazônia, utilizando óleo vegetal “in natura” de espécies nativas como combustível em motores diesel. Saex, Módulo-biomassa, p. 9, 2004.

KINNEY, A.; CLEMENTE, T. Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel Process Technology*, 86, 1137–47, 2005.

KNOTHE, G. A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acid methyl esters. *Fuel*, 119, 6–13, 2014.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 36, 364–373, 2010.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technology*, 86, 1059–70, 2005.

KRAWCZK, T. Biodiesel – Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *Informed*, 7, 801–22, 1996.

KULKARNI, M.G.; DALAI, A. K. Waste cooking oil – an economical source for biodiesel: a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 2901–2913, 2006.

KUSS, V.V.; KUSS, A.V.; ROSA, R.G.; ARANDA, D.A.G.; CRUZ, Y.R. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 1013-1020, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*, 2^a ed, Sarvier: São Paulo, 1995.

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

LOURINHO, G.; BRITO, P.; Advanced biodiesel production technologies: novel developments. *Environmental Science and Bio/Technology*, 14, 287–316, 2015.

LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T.; Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 122–5, 2009.

MARÍA, P. D.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances*, 24, 180 – 196, 2006.

MA, F.; HANNA, M.A.; Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70, 1–15, 1999.

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

MATA, T.M.; SOUSAB, I.R.; CAETANOAB, N.S.; Transgenic corn oil for biodiesel production via enzymatic catalysis with ethanol. *Chemical Engineering Transactions*, 27, 20–4, 2012.

MATOSA, F.B.; CAMACHOB, J.R.; RODRIGUES, P.; GUIMARÃES, S.C. A research on the use of energy resources in the Amazon. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 3196– 3206, 2011.

MESSIAS, J. M.; Costa, B. Z.; LIMA, V.M.G.; GIESE, E.; C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. *Semina: Ciências exatas e tecnológicas*, Londrina. 2 (32), 213-234, 2011.

MORETTO, E.; FETT, R. *Óleos e Gorduras Vegetais (Processamento e Análises)*. UFSC: Florianópolis, p. 177, 1989.

NAGESHA, G.K.; MANOHAR, B.U.; DAYA, S.K.; Enzymatic esterification of free fatty acids of hydrolysed soy deodorized is tillate in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 32,137–45, 2004.

NARASIMHARAO, K.; LEE, A.; WILSON, K.; Catalysts in production of biodiesel: a review. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 1, 19–30, 2007.

NELSON, L.A.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N.; Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 73, 1191–5, 1996.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNKS, R.E. *Como fazer experimentos*. 3 ed., Editora Unicamp: São Paulo, 2007.

PANTOJA, S.S.; CONCEIÇÃO, L.R.; COSTA, C.E.F.; ZAMIAM, J.R.; ROCHA, G.N.; Oxidative stability of biodiesels produced from vegetable oils having different degrees of unsaturation. *Energy Conversion and Management*, 74, 293–298, 2013.

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29, 82–93, 2009.

PESCE, C. *Oleaginosas da Amazônia*. 2 ed., Museu Paraense Emílio Goeldi, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural: Belém, 2009.

PNUD - PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil em 2013. Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/>> Acesso em: 02.04.2016

POCKLINGTON, W.D. Determination of the iodine value of oils and fats. *International union of pure and applied chemistry*, 62, 12, 2339 – 2343, 1990.

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

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99, 3975–81, 2008.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. *Advances in colloid and interface science*, 147–148, 237–250, 2009.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; DE OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Comparison of two Lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry. *Industrial & engineering chemistry research*, 47, 1760-1765, 2008.

ROBLES, M. A.; GONZALEZ, M.P.; ESTEBAN, C.L.; MOLINA, G.E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27, 398–408, 2009.

RODRIGUES, J.A.P. Do engenho a biorrefinaria: A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. *Química Nova*. 34, 7, 2011.

RUA, M.L.; SCHMIDT, D.C.; WAHL, S.; SPRAUER, A.; SCHMID, R.D.; Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, 56, 89–102, 1997.

SÁ, C.P.; BAYMA, M.M.A.; WADT, L.H.O.; *Coeficientes técnicos, custo e rentabilidade para a coleta de castanha-do-brasil no Estado do Acre: sistema de produção melhorado*. Embrapa: Rio Branco, p.4, 2008.

