



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA
INSTITUTO DE ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL - IEDS
CURSO DE ENGENHARIA DE ENERGIAS**

PEDRO HENRIQUE DE LIMA GOMES

**ÓLEO DE FRANGO COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL: EMPREGO DE LIPASES COMBINADAS COMO CATALISADOR**

**ACARAPE
2017**

PEDRO HENRIQUE DE LIMA GOMES

**ÓLEO DE FRANGO COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL: EMPREGO DE LIPASES COMBINADAS COMO CATALISADOR**

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Energias do Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energias.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Coorientadora: Profa Dra. Maria Cristiane Martins de Souza.

**ACARAPE
2017**

**Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro- Brasileira
Direção de Sistema Integrado de Bibliotecas da UNILAB (DSIBIUNI)
Biblioteca Setorial Campus Liberdade
Catalogação na fonte**

Bibliotecário: Gleydson Rodrigues Santos – CRB-3 / 1219

G615p Gomes, Pedro Henrique de Lima.
Óleo de frango como matéria-prima para a produção de biodiesel: emprego de lipases combinadas como catalisador. / Pedro Henrique de Lima Gomes. - Redenção, 2018.
81f : il.
Monografia - Curso de Engenharia De Energias - Semestral, Instituto De Engenharias E Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2018.
Orientador: José Cleiton Sousa dos Santos.
Coorientador: Maria Cristiane Martins de Souza.
Inclui figuras, tabelas e referências.

1. Biodiesel - Brasil. 2. Biocombustíveis - Brasil. 3. Ésteres Etfílicos (biodiesel). I. Título.

CDD 338.476655384

PEDRO HENRIQUE DE LIMA GOMES

**ÓLEO DE FRANGO COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL: EMPREGO DE LIPASES COMBINADAS COMO
CATALISADOR**

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Energias do Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energias.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza.

Aprovado em 20/12/2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos (Orientador)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)



MSc. Davino Machado Andrade Neto

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)



MSc. Camila Peixoto do Valle

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

À Deus. Aos meus amados pais, Maria das Graças de Lima Gomes e Pedro Silva Gomes, e a minha irmã Francisca Beatriz. Essas pessoas sempre me apoiaram e me incentivaram na busca dos meus objetivos, apesar da árdua luta que é estudar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde e força de vontade, por ter me guiado por esta caminhada, e por todas as coisas que contribuíram para que esse momento pudesse acontecer.

À toda a minha família, em especial aos meus pais, Maria das Graças de Lima Gomes e Pedro Silva Gomes, pelo apoio, atenção, incentivo, carinho e amor dados durante essa difícil jornada. E ainda, a Francisca Nayane Saraiva da Silva e minha irmã Francisca Beatriz de Lima Gomes pela compreensão e incentivo dados a mim quando precisei.

Ao professor Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, pela orientação do trabalho, pela confiança, pela paciência, pela dedicação e atenção para comigo, por disponibilizar tudo que estava ao seu alcance para me ajudar e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho com o senhor.

À professora Dra. Maria Cristiane Martins de Souza, pela também orientação do trabalho, pela paciência, disposição de tempo, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biomassa, local que pude aprender a desenvolver competências necessárias para executar esse trabalho.

Ao professor Dr. Aluísio Marques da Fonseca pela sua colaboração com esse trabalho e por disponibilizar equipamentos e o espaço do laboratório de química inorgânica vinculado ao instituto de ciências exatas e da natureza – (ICEN), para a execução das atividades exigidas neste trabalho.

Aos técnicos de laboratório do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável – (IEDS), em especial a Ana Kátia de Sousa Braz, pelo empenho, dedicação, orientação e por todo o auxílio prestado na execução das diversas atividades laboratoriais.

Aos técnicos de laboratório do instituto de ciências exatas e da natureza – (ICEN), em especial a Camila Peixoto do Valle e Davino Machado Andrade Neto, pelo empenho, dedicação, orientação e também por todo o auxílio prestado na execução dos ensaios experimentais descritos nesse TCC.

A todos que fazem a Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - (UNILAB) acontecer, e a todos os professores, técnicos e auxiliares administrativos que fazem parte do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável – (IEDS), por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Aos meus amigos de ingresso e colegas do curso de Engenharia de Energias, e a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse sonho.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

(Ayrton Senna)

RESUMO

A síntese de biodiesel via rota enzimática oferece muitas vantagens frente a rota química, tais como uma elevada seletividade, menor formação de produtos secundários e resíduos, e fácil recuperação dos biocatalisadores. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo a produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir da esterificação do óleo de frango tendo como catalizador lipases combinadas. Neste trabalho a combinação de lipases foi utilizada partindo do princípio que a combinação pode aumentar a taxa de reação, diminuir os níveis de glicéridos residuais e ampliar o nível de especificidade ao substrato. A síntese de ésteres etílicos foi realizada em seguida aos ensaios de caracterização físico-química e determinação do perfil de ácidos graxos (obtidos por CG-EM) realizados para o óleo de frango. Buscando avaliar o comportamento das lipases foram realizados ensaios para avaliar a atividade enzimática, para observar a estabilidade operacional e a cinética reacional das mesmas. As reações de esterificação ocorreram na presença da combinação das lipases comerciais Lipozyme[®] RM-IM (75%) e Novozym[®] 435 (25%), para uma razão molar de 1:1 (etanol: óleo de frango), em agitação de 150 rpm e para as condições impostas pelo planejamento experimental fatorial completo 2³ gerado pelo software STATISTICA[®] 10.0. As superfícies de respostas geradas no tratamento estatístico identificaram que a melhor conversão em ésteres etílicos (58,85±0,38%) é obtida a 40°C, usando 6% de biocatalisador e 10% de água. Análise estatística realizada indicou que existe uma influência significativa, de forma independente, da temperatura, massa de catalisador e teor de água sobre o valor da conversão em ésteres etílicos. Por fim, os ésteres etílicos passaram por uma caracterização físico-química e por uma análise qualitativa através da Cromatografia em Camada Delgada – (CCD), confirmando a formação dos ésteres etílicos (biodiesel) e a presença de ácidos graxos não reagidos. Este trabalho aproveita e agrega valor a gordura de frango (resíduo industrial) ao produzir biodiesel (biocombustível de alto valor comercial) ao passo que busca otimizar essa produção usando combinação de lipases como catalisador.

Palavras-Chave: Óleo de frango. Esterificação. Software STATISTICA[®]. Ésteres Etílicos (biodiesel). Enzimas comerciais (lipases).

ABSTRACT

The synthesis of biodiesel via the enzymatic route offers many advantages over the chemical route, such as high selectivity, lower formation of by-products and residues, and easy recovery of the biocatalysts. In this context, the present work has the objective of producing ethyl esters (biodiesel) from the esterification of the chicken oil with combined lipases as catalysts. In this work the lipase combination was used based on the principle that the combination could increase the reaction rate, decrease residual glyceride levels and increase the level of specificity to the substrate. The synthesis of ethyl esters was carried out following the physico-chemical characterization and determination of the fatty acid profile (obtained by GC-MS) performed for chicken oil. In order to evaluate the behavior of the lipases, assays were performed to evaluate the enzymatic activity, to observe the operational stability and the reaction kinetics of the same. The esterification reactions occurred in the presence of the combination of the commercial lipases Lipozyme® RM-IM (75%) and Novozym® 435 (25%), at a molar ratio of 1:1 (ethanol: chicken oil) and for the conditions imposed by the 2³ complete factorial experimental design generated by STATISTICA® 10.0 software. The response surfaces generated in the statistical treatment identified that the best conversion to ethyl esters (58.85 ± 0.38%) was obtained at 40 °C using 6% biocatalyst and 10% water. Statistical analysis performed indicated that there is a significant influence, independently, of temperature, mass of catalyst and water content over the conversion value to ethyl esters. Finally, the ethyl esters underwent a physicochemical characterization and a qualitative analysis through Thin Layer Chromatography (TLC), confirming the formation of the ethyl esters (biodiesel) and the presence of unreacted fatty acids. This work harnesses and adds value to chicken fat (industrial waste) when producing biodiesel (biofuel of high commercial value) while seeking to optimize this production using a combination of lipases as a catalyst.

Key-words: Chicken oil. Esterification. STATISTICA® 10.0 software. Ethyl Esters (biodiesel). Commercial enzymes (lipases).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil brasileiro de matérias-primas consumidas na produção de biodiesel.	21
Figura 2 - Vantagens da rota enzimática sobre os métodos convencionais de obtenção de biodiesel.	22
Figura 3 - Estrutura tridimensional da CALB.	25
Figura 4 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	26
Figura 5 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	27
Figura 6 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3-específica	28
Figura 7 – Óleo de frango no seu estado bruto (conforme obtido em coleta) e após a exposição ao tratamento térmico e mecânico (40°C e agitação constante), de filtragem e de desumidificação (usando Celite® Diatomite e Sulfato de Sódio Anidro).	32
Figura 8 - Equipamento usado nos ensaios oxidativos segundo a EN 14112 (Rancimat 873 da METROHM®).	34
Figura 9 - Stabinger Viscometer™ SVM 3000 da marca Anton Paar utilizado na determinação da Viscosidade Cinemática (mm ² /s) e Densidade (g/cm ³).	35
Figura 10 - Reação de Esterificação	38
Figura 11 - Cromatograma do óleo de frango obtido através do CGMS-QP2010 SE da marca SHIMADZU. As demais especificações são descritas no item 4.5.	44
Figura 12- Conversões da síntese de oleato de etila para as combinações de enzimas: Lipozyme® TL-IM e Lipozyme® RM-IM (■), Lipozyme® TL-IM e Novozym® 435(●), e Lipozyme® RM-IM e Novozym® 435 (▲); para as condições: razão molar de 1:1 (álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 24 horas.	49
Figura 13 – Cinética da reação de esterificação do óleo de frango na presença da combinação de enzimas (75% de Lipozyme® RM-IM e 25% de Novozym® 435) para as condições: razão molar de 1:1 (álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 12h, 24h, 36h e 48h de reação.	50
Figura 14 - Atividades de esterificação (U/g) referente a enzima Lipozyme® TL-IM, Lipozyme® RM-IM e Novozym® 435 para as condições reacionais (razão molar de 1:1 (Ácido: Álcool), 40°C, 150 rpm; 10h, 20h, 40h e 120h de reação).	51
Figura 15 - Gráfico de Pareto gerado da interação entre as variáveis independentes (temperatura, massa de biocatalizador e teor de água) e a variável dependente (conversão em ésteres etílicos).	55
Figura 16 - Valores previstos pelo modelo versus os valores observados experimentalmente para a conversão em ésteres etílicos.	57
Figura 17 - Curva de Resposta e Superfícies de Respostas em função da conversão em ésteres etílicos, para massa de biocatalizador versus teor de água (A); Massa de biocatalizador versus temperatura (B); Temperatura versus teor de água (C).	59
Figura 18 - Estabilidade operacional obtida através da síntese de oleato de etila para a combinação entre as lipases Lipozyme® RM-IM e Novozym® 435, nas proporções 75%:25% (■), 50%:50% (●) e 25%:75% (▲), para as condições adotadas: (razão molar de 1:1 (álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 24h de reação).	61

- Figura 19 - Estabilidade operacional da síntese de oleato de etila para as enzimas Lipozyme[®] TL-IM (◄), Lipozyme[®] RM-IM (◆) e Novozym[®] 435 (▼) para as condições adotadas: (razão molar de 1:1(álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 24h de reação).....62
- Figura 20- Valores de conversão obtidos na esterificação do óleo de frango hidrolisado para a combinação entre as enzimas Lipozyme[®] RM-IM (75%) e Novozym[®] 435 (25%), e para as enzimas individuais Lipozyme[®] TL-IM, Lipozyme[®] RM-IM, e Novozym[®] 435 para as condições reacionais (razão molar de 1:1 (Óleo: Álcool), 40°C, 150 rpm e 24h de reação).63
- Figura 21 – Placa utilizada na CCD para acompanhamento dos experimentos do planejamento experimental e da amostra de partida (óleo de frango hidrolisado).66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal dos principais ácidos graxos de algumas fontes naturais de triacilgliceróis.	23
Tabela 2 – Composição geral da gordura de Frango	23
Tabela 3 - Combinação percentual entre enzimas utilizadas na síntese de oleato de etila. A enzima 1 varia de 0% a 100% enquanto a enzima 2 varia de 100% a 0% garantindo sempre uma massa de catalizador igual a 100%.....	37
Tabela 4 - Valores numéricos e codificados das variáveis adotadas no planejamento experimental para a reação de esterificação do óleo de frango.	40
Tabela 5 - Quantitativo das variáveis adotadas nas reações de esterificação do óleo de frango, geradas pelo planejamento experimental fatorial completo 2 ³	41
Tabela 6 - Ácidos graxos presentes no óleo de frango obtidos por CG-EM. As demais especificações são descritas no item 4.5.....	45
Tabela 7 - Resultados da análise físico-química do óleo de frango para os ensaios de índice de Acidez e Saponificação, Estabilidade Oxidativa, Umidade, Densidade e Viscosidade.....	46
Tabela 8 - Planejamento fatorial completo 2 ³ para a reação de esterificação do óleo de frango. Outras especificações são descritas no item 4.9.	53
Tabela 9 - Análise dos fatores de perturbação (efeitos) das variáveis independentes na	54
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para a resposta conversão em ésteres etílicos de óleo de frango para as condições impostas pelo planejamento descrito no item 5.6.1.	58
Tabela 11 - Resultados das análises físico-químicas dos ésteres etílicos (biodiesel).....	64

LISTA DE SIGLAS

DCCR -	Delineamento Composto Central Rotacional
MSR -	Metodologia de Superfície de Respostas
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
PNPB -	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
ANP -	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
CALB -	Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B
UFC -	Universidade Federal do Ceará
CG-EM -	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa
ANOVA -	Análise de Variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Biocatálise	19
3.2	Biocombustíveis	19
3.3	Biodiesel no Brasil e no mundo	20
3.3.1	Síntese de biodiesel por rota enzimática	21
3.4	Óleo de frango como matéria-prima	22
3.5	Lipases	24
3.5.1	Novozym [®] 435	25
3.5.2	Lipozyme [®] TL-IM	26
3.5.3	Lipozyme [®] RM-IM	26
3.6	Combinação de lipases	27
3.7	Parâmetros que influênciam as reações	28
3.7.1	Teor de água	28
3.7.2	Temperatura	29
3.7.3	Massa de biocatalisador	29
3.8	Metodologia de Superfície de Resposta – (MSR)	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Enzimas e outros materiais	31
4.2	Tratamento da matéria-prima	31
4.3	Obtenção do óleo de frango hidrolisado	32
4.4	Caracterização físico-química do óleo de frango	33
4.4.1	Índice de Acidez	33
4.4.2	Estabilidade Oxidativa	33
4.4.3	Índice de Saponificação	34
4.4.4	Densidade e Viscosidade	35
4.4.5	Umidade	35
4.5	Determinação do perfil de ácidos graxos	36
4.5.1	Cálculo da massa molar média do óleo de frango	36

4.6	Determinação da melhor combinação de enzimas	37
4.6.1	Síntese de Oleato de Etila.....	37
4.7	Acompanhamento cinético da reação de esterificação do óleo de frango	38
4.8	Determinação da atividade enzimática	39
4.9	Planejamento Experimental	40
4.9.1	Esterificação do óleo de frango	40
4.10	Estabilidade Operacional dos biocatalisadores	41
4.11	Verificação do comportamento catalítico combinado e individual das lipases ..	42
4.12	Caracterização físico-química dos ésteres etílicos	42
4.13	Cromatografia em Camada Delgada - (CCD)	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Perfil de ácidos graxos do óleo de frango	44
5.1.1	Massa molar média do óleo de frango.....	45
5.2	Caracterização físico-química do óleo de frango	45
5.3	Combinação de enzimas	48
5.4	Cinética da reação de esterificação do óleo de frango	49
5.5	Atividade enzimática	51
5.6	Análise estatística	52
5.6.1	Planejamento experimental.....	52
5.6.2	Análise estatística dos parâmetros de influência da variável resposta	53
5.7	Estabilidade Operacional dos biocatalisadores	60
5.8	Verificação do comportamento catalítico combinado e individual das lipases ..	63
5.9	Análises físico-química dos ésteres etílicos	64
5.10	Análise por Cromatografia em Camada Delgada - (CCD)	65
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	80
	Anexo 1 – Espectros obtidos na Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa - (CG-EM) a partir do óleo de frango	80
	Anexo 2 - Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade	81

1 INTRODUÇÃO

A utilização de combustíveis fósseis está diretamente relacionada a diversos problemas globais, como o efeito estufa, mudanças climáticas e ao surgimento de algumas doenças (LI; DU; LIU, 2007). Por causa desses e outros problemas os países estão criando uma consciência de produção tecnológica mais limpa, levando-os a desenvolverem alternativas aos combustíveis fósseis (ARANSIOLA, 2014). Entre as alternativas estão os biocombustíveis, a exemplo, podemos citar o biodiesel que é uma forma limpa e alternativa de combustível, pois é biodegradável, não tóxico e tem um perfil baixo de emissão de gases poluentes (TABANI, 2012). Devido à sua similaridade com o diesel em conteúdo energético e em algumas propriedades, o biodiesel atraiu à atenção para si em meio aos variados biocombustíveis existentes (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Os meios tecnológicos empregados na produção de biocombustíveis objetivam satisfazer a demanda de energia mundial, ao mesmo tempo que tenta atender questões sociais, econômicas, ambientais e técnicas (JOSHI *et al.*, 2017). A necessidade alimentar e energética é um fato que desafia a humanidade, uma vez que a produção de biocombustíveis a partir de culturas vegetais leva a competição por recursos naturais e agrícolas, influenciando os preços mundiais das commodities agrícolas e a segurança alimentar (TOMEI, 2016; KOIZUMI, 2015). Pensando nisso, as matérias-primas não empregadas na alimentação de pessoas e animais como óleos não comestíveis, resíduos de óleos comestíveis e gorduras animais, se tornaram um grande potencial para produção de biodiesel, pois podem reduzir notavelmente os custos de produção e garantir a viabilidade econômica do processo (PASCHALIDOU; TSATIRIS; KITIKIDOU, 2016).

Geralmente a transesterificação de triglicerídeos junto a um álcool de cadeia curta, sendo o metanol o mais utilizado, e um catalisador alcalino, é hoje a forma mais comum de se produzir biodiesel em escala industrial (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016). No entanto, a reação de transesterificação é sensível a óleos ou gorduras com quantidades significativas de ácidos graxos livres, pois leva o processo a formação de sabão reduzindo o rendimento e complicando o processo de separação dos produtos (LIU, 2015). Na transesterificação além de catalisadores alcalinos podem ser usados catalisadores ácidos, porém ambos reduzem a taxa de reação devido a formação de subprodutos como o glicerol, o que dificultando a separação do biodiesel do catalisador, a sua purificação e outros (VERMA; SHARMA, 2016). Levando em consideração esses e outros problemas aqui não descritos, a esterificação de ácidos graxos na presença de um catalisador enzimático se mostra como uma solução

vantajosa para a produção de biodiesel, pois o processo não forma nenhum sabão, os produtos possuem uma maior pureza, o processo de produção é simplificado, o consumo energético é reduzido e o reciclo e separação do catalisador do meio reacional são facilitados (SOUZA, 2013). As lipases são as enzimas mais utilizadas neste tipo de processo reacional devido à sua ampla especificidade, elevada estabilidade sob diferentes condições e meios de reação, e por conseguirem catalisar uma grande variedade de reações (SANTOS *et al*, 2017). Visando o aumento da taxa de reação, diminuição dos níveis de glicéridos residuais e ampliação do nível de especificidade ao substrato, a combinação de lipases surgiu como proposta a utilização na produção de biodiesel (HAMA; KONDO, 2012). De forma a reduzir o uso de combustíveis fósseis utiliza-se o etanol ao invés do metanol na produção de biodiesel, já que é obtido de origem renovável, possui toxicidade moderada e é de baixo impacto em casos de acidentes (SOUZA, 2013; GOMES, 2009).

Na literatura são encontrados diferentes processos para a produção de biodiesel, tendo aqueles que utilizam reações em condições supercríticas e subcríticas e as que fazem uso de catalisadores químicos ou enzimáticos, podendo ambos serem encontrados na forma heterogênea ou homogênea (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). A reação mais usual e citada na literatura é a transesterificação, sendo esta aplicada a diferentes metodologias. Moreira (2009) na busca da compreensão da influência de alguns parâmetros como concentração de catalisador, razão Álcool: óleo, temperatura e tempo de reação sobre a produção de biodiesel fez uso do catalisador básico hidróxido de sódio e metanol, enquanto Gomes (2010) utilizou hidróxido de sódio e potássio em um sistema de ultrassom. Alptekin e Canakci (2010) visando a otimização da produção de éster metílicos a partir de gordura de frango usou hidróxido de potássio e metanol. Tomiello (2014) verificou experimentalmente a influência da temperatura e dos catalisadores hidróxido de sódio e hidróxido de potássio em um reator submetido a ondas ultrassônicas. Catalisadores sólidos a base de óxidos de cálcio obtidos de cascas de ovos foram usados por Santos, Viana e Sousa (2015) na produção de biodiesel a partir da gordura do frango. Ainda, em meio a literatura foi encontrado o uso de processos não catalítico do tipo fluxo contínuo supercrítico, porém devido ao alto consumo energético solicitado pelas altas pressões e temperaturas não é convencionalmente utilizado (MARULANDA; ANITESCU; TAVLARIDES, 2010). A Produção de biodiesel via catalise enzimática utilizando óleo de frango como matéria-prima possui registros na literatura, a exemplo, temos o estudo realizado por Bet e Rosa (2015) onde foram fixados os parâmetros referentes à temperatura, razão óleo: etanol e tempo levando a lipase Novozyme[®] 435 como catalisador. Já no estudo feito por Feltes *et al.* (2009) foram utilizadas as lipases comerciais

Novozym[®] 435 e Lipozyme[®] RM-IM junto a etanol e um sistema com agitador orbital. Bonissoni et al. (2015) utilizando a lipase comercial Lipozyme[®] RM-IM e um sistema de ultrassom investigou as variáveis razão etanol: óleo, concentração mássica de enzima, temperatura da reação e quantidade de hexano. Em meio as metodologias de produção de biodiesel mencionadas na literatura, esse trabalho buscou preencher lacunas existentes quanto ao uso da combinação de enzimas na esterificação do óleo de frango.

Nesse contexto, o presente trabalho buscou valorizar a gordura de frango como matéria-prima para a produção de biodiesel, via catalise heterogênea, através da combinação de enzimas comerciais. Foi utilizando um delineamento experimental do tipo DCCR, associado a Metodologia de Superfície de Respostas – (MSR), para o estudo da influência da temperatura, teor de água e quantidade de biocatalizador na produção dos ésteres etílicos (biodiesel) para determinar as condições reacionais ótimas. Para isso, foi realizada a esterificação do óleo de frango, previamente hidrolisado, com etanol na presença da combinação de enzimas (75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®] 435) conhecida a partir da reação de esterificação de ácido oleico e etanol. Antes do processo reacional ocorrer foram realizados alguns ensaios de caracterização físico-química da matéria-prima e a determinação do seu perfil de ácidos graxos. De forma a obter o melhor desempenho catalítico, os biocatalisadores foram testados em uma cinética reacional, em um ensaio para avaliar a atividade enzimática e um ensaio para observação da sua estabilidade operacional. Os ésteres etílicos obtidos também passaram pela caracterização físico-química e por uma análise qualitativa através da Cromatografia em Camada Delgada – (CCD).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi realizar a produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir do óleo de frango via catálise enzimática.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar e tratar o óleo de frango bruto.
- Realizar a caracterização físico-química do óleo de frango e dos ésteres etílicos (biodiesel).
- Obter ácidos graxos a partir da matéria-prima estudada.
- Determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de frango.
- Determinar a melhor combinação de enzimas através da síntese de oleato de etila.
- Determinar a atividade e a estabilidade operacional das enzimas.
- Produzir ésteres etílicos (biodiesel) a partir do óleo de frango utilizando a melhor combinação de enzimas estudada na síntese de oleato de etila.
- Utilizar um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – (DCCR) para avaliar a influência da temperatura, massa de biocatalisador e quantidade de água no processo de produção de ésteres etílico a partir do óleo de frango, com o intuito de determinar as condições reacionais ótimas.
- Avaliar qualitativamente os resultados da esterificação do óleo de frango através da Cromatografia em Camada Delgada – (CCD).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocatálise

Os desenvolvimentos sociais e econômicos globais foram principalmente impulsionados pela crescente demanda energética, e as suas consequências ambientais impulsionaram a evolução de tecnologias renováveis no âmbito energético e sustentável em todo o mundo (JOSHI *et al.*, 2017). Atualmente os processos químicos industriais estão sendo gradativamente substituídos por rotas alternativas mais seguras e menos prejudiciais ao meio ambiente, sendo assim, a biocatálise é uma alternativa aos meios convencionais atuais, tendo como agentes catalíticos às enzimas (BOLIVAR; EISL; NIDETZKY, 2015). Em particular, as enzimas fornecem uma maneira mais rica de produzir compostos puros enantioméricos principalmente através de alta quimiosseletividade, regioseletividade e estereosseletividade. (CHOI; HAN; KIM, 2015).

Nas últimas décadas foram desenvolvidas técnicas para melhorar a estrutura das enzimas (e.g. engenharia de proteínas e evolução direta), abordagens de engenharia (e.g. líquidos iônicos e fluidos supercríticos) e estabilização física (e.g. imobilização e CLEAS) o que levou ao melhoramento da biotransformação e a síntese de novos Produtos (ILLANES *et al.*, 2012). A biocatálise está presente nas indústrias de alimentos, de produtos químicos finos e a granel, na farmacêutica, de cosméticos, têxtil e de celulose e papel (CHOI; HAN; KIM, 2015). Baseado nos 12 princípios da química verde a biocatálise busca a alta eficiência dos processos envolvidos através da seletividade e especificidade, condições brandas de operação, baixo gasto energético, livre de reações secundárias e formação de produtos biodegradáveis (LAU; GROSSE, 2013). Contudo, a biocatálise destina-se a desempenhar um papel cada vez maior no atendimento de necessidades sociais e industriais, ao mesmo tempo em que alcança a sustentabilidade ambiental.

3.2 Biocombustíveis

Os biocombustíveis incluem qualquer produto químico enriquecido em energia gerado diretamente através dos processos biológicos ou derivado da conversão química da biomassa por meio de organismos vivos (RODIONOVA *et al.*, 2017). Dentre eles temos o etanol produzido a partir da biomassa celulósica alimentícia ou não, o biodiesel gerado a partir de óleos vegetais e resíduos de animais, e ainda estes podem usufruir de tecnologias que utilizam cianobactérias, microalgas e outros micróbios para a sua obtenção (JOSHI *et al.*, 2017).

Está cada vez mais claro que os biocombustíveis podem ser uma fonte viável de energia renovável em contraste com a natureza finita, a instabilidade geopolítica e os efeitos deletérios globais da energia de combustíveis fósseis (GAURAV, 2017). Ao longo das últimas décadas o enfrentamento dos desafios da energia e do meio ambiente levou a ciência dos biocombustíveis a grandes mudanças em relação à sua taxa de desenvolvimento, foco e países contribuintes (AZADI *et al.*, 2017). Para termos uma ideia da sua importância, entre 1990 e 2014, países como Dinamarca, Suécia e Finlândia tiveram o maior número de publicações per capita no mundo relacionadas a biocombustíveis, da ordem de 113 trabalhos por milhão de habitantes por ano, sendo a fermentação, a hidrólise e a esterificação as vias de conversão mais amplamente estudadas (RODIONOVA *et al.*, 2017).

3.3 Biodiesel no Brasil e no mundo

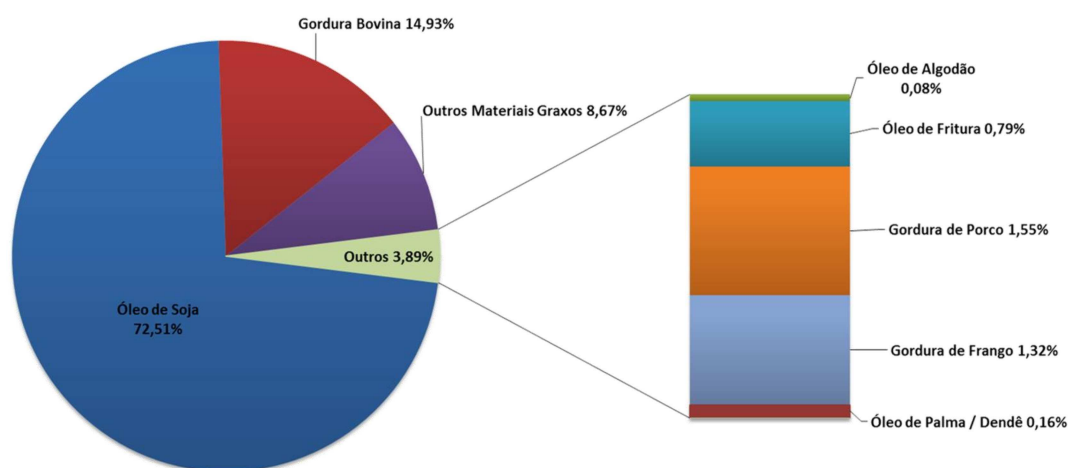
Os ésteres monoalquílicos, mais comumente os ésteres metílicos, de óleos vegetais, gorduras animais ou outros materiais constituídos por triacilgliceróis e ácidos graxos, são muitas vezes referidos como biodiesel, e determinantes, em grande parte, de muitas propriedades importantes ao biocombustível (KNOTHE; RAZON, 2017). O biodiesel, combustível renovável, é obtido majoritariamente por transesterificação, através de um processo que faz triglicerídeos reagirem com um álcool primário, diante de catalisadores, gerando ésteres e glicerina, sendo o primeiro purificado adequadamente e estando dentro especificações de uso e qualidade, é utilizado em automóveis do ciclo Diesel (ANP, 2017b).

No Brasil a política do biodiesel iniciou em entre 2003 e 2004, através de algumas ações, destacando o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel - (PNPB) que tinha o objetivo de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. Contudo, foi só em 2005, por meio do artigo 2º da Lei nº 11.097/2005, que o biodiesel de fato entrou na matriz energética brasileira, vigorando apenas em 2008 a mistura obrigatória de 2% (B2) em todo o território nacional (TIBURCIO, 2011). Com o amadurecimento do mercado brasileiro o percentual de biodiesel ao diesel atual de 8,0% deve chegar a 10% em 2019, conforme consta na lei 13.623/2016, o que garante ao Brasil uma posição de destaque em relação ao resto do mundo a medida que se mostra que o biodiesel já é uma realidade estabelecida no país (ANP, 2017b).

A composição do biodiesel depende da composição da matéria-prima utilizada, uma vez que a composição de ácidos graxos presente é amplamente variável. Além disso, o uso de diferentes matérias-primas está relacionado aos aspectos de rendimento e questões socioeconômicas (KNOTHE; RAZON, 2017). O biodiesel pode ser obtido a partir de óleos

vegetais de colza (União Europeia), soja (Estados Unidos, Argentina e Brasil), óleo de palma (Indonésia, Malásia) dentre outras matérias-primas (PRADO, 2015). Atualmente no Brasil existem 51 plantas produtoras de biodiesel em operação, correspondendo a uma capacidade total de 22.066,81 m³/dia, destes 276,28 m³/dia (1,32%) provem do óleo de frango, sendo a soja (72,51%) a matéria-prima mais utilizada no Brasil seguida da gordura bovina (14,93%), materiais graxos (8,67%) e outros (3,89%) (ANP, 2017a). A figura 1 apresenta o perfil brasileiro de matérias-primas consumidas na produção de biodiesel.

Figura 1 - Perfil brasileiro de matérias-primas consumidas na produção de biodiesel.



Fonte: Boletim Mensal do Biodiesel para o mês de agosto de 2017 (ANP, 2017a).

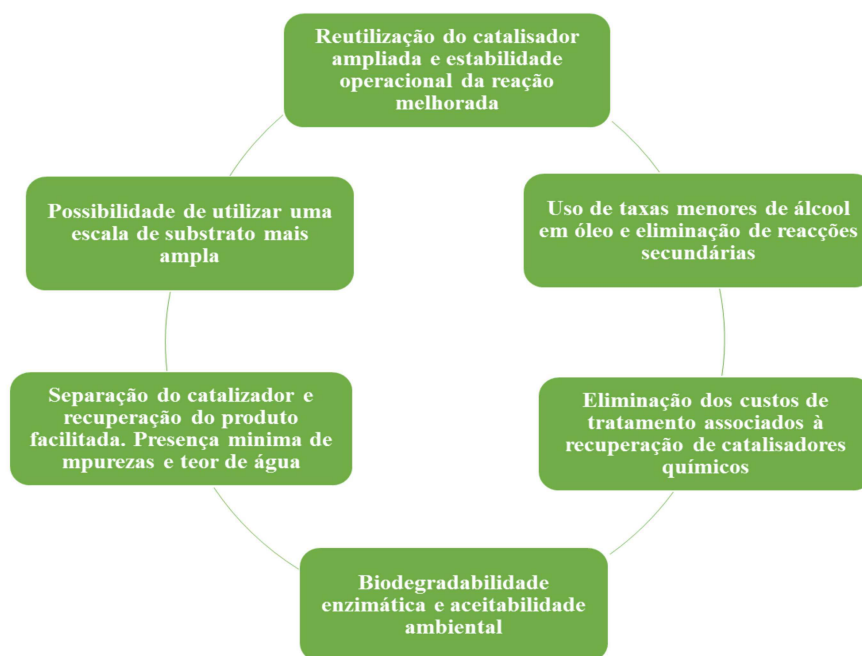
Em 2011 os países com maior produção de biocombustíveis líquidos per capita incluíam os Estados Unidos, Brasil, Argentina e Bélgica, juntos produziram 34,1 MJ/dia, ficando o bioetanol com 80% da produção desses países e o biodiesel um pouco mais de 60% nos países europeus, fazendo assim com que a produção anual mundial de biocombustíveis líquidos aumentasse de 0,3 a 2,0 milhões de barris por dia entre 2000 e 2013 (AZADI *et al.*, 2017).

3.3.1 Síntese de biodiesel por rota enzimática

A catalise enzimática é aplicada em distintas áreas de interesse industrial, incluindo a área de biocombustíveis (CHOI; HAN; KIM, 2015). O biodiesel é um exemplo de biocombustível produzido pela catalise enzimática, e geralmente é sintetizado através da reação de transesterificação de triglicerídeos ou pela esterificação de ácidos graxos livres (SCHUMACHER; GERPEN; ADAMS, 2009). A rota enzimática surge da necessidade em

sanar as desvantagens ocasionadas pelos métodos tradicionais de produção do biodiesel, como a transesterificação ácida /básica que utiliza altas temperaturas de reação, alto consumo de energia, etapas de recuperação de glicerol, lavagens adicionais para remoção de impurezas do biodiesel, e ainda apresentam dificuldades em separar o catalisadores do meio reacional (SOUZA, 2010). A rota enzimática é empregada na produção de biodiesel por apresentar uma série de vantagens ambientais e econômicas sobre a rota química (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). A figura 2 abaixo apresenta algumas dessas vantagens.

Figura 2 - Vantagens da rota enzimática sobre os métodos convencionais de obtenção de biodiesel.



Fonte: Adaptado de (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

3.4 Óleo de frango como matéria-prima

A grande demanda por alimento impulsiona a economia, à medida que a produção industrial cresce para atender essa demanda de mercado, sendo a indústria avícola um exemplo. Esse mercado é competitivo e busca adquirir consumidores através da qualidade de seus produtos e preços mais estáveis (DÍAZ, 2007). O Brasil é o segundo maior produtor de frango no mundo, gerando uma grande quantidade de resíduos por meio da indústria avícola (CNA, 2016). Os resíduos gerados (gordura, ossos, penas, sangue e pele) correspondem a 30% do peso do animal, sendo 2% a 2,5% referente a gordura abdominal e 10% a pele. Um grande impasse é a destinação inadequada deste material, que atualmente é um potencial poluente (CENTENARO; FURLAN; SOARES, 2008). A gordura, resíduo barato e abundante

em lipídeos de baixo valor agregado, pode ser uma alternativa sustentável quando utilizada, á exemplo, na produção de biodiesel (MOREIRA, 2009).

Tabela 1 - Composição centesimal dos principais ácidos graxos de algumas fontes naturais de triacilgliceróis.

FAME	SOJA	MAMONA	PINHÃO MANSO	ALGODÃO	SEBO DE BOI
Mirístico (14:0)	(*)	(*)	(*)	(*)	5,0
Palmítico (16:0)	23,2	2,3	17,9	17,9	29,1
Palmitoleico (16:1)	(*)	(*)	1,0	(*)	3,2
Esteárico (18:0)	5,1	3,0	6,4	3,5	25,3
Oleico (18:1)	29,2	9,9	42,8	24,6	35,8
Ricinoleico (18:1-OH)	(*)	80,3	(*)	(*)	(*)
Linoleico (18:2)	41,0	4,5	31,9	51,6	1,5
Linolênico (18:3)	1,6	(*)	(*)	2,4	(*)

*Não detectados.

Fonte: (SCHULER, 2010).

No Brasil, é proibido a utilização de produtos destinados à alimentação de ruminantes que contenham em sua composição proteínas e gorduras de origem animal, pois apresentam risco de transmissão de doenças (TOMIELLO, 2014). Segundo Centenaro, Furlan e Soares (2008), o trato inadequado dos resíduos industriais contribui para o agravamento dos problemas ambientais, pois na maioria das vezes esses resíduos são lançados, à exemplo, em corpos hídricos. Os óleos vegetais e as gorduras de origem animal, são matérias-primas que se diferenciam-se entre si pela sua composição de triacilgliceróis, que correspondem a mais de 90% em massa do seu conteúdo (SCHULER, 2010). A tabela 1, a seguir, apresenta a composição centesimal dos principais ácidos graxos encontrados em algumas fontes naturais de triacilgliceróis.

Tabela 2 – Composição geral da gordura de Frango

Ácidos Graxos (%)	Gordura de frango
C14:0 mirístico	0,6
C16:0 palmítico	24,7
C16:1 palmitoléico	7,1
C18:0 esteárico	6,0
C18:1 oléico	43,4
C18:2 linoléico	17,2
C18:3 α -linolênico	1,0
Σ Saturados	31,3
Σ Monoinsaturados	50,5
Σ Poliinsaturados	18,2

Fonte: (TOMIELLO, 2014).

A comparação da gordura do frango com outras gorduras animais, como a banha suína e o sebo bovino, mostra que a gordura de frango, em geral, apresenta grande proporção de ácidos graxos insaturados, entorno de 60%. Portanto, altamente insaturada quando comparada ao sebo bovino, apresentando-se semilíquida a temperatura ambiente e devido ao baixo conteúdo de ácidos graxos saturados, tem baixo ponto de ebulição (JUBILUT, 2010).

3.5 Lipases

As lipases são esterases do tipo glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana e são compostas por vários aminoácidos (e.g., glicina, serina, histidina, ácido aspártico ou glutâmico) (MELLO, 2014; SANTOS, 2015). As propriedades estruturais das lipases de diferentes fontes podem exibir diferentes atividades em diferentes substratos, o que pode estar relacionado com a sua classificação (i.e., se são regiosseletivas ou enantiosseletivas) e especificidade ao substrato, podendo ser: lipases específicas de ácidos graxos (1,3-específico) que hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos presentes nas posições 1 ou 3, e não específicas que hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016; PAQUES; MACEDO, 2006).

A atuação de lipases como biocatalisadores em rotas enzimáticas vem crescendo ao longo dos anos, tendo em vista que na literatura estão entre as principais enzimas utilizadas em processos envolvendo biocatálise (SANTOS, 2015). Isso deve-se a sua especificidade, seletividade, capacidade de se adequar a uma ampla gama de substratos e de catalisar reações em meios aquosos e orgânicos. Além disso, por possuírem elevada estabilidade para variados parâmetros e meios reacionais e poderem catalisar variadas reações, incluindo as usadas na produção do biodiesel (SOUZA, 2013; SANTOS *et al.*, 2017). Neste contexto, além das características e vantagens citadas acima, as lipases possuem a capacidade de reação a baixas temperaturas, reduzem o número de passos e a quantidade de resíduos gerados na reação, ocasionando assim um menor impacto ao meio ambiente se comparado aos processos normalmente utilizados pela indústria (POPPE *et al.*, 2015).

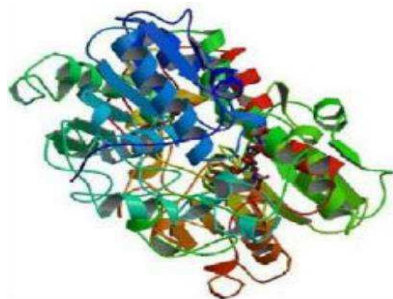
É importante mencionar que o uso de enzimas em aplicações industriais pode ser reforçado através da imobilização enzimática, pois esse mecanismo pode melhorar a estabilidade da enzima, e também alguns outros parâmetros como atividade, seletividade, etc. (SANTOS *et al.*, 2017). Entre os métodos de imobilização mais utilizados estão os que fazem uso de adsorção ou ligação covalente, e os que encapsulam enzimas em matrizes ou membranas poliméricas. Geralmente enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora

possam ser imobilizadas em polímeros solúveis ou insolúveis (SANTOS, 2011). Os métodos e os tipos de suporte utilizados na imobilização enzimática podem ser de origem orgânica ou inorgânica e podem modificar fortemente as propriedades das enzimas imobilizadas (VERDASCO-MARTÍN et al., 2016). A imobilização ajuda a reduzir o custo do catalisador, pois pode ser facilmente separada e reutilizada, e ainda possui atividade catalítica superior a lipases livres (GULDHE et al., 2015).

3.5.1 Novozym® 435

É uma lipase não específica produzida a partir da *Candida antarctica* do tipo B (CALB) e imobilizada em resina acrílica, possui estabilidade em uma ampla faixa de pH e um alto grau de especificidade ao substrato, tanto em relação à regio quanto à enantiosseletividade (NOVOZYMES, 2017). A CALB é constituída de 317 resíduos de aminoácidos, tem uma dimensão de 30Å x 40Å x 50Å, massa molecular de 33KDa (Quilodalton) e ponto isoelétrico de 6,0 (SANTOS, 2011). A figura 3 apresenta a sua estrutura tridimensional. Ao contrário da maioria das lipases, a CALB não apresenta ativação interfacial (i.e., não atuam nas interfaces de gotas insolúveis de substratos), sendo o acesso ao sítio ativo feito por um canal estreito com uma particularidade da existência de uma pequena hélice de elevada mobilidade perto deste sítio (MANOEL, 2011; SANTOS, 2015). Esse canal estreito consiste em uma cavidade para ligações acila e outra porção para ligações com álcoois, podendo algumas lipases apresentarem um impedimento maior ("tampa") na entrada de seu sítio ativo, e outras como a CALB uma tampa menor facilitando a entrada de substratos e saída de produto (SOUZA, 2013).

Figura 3 - Estrutura tridimensional da CALB.



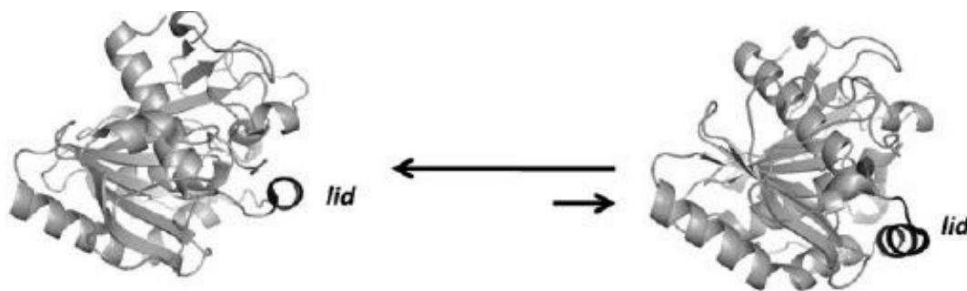
Fonte: (MANOEL, 2011).

3.5.2 Lipozyme® TL-IM

É uma lipase (1,3-específica) produzida a partir da *Thermomyces lanuginosus* e imobilizada em resina de sílica gel. Atua no grupo funcional dos substratos, exclusivamente nas posições 1- e 3- dos triglicerídeos, e além disso, exibe um alto grau de seletividade de substrato permitindo cadeias laterais volumosas/ grandes grupos no álcool e parte ácida da molécula (NOVOZYMES, 2017; BONAZZA *et al.*, 2017).

Essa enzima é uma proteína de cadeia única que consiste em 269 aminoácidos, de peso molecular igual a 31.700 g/mol, ponto isoelétrico de 4,4, de forma aproximadamente esférica (35Å x 45Å x 50 Å), e contém uma estrutura de folha beta central de oito cadeias paralela com cinco hélices alfa interligadas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A figura 4 ilustra a estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, utilizada no preparo do derivado enzimático comercial Lipozyme® TL-IM e destaca o equilíbrio entre as formas inativas (com a tampa (lid) em sua posição original) e ativa (com a tampa (lid) aberta oferecendo acesso ao sítio ativo da enzima) (FABER, 2000). A tampa é um loop de superfície móvel alfa-helicoidal constituído por aminoácidos que cobre o local ativo, e de acordo com estudos cristalográficos de raios-X, esta tampa também é altamente móvel nos cristais (FONSECA, 2015).

Figura 4 - Estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.



Fonte: (FONSECA, 2015).

3.5.3 Lipozyme® RM-IM

É uma lipase (1,3-específica) produzida a partir do fungo *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina, age principalmente no grupo funcional dos substratos especificamente nas posições 1- e 3- dos triglicerídeos, sendo altamente eficaz na transesterificação estereosseletiva e hidrólise das ligações éster em glicerídeos, e possui uma atividade da ordem de 275 IUN / g (unidade de interesterificação) (INC, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Essa lipase é uma proteína extracelular de origem fúngica constituídas de 269 aminoácidos de massa molecular de 29 KDa, ponto isoelétrico de 3,8 e é formada pelos resíduos dos

aminoácidos serina, histidina e aspartato, sendo a região da tampa hidrofóbica constituída dos resíduos de aminoácidos da posição 85 até a 91 (OLIVEIRA, 2012a). Por meio da figura 5 podemos observar a estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*.

Figura 5 - Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*.



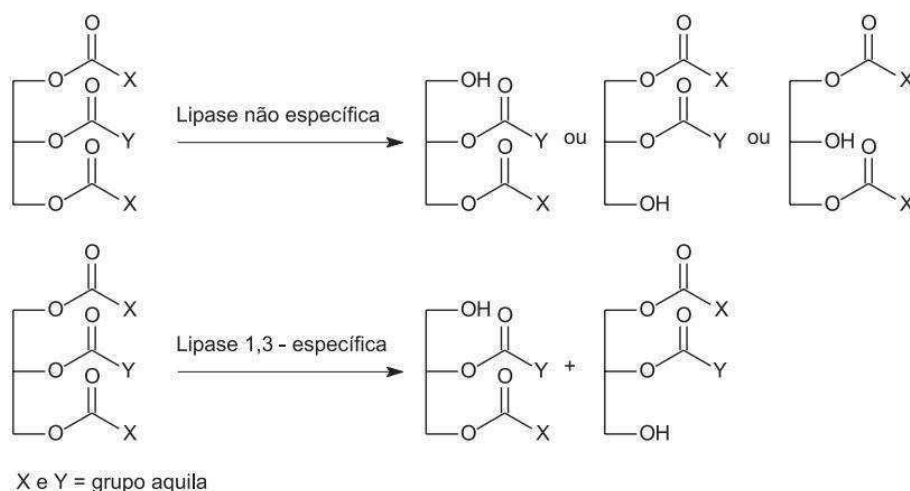
Fonte: (OLIVEIRA, 2012a).

3.6 Combinação de lipases

Segundo Hama e Kondo (2012) a combinação de lipases aumenta a taxa de reação e diminui os níveis de glicéridos residuais do processo, além de ampliar o nível de especificidade ao substrato. Em um determinado substrato, podem haver ao mesmo tempo ácidos graxos, mono ou diglicerídeos exigindo das enzimas uma atividade diversificada, e que pode ser conseguida da combinação de enzimas, como afirma Alves *et al.* (2014) em seu trabalho. Conforme Rodrigues e Ayub (2010), essa combinação gera um ataque enzimático as diferentes posições dos triglicerídeos contidos no substrato.

A combinação realizada entre lipases não-específicas e 1,3-específicas proporciona um aumento da conversão reacional, uma vez que as lipases não-específicas catalisam o substrato independente da região do grupo funcional, compensando assim o comportamento regioseletivo das lipases 1,3-específicas, que podem clivar ácidos graxos das posições terminais do glicerol em triglicerídeos (VÉRAS, 2012). Além disso, como as lipases apresentam diferentes especificidades de substrato e atividade catalítica, a sua combinação favorecerá a formação do produto desejado ao final do processo reacional (GULDHE *et al.*, 2015). A figura 6, a seguir, ilustra o ataque enzimático realizado pelas enzimas 1,3-específicas e não específicas sobre triglicerídeos.

Figura 6 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3-específica



Fonte: (PAQUES; MACEDO, 2006).

3.7 Parâmetros que influenciam as reações

Pesquisas atuais voltadas para a produção de biodiesel via rota enzimática têm focado na otimização dos processos de produção, no sentido de se obter bons rendimentos reacionais e detalhar a influência dos fatores envolvidos na atividade catalítica das lipases. (NETO, 2002). Esses fatores são o tipo de álcool empregado, concentração da enzima e de água no meio de reação, razão molar entre o óleo e o álcool, temperatura, agitação, tipo de suporte de imobilização e presença ou ausência de solvente orgânico no meio reacional (POPPE, 2012). Tais fatores estão sendo observados, uma vez que estes afetam de maneira significativa o rendimento das reações (KOCHEPKA, 2015). Serão abordados a seguir, entre os fatores citados, apenas os considerados no presente estudo.

3.7.1 Teor de água

A quantidade de água na mistura de reação enzimática é um parâmetro crítico e tem forte influência sobre a atividade catalítica, sobre a estabilidade das lipases, e ainda, tem um efeito termodinâmico no equilíbrio da reação, podendo reduzir o rendimento de ésteres alquílicos à medida que favorece a reação de hidrólise (BABAKI, 2016). Sabe-se que a enzima precisa de uma certa quantidade de água para manter sua conformação adequada, sendo assim, se faz necessário meios de reação com um certo teor de água, tendo cuidado na quantidade pois um alto teor de água pode diminuir a estabilidade da enzima. (CHRISTOPHER *et al.*, 2013). O conteúdo ótimo de água presente no meio reacional depende da lipase e matéria-prima usada, da técnica de imobilização empregada e do tipo de solvente utilizado (GULDHE *et al.*, 2015).

A água é responsável por realizar a hidrólise da molécula de triacilglicerol, liberando os ácidos graxos para serem esterificados, e além disso, ela é necessária para hidratar a enzima fazendo com que a mesma possa aproximar seu sítio ativo do substrato e promover sua ação hidrolítica (HAMA; KONDO, 2013). A água aumenta a região interfacial (água/óleo) e, portanto, a área de ação da enzima, melhorando assim sua atividade. (CHRISTOPHER *et al.*, 2013).

3.7.2 Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores operacionais de processos indústrias, uma vez que a temperatura se relaciona com o gasto energético, fazendo com que os produtos obtidos aumentem de valor (ENCARNAÇÃO, 2008). Um aumento de temperatura só aumenta a atividade enzimática até atingir a temperatura ideal para a enzima, já que o aumento descontrolado da temperatura pode causar a desnaturação desta, e conseqüentemente sua inutilização (TEXEIRA, 2011). Existem alguns fatores que determinam qual temperatura é ideal para reações catalisadas por lipase, dentre eles estão a imobilização, estabilidade da lipase, relação molar álcool em óleo e tipo de solvente. O aumento da temperatura facilita a transferência de massa da mistura reacional a medida que a viscosidade do meio reacional é diminuída (GULDHE *et al.*, 2015).

3.7.3 Massa de biocatalisador

A quantidade de biocatalisador deve ser controlada, sem o uso excessivo, a fim de proporcionar um contato efetivo do substrato com o sítio ativo da enzima, pois caso contrário o custo de produção tende a aumentar (KOCHEPKA, 2015). Segundo observações feitas por Neto (2002), o aumento da massa de biocatalisador diante de óleos com um bom estado oxidativo eleva o valor de conversão, enquanto para óleos oxidados não basta aumentar apenas a quantidade do biocatalisador para melhorar a taxa de conversão, mas possivelmente também é necessário aumentar o tempo de reação (NETO, 2002).

Na literatura temos vários trabalhos que evidenciam o comportamento enzimático conforme a quantidade de biocatalisador utilizado. Kochepka (2015) observou que um aumento de 3% de Novozym[®]435 aumentou em 25% a conversão de ésteres etílicos para as primeiras horas da etanólise de óleo de fritura para as condições adotadas (razão molar etanol: óleo de 4:1, 40°C, 150 rpm por 10). Neto (2002) também observou esse comportamento, tendo em vista que um aumento de 50% aumentou em 66% a conversão de ésteres etílicos para etanólise de óleo de soja nas condições adotadas (1mL óleo; 0,5mL Etanol; 20 mL n-

hexano; 35°C; 8 horas de reação). E assim como Oliveira *et al.* (2004), que realizou vários ensaios variando o percentual de biocatalisador (5 %p/p a 20 %p/p), observou que o percentual máximo resultou no maior rendimento para a etanólise de óleo de mamona para as condições adotadas (razão molar etanol: óleo de 10:1; 10 mL n-hexano; 65°C; 6 horas de reação). A partir das observações acima descritas, fica evidenciando que a quantidade de catalisador altera a velocidade inicial das reações e permite conversões elevadas em menores tempos reacionais.

3.8 Metodologia de Superfície de Resposta – (MSR)

A metodologia de superfície de resposta - (MSR) tem sido utilizada por muitos pesquisadores para estabelecer condições de produção ótimas para o biodiesel (NDA, 2015). A MSR é uma ferramenta usada para estudar e separar efeitos interativos de sistemas de fatores sobre determinada resposta, e corresponde a um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas na modelagem e análise de problemas onde a resposta de interesse sofre influência de diversas outras variáveis, tendo como objetivo a otimização dessa resposta, e ainda, reduzir o número de experimentos suficientes para fornecer resultados estatisticamente aceitáveis (PEREIRA, 2014). O estudo de otimização usando MSR inicia com a determinação dos parâmetros dependentes e independentes e dos seus níveis, em seguida ocorre a seleção do planejamento experimental para a previsão e verificação da equação do modelo, e por último a obtenção das superfícies de respostas e curvas de contorno da resposta como uma função dos parâmetros independentes e a determinação das condições operacionais ótimas (TERRAZAS, 2012).

Dentre as classes de planejamentos experimentais mais utilizados para este fim destaca-se o Planejamento Composto Central (CCD, do inglês, *Central Composite Design*) (LIMA, 2012). Utilizando um CCD ou um Delineamento Composto Central Rotacional – (DCCR) como alguns autores costumam chamar, podemos usufruir da MSR na pesquisa fatorial completa para examinar a variação simultânea, sistemática e eficiente de elementos reacionais importantes, na identificando das possíveis interações de variáveis, nos efeitos de maior ordem e no estudo das condições operacionais a serem utilizadas. (PEREIRA, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

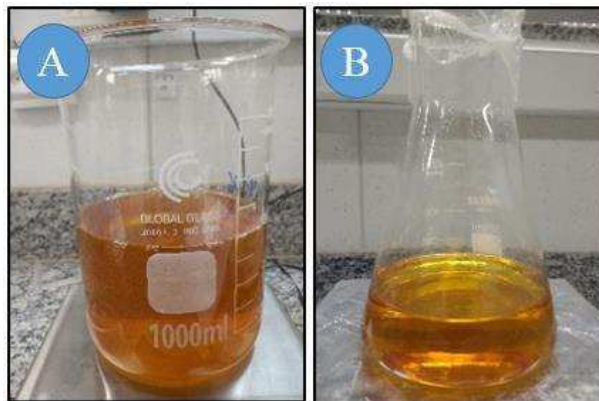
4.1 Enzimas e outros materiais

As lipases (E.C. 3.1.1.3) comerciais Novozym[®] 435 (10000 PLU/g), Lipozyme[®] TL-IM (250 IUN/g) e Lipozyme[®] RM-IM (275 IUN/g) foram doadas pela Novozymes A/S (Espanha). O ácido oleico (P.A. 99%) foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil), o etanol (P.A. 96%) da Dinâmica (São Paulo, Brasil) e o óleo de frango obtido no mercado local (Redenção, Brasil). A placa de sílica comercial Alugram[®] da marca Macherey-Nagel utilizada na CCD foi doada pelo Universidade Federal do Ceará – (UFC). Os reagentes empregados na caracterização da matéria-prima e produtos gerados foram todos de grau analítico. Para a elaboração do planejamento experimental do tipo DCCR foi utilizado o software STATISTICA da StatSoft[®] na versão 10.0. E ainda, para criação de tabelas e gráficos foram utilizados respectivamente o Microsoft Excel 2013 da Microsoft[®] e o OriginPro 9.1 do OriginLab[®].

4.2 Tratamento da matéria-prima

O óleo de frango bruto foi obtido a partir da desidratação forçada de frangos conseguida através de um forno rotativo a gás, comumente conhecido por assador de frangos. Esse óleo inicialmente passou por um aquecimento prévio a uma temperatura de 40°C, para diminuir sua viscosidade e facilitar sua homogeneização através de um agitador magnético, para em seguida receber 5% m/m de Celite[®] Diatomite para remover partículas muito finas que passariam ou saturariam o papel de filtro na etapa posterior, que é a filtragem do óleo. Após a adição de Celite[®] Diatomite manteve-se o óleo sob a mesma agitação e temperatura descritas acima durante um período de 15 minutos. Finalizada esta etapa o óleo passou por uma filtragem a vácuo para remoção da Celite[®] Diatomite. Em seguida, foi adicionado 10% m/m de Sulfato de Sódio Anidro (Na₂SO₄) ao óleo clareado e isento de Celite[®] Diatomite para remoção da umidade presente no óleo. Após a remoção da umidade o óleo passou por mais uma filtragem a vácuo para remoção do Sulfato de Sódio Anidro (Na₂SO₄). A figura 7 abaixo apresenta a matéria-prima no seu estado bruto (Figura 6A) e a matéria-prima resultante do tratamento (figura 6B).

Figura 7 – Óleo de frango no seu estado bruto (conforme obtido em coleta) e após a exposição ao tratamento térmico e mecânico (40°C e agitação constante), de filtração e de desumidificação (usando Celite® Diatomite e Sulfato de Sódio Anidro).



A: Matéria-prima bruta; B: Matéria-prima tratada.

Fonte: Autor

4.3 Obtenção do óleo de frango hidrolisado

O procedimento experimental descrito por Lima e Fernandes (2014) para extração de ácido graxo foi ajustado para o uso de um sistema de refluxo e aquecimento ao invés de um sistema com ultrassom. Sendo assim, utilizando uma reação de saponificação seguida de hidrólise foi possível obter os ácidos graxos do óleo em estudo. A reação ocorreu em um sistema formado por condensador acoplado a um balão de fundo redondo de 1L suspenso sobre um banho de glicerina líquida. No interior do balão uma solução alcoólica contendo 54,45g de KOH e 500mL de etanol foi misturada ao óleo de frango quando o mesmo atingiu 50°C. Sob agitação constante a uma temperatura de 80°C a solução permaneceu durante 1h.

Após a finalização do tempo de 1 hora o produto da etapa de saponificação foi dissolvido em uma solução de ácido clorídrico 6 molares até obtenção de pH igual a 2,0. O uso da solução de HCl foi necessário para transformar os sais obtidos da saponificação em ácidos graxos, e a água contida na solução para dissolver o álcool, a glicerina e posteriormente os sais de cloreto de potássio que se formaram com adição do ácido clorídrico. Adaptado de (LIMA; FERNANDES, 2014). A mistura obtida foi transferida para um funil de decantação para em seguida se separar a camada aquosa da massa de ácido sobrenadante.

Em um funil de decantação a massa de ácido graxo obtida após a reação de saponificação seguida de hidrólise foi lavada com água destilada até que o pH da água residual se mostrasse igual ou aproximadamente 6. Em seguida, essa massa de ácidos graxos foi deixada em repouso com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para ser desumidificada. A determinação do índice de acidez seguiu a mesma metodologia detalhada por Santos (2011)

diferenciando se apenas a concentração molar da solução de NaOH, que desta vez foi de 0,02 molar. O cálculo do índice de acidez é descrito no item 4.4.1 a seguir.

4.4 Caracterização físico-química do óleo de frango

Para a caracterização físico-química do óleo de frango, utilizado como matéria-prima principal neste estudo, as análises a seguir foram realizadas.

4.4.1 Índice de Acidez

O óleo de frango recém coletado (óleo bruto) foi submetido a análise por índice de acidez, assim como o óleo obtido da reação de saponificação seguida de hidrólise (óleo hidrolisado). O teste se deu por meio do gotejamento de uma solução de NaOH 0,1 molar. Para a determinação do índice de acidez realizou-se a titulação de uma solução contendo 2g de óleo bruto ou hidrolisado, 20mL de éter alcoólico e 3 gotas de fenolftaleína até a solução ficar com uma coloração levemente rósea permanente. Em seguida, com auxílio da equação 1 a baixo foi determinado o índice de acidez (SANTOS, 2011).

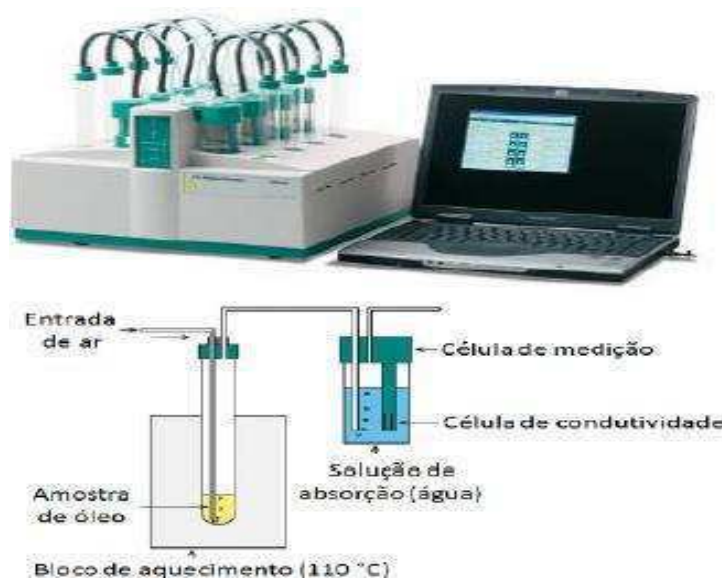
$$IA(mgNaOH/g) = \text{III}_{NaOH} \times MM_{NaOH} \times f \times \left(\frac{V_{NaOH}}{m} \right) \quad (1)$$

Onde: III_{NaOH} é molaridade ou concentração molar em mol/L de NaOH; MM_{NaOH} é a massa molar de NaOH; f é o valor do fator determinado pela padronização de NaOH; V_{NaOH} é o volume de NaOH gasto na titulação; m é a massa da amostra a ser analisada.

4.4.2 Estabilidade Oxidativa

A estabilidade à oxidação do biodiesel está sujeita as diferentes proporções de ácidos graxos saturados e insaturados presentes nos óleos e gorduras vegetais utilizados. Esse parâmetro está incluso nas normas (ASTM D6751 2011) e (EN14214 2003) a qual utiliza o método EN 14112 (Rancimat) como ferramenta de avaliação. E estas estabelecem limites mínimos, os quais devem estar especificados (MACHADO, 2014). Seguindo a Norma EN 14112 determinou-se a estabilidade oxidativa do óleo de frango hidrolisado, por meio do método do Rancimat, através do equipamento ilustrado na figura 8. Como estabelecido na norma, são exigidos uma temperatura de 110°C e um tempo mínimo de análise de 8 horas para o aparecimento dos produtos primários de oxidação. Adaptado de (RODRIGUES, 2013).

Figura 8 - Equipamento usado nos ensaios oxidativos segundo a EN 14112 (Rancimat 873 da METROHM®).



Fonte: (VALLE, 2015).

4.4.3 Índice de Saponificação

Para a determinação do índice de saponificação utilizou-se um sistema de refluxo em conjunto de um agitador magnético. Inicialmente pegou-se uma amostra de 2 g de óleo de frango hidrolisado e adicionou-se a um Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de uma solução alcoólica de KOH 4% m/v. Em seguida, foi preparado um branco e procedeu-se ao andamento analítico, simultaneamente com a amostra. Sob agitação constante a uma temperatura de 80°C a solução permaneceu durante 1 hora. Após o tempo de reação, desconectou-se o condensador do Erlenmeyer e adicionou-se 1 mL do indicador fenolftaleína para em seguida dar início a titulação com uma solução de ácido clorídrico 0,5 M, persistindo até o desaparecimento da coloração rósea (LUTZ, 2008). Por meio da equação 2 a abaixo determinou-se o valor do índice de saponificação da amostra.

$$\text{Índice de saponificação (mgKOH/g)} = \frac{26,6 * f * (B - A)}{P} \quad (2)$$

Onde: A é o volume gasto na titulação da amostra; B é o volume gasto na titulação do branco; f é o fator da solução de HCl 0,5 M; P é o nº de g da amostra.

4.4.4 Densidade e Viscosidade

Para a determinação desses parâmetros foi utilizado o equipamento Stabinger Viscometer™ SVM 3000 (viscosímetro digital) da marca Anton Paar. A análise de densidade foi realizada de acordo com a norma NBR 14065 e a análise de viscosidade conforme NBR 1044 (VALLE, 2015). Com apenas 2,5mL de amostra, são mensurados os valores da viscosidade dinâmica [mPa.s] e da densidade [g/m³] da amostra, para em seguida, a partir destas, a viscosidade cinemática [mm²/s] ser calculada.

Figura 9 - Stabinger Viscometer™ SVM 3000 da marca Anton Paar utilizado na determinação da Viscosidade Cinemática (mm²/s) e Densidade (g/cm³).



Fonte: (PAAR, 2015b)

4.4.5 Umidade

O aquecimento direto da amostra a 105°C (método da estufa) é o processo mais usual, porém também são utilizados processos com aquecimento em estufas a vácuo, de destilação com líquidos imiscíveis, e baseados em reações que se dão em presença de água, como o método de Karl Fischer (LUTZ, 2008).

Para a determinação da umidade foi pesada 2 g do óleo de frango hidrolisado em uma capsula de porcelana, previamente tarada. Em seguida, utilizando uma estufa aqueceu durante 1 hora a capsula contendo o óleo. Finalizado o tempo de 1 hora transferiu-se a capsula para um dessecador até que se atinge a temperatura ambiente necessária a realização da pesagem da mesma em uma balança analítica. Foi necessário repetir a operação de aquecimento e resfriamento até o peso do óleo ficar em um valor constante. Ao final do ensaio, com o auxílio da equação 3 pode-se conhecer o valor da umidade presente no óleo de frango hidrolisado (LUTZ, 2008).

$$\text{Umidade e material volátil} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{100 * N}{P} \quad (3)$$

Onde: N é n° de gramas de umidade (perda de massa em g) e P é n° de gramas da amostra.

4.5 Determinação do perfil de ácidos graxos

A análise da composição em triacilgliceróis foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa - (CG-EM) através de um CGMS-QP2010 SE da marca SHIMADZU utilizando as seguintes condições operacionais: temperatura do injetor a 250°C, Interface a 300°C e fonte de íon a 240°C. E ainda, o cromatógrafo usava uma coluna RESTEK-RTX® 5MS (crossbond® 5% difenil/ 95% dimetil polisiloxano) de 30 metros de comprimento com diâmetro interno de 0,25mm e espessura do filme igual a 0,25µm. A análise iniciou-se com a coluna a uma temperatura de 160°C a uma taxa de aumento de 2°C/min até a temperatura de 200°C, em seguida a uma taxa de aumento de 45°C/min até a temperatura de 290°C, onde permaneceu por 10 minutos, totalizando em uma corrida de 35 minutos (SCHULER, 2010). Ao final da corrida foram gerados cromatogramas e seus respectivos espectros, informando em detalhes o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de frango analisado.

4.5.1 Cálculo da massa molar média do óleo de frango

Partindo do perfil de ácidos graxos determinados no item anterior foi possível realizar o cálculo da massa molar do óleo de frango, a partir da equação 4 abaixo. O conhecimento da massa molar do óleo é necessário e fundamental para o conhecimento das condições de reação utilizadas na produção dos ésteres etílicos, pois alguns parâmetros, como a adição de álcool ao meio reacional, se baseiam na relação estequiométrica do mesmo em relação ao óleo. O cálculo para a determinação da massa molar do óleo de frango foi adaptado de Silveira (2014).

$$MM(g/mol)_{\text{ácidos graxos}} = \{(\sum(M_{\text{ácido graxo}} * A_{\text{pico}}) * 3) - M_{\text{hidrogênio}}\} \quad (4)$$

Onde: $MM(g/mol)_{\text{ácidos graxos}}$ representa a massa molar média do óleo de frango; $M_{\text{ácido graxo}}$ representa a massa molar de cada ácido graxo presente na composição do óleo de frango; A_{pico} representa a área abaixo da curva ou do pico de cada ácido graxo

presente na composição do óleo de frango; $M_{hidrogênio}$ representa a massa molar de quatro hidrogênios.

4.6 Determinação da melhor combinação de enzimas

A combinação ocorreu entre duas enzimas e foi pensada de tal forma que a enzima 1 mantivesse seu percentual variando de 0 a 100%, ao passo que a enzima 2 completasse o percentual necessário a perfazer 100% da massa de biocatalisador. A tabela 3 apresenta essa informação de forma mais clara. Neste contexto, foram geradas as seguintes combinações possíveis entre os diferentes biocatalisadores utilizados: Lipozyme[®] TL-IM e Lipozyme[®] RM-IM; Lipozyme[®] TL-IM e Novozym[®] 435; e Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435. As combinações de enzimas, descritas aqui, foram avaliadas para se conhecer a proporção de enzimas combinadas que melhor favorece a conversão de ésteres na síntese de oleato de etila a seguir (item 4.6.1). Conhecida a melhor combinação de enzimas, está será utilizada na reação de esterificação do óleo de frango hidrolisado.

Tabela 3 - Combinação percentual entre enzimas utilizadas na síntese de oleato de etila. A enzima 1 varia de 0% a 100% enquanto a enzima 2 varia de 100% a 0% garantindo sempre uma massa de catalizador igual a 100%.

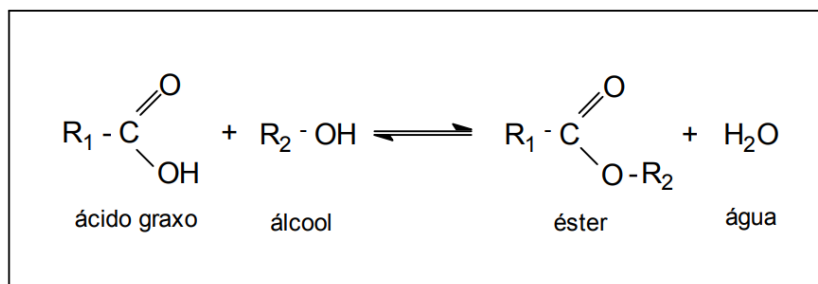
Enzima 1 (%)	Enzima 2 (%)	Total de catalisador (%)
0	100	100
25	75	100
50	50	100
75	25	100
100	0	100

Fonte: Autor

4.6.1 Síntese de Oleato de Etila

A síntese de oleato de etila foi realizada por meio da reação de esterificação (figura 10) entre o ácido oleico e o etanol (razão molar 1:1) na presença de 0,04g da combinação de enzimas, estabelecida no item 4.6 anterior. O quantitativo dos reagentes mencionados aqui teve como base a síntese de oleato de etila realizada por Souza (2013). A utilização do uso da razão molar de 1:1, foi motivado tendo em vista que o excesso de álcool pode remover a camada de água essencial que estabiliza a enzima imobilizada, bem como formar complexos binários inibitórios álcool-lipase (BERNARDES, 2008).

Figura 10 - Reação de Esterificação



Fonte: (BERNARDES, 2008)

As reações ocorreram em duplicatas, em frascos de 2mL a uma temperatura de 37°C, e a 150 rpm gerados por um banho termostático durante um período de 24 horas. A determinação do percentual de ésteres etílicos formados pela reação foi medido através do índice de acidez seguindo a metodologia detalhada por Santos (2011), diferenciando se apenas a concentração molar da solução de NaOH que desta vez foi de 0,02 molar. O cálculo do índice de acidez é descrito no item 4.4.1, enquanto os valores de conversão em ésteres são determinados pela equação 5 abaixo.

$$\text{Conversão}(\%) = \frac{IA - IA_b}{IA_b} \quad (5)$$

Onde: IA é o valor do índice de acidez para as diversas combinações de enzima e IA_b é o índice de acidez do branco.

4.7 Acompanhamento cinético da reação de esterificação do óleo de frango

O tempo é um fator importante a ser considerado em bioprocessos tendo em vista que ele pode influenciar o nível de conversão de ésteres e o custo da produção, já que muitas horas de reação aumentam o consumo de energia pelo processo (FONTES, 2012). Nesse contexto, se fez necessário conhecer o comportamento catalítico das enzimas ao longo do tempo de reação de esterificação do óleo de frango.

A reação de esterificação do óleo de frango foi realizada para uma razão molar 1:1 (Álcool: Ácido) na presença de etanol e de 0,12g da combinação de enzimas (75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®]435). As reações ocorreram em frascos de 50mL a 37°C para uma agitação de 150 rpm gerados por um banho termostático, para períodos de tempos de 12h, 24h, 36h e 48h. A forma de acompanhar a formação de ésteres (conversão) foi por índice de acidez seguindo a metodologia detalhada por Santos (2011) e descrita no item

4.4.1, diferenciando se apenas a concentração molar da solução de NaOH que desta vez foi de 0,02 molar.

4.8 Determinação da atividade enzimática

Afim de verificar o comportamento catalítico individual das lipases, e ainda comprovar que a combinação de lipases determinada no item 4.6 é de fato a melhor combinação, por ser formada pelas enzimas de maior atividade catalítica, foi proposto um ensaio experimental para determinar a atividade de esterificação das lipases, e para isso tomou-se como base alguns estudos da literatura (FELTES, 2011; SANTOS *et al.*, 2013; RIGO, 2009; ERIG, *et al.*, 2014).

As reações foram conduzidas em frascos de vidro com tampa mantidos em um banho termostático a 40°C e 150 rpm. A atividade de esterificação das lipases foi quantificada através da reação de esterificação do ácido oleico e n-propanol (razão molar 1:1). Após cerca de 2 min do início da reação foram retiradas duas alíquotas de 150µl do meio reacional. Este volume foi adicionado a um Erlenmeyer contendo 10 mL de solução de éter alcoolizado, constituindo o tempo zero de reação (sem lipase). A determinação do percentual de ésteres etílicos formados pela reação de esterificação, para as amostras sem (branco) e com lipases, foi medido através do índice de acidez seguindo a metodologia detalhada por Santos (2011), diferenciando se apenas a concentração molar da solução de NaOH que desta vez foi de 0,1 mol/L. Em seguida, foi adicionada a lipase a ser avaliada, na proporção de 6% em relação à massa de ácido oleico, ao meio reacional que foi submetido às condições de agitação e temperatura descritas anteriormente. A atividade de esterificação das lipases foi avaliada para períodos de tempo igual a 10 min, 20 min, 40 min e 120 min, em duplicatas, seguindo o mesmo procedimento descrito para o tempo zero de reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, para as condições descritas no ensaio.

$$AE = \frac{(Vb - Va) * M * 10^3 * Vf}{t * m * Vc} \quad (6)$$

Onde: AE (U/g) é a atividade de esterificação; Va (mL) é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada ao fim do tempo reacional (mL); Vb (mL) é o volume de NaOH gasto na titulação do Branco; M (mol/L) é a molaridade da solução de NaOH; Vf

(mL) é o volume final do meio reacional (mL); t (min) é o tempo de reação; m (g) é a massa de enzima utilizada; Vc (mL) é o volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação.

4.9 Planejamento Experimental

A partir do software STATISTICA[®] um Delineamento Composto Central Rotacional - (DCCR) foi utilizado para a criação de um planejamento experimental, contendo 17 ensaios experimentais a serem realizados. O planejamento adotado utilizou um fatorial completo de 2^3 , com três variáveis e cinco níveis como apresentado na tabela 4 a seguir. Os valores dos níveis (-1 e 1) correspondem aos valores mínimo e máximo das variáveis utilizadas no planejamento experimental, sendo estas fundamentadas nos dados mais usuais da literatura. E por meio da média obtida desses valores foi obtido o valor correspondente ao ponto central do planejamento. Já os níveis (-1,68 e 1,68), que representam os pontos axiais, foram gerados automaticamente pelo software. Em um DCCR os números de pontos axiais são iguais ao dobro do número de fatores, representam os valores extremos do planejamento e são eles que permitem estimar eficientemente os termos quadráticos do modelo matemático usado pelo planejamento fatorial (PORTAL ACTION, 2017).

Tabela 4 - Valores numéricos e codificados das variáveis adotadas no planejamento experimental para a reação de esterificação do óleo de frango.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X ¹ Temperatura (°C)	31,6	35	40	45	48,4
X ² Massa de biocatalisador (%) [*]	1,6	4	6	8	9,4
X ³ Quantidade de Água (%) [*]	2,6	5	10	15	18,4

^{*}Estão expressos em percentual (% m/m), em relação à massa de óleo adicionada, a qual foi de 2 g em todos os experimentos.

Fonte: Autor

4.9.1 Esterificação do óleo de frango

As reações de esterificação do óleo de frango foram realizadas conforme planejamento experimental, descrito na tabela 5, gerado a partir da tabela 4. O óleo de frango hidrolisado foi inserido em frascos de 15mL juntamente com etanol e água destilada na presença da combinação de enzimas (75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®] 435). A tabela 5 a seguir apresenta os quantitativos das variáveis propostas pelo planejamento experimental. Todos os 17 experimentos descritos reagiram a uma agitação constante de 150 rpm durante 24 horas em um banho termostático. Essas variáveis foram adotadas tendo em

vista os ótimos valores de conversão alcançados na esterificação do ácido oleico para a produção de oleato de etila descritos por Souza (2013), com essa agitação o autor conseguiu uma conversão de aproximadamente 90% em 24h a 37°C. Já o tempo foi escolhido a partir do estudo cinético descrito no item 4.7 desse trabalho.

A determinação do percentual de ésteres etílicos, formados pela reação, foi medido através do índice de acidez seguindo a metodologia detalhada por Santos (2011) diferenciando se apenas a concentração molar da solução de NaOH que desta vez foi de 0,1 mol/L. O cálculo do índice de acidez é descrito no item 4.4.1, enquanto os valores de conversão em ésteres são determinados pela equação 5 descrita no item 4.6.1.

Tabela 5 - Quantitativo das variáveis adotadas nas reações de esterificação do óleo de frango, geradas pelo planejamento experimental fatorial completo 2³.

E N S A I O S	Variáveis independentes								
	Codificadas			Reais					
	X ¹	X ²	X ³	Alcool (µL)	Óleo (µL)	Água (µL)	RM-IM (g)	Nov435(g)	T (°C)
1	-1	-1	-1	137,8	2178,6	100,0	0,06	0,02	35
2	-1	-1	1	137,8	2178,6	300,0	0,06	0,02	35
3	-1	1	-1	137,8	2178,6	100,0	0,12	0,04	35
4	-1	1	1	137,8	2178,6	300,0	0,12	0,04	35
5	1	-1	-1	137,8	2178,6	100,0	0,06	0,02	45
6	1	-1	1	137,8	2178,6	300,0	0,06	0,02	45
7	1	1	-1	137,8	2178,6	100,0	0,12	0,04	45
8	1	1	1	137,8	2178,6	300,0	0,12	0,04	45
9	-1,68179	0	0	137,8	2178,6	200,0	0,09	0,03	31,6
10	1,68179	0	0	137,8	2178,6	200,0	0,09	0,03	48,4
11	0	-1,68179	0	137,8	2178,6	200,0	0,024	0,008	40
12	0	1,68179	0	137,8	2178,6	200,0	0,141	0,047	40
13	0	0	-1,68179	137,8	2178,6	56,6	0,09	0,03	40
14	0	0	1,68179	137,8	2178,6	368,0	0,09	0,03	40
15©	0	0	0	137,8	2178,6	200,0	0,09	0,03	40
16©	0	0	0	137,8	2178,6	200,0	0,09	0,03	40
17©	0	0	0	137,8	2178,6	200,0	0,09	0,03	40

X1: Temperatura (C°), X2: Massa de biocatalisador (%); X3: Quantidade de Água (%); E: Teor de ésteres (%);

©: Refere-se ao ponto central adotado pelo planejamento experimental.

Fonte: Autor

4.10 Estabilidade Operacional dos biocatalisadores

Para aplicações industriais é requerida a estabilidade enzimática no meio de reação, permitindo reações de vários lotes e a implementação de sistemas contínuos ou descontínuos com reutilização sucessiva desses biocatalisadores, uma vez que essas preparações enzimáticas possuem um valor elevado (SOARES, 2014). Portanto, os

biocatalisadores devem ser submetidos a vários ciclos de reação nas condições ideais para verificar a viabilidade de um processo repetido, já que o mesmo constitui um fator importante na economia do processo (ALVES, *et al.*, 2014).

A estabilidade operacional por reação de esterificação foi realizada através da síntese consecutiva de oleato de etila, descrito no item 4.6.1, uma vez que o óleo de frango hidrolisado era uma matéria-prima escassa e poderia não ser suficiente para a realização do ensaio, ao contrário do ácido oleico que se tinha em abundância. Ao final das reações ou antes de cada ciclo reacional as enzimas foram lavadas com hexano para a remoção de produtos residuais e substratos não reagidos, conforme metodologia descrita por Souza (2013).

4.11 Verificação do comportamento catalítico combinado e individual das lipases

Com o intuito de verificar e comparar os valores de conversão em ésteres produzidos pelas lipases individuais e combinadas, utilizou-se o óleo de frango hidrolisado como substrato na reação de esterificação e as condições do experimento 16 do planejamento experimental, tendo em vista que esse foi o experimento que resultou na melhor conversão em ésteres etílicos para as variáveis estudadas (Temperatura, massa de biocatalisador e teor de água), descritas no item 4.9. Neste ensaio foram avaliadas individualmente as enzimas Lipozyme[®] RM-IM, Lipozyme[®] TL-IM e Novozym[®] 435. Ainda, de forma a comparar o comportamento catalítico individual das lipases na reação, a combinação entre Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435 na proporção de 75% e 25%, respectivamente, foi avaliada nas mesmas condições impostas as lipases individuais.

4.12 Caracterização físico-química dos ésteres etílicos

As análises físico-químicas dos ésteres etílicos obtidas do óleo de frango foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos nos itens: **4.4.1; 4.4.2 e 4.4.4**, diferenciando-se apenas o analito, que neste caso são os ésteres etílicos formados na reação de esterificação do óleo de frango hidrolisado.

4.13 Cromatografia em Camada Delgada - (CCD)

De forma a acompanhar qualitativamente o andamento e os resultados da esterificação, as amostras foram analisadas via CCD, utilizando uma placa de sílica comercial de 3 cm x 5 cm. Para este método utilizou-se como fase móvel uma solução contendo 95%v/v de hexano (Dinâmica) e 5%v/v de acetato de etila (Synth), e uma solução de permanganato de potássio como agente revelador. Para verificar e comparar a eficiência das reações aplicou-se

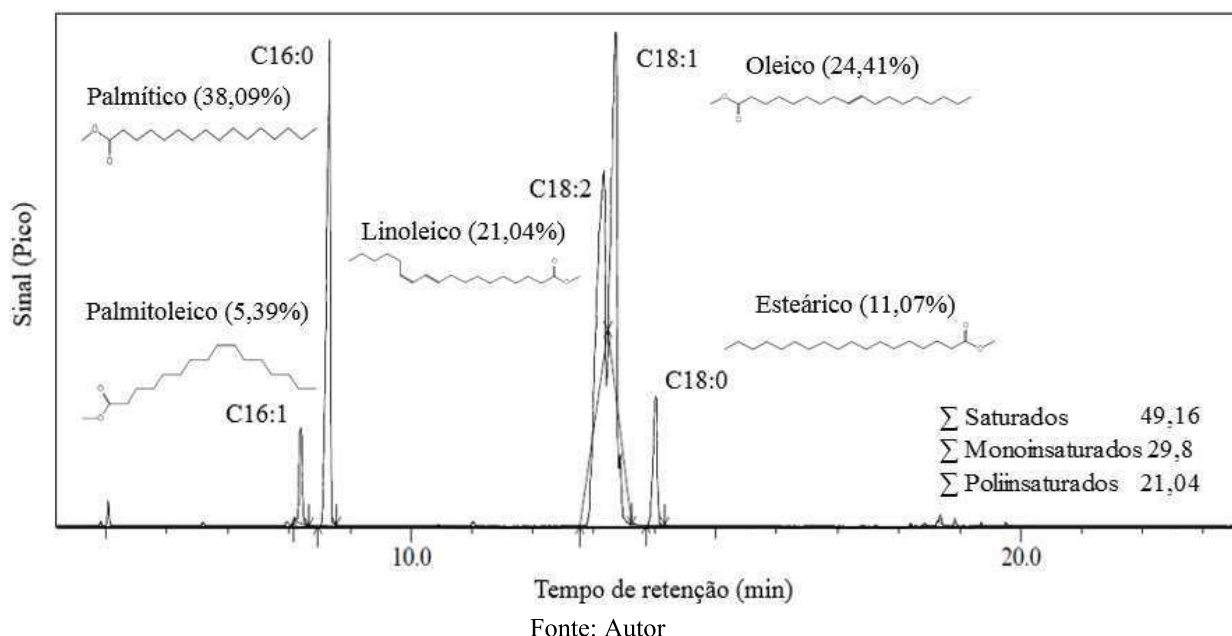
um ponto na placa correspondente ao material de partida (óleo de frango hidrolisado). As amostras retiradas das reações e do material de partida foram impregnadas na placa em linha horizontal com espaçamento entre amostras de 0,5 cm, utilizando um capilar de vidro a fim de conseguir adições mínimas na base da placa. Após a aplicação das amostras a placa foi transferida para uma cuba contendo cerca de 3 mL da fase móvel, para que o solvente ascendesse pela placa até a distância de cerca de 0,25 cm da borda superior. Atingida a marcação superior da placa pelo solvente, a placa foi retirada da cuba para que o excesso de solvente secasse. Em seguida, a placa foi imersa em uma solução reveladora (agente revelador) para que os diferentes constituintes da amostra de partida e das reações fossem visíveis ao olho humano. Adaptado de (SILVA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil de ácidos graxos do óleo de frango

A análise da composição dos triglicerídeos presentes no óleo de frango foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa - (CG-EM), e como resultado da análise foram gerados o cromatograma apresentado na figura 11 e seus respectivos espectros, presentes no anexo 1, informando em detalhes o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de frango analisado.

Figura 11 - Cromatograma do óleo de frango obtido através do CGMS-QP2010 SE da marca SHIMADZU. As demais especificações são descritas no item 4.5.



Por meio da cromatografia revelou-se o percentual equilibrado de ácidos graxos presentes no óleo de frango, contendo 49,16% de ácidos graxos saturados com majoritário de ácido palmítico (C16:0), representando 38,09% do conteúdo total de ácidos graxos, e os ácidos graxos insaturados (monoinsaturados e poliinsaturados) totalizando 50,84% com majoritário dos ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), representando 24,41% e 21,04% do conteúdo total de ácidos graxos, respectivamente. A descrição detalhada dos ácidos graxos constituintes do óleo de frango são apresentados na tabela 6 a seguir.

Tabela 6 - Ácidos graxos presentes no óleo de frango obtidos por CG-EM. As demais especificações são descritas no item 4.5.

Ácido graxo	Nome comum	Nome IUPAC	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Porcentagem (%)
C16:1	Palmitoléico	9-Hexadecenoic acid, methyl ester,	$C_{17}H_{32}O_2$	268,00	5,39
C16:0	Palmitico	Hexadecenoic acid, methyl ester,	$C_{17}H_{34}O_2$	270,00	38,09
C18:2	Linoléico	methyl 10-trans,12-cis-octadecadienoate	$C_{19}H_{34}O_2$	294,00	21,04
C18:1	Oléico	9-Octadecenoic acid, methyl ester	$C_{19}H_{36}O_2$	296,00	24,41
C18:0	Estearico	Methyl stearate	$C_{19}H_{38}O_2$	298,00	11,07

Fonte: Autor

5.1.1 Massa molar média do óleo de frango

Após a determinação do perfil de ácidos graxos foi possível calcular a massa molar para o óleo de frango. O valor calculado para massa molar foi de 847,67 g/mol, valor bem próximo dos valores encontrados por Guimarães (2016) e por Boey *et al.* (2011), respectivamente, 856,2 g/mol e 885 g/mol. Este dado é indispensável para a realização das reações de síntese dos ésteres etílicos, tendo em vista que a adição de álcool, massa de biocatalisador e quantidade de água utilizadas foi realizada de maneira estequiométrica em relação ao óleo de frango.

5.2 Caracterização físico-química do óleo de frango

Os resultados da caracterização físico-química do óleo de frango hidrolisado são apresentados na tabela 7 abaixo. Todos os valores foram obtidos em duplicata seguindo as metodologias descritas no item 4.4. Realizando uma busca na literatura observou-se que alguns dos resultados encontrados possuem coerência e uma aproximação com a mesma, já outros nem tanto. Essa variação pode estar relacionada, à exemplo, ao atual estado de degradação do óleo, pois o tipo de perfil de ácidos graxos pode acelerar ou não o processo de oxidação e degradação do óleo, quando armazenados ou transportados de maneira inadequada (SILVA, 2015).

Tabela 7 - Resultados da análise físico-química do óleo de frango para os ensaios de índice de Acidez e Saponificação, Estabilidade Oxidativa, Umidade, Densidade e Viscosidade.

Parâmetros avaliados	Autor		Literatura
Índice de Acidez (mgKOH/g)	0,18±0,01*	0,13 ± 0,04	(LIN; TSAI, 2015)
	134,78±1,92**	-	-
Índice de Saponificação (mgKOH/g)	173,21±1,02	194,30±0,05	(BOEY <i>et al.</i> , 2011)
Estabilidade Oxidativa (Horas)	0,25±0,04	0,85±0,20	(Dias, 2014)
Umidade (% m/m)	4,47±0,87	1,00±0,03	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2012b)
Densidade (g/cm ³)	0,92±0,02	0,93±0,01	(ALPTEKIN;
Viscosidade Cinemática (mm ² /s)	36,91±0,01	59,20± 0,02	CANAKCI, 2010)

* Correspondente ao óleo bruto e ** ao óleo hidrolisado. Fonte: Autor

O ensaio de índice de acidez é conseguido através de uma neutralização simples, formando sais e água como produtos, e corresponde ao número de miligramas de KOH necessário para neutralizar a acidez de 1g de uma amostra de óleo ou gordura (mgKOH/g), sendo essa acidez consequência da presença de ácidos graxos livres na amostra (RODRIGUES, 2013). O valor da acidez encontrada é um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo, pois alguns processos (e.g., hidrólise, a oxidação ou fermentação) alteram quase sempre a concentração dos íons hidrogênio presentes nesses óleos, devido a fatores (e.g., aquecimento e luz) que aceleram a decomposição dos glicerídeos, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (VALLE, 2015). O óleo de frango bruto analisado apresentou uma baixa acidez (0,18±0,01 mgKOH/g), o que é desejável na reação de transesterificação por evitar a formação de emulsão durante a purificação do biodiesel (MOURA, 2008). Porém, como este trabalho não se trata de uma reação de transesterificação, mas sim de uma esterificação, a acidez não é um problema, e por meio do processo de saponificação seguida de hidrólise o óleo teve sua acidez aumentada. Por se tratar de uma reação envolvendo catalisadores enzimáticos, não há a formação sabões, o que consequentemente favorece o aumento do rendimento reacional e exclui uma possível etapa de purificação do biodiesel (SOUZA, 2013).

Óleos, gorduras e seus derivados sempre estão sujeitos à oxidação devido fatores, como a exposição ao calor e ao ar, a presença de traços de metais e insaturações e ao longo tempo de armazenamento. A presença de ácidos graxos insaturados favorece os processos de degradação oxidativa devido a auto-oxidação lipídica, associada à reação do oxigênio com os ácidos graxos insaturados presentes nos óleos, gorduras e seus derivados (VALLE, 2015; FREIRE; FILHO; FERREIRA, 2013). Quando se trata do uso contínuo de algum produto ou material temos que contar com o fato que o tempo e as condições de estocagem podem

ocasionar a degradação dos mesmos, pois a presença de ácidos graxos insaturados acelera o processo de oxidação e polimerização, devido ao número de insaturações presentes no óleo (SILVA, 2015). Sendo assim, o ensaio de estabilidade oxidativa realizado é um indicativo quanto ao estado de degradação de óleos e gorduras. Rodrigues (2013) afirma que a presença de ácidos graxos insaturados em grande quantidade no óleo pode oferecer uma baixa estabilidade oxidativa, como é o caso do óleo de frango. Esse ensaio é um ensaio acelerado que permite verificar o período de tempo que óleos podem ficar armazenados em determinadas condições até apresentarem o processo de propagação da reação de oxidação (MACHADO, 2014). Neste trabalho encontrou-se um valor de estabilidade oxidativa de 0,25 horas, ficando abaixo do valor encontrado por Dias (2014). Neste contexto, esse valor pode estar relacionado ao percentual de insaturação apresentado pelo óleo de frango bruto (50,84%) indicado pela análise cromatográfica, descrita no item 5.1.

O índice de saponificação é definido como a quantidade de miligramas de KOH requerido para saponificar 1g de óleo ou gordura, e indica a quantidade de base a ser utilizada para saponificar completamente o óleo ou gordura utilizada na reação (RODRIGUES, 2013). Segundo Valle (2015) através da reação de saponificação são obtidos uma mistura de sais alcalinos de ácidos graxos (sabões) e glicerol, quando um óleo ou gordura é aquecido na presença de uma solução aquosa alcalina de NaOH ou KOH. O ensaio de saponificação realizado sinalizou a formação eficiente de ácidos graxos provenientes da reação de saponificação seguida de hidrólise, uma vez que a acidez do óleo de frango passou de um valor de $0,18 \pm 0,01$ mgKOH/g para um valor de $134,78 \pm 1,92$ mgKOH/g.

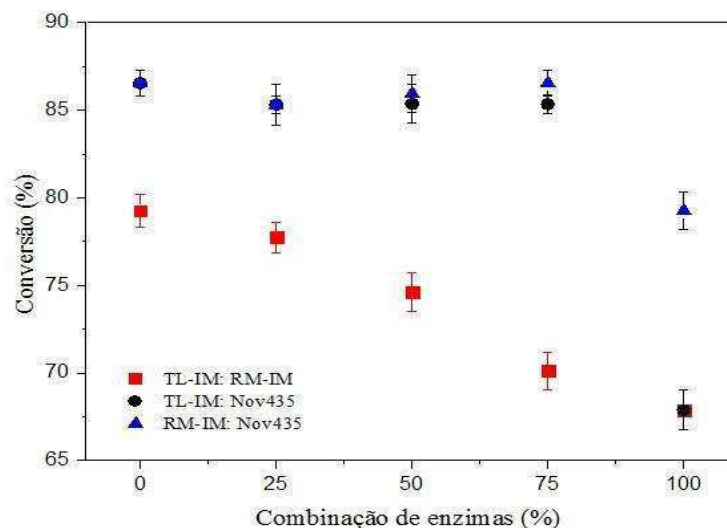
Uma vez conhecida a viscosidade dinâmica, que segundo Paar (2015a) é usada para investigar mudanças de viscosidade a diferentes temperaturas, e a densidade, que segundo Santos (2016) é à medida que correlaciona a massa de uma substância com o seu volume ocupado, podemos determinar a viscosidade cinemática. Ela é muito importante pois é um indicativo do comprimento da cadeia carbônica e do grau de saturação dos ácidos graxos presentes em óleos e gorduras (VALLE, 2015). Neste trabalho os valores encontrados para a viscosidade cinemática e para a densidade estão bem próximos dos valores observados por Alptekin e Canakci (2010). Os autores encontraram um perfil de ácidos graxos similar a esse trabalho, apenas diferenciando-se pela presença do C14:0 e C18:3 e seus respectivos percentuais. O que explicaria a pequena diferença da viscosidade cinemática encontrada em relação a literatura, seria a variação do comprimento da cadeia carbônica (C16, C18 e C14, C16, C18) e do grau de saturação (49,16% e 32,6%) dos ácidos graxos presentes no óleo utilizado neste trabalho e do utilizado pelo autor citado, respectivamente (VALLE, 2015).

A água é um parâmetro que deve ser ajustado a um valor determinado, já que promove a hidrólise de óleos, gorduras e seus derivados, e está associada à proliferação de micro-organismo, diminuição do calor de combustão, corrosão em tanques de estocagem e das peças metálicas do motor (VALLE, 2015). Todas as matérias-primas ou produtos gerados contêm água em maior ou menor proporção, e a umidade medida corresponde a perda em peso de água e substâncias voláteis quando esses são aquecidos em condições necessárias a ocorrência dessa perda. O significativo valor de umidade apresentado pelo óleo frango bruto pode estar relacionado ao fato de que óleo foi refrigerado algumas vezes, e ainda por não ter sido desumidificado adequadamente após a etapa de adequação de pH (6,0) onde o mesmo foi lavado após a reação de saponificação seguida de hidrólise. Esse parâmetro é um fator que pode favorecer tanto a hidrólise como a esterificação, já que a atividade catalítica e a estabilidade das lipases são influenciadas (CHRISTOPHER *et al.*, 2013).

5.3 Combinação de enzimas

A combinação de lipases aplicada a produção de biodiesel, já mencionada anteriormente, tem como princípio o aumento da taxa de reação, diminuição dos níveis de glicéridos residuais, ampliação do nível de especificidade ao substrato, dentre outros (HAMA; KONDO, 2012). Analisando a figura 12, das reações realizadas a melhor conversão alcançou um valor de $86,54 \pm 0,76\%$ utilizando uma combinação de 75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®] 435, enquanto a pior conversão resultou em $70,11 \pm 1,54\%$ com 75% de Lipozyme[®] TL-IM e 25% de Lipozyme[®] RM-IM. Em meio aos resultados apresentados na figura 12 percebe-se que há um aumento da conversão à medida que a combinação percentual da Lipozyme[®] TL-IM é reduzida junto a Lipozyme[®] RM-IM. Entretanto, para as combinações percentuais junto a Novozym[®] 435, não foi observado aumento nem redução na conversão obtida. Se compararmos a conversão individual de $67,87 \pm 1,2\%$ referente a Lipozyme[®] TL-IM com os das combinações, observamos que a Lipozyme[®] TL-IM combinada com as outras enzimas tem sua conversão melhorada.

Figura 12- Conversões da síntese de oleato de etila para as combinações de enzimas: Lipozyme[®] TL-IM e Lipozyme[®] RM-IM (■), Lipozyme[®] TL-IM e Novozym[®] 435(●), e Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435 (▲); para as condições: razão molar de 1:1 (álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 24 horas.



Fonte: Autor

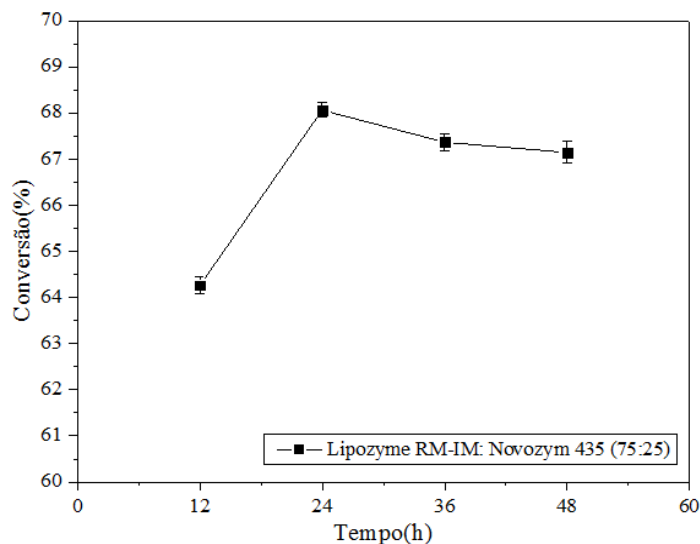
Ao avaliarmos o comportamento da combinação entre a Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435, observamos um pequeno aumento da conversão à medida que a combinação percentual da Lipozyme[®] RM-IM é aumentada junto a Novozym[®] 435. Esse comportamento apresentado pela Novozym[®] 435 é devido a sua capacidade de poder catalisar o substrato independente da região do grupo funcional, ao contrário das Lipozyme[®] TL-IM e RM-IM que são regioseletivas (VÉRAS, 2012). Aguierras, Souza e Langone (2013) usando a Lipozyme[®] RM-IM obtiveram conversões superiores a 90% na síntese de oleato de etila em um reator batelada fechado a 40°C após 2h de reação. Já Souza (2013) utilizando a Novozym[®] 435 observou uma conversão de 90% em 24h a 37°C sob agitação orbital.

Contudo, optou-se por utilizar a combinação de 75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®] 435 nas reações de esterificação do óleo de frango, conforme planejamento experimental descrito no item 4.9, já que essa foi a combinação de enzimas que melhor favoreceu a reação de esterificação aplicada a produção de oleato de etila.

5.4 Cinética da reação de esterificação do óleo de frango

Como mencionado anteriormente no item 4.7, o tempo é um fator importante a ser considerado tendo em vista que ele pode influenciar a conversão de ésteres requeridos. A figura 13 abaixo apresenta o acompanhamento cinético da reação de esterificação do óleo de frango para os tempos de 12h, 24h, 36h e 48h.

Figura 13 – Cinética da reação de esterificação do óleo de frango na presença da combinação de enzimas (75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®] 435) para as condições: razão molar de 1:1 (álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 12h, 24h, 36h e 48h de reação.



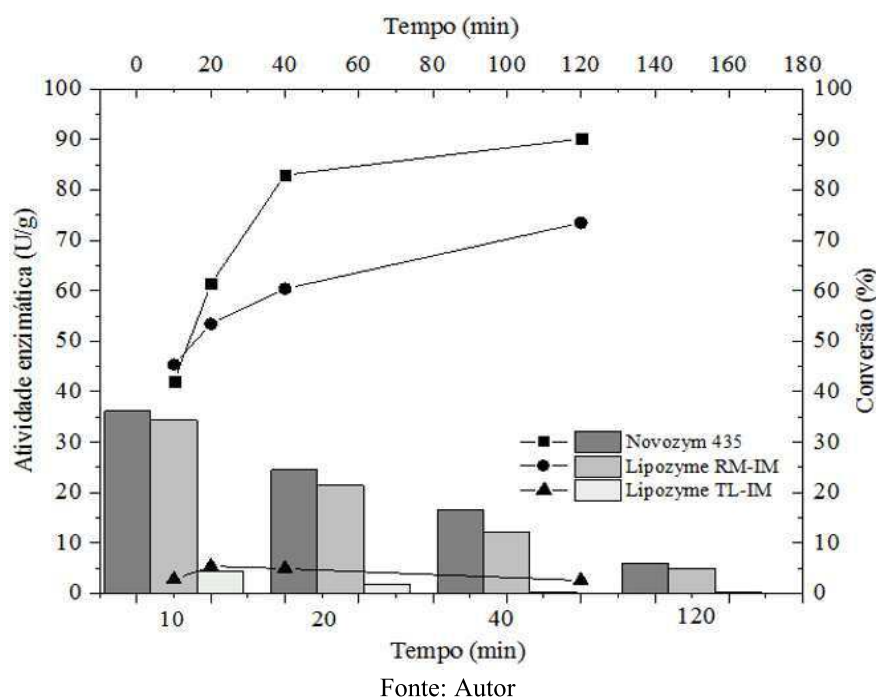
Fonte: Autor

Analisando o gráfico acima observa-se que 24 horas é o tempo necessário para que a reação alcance um valor máximo de conversão de 68,06% em ésteres etílicos. Inicialmente a conversão é mais rápida, por exemplo, se analisarmos o intervalo de tempo entre o início da reação até as 12 horas de reação observaremos um aumento de conversão da ordem de 64,26%, enquanto a partir desse tempo de reação é observado um ganho de no máximo 5,5% as 24 horas, e acima desse tempo o equilíbrio reacional é constatado. Souza (2013) presenciou um cenário semelhante ao analisar durante 96 horas a produção de biodiesel a partir da reação de esterificação. Em seu estudo pode observar que em 24 horas de reação uma conversão de 90% foi alcançada, ficando as demais horas sem nenhum aumento significativo de conversão. Segundo Wenlei e Ning (2010) a diminuição da atividade enzimática ao longo do tempo está relacionada ao bloqueio dos sítios ativos da enzima provocados pela produção do glicerol, ao desprendimento da enzima do suporte de imobilização ou pela mudança da conformação da enzima. Neste estudo, dentre as possíveis causas da diminuição da atividade enzimática após o tempo de 24 horas, a mais provável deve-se ao bloqueio dos sítios ativos da enzima, uma vez que a imobilização reduz as chances de perda da enzima para o meio reacional e mudanças da conformação original da enzima (MELO, 2012; SOUZA, 2013).

5.5 Atividade enzimática

O ensaio da atividade de esterificação das lipases teve como propósito constatar o comportamento catalítico individual das lipases e comprovar que a combinação de enzimas, que melhor favoreceu a reação de síntese de oleato de etila, é formada pelas enzimas de maior atividade catalítica. Nesse estudo, utilizou-se o ácido oleico como doador acila, pois é o principal ácido graxo constituinte do óleo de frango. A técnica original para a determinação da atividade de esterificação utiliza ácido láurico (FELTES, 2011; SANTOS *et al.*, 2013). A figura 14 abaixo apresenta a conversão em ésteres etílicos para cada uma das lipases utilizadas, e ao mesmo tempo demonstra, por meio de gráficos de colunas, a atividade desses biocatalizadores.

Figura 14 - Atividades de esterificação (U/g) referente a enzima Lipozyme[®] TL-IM, Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435 para as condições reacionais (razão molar de 1:1 (Ácido: Álcool), 40°C, 150 rpm; 10h, 20h, 40h e 120h de reação).



Observando o gráfico percebe-se que a medida que os ácidos graxos são convertidos em ésteres na reação de esterificação a atividade enzimática diminui, a exemplo, a atividade enzimática da Novozym[®] 435 decaiu de 36,16 U/g no início da reação (conversão de $\approx 41,9 \pm 0,11\%$) para 6,03 U/g ao final da reação (conversão de $\approx 90,1 \pm 0,02\%$). Esse comportamento deve-se a disponibilidade de substratos presentes no meio reacional, como cita Leite, Filho e Rocha (2004), para uma dada concentração de enzima, a velocidade da

reação aumenta com a concentração do substrato até um valor limite, onde inicia-se a saturação dos sítios ativos da enzima. Neste contexto, os baixos valores de atividade enzimática, apresentados nas altas taxas de conversão, podem estar relacionadas pela baixa concentração de substratos presentes no meio reacional.

A Novozym[®] 435 é a enzima atualmente mais utilizada em trabalhos envolvendo reações de modificação de óleos e gorduras, principalmente por sua alta atividade e versatilidade frente a diferentes substratos (SANTOS, 2011). A atividade de esterificação encontrada para a lipase Novozym[®] 435 foi um pouco superior à encontrada para a Lipozyme[®] RM-IM, e a mesma obteve a atividade de esterificação superior a apresentada pela Lipozyme[®] TL-IM, o que já era esperado tendo em vista o comportamento apresentado na análise da combinação de enzimas descrita no item 5.3. Na literatura foram encontrados diferentes comportamentos para essas enzimas, a exemplo, temos o trabalho realizado por Erig (2014) onde a lipase Novozym[®] 435 obteve o menor valor de atividade frente as lipases Lipozyme[®] RM-IM e Lipozyme[®] 435, que obteve a melhor atividade. Contudo, pode-se observar que as condições em que essas lipases são expostas, os substratos utilizados e o tipo de reação envolvida são fatores que podem influenciar a sua atividade catalítica.

5.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA[®] 10.0, seguindo os níveis de significância determinados em cada situação, conforme as condições utilizadas. A seguir são apresentadas os resultados e discussões a respeito do estudo estatístico, e os valores de conversão em ésteres etílicos para cada experimento descrito pelo planejamento experimental.

5.6.1 Planejamento experimental

As condições propostas pelo planejamento experimental são apresentadas pela tabela 8. Ao todo foram realizados 17 ensaios experimentais, sendo 08 ensaios nos pontos fatoriais, 06 ensaios nos pontos axiais e 03 repetições no ponto central. As repetições no ponto central são necessárias pois proporcionam estimar os erros experimentais e verificar o ajuste do modelo (MAIA, 2013). A tabela abaixo apresenta as variáveis independentes codificadas (entre parênteses) e reais (valores de temperatura, teor de água e massa de biocatalisador), e a variável dependente correspondente ao teor de ésteres presentes no produto final.

Tabela 8 - Planejamento fatorial completo 2³ para a reação de esterificação do óleo de frango. Outras especificações são descritas no item 4.9.

E N S A I O S	Variáveis independentes						Variável dependente
	Codificadas			Reais			
	X ¹	X ²	X ³	T	C*	A*	E*
1	-1	-1	-1	35	4	5	50,58±0,01
2	-1	-1	1	35	4	15	50,26±0,13
3	-1	1	-1	35	8	5	51,66±0,75
4	-1	1	1	35	8	15	51,93±0,38
5	1	-1	-1	45	4	5	51,42±0,06
6	1	-1	1	45	4	15	49,96±0,63
7	1	1	-1	45	8	5	52,85±0,91
8	1	1	1	45	8	15	49,98±0,24
9	-1,6818	0	0	31,6	6	10	52,03±0,06
10	1,68179	0	0	48,4	6	10	55,81±0,14
11	0	-1,68179	0	40	2,6	10	54,95±0,25
12	0	1,68179	0	40	9,4	10	54,85±0,07
13	0	0	-1,6818	40	6	1,6	53,22±0,20
14	0	0	1,68179	40	6	18,4	54,91±0,16
15©	0	0	0	40	6	10	57,60±0,01
16©	0	0	0	40	6	10	58,85±0,38
17©	0	0	0	40	6	10	57,02±0,66

X1, T: Temperatura (C°), X2, C: Massa de biocatalisador (%); X3, A: Quantidade de Água (%); E: Teor de ésteres (%); ©: Refere-se ao ponto central adotado pelo planejamento experimental.

*Estão expressos em percentual (% m/m), em relação à massa de óleo adicionada, a qual foi de 2 g em todos os experimentos. Com exceção do teor de ésteres, onde este percentual é em relação ao produto final da reação.

Fonte: Autor

No geral, pode-se afirmar que os valores de teor de ésteres encontrados não variaram muito, sendo o maior valor (58,85±0,38%) alcançado a uma temperatura de 40°C, 6% m/m de biocatalisador e 10% m/m de água, e o menor valor (49,96±0,63%) obtido a uma temperatura de 45°C, 4% m/m de biocatalisador e 15% m/m de água. Numa análise prévia e visual dos resultados é possível observar que o catalisador utilizado consegue trabalhar em variadas condições operacionais, apresentando estabilidade nos resultados em praticamente todas as condições em que o mesmo foi empregado.

5.6.2 Análise estatística dos parâmetros de influência da variável resposta

Após a determinação do teor de ésteres etílicos utilizou-se o software STATISTICA[®] 10.0 para verificar a significância dos fatores adotados na reação em questão

e suas interações. A tabela 9 apresenta os efeitos causados por variável e pela interação das mesmas na produção dos ésteres etílicos (biodiesel).

Tabela 9 - Análise dos fatores de perturbação (efeitos) das variáveis independentes na conversão de ésteres etílicos para as condições impostas pelo planejamento experimental descrito no item 5.6.1.

Variáveis	Efeitos	Desvio Padrão	t (7)	p*
Média	58,01	1,37	42,1	0,00
1: Temperatura (L)	0,89	1,29	0,69	0,50
1: Temperatura (Q)	-4,09	1,42	-2,87	0,02
2: Massa de biocatalisador (L)	0,59	1,29	0,45	0,66
2: Massa de biocatalisador (Q)	-3,39	1,42	-2,38	0,04
3: Teor de Água (L)	-0,22	1,29	-0,17	0,86
3: Teor de Água (Q)	-3,99	1,42	-2,80	0,02
1L x 2L	-0,32	1,69	-0,19	0,85
1L x 3L	-1,07	1,69	-0,63	0,54
3L x 2L	-0,20	1,69	-0,12	0,90

* valores considerados significativos a 95% de confiança quando $p \leq 0,05$.

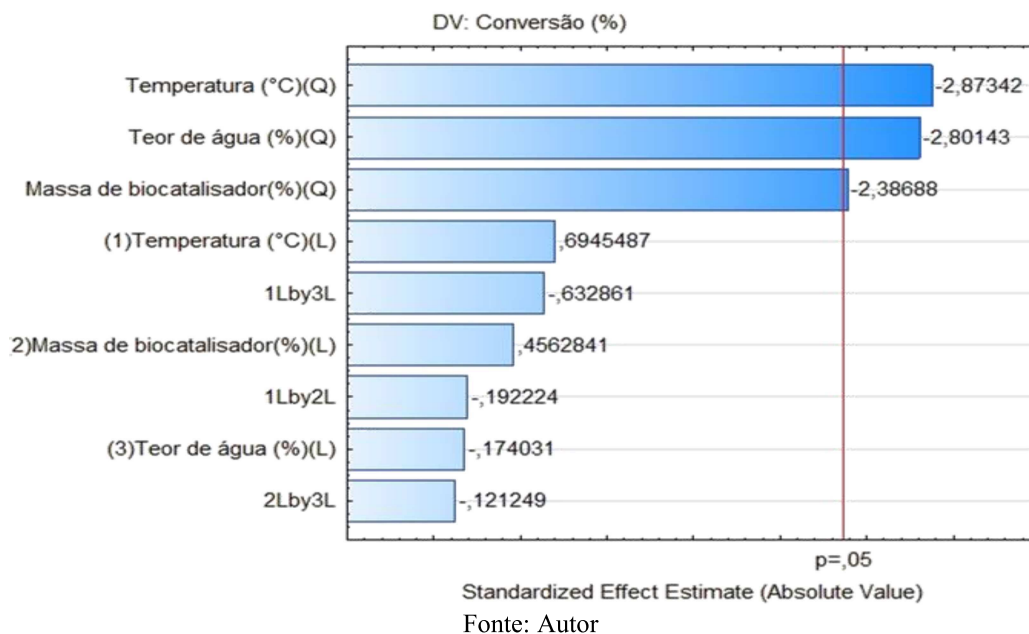
(L): termo linear; (Q): termo quadrático.

Fonte: Autor

A tabela acima destaca na cor vermelha as variáveis independentes (Temperatura (Q), Massa de biocatalisador (Q) e Teor de água (Q)) que influenciam significativamente o percentual de conversão em ésteres etílicos (variável dependente) a um limite de confiança de 95%. A influência dessas variáveis também pode ser constatada por meio do Diagrama de Pareto (Figura 15) que examina a sensibilidade das variáveis sobre a resposta de interesse.

A análise dos efeitos e o gráfico de Pareto nos diz se uma variável independente produzira ou não efeitos sobre uma variável dependente, e ainda se a interação entre essas variáveis independentes é significativa sobre a resposta em estudo, porém cada uma possui uma forma de afirmar isso. Na análise de efeitos o valor de (p) correspondente é esse mecanismo de identificação, ou seja, valores de (p) igual ou inferior a 0,05 representam uma alta probabilidade que mudanças na variável independente produzirá mudanças significativas na variável dependente. Já o gráfico de Pareto evidencia essa questão de forma visual, e é constatada seguindo a ideia de que quanto mais a barra horizontal estiver à direita da linha delimitada, tem-se uma alta probabilidade que mudanças na variável independente causem mudanças significativas na variável dependente.

Figura 15 - Gráfico de Pareto gerado da interação entre as variáveis independentes (temperatura, massa de biocatalisador e teor de água) e a variável dependente (conversão em ésteres etílicos).



Áfim de evitar discursões redundantes iremos analisar apenas a tabela de efeitos. Analisando a tabela de efeitos (tabela 9) observa-se que a temperatura (Q), o teor de água (Q) e a massa de biocatalisador (Q) são as variáveis que mais influenciam o processo reacional, e ainda, que nenhuma interação entre variáveis independentes apresentou efeito significativo sobre a variável dependente. O termo quadrático foi o único evidenciado para as três variáveis que influenciaram a resposta (conversão em ésteres etílicos). O efeito negativo das variáveis que mais influenciam a resposta indica que o efeito destas variáveis na conversão em ésteres, para os níveis adotados no planejamento experimental, será alcançado quanto menor for o seu valor, ou seja, para baixos valores de temperatura, teor de água e massa de biocatalisador podemos obter valores de conversão em ésteres etílicos equivalentes a altas temperaturas, teor de água e massa de biocatalisador.

Esse comportamento nos mostra que as lipases possuem boa estabilidade térmica, e devido a isso o alcance dos níveis de conversão exigidos pode ser obtido a um baixo custo energético, já que utilizando uma temperatura 35°C pode-se alcançar aproximadamente um valor de conversão em ésteres etílicos alcançado a uma temperatura de 45°C. Como observado anteriormente, um comportamento similar a temperatura foi notado para a faixa de valores (níveis) utilizados para as variáveis teor de água e massa de biocatalisador, assim, tanto o teor de água quanto a massa de biocatalisador podem ser utilizados em baixas

quantidades, ou seja, podem ser economizados no processo reacional, tendo em vista que a água é um bem precioso e escasso, e lipases são caras. Sendo assim, o processo reacional será mais viável economicamente uma vez que menores quantidades dessas duas variáveis poderão ser utilizadas.

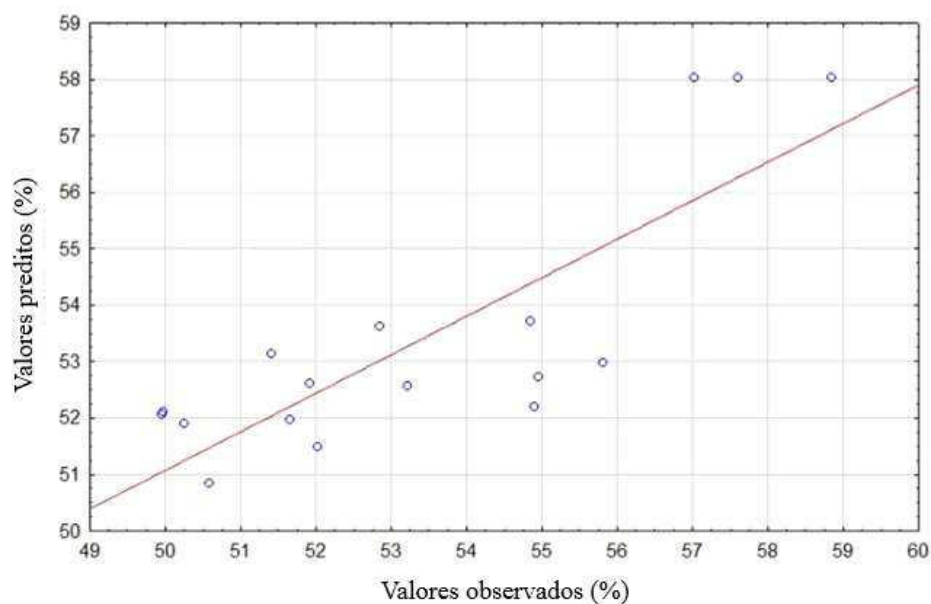
Por meio dos resultados do planejamento experimental, fornecidos pelo tratamento estatístico computacional, uma análise de regressão foi realizada para obtenção dos coeficientes de regressão relacionados as variáveis independentes e suas interações. A partir dos coeficientes de regressão um modelo matemático (equação 7) foi gerado para representar o comportamento da variável dependente, referente a conversão de ésteres etílicos obtidos na reação de esterificação do óleo de frango.

$$\text{Conversão} = -113,55 + 6,94*T - 0,082*T^2 + 5,99*M^2 - 0,42*M + 2,49*A - 0,80*A^2 - 0,016*T*M - 0,21*T*A - 0,010*M*A \quad (7)$$

Onde: T é a temperatura (Q); A: é o teor de água (Q); M: é a massa de biocatalisador (Q).

A Figura 16 apresenta graficamente os valores de conversão em ésteres etílicos observados versus os preditos pelo modelo estatístico, descrito na equação 7 acima, para a reação de esterificação do óleo de frango. A adequação do modelo pode ser observada pela proximidade dos pontos experimentais à reta, e também pelo valor do coeficiente de determinação (R^2). Com um valor de R^2 igual a 0,68, podemos dizer que 68% da proporção de variação total da variável dependente (conversão em ésteres etílicos) é explicada pela variação das variáveis independentes (Temperatura, teor de água e massa de biocatalisador). Portanto, 32% da variância da regressão não depende das variáveis estudadas, ficando claro que existem outros fatores que poderiam ser importantes para a reação de esterificação do óleo de frango.

Figura 16 - Valores previstos pelo modelo versus os valores observados experimentalmente para a conversão em ésteres etílicos.



Fonte: Autor

De forma a avaliar a qualidade estatística do modelo matemático gerado, realizou-se o teste de F de Fisher através da análise de variância (ANOVA), apresentada na tabela 10 abaixo, para a resposta conversão em ésteres etílicos. A análise de variância para o modelo foi realizada a um nível de confiança de 95%.

A análise de variância (ANOVA) possibilita conhecer se não há efeito significativo das variáveis na conversão estudada (hipótese nula) ou há efeito significativo (hipótese alternativa), e se as variáveis atuam independentemente sobre a conversão estudada (hipótese nula) ou há interação entre elas (hipótese alternativa). Para se testar a aceitação ou rejeição da hipótese nula deve se comparar o valor do F calculado presente na tabela ANOVA acima, que está em concordância com o valor de (p), com o valor de F tabelado encontrado na tabela F de Fisher – 95% de confiança, presente no anexo 2. Se o valor do F calculado (F_{cal}) for maior que o valor do F tabelado (F_{tab}) dizemos que a hipótese nula foi rejeitada, caso contrário dizemos que ela foi aceita. Nesse contexto, analisando a tabela ANOVA percebe-se que, para um valor de F tabelado igual a 5,59, apenas as variáveis temperatura (Q), o teor de água (Q) e a massa de biocatalisador (Q) foram significativas (hipótese nula rejeitada) já que o valor de $F_{cal} > F_{tab}$, e que nenhuma interação entre as variáveis foi significativa (hipótese nula aceita) tendo em vista que $F_{cal} < F_{tab}$.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para a resposta conversão em ésteres etílicos de óleo de frango para as condições impostas pelo planejamento descrito no item 5.6.1.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p*
1: Temperatura (L)	2,76	1	2,76	0,48	0,5
1: Temperatura (Q)	47,20	1	47,20	8,26	0,02
2: Massa de biocatalisador (L)	1,19	1	1,19	0,21	0,66
2: Massa de biocatalisador (Q)	32,57	1	32,57	5,70	0,04
3: Teor de Água (L)	0,17	1	0,17	0,03	0,86
3: Teor de Água (Q)	44,87	1	44,87	7,85	0,02
1L x 2L	0,21	1	0,21	0,04	0,85
1L x 3L	2,29	1	2,29	0,40	0,54
3L x 2L	0,08	1	0,08	0,01	0,9
Regressão	85,68	9	9,52	1,67	
Resíduo	40,02	7	5,72		
Total	125,70	16		F _{tab} (1,7; 95%) = 5,59	

F_{tab}: é determinado pelo grau de liberdade da variável analisada em relação ao grau de liberdade residual com significância a 95% de confiança. Esse valor é encontrado a partir da tabela F de Fisher – 95% de confiança.

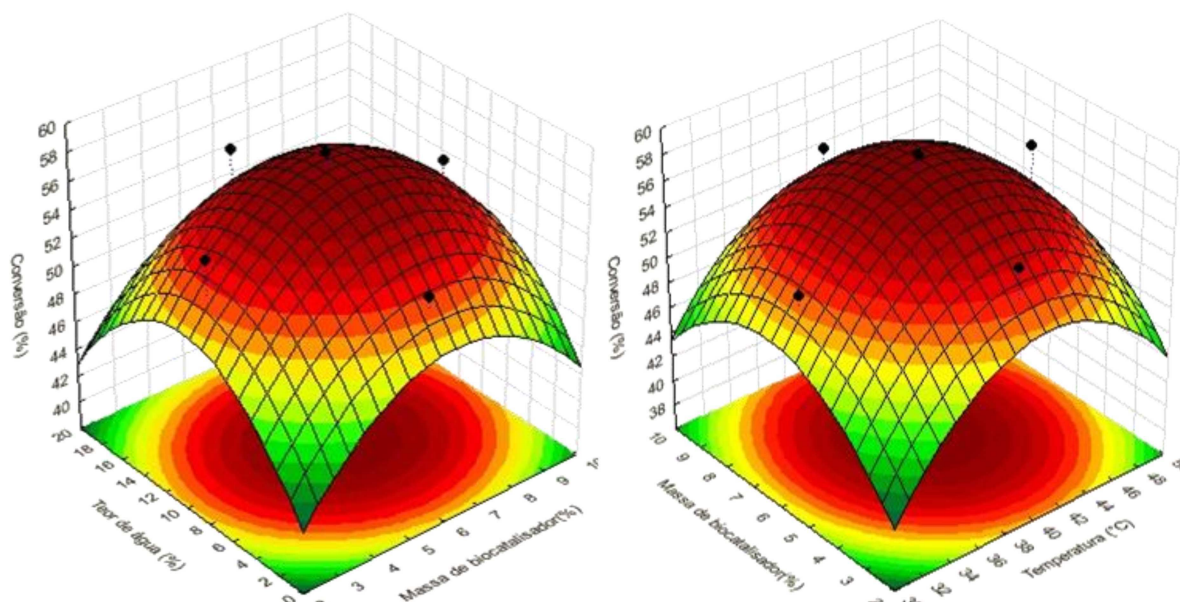
* valores considerados significativos a 95% de confiança quando $p \leq 0,05$.

Fonte: Autor

Rejeitando a hipótese nula para variáveis individuais afirmamos que existe uma influência significativa dessas variáveis no percentual de conversão em ésteres etílicos obtida, ou ainda, que mudanças na variável independente produzirá mudanças significativas na variável dependente. No entanto, aceitando a hipótese nula para as interações entre as variáveis temos que as variáveis atuam independentemente sobre a conversão estudada.

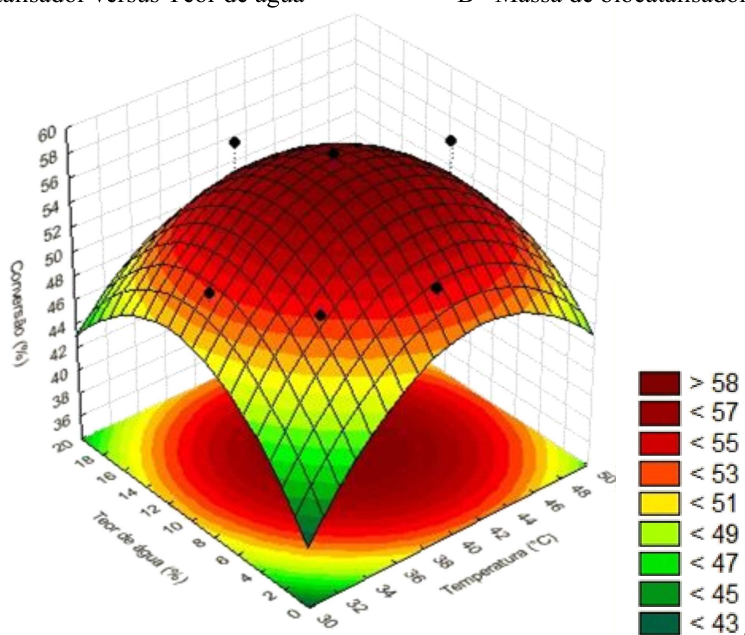
Afim de identificar as condições que maximizam a conversão de ésteres etílicos, gerou-se as superfícies de Respostas apresentadas na figura 17. Os maiores valores de conversão de ésteres etílicos gerados a partir do óleo de frango são obtidos para os níveis centrais, sendo o melhor valor de conversão encontrado ($58,85 \pm 0,38\%$) para a temperatura de 40°C, teor de água de 10% m/m e massa de biocatalisador de 6% m/m.

Figura 17 - Curva de Resposta e Superfícies de Respostas em função da conversão em ésteres etílicos, para massa de biocatalisador versus teor de água (A); Massa de biocatalisador versus temperatura (B); Temperatura versus teor de água (C).



A –Massa de biocatalisador versus Teor de água

B –Massa de biocatalisador versus Temperatura



C –Teor de água versus Temperatura

Fonte: Autor

Observando as superfícies de respostas provenientes da conversão em ésteres etílicos em função de duas das variáveis independentes estudadas (figura 17), fica claro e perceptível através das diferentes cores o percentual obtido da variável resposta (conversão). E ainda, por meio dos pontos espalhados sobre as superfícies de respostas temos uma análise facilitada da influência das variáveis sobre a resposta, pois à medida que cruzamos as informações das variáveis independentes (temperatura, teor de água, massa de biocatalisador),

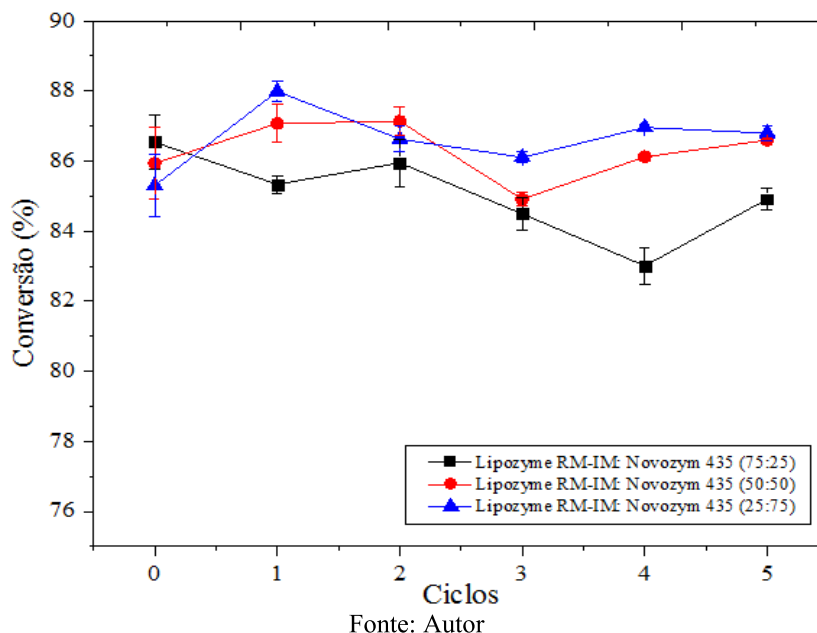
em cada eixo correspondentes a cada ponto, temos um valor resultante para a variável dependente (conversão em ésteres etílicos).

Neste contexto, analisando as superfícies de respostas da figura 17, vemos que existe um valor mínimo e máximo que as variáveis temperatura, teor de água e massa de biocatalisador podem assumir para que os valores ótimos de conversão sejam alcançados. Para a superfície de resposta da figura 17 (A), temos que o intervalo ótimo de valores para a variável massa de biocatalisador, é conseguido na faixa que vai de 5 %m/m a 7 %m/m, e o intervalo de valores para a variável teor de água que vai de 7 %m/m a 13 %m/m, sendo que 6 %m/m e 10 %m/m são os valores que resultaram na melhor conversão. Para a superfície de resposta da figura 17 (B), observamos que o intervalo ótimo de valores para a variável massa de biocatalisador é o mesmo visto anteriormente na figura 17 (A), enquanto o intervalo de valores para a variável temperatura vai de 37°C a 44°C, sendo que 6 %m/m e 40°C são os valores que resultaram na melhor conversão. E ainda, para a superfície de resposta da figura 17 (C), nota-se que o intervalo ótimo de valores para a variável teor de água é o mesmo visto na figura 17 (A), e o intervalo de valores para a variável temperatura é o mesmo visto na figura 17 (B), sendo que 10 %m/m de água e 40°C de temperatura foram os valores que resultaram na melhor conversão.

5.7 Estabilidade Operacional dos biocatalisadores

A estabilidade enzimática no meio de reação permite que reações de vários lotes e a implementação de sistemas contínuos ou descontínuos ocorra em distintas aplicações indústrias (SOARES, 2014). Partindo desse contexto, a figura 18 ilustra a manutenção da atividade catalítica da combinação de enzimas entre a lipase Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435 para as proporções (75%:25%), (50%:50%) e (25%:75%) em 5 ciclos de reuso. Essas combinações mantiveram uma operacionalidade catalítica de 95,9%, 98,2% e 99,5%, respectivamente, ao final dos 5 ciclos de reação consecutivos, mostrando que a variação na composição das combinações não influenciou significativamente os resultados obtidos, uma vez que as lipases responderam em uma faixa de valores muito próxima. Essa observação é algo positivo, tendo em vista há possibilidade de reduzir o custo operacional através da redução do uso da lipase de maior valor comercial. Estudos conduzidos por Alves *et al.* (2014), mostraram que a combinação de enzimas (80% de Lipozyme[®] RM-IM e 20% de Novozym[®] 435) manteve 90% de operacionalidade catalítica ao final de 15 ciclos, mostrando coerência dos dados obtidos nesse trabalho.

Figura 18 - Estabilidade operacional obtida através da síntese de oleato de etila para a combinação entre as lipases Lipozyme[®] RM-IM e Novozym[®] 435, nas proporções 75%:25% (■), 50%:50% (●) e 25%:75% (▲), para as condições adotadas: (razão molar de 1:1 (álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 24h de reação).

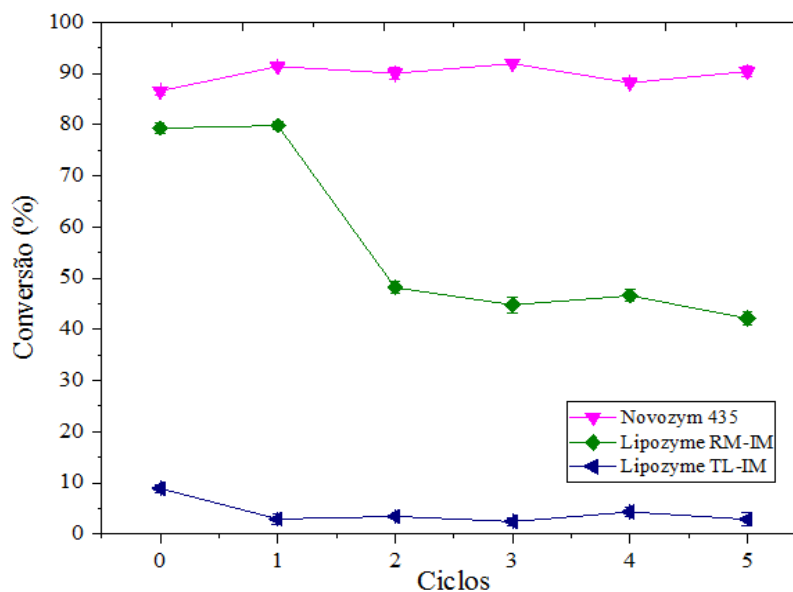


A figura 19 abaixo apresenta o comportamento das lipases Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM-IM e Lipozyme[®] TL-IM, com relação a manutenção da atividade catalítica na síntese de oleato de etila ao longo 5 ciclos de reuso. Elas mantiveram, respectivamente, 94,18%, 52,80% e 27,45% de operacionalidade catalítica ao final dos ciclos de reação consecutivos. Essa estabilidade operacional observada já era algo esperado, tendo em vista o comportamento catalítico apresentado no ensaio de atividade enzimática, descrito no item 5.5. A Novozym[®] 435 apresentou um comportamento quase que constante, como mostra a figura 19, indicando uma ótima estabilidade operacional, diferente da Lipozyme[®] RM-IM e Lipozyme[®] TL-IM que apresentaram uma queda de 47,2% e 72,5%, respectivamente, mostrando que a etapa de lavagem necessária para reutilização das lipases, procedimento adotado após cada reação, influenciou bastante no comportamento catalítico destas.

Trabalhando com a Novozym[®] 435, Souza (2013) e Santin (2014), observaram uma estabilidade operacional acima de 90% ao final de 12 e 14 ciclos, respectivamente, utilizando ácido oleico e ácido graxo vegetal de soja como substrato. Agueiras, Souza e Langone (2013) e Santin (2014), utilizando os mesmos substratos observaram uma estabilidade operacional, para a Lipozyme[®] RM-IM, acima de 80% e 90%, respectivamente, ao final de 7 e 13 ciclos reacionais. Com relação a Lipozyme[®] TL-IM não foram encontrados

trabalhos similares ao realizado neste estudo, ou seja, usando algum tipo de ácido graxo e condições operacionais parecidas, sendo assim, não foi possível realizar uma comparação com a literatura.

Figura 19 - Estabilidade operacional da síntese de oleato de etila para as enzimas Lipozyme[®] TL-IM (◄), Lipozyme[®] RM-IM (◆) e Novozym[®] 435 (▼) para as condições adotadas: (razão molar de 1:1(álcool: óleo), 37°C, 150 rpm e 24h de reação).



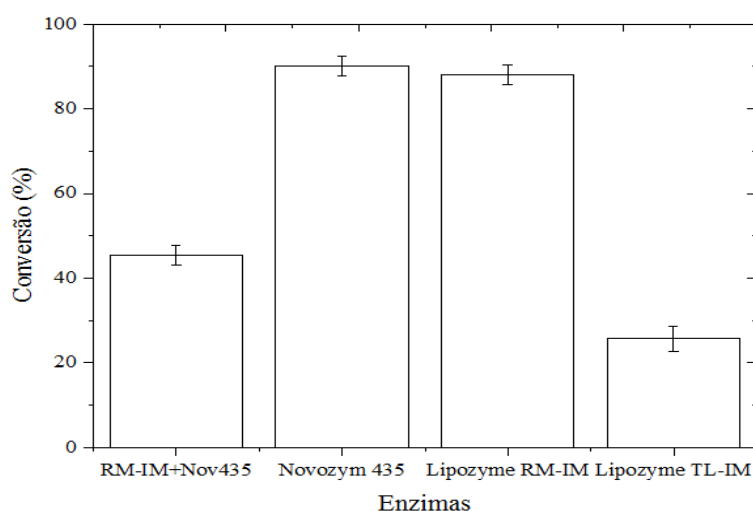
Fonte: Autor

A redução da estabilidade operacional, observada para algumas das enzimas individuais e para a combinação de enzimas, podem estar relacionadas à perda de massa catalítica devido a etapa de lavagem das enzimas após cada ciclo reacional, ocasionada pela remoção não intencional de massa catalítica e conseqüentemente redução do número de enzimas disponíveis para atuarem sobre os substratos, mesmo com o hexano proporcionando uma maior retenção na atividade da lipase (SOUZA, 2013). Segundo Poppe (2012) este solvente remove a camada óleo/biodiesel formado em torno na enzima, responsável por limitar a difusão de substrato e produto, que poderiam inativar ou inibir a atividade da lipase. Um outro fator que pode influenciar a operacionalidade enzimática é o tipo de suporte empregado como sugere Gomes (2006), pois segundo Ficanha (2014), bateladas consecutivas da reação de interesse podem ocasionar o desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários e perda de suporte por atrito ou dissolução, o que pode levar a baixos valores de estabilidade operacional.

5.8 Verificação do comportamento catalítico combinado e individual das lipases

Esse ensaio experimental teve como proposta, dentre outras, verificar e comparar os dados de conversão obtidos na síntese de oleato de etila, descrita no item 4.6.1, tendo em vista que o óleo de frango diferentemente do ácido oleico possui uma composição de ácidos graxos, podendo os dados de conversão divergirem ou não dos encontrados para um único ácido graxo. Das reações realizadas, a que levou Novozym[®] 435 como catalizador obteve a melhor conversão em ésteres etílicos, alcançando um valor $90,21 \pm 0,31\%$, enquanto a pior conversão foi obtida pela presença da Lipozyme[®] TL-IM, na ordem de $25,69 \pm 0,97\%$. Já a Lipozyme[®] RM-IM e a combinação de lipases obteve um comportamento intermediário as duas lipases anteriores, com um valor de conversão de $87,96 \pm 0,34\%$ e $45,43 \pm 0,25\%$, respectivamente. A figura 20 apresenta o comportamento descrito acima de forma gráfica.

Figura 20- Valores de conversão obtidos na esterificação do óleo de frango hidrolisado para a combinação entre as enzimas Lipozyme[®] RM-IM (75%) e Novozym[®] 435 (25%), e para as enzimas individuais Lipozyme[®] TL-IM, Lipozyme[®] RM-IM, e Novozym[®] 435 para as condições reacionais (razão molar de 1:1 (Óleo: Álcool), 40°C, 150 rpm e 24h de reação).



Fonte: Autor

A literatura é vasta e diversifica, porém não foram encontrados trabalhos especificamente sobre a esterificação do óleo de frango empregando as mesmas enzimas estudadas nesse trabalho, sendo assim, como o ácido oleico é um dos componentes majoritários dessa matéria-prima foi feita uma aproximação prioritária a partir de trabalhos que tratam da esterificação enzimática do ácido oleico, e de forma complementar comparou-se com outras matérias-primas. Neste contexto, observou-se que o comportamento da Novozym[®] 435 se assemelhou com o observado por Souza (2013) e Ramos (2017), que obtiveram uma

conversão de $\approx 90\%$, para as condições adotadas, usando o ácido oleico e óleo de fritura, respectivamente. O resultado proveniente da Lipozym[®] RM-IM também foi similar ao encontrado na literatura, tendo em vista que Aguiéiras, Souza e Langone (2013) e Ramos (2017) usando a mesma lipase obtiveram conversões superiores a 90%, para as condições adotadas, usando o ácido oleico e óleo de macaúba, respectivamente. Já o comportamento da Lipozyme[®] TL-IM foi superior ao encontrado por Aguiéiras (2011) que observou uma conversão inferior a 15% para as condições adotadas (48h, 80°C e 400 rpm). Esse comportamento pode ser justificado pela capacidade da Novozym[®] 435, como lipase não-específica, de poder catalisar o substrato independente da região do grupo funcional, ao contrário da Lipozyme[®] TL-IM e Lipozyme[®] RM-IM, como lipase 1,3-específicas, que possui um comportamento regioseletivo, ou seja, podem clivar ácidos graxos das posições terminais do glicerol em triglicerídeos (VÉRAS, 2012).

5.9 Análises físico-química dos ésteres etílicos

Os resultados da caracterização físico-química dos ésteres etílicos são apresentados na tabela 11 abaixo. Todos os valores foram obtidos em duplicata seguindo as metodologias descritas no item 4.12. Vale salientar que a caracterização físico-química, tanto do óleo como do biodiesel, são importantes, a exemplo, para se conhecer as propriedades físicas e químicas de ambos, para se ter um controle de qualidade e atender aos parâmetros exigidos na produção de biodiesel. Realizando uma busca na literatura observou-se que alguns dos resultados encontrados possuem coerência e uma aproximação com a mesma, já outros possuem uma característica mais específica do óleo em estudo. Lembrando que todas as análises realizadas seguiram as principais metodologias utilizadas pela indústria.

Tabela 11 - Resultados das análises físico-químicas dos ésteres etílicos (biodiesel).

Parâmetros avaliados	Resultados
Índice de Acidez (mgKOH/g)	72,50±0,33
Estabilidade Oxidativa (Horas)	0,17±0,02
Densidade (g/cm ³)	0,89±0,01
Viscosidade Cinemática (mm ² /s)	10,68±0,04

Fonte: Autor

O resultado do ensaio de índice de acidez do biodiesel, levando em consideração ao obtido a partir do óleo de frango hidrolisado (134,78±1,92 mgKOH/g), mostra uma redução de 46,20% para uma conversão em ésteres etílicos de 45,43%, resultante da reação

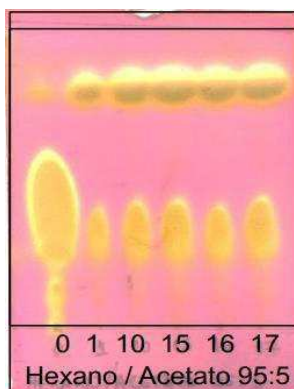
esterificação do óleo de frango via enzimas combinadas, descrita no item 5.8. Essa redução indica que quase a metade do percentual de ácidos graxos presentes no óleo de frango hidrolisado foram convertidos. Esse argumento pode ser reforçado a partir da análise por Cromatografia de Camada Delgada – (CCD), descrita no item 5.10, onde pode se observar de forma visual o quantitativo de ácidos graxos livres convertidos. Se tratando dos ensaios de viscosidade cinemática e da densidade, os valores encontrados estão bem próximos dos valores observados por Tomiello (2014), onde o mesmo observou um valor de viscosidade cinemática de 8,66 (mm²/s) e um valor de densidade de 0,88 (g/cm³) para as condições adotadas em seu trabalho.

O ensaio de estabilidade oxidativa apresentou um baixo valor, o que já era esperado tendo em vista o elevado percentual de ácidos graxos insaturados contidos no óleo de frango, e devido ao percentual ainda presente no meio reacional após a reação de esterificação, já que apenas 58,85±0,38% foram convertidos. Um outro fator que poderia ter causado esse baixo valor de estabilidade diz respeito a presença elevada de umidade no biodiesel, uma vez que foi acrescentado água ao meio reacional mediante a umidade do óleo de frango, pois segundo Moreira (2009), a umidade tem um efeito proeminente na degradação do biodiesel. Por meio da EN 14214, que trata dos métodos de teste para ésteres metílicos de ácidos graxos (tipo de biodiesel mais comum), todas os resultados dos parâmetros avaliados e descritas acima, com exceção da densidade, estão fora dos limites aceitáveis pelas especificações da norma para a comercialização do biodiesel. Sendo assim, estudos posteriores devem adequar esses e outros parâmetros exigidos por norma, de forma a atender aos padrões e especificações do biodiesel.

5.10 Análise por Cromatografia em Camada Delgada - (CCD)

Para verificar e acompanhar qualitativamente o progresso da reação de esterificação do óleo de frango hidrolisado, foi realizada uma CCD para visualizar a conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos das amostras reacionais dos experimentos 1, 10, 15, 16 e 17 do planejamento experimental, descrito no item 5.6.1. A figura 21 apresenta a placa com os sinais cromatográficos revelados.

Figura 21 – Placa utilizada na CCD para acompanhamento dos experimentos do planejamento experimental e da amostra de partida (óleo de frango hidrolisado).



Fonte: Autor

Os experimentos correspondentes as marcações 0, 1, 10, 15, 16 e 17 são respectivamente referentes a amostra de partida (óleo de frango hidrolisado) e aos valores de conversão (50,58%, 55,81%, 57,60%, 58,85% e 57,02%). Observando a placa de CCD visualizamos um grande sinal cromatográfico próximo a base esquerda da placa, referente aos ácidos graxos e aos resquícios de triglicerídeos presentes no óleo de frango hidrolisado, e sinais menores na base da esquerda para a direita, referentes aos ácidos graxos não convertidos para os experimentos 1, 10, 15, 16 e 17. Os ácidos graxos presentes no óleo de frango possuem uma maior afinidade com a fase estacionária, ficando mais adsorvidos na base da placa devido serem mais polar do que os ésteres formados. Já os ésteres etílicos formados nas reações, responsáveis pelo aparecimento das manchas circulares na parte superior da placa, ficaram menos adsorvidos na placa devido serem menos polar do que os ácidos graxos (ABRIL, 2012). A medida que os ácidos graxos são convertidos em ésteres etílicos, ou seja, a conversão em ésteres se aproxima do seu valor máximo, os sinais ou manchas circulares na parte superior da placa se intensificam, indicando altos valores de conversão, e os sinais menores na base da esquerda para a direita, referentes aos ácidos graxos não convertidos ficam cada vez menores, concordando com o indicativo para altos valores de conversão obtidos na reação analisada.

Um parâmetro importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção - (R_f) de um composto, que é uma medida relativa do caráter polar da substância. O R_f é função do tipo de suporte (fase estacionária) e do eluente (fase móvel) empregado, e é definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente. Para condições pré-estabelecidas (sistema de solvente utilizado, adsorvente usado, espessura da camada de adsorvente e quantidade relativa de material) um determinado

composto percorrerá sempre uma distância fixa relativa à distância percorrida pelo solvente. Adaptado de (NUQUIOCAT, 2015). Com base nos sinais cromatográficos apresentadas pela placa de CCD, foi possível determinar o fator de retenção para cada ponto de teste inseridos na placa. Os fatores de retenção relacionados aos valores de conversão em ésteres correspondentes aos experimentos 1, 10, 15, 16, 17 e a amostra de partida são, respectivamente, 0,83; 0,84; 0,85; 0,86; 0,88 e 0,55. Enquanto que os fatores de retenção relacionados aos valores de ácidos graxos não convertidos, correspondentes aos experimentos 1, 10, 15, 16, 17 são, respectivamente, 0,25; 0,28; 0,30; 0,26; 0,31. Quando se compara dois valores de R_f em condições idênticas, o composto com maior fator de retenção é menos polar, pois interage menos com o adsorvente polar (RODRIGUES, 2015). Portanto, fica confirmada a presença e formação dos ésteres etílicos pela sua menor interação com a fase estacionária (menos polar; $R_f \geq 0,83$) e dos ácidos graxos pela sua maior interação com a fase estacionária (mais polar; $R_f \leq 0,31$).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho aproveita e agrega valor a gordura de frango (resíduo industrial) ao produzir biodiesel (biocombustível de alto valor comercial) ao mesmo tempo que busca otimizar essa produção usando lipases combinadas como catalisador.

Por meio da CG-EM descobriu-se um percentual de 49,16% de ácidos graxos saturados, com majoritário de ácido palmítico (38,09%), e 50,84% de ácidos graxos insaturados, com majoritário dos ácidos oleico (24,41%) e linoleico (21,04%). A caracterização físico-química do óleo possibilitou conhecer suas características específicas, estando alguns dos resultados encontrados coerentes com a literatura, e outros detentores de características mais específica do óleo em estudo. Com relação a caracterização físico-química do biodiesel, todos os resultados dos parâmetros avaliados, com exceção da densidade, ficaram fora dos limites aceitáveis pela norma comparada.

A síntese de oleato de etila alcançou uma conversão de 86,54% em ésteres etílicos, utilizando 75% de Lipozyme[®] RM-IM e 25% de Novozym[®] 435, sendo esta escolhida para as reações do planejamento experimental e para outras reações envolvendo o óleo de frango. A reação de esterificação do óleo de frango, realizada no estudo cinético, atingiu um valor de conversão de 68,06% em ésteres etílicos para um período de 24 horas, indicando que esse período de tempo é o necessário para as reações de esterificação alcançarem seu valor máximo de conversão.

De forma a conhecer o comportamento catalítico das enzimas, realizou-se um ensaio para avaliar a atividade enzimática, onde foram constatadas uma atividade de 36,16 U/g para a Novozym[®] 435, uma atividade de 34,22 U/g para a Lipozyme[®] RM-IM e uma atividade de 4,38 U/g para a Lipozyme[®] TL-IM. A partir desse ensaio ficou comprovado que a Novozym[®] 435 é a enzima mais ativa e adequada para o tipo de reação, ficando a Lipozyme[®] RM-IM como a melhor alternativa e a Lipozyme[®] TL-M como não adequada. O ensaio de estabilidade operacional, realizado para avaliar a manutenção da atividade catalítica, mostrou uma operacionalidade catalítica ao final de 5 ciclos reacionais de 94,18%, 52,80% e 27,45%, respectivamente, para a Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM-IM e Lipozyme[®] TL-IM. Sendo assim, a Novozym[®] 435 é mais indicada em situações que exigem reações de vários lotes e a implementação de sistemas com reutilização sucessiva sem perder significativamente operacionalidade catalítica.

A análise estatística mostrou que existe uma influência significativa das variáveis independentes (temperatura, massa de biocatalizador e teor de água) sobre a variável

dependente (conversão em ésteres etílicos), e que não há interação significativa entre temperatura, massa de biocatalizador e teor de água para exercer influência sobre a conversão em ésteres etílicos. Através das superfícies de respostas foi identificado que 10% de água, 40% de temperatura e 6% de biocatalizador foram as condições ótimas que promoveram a máxima conversão (58,9%) em ésteres etílicos na reação de esterificação do óleo de frango. Empregando as lipases comerciais (Novozym[®] 435, Lipozyme[®] TL-IM, e Lipozyme[®] RM-IM) para esta mesma reação, foram encontrados valores de conversão de $90,21 \pm 0,31\%$, $25,69 \pm 0,97\%$ e $87,96 \pm 0,34\%$ em ésteres etílicos, respectivamente. Contudo, a combinação de enzimas só é favorável ao aumento da conversão para as situações em que existe uma presença majoritária de Lipozyme[®] RM-IM ou Novozym[®] 435 junto a Lipozyme[®] TL-IM, e Lipozyme[®] RM-IM junto a Novozym[®] 435. Para as situações que divergem dessa condição, a atuação individual das enzimas Lipozyme[®] RM-IM ou Novozym[®] 435 é indicada.

Por fim, os ésteres etílicos obtidos no planejamento experimental passaram por uma análise qualitativa via Cromatografia em Camada Delgada, a qual confirmou a presença e formação de ésteres etílicos, pela sua menor interação com a fase estacionária (menos polar; $R_f \geq 0,83$), e a presença de ácidos graxos não reagidos pela sua maior interação com a fase estacionária (mais polar; $R_f \leq 0,31$). Essa análise cumpriu com sua proposta, e mostrou ser eficaz no acompanhamento do progresso dos processos reacionais o qual foi submetido neste estudo.

7 REFERÊNCIAS

ABRIL, Paulo Antônio Sette de. **Transesterificação enzimática de óleo de soja por lipase presente no concentrado bruto do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. Estudo do comportamento da lipase comercial Lipozyme[®] RM-IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. **Quím. Nova**. 2013, vol.36, n.5, pp.646-650. ISSN 0100-4042.

AGUIEIRAS, Erika Cristina Gonçalves. **Síntese de estolides empregando catálise enzimática**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

ALPTEKIN, Ertan; CANAKCI, Mustafa. Optimization of pretreatment reaction for methyl ester production from chicken fat. **Fuel**, v. 89, n. 12, p.4035-4039, dez. 2010.

ALVES, Joana S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **Rsc Adv.**, v. 4, n. 14, p.6863-6868, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC).

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis -. **Informações de mercado**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>. Acesso em: 20 set. 2017a.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e biocombustíveis. **Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 08.10.2017b.

ARANSIOLA, E. F. et al. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p.276-297, fev. 2014.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p.2070-2093, mai. 2012.

AZADI, Pooya et al. The evolution of the biofuel science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p.1479-1484, set. 2017.

BABAKI, Mohadese et al. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t -butanol and blue silica gel contents. **Renewable Energy**, v. 91, p.196-206, jun. 2016.

BERNARDES, Otávio Luiz. **Produção de Biodiesel por transesterificação enzimática de óleo de soja**, 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química Ambiental) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BET, Alan Ricardo; ROSA, Clarissa Dalla. Estudo de produção de biodiesel de 2º geração via catalise enzimática. In: **Anais do V Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão – (SEPE) e V Jornada de Iniciação Científica**, v.5, Chapecó: 2015. ISSN 2317-7489.

BOEY, Peng-lim et al. Crab and Cockle Shells as Catalysts for the Preparation of Methyl Esters from Low Free Fatty Acid Chicken Fat. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 2, p.283-288, 11 ago. 2010.

BOLIVAR, J. M.; EISL, I.; NIDETZKY, B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. **Catalysis Today**, p. 15–19, 2015.

BONAZZA, Horacio L. et al. Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces lanuginosus* Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p.1-15, 29 jun. 2017.

BONISSONI, C. et al. Produção de biodiesel de óleo de frango em ultrassom utilizando lipase comercial de *Rhizomucor miehei*. In: **Anais da VIII Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar - MICTI**. Santa Catarina. Araquari: Instituto Federal Catarinense, 2015.

CENTENARO, Graciela Salete; FURLAN, Valcenir Júnior Mendes; SOUZA-SOARES, Leonor Almeida de. Chicken fat: technological and nutritional alternatives. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, p. 619-630. set. 2008.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil -. **Balanco 2016 perspectivas 2017**. Disponível em: <http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/balanco_2016_perspectivas2017_web.pdf>. Acesso em: 15 set. 2017.

CHRISTOPHER, Lew P.; KUMAR, Hemanathan; ZAMBARE, Vasudeo P.. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p.497-520, abr. 2014.

DABDOUB, Miguel J.; BRONZEL, João L.; RAMPIN, Márcia A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Quím. Nova**. 2009, vol.32, n.3, pp.776-792. ISSN 0100-4042.

DIAS, Fernando Pedro. **Produção sustentável do biodiesel de óleo e gordura residual: estudo comparativo do processo de purificação do biodiesel com água e adsorventes sintéticos**. 2014. 178 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Civil, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

DÍAZ, Frida Liliana Cárdenas. **Competitividade e coordenação na avicultura de corte: análise de empresas (são paulo - brasil e lima- peru)**. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ENCARNAÇÃO, Ana Paula Gama. **Geração de Biodiesel pelos Processos de Transesterificação e Hidroesterificação, Uma Avaliação Econômica**. Orientador: Donato

A.G. Aranda. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ERIG, Cátia Lohmann et al. **Comparação da atividade de esterificação de diferentes lipases comerciais:** trabalho apresentado no VII Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar Santa Catarina. Araquari: Instituto Federal Catarinense, 2014. 5 p.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** 4^o ed. Berlin: Springer, 2000.

FELTES, Maria M. C. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe.** 2011. 223 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FELTES, Maria M. C. et al. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel via ethanolsis of chicken fat from processing by-products. **New Biotechnology**, v. 25, p.277-277, set. 2009.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p.197-212, mar. 2010.

FICANHA, Aline Matuella Moreira. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (cal b) pela técnica de sol-gel.** 2014. 70 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

FONTES, Marcelo Marques de. **Otimização da síntese de biodiesel a partir do óleo das sementes de algodoeiro.** 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

FONSECA, Stéphanie Baía Cancela da. **Aspectos técnicos e avaliação de metodologia para o acompanhamento da reação de glicerólise catalisada pelo derivado enzimático Lipozyme[®]TL-IM.** Orientadores: Prof. Agenor Furigo Jr. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FREIRE, Poliana C. M; FILHO, Jorge M; FERREIRA, Tânia A. P. C. Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 3, p.353-358, jun. 2013.

GAURAV, N. et al. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p.205-214, jun. 2017.

GOMES, M. A. **Obtenção de Biodiesel a partir de resíduos gordurosos obtidos de gordura animal – vísceras de frango.** 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

GOMES, Michelle. M. R. **Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe.** 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso

de processos Química e Bioquímicos, Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GOMES, Fabrício M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, Lorena, v. 29, n. 4, p.710-718, mar. 2006.

GUIMARÃES, Ingrid Aparecida dos Santos et al. **Estudo da produção enzimática de biodiesel a partir de óleo de frango em ultrassom**: trabalho apresentado no VIII Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar Santa Catarina. Araquari: Instituto Federal Catarinense, 2015. 5 p.

GULDHE, Abhishek et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p.1447-1464, jan. 2015.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, 2013.

HAMA, S.; KONDO, A. Bioresource Technology Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, 2012.

ILLANES, Andrés et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p.48-57, jul. 2012.

INC, Strem Chemicals,. **Lipozyme®RM-IM**. Disponível em: <https://www.strem.com/uploads/technical_notes/06-3120tech.pdf>. Acesso em: 23 set. 2017.

JOSHI, Girdhar et al. Challenges and opportunities for the application of biofuel. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p.850-866, nov. 2017.

JUBILUT, Paulo Roberto. **Avaliação do Potencial de Produção de Biodiesel a partir de Gorduras animais no Estado de Santa Catarina e Estudos de Conversão destas por transesterificação química**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010.

KNOTHE, Gerhard; RAZON, Luis F.. Biodiesel fuels. **Progress In Energy And Combustion Science**, v. 58, p.36-59, jan. 2017.

KOCHEPKA, Débora Merediane. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleos residuais e gorduras residuais empregando a lipase Novozym®435**. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

KOIZUMI, Tatsuji. Biofuels and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p.829-841, dez. 2015.

LAU, Peter C.k.; GROSSE, Stephan. The fundamentals and fun of biocatalysis. **Marine Enzymes For Biocatalysis**, p.17-69, 2013.

LEITE, Oldair D.; FILHO, Orlando F.; ROCHA, Fábio R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.337-341, abr. 2004.

LIMA, L. P.; FERNANDES, F. A. N. Avaliação do uso de ultrassom na produção de ácidos graxos via reação de saponificação seguida de hidrólise ácida. p. 10889-10896 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - (COBEQ) 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757.

LI, Wei; DU, Wei; LIU, Dehua. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p.122-127, abr. 2007.

LIN, Chia-wei; TSAI, Shuo-wen. Production of biodiesel from chicken wastes by various alcohol-catalyst combinations. **Journal Of Energy In Southern Africa**. Taiwan, p. 36-45. fev. 2015.

LIU, Wei et al. Biodiesel production from the esterification of fatty acid over organophosphonic acid. **Journal Of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p.893-899, jan. 2015.

LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

LIMA, Giovana de Fátima. **Avaliação de matriz de sílica modificada com óxidos mistos dispersos como sorvente na pré-concentração e especiação de íons metálicos usando sistema FIA-FAAS**. 2012. 176 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MAIA, Paulo Roberto. **Método do vetor gradiente multivariado**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2013.

MACHADO, Yguatyara de Luna. **Avaliação da estabilidade oxidativa e determinação da cinética de oxidação de óleos vegetais, ácido oleico e biodiesel utilizando o método PetroOXY (ASTM D7545)**. 2014. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

MANOEL, Evelin Andrade. **Resolução de derivados racêmicos do mio-inositol catalisada por lipases**. Orientadores: Prof(a). Maria Alice Zarur Coelho e Prof(a). Denise Maria Guimarães Freire. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MARULANDA, Victor F.; ANITESCU, George; TAVLARIDES, Lawrence L. Biodiesel Fuels through a Continuous Flow Process of Chicken Fat Supercritical Transesterification. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 1, p.253-260, 21 jan. 2010. American Chemical Society (ACS).

MELLO, Marcia Cristina Santos de. **Análise do impacto ambiental na produção de biodiesel via rotas: metílica alcalina e etílica enzimática.** Orientadores: Prof(a). Andréa Medeiros Salgado e Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

MELO, Danielle Caroline Cipriani. **Preparação de biocatalisadores contendo derivados da quitosana, lipase e partículas magnéticas para síntese de ésteres de cadeia longa.** 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2012.

MOURA, Kátia Regina Marques. **Otimização do processo de produção de biodiesel metílico do sebo bovino aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional - (DCCR) e a avaliação da estabilidade térmica.** 2008. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MOREIRA, Ana Luísa de Vasconcelos. **Produção de biodiesel a partir de gordura de frango.** 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade do Porto, Portugal, 2009.

NDE, Divine Bup; ASTETE, Carlos; BOLDOR, Dorin. ESolvent-free, enzyme-catalyzed biodiesel production from mango, neem, and shea oils via response surface methodology. **Amb Express**, v. 5, n. 1, p.1-12, dez. 2015. Springer Nature.

NETO, Pedro Ramos da Costa. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja.** 2002. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

NOVOZYMES. **Immobilized lipases for biocatalysis: for smarter chemical synthesis.** Disponível em: <https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Immobilised_Lipases.pdf>. Acesso em: 23 set. 2017.

NUQUIOCAT, Núcleo de Química Orgânica e Catálise -. **Química orgânica experimental.** 2015. Disponível em: <http://nuquiocat.quimica.blumenau.ufsc.br/files/2015/03/Apostila_QO_Blumenau_2015_2_Parte-I.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2017.

OLIVEIRA, Ulisses M. F. de et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, p.1-12, 10 out. 2017.

OLIVEIRA, Elaine de et al. **Extração e caracterização do óleo das vísceras do peixe tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) produzido no Açude Castanhão-CE.** 2012b. Disponível em: <<http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/1989/2871>>. Acesso em: 21 out. 2017.

OLIVEIRA, Ulisses Marcondes Freire de. **Desenvolvimento de biocatalisadores utilizando lipase de *Rhizomucor Miehei* (RmL) imobilizada em suporte quitosana e sua aplicação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila.** 2012a. 272 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

OLIVEIRA, Débora et al. INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA ALCOÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE MAMONA. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, p. 178-182. 25 mar. 2004.

PAAR, Anton. **SVM 3000 Stabinger Viscometer™.** 2015a. Disponível em: <http://www.metrohmsiam.com/petrochemist/PC_37/SVM_3000.pdf>. Acesso em: 16 out. 2017.

PAAR, Anton. **SVM 3000: Diesel Viscosity Classification.** 2015b. Disponível em: <<http://www.selectscience.net/SelectScience-TV/Videos/svm-3000-diesel-viscosity-classification/?videoID=2670>>. Acesso em: 16 out. 2017.

PASCHALIDOU, A.; TSATIRIS, M.; KITIKIDOU, K.. Energy crops for biofuel production or for food? - SWOT analysis (case study: Greece). **Renewable Energy**, v. 93, p.636-647, ago. 2016.

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

PEREIRA, Celeide. **Propriedades funcionais de sorvete de morango diet com adição da enzima lactase e transglutaminase otimizada através da metodologia de superfície de resposta.** 2014. 321 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

POPPE, J. K. et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, p. 50–56, 2015.

POPPE, Jakeline Kathiele. **Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em suportes hidrofóbicos.** 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PORTAL ACTION. **Experimento composto central.** 2017. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/611-experimento-composto-central>>. Acesso em: 01 nov. 2017.

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

PRADO, Jefferson Nery do. **Estudo sobre o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Uma análise sobre os municípios produtores de soja e as cooperativas de agricultura familiar.** 2015. 103 f. Tese (Doutorado) - Curso de Economia Aplicada, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

RAMOS, Luiz P. et al. Biodiesel: Raw Materials, Production Technologies and Fuel Properties. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p.317-369, 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

RICHETTI, Aline. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

RIGO, Elisandra. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. 2009. 190 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

RODIONOVA, M. V. et al. Biofuel production: Challenges and opportunities. **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p.8450-8461, mar. 2017.

RODRIGUES, João. **Cromatografia em Camada Fina (TLC) – Laboratório Online**. 2015. Disponível em: <<http://www.fciencias.com/2015/03/12/cromatografia-em-camada-fina-tlc-laboratorio-online/>>. Acesso em: 22 out. 2017.

RODRIGUES, Rafael C.; AYUB, Marco A. Záchia. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**. Porto Alegre, p. 682-688. 17 nov. 2010.

RODRIGUES, Jailson Silva. **Produção de biolubrificantes a partir de óleos de mamona (*Ricinus communis*) e de vísceras da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SANTIN, C. M. T. et al. **Estudo das lipases Lipozyme[®]RM-IM, Lipozyme[®]TL-IM e Novozym[®]435 para a produção de biodiesel**. 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1019-21569-144311.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

SANTOS, José C. S