SANTOS, A.L.; KUNRATH, N.F.; SOUZA, I.S.S.; CARVALHO, E.G. Avaliação físico-química de óleo residual de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e sua conversão em biodiesel. *Enciclopédia biosfera*, 11 (22), 3550, 2015.

SANTOS, N.A.; SANTOS, J.R.J.; BICUDO, I.M.G.; SANTOS, F.S.M.; ANTONIOSI, N.R.; FERNANDES, V.J. SOUZA, A.G. Thermo-oxidative stability and cold flow properties of babassu biodiesel by PDSC and TMDSC techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 97(2), 611–614, 2009.

SAXENA, R.; GHOSH, P.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADDOO, S.; GUTALI, R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, 77, 101–115, 1999.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiology Methodology*, 52 (1), 1-18, 2003.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. Transesterification of Vegetable Oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9(1), 199-210, 1998.

SERRI, N.A.; KAMARUDIN, A.H.; RAHAMAN, S.N.A. Preliminary studies for production of fatty acids from hydrolysis of cooking palm oil using *C. rugosa* Lipase. *International journal of physical sciences*, 19, 79–88, 2008.

SCHMIDT, D.C. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, 2123–2130, 1999.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627–622, 2001.

SHARMA, Y.C. SINGH, B. Development of biodiesel: current scenario. *Renewable & Sustainable Energy Review*, 13, 1646–51, 2009.

SILVA, M. C. H.; RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M. Alternativas Verdes para o Preparo de Amostra e determinação de Poluentes Fenólicos em Água. *Química Nova*, 33 (6), 1370- 1378, 2010.

SOARES, A. B.; SILVA, P. R. N.; STUMBO, A. M.; FREITAS, J. C.C. Emprego de catalisadores heterogêneos de CaO e SnO_2 suportados em cinza de casca de arroz na obtenção de biodiesel. *Química Nova*, 35 (2), 268-273, 2012.

SOUSA, J. S.; OLIVEIRA-CAVALCANTE, E. A.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65, 133–137, 2010.

SPERANZAL, P.; RIBEIRO, A.P.B.; MACEDO, G.A. Lipase catalyzed interesterification of Amazonian pataúá oil and palm stearin for preparation of specific-structured oils. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (12), 8268–8275, 2015.

STACHIW, R.; RIBEIRO S.B.; JARDIM M.A.G.; POSSIMOSER, D.; ALVES, W.C.; CAVALHEIRO, W.C.S.; Potencial de produção de biodiesel com espécies oleaginosas nativas de Rondônia, Brasil. *Acta da Amazônia*, 46(1), 81 – 90, 2015.

SUNNA, A.; HUNTER, L.; HUTTON, C.A.; BERGGUIST, P.L.; Biochemical characterization of a recombinant thermo alkalophilic lipase and assessment of its substrate enantio selectivity. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 472–6, 2002.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C. FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 207–212, 2010.

TAMALAMPUDI, S. TALUKDER, M.R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H.; Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 185–9, 2008.

TEOFILO, R.F e FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29, 2, 338 – 350, 2006.

TING, W.J.; HUANG, C.M.; GIRIDHAR, N.; WU, W.T.; An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil . *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39, 203–10, 2008.

TIOSSO, P.C.; CARVALHO, A.K.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31 (04), 839 - 847, 2014.

TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of Gum Arabic on Lipase Interfacial Binding and Activity. *Analytical Biochemistry*, 294, 36 – 43, 2001.

VAKHLU, J.; KOUR, A.; Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 561–567, 2006.

VYAS, A.P.; VERMA, J.L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. *Fuel*, 89, 1–9, 2010.

WOOLLEY, P. e PETERSEN, S.B. *Lipases: their structure, biochemistry and application*. 2 ed, Cambridge University Press: Cambridge, 2011.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNKS, R.E. *Como fazer experimentos*. 3 ed., Editora Unicamp: São Paulo, 2007.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 84, 1015–21, 2007.

YUZBASHEVAA, Y. E.; GOTOVTSEVB, P.M.; MOSTOVAA, E.B.; PERKOVSKAYAA, N.I.; LOMONOSOVAB, M.A.; BUTYLINB, V.V. SINEOKIIA, S.P.; VASILOVB, R.G. Biodiesel Production via Enzymatic Catalysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50 (8), 737–749, 2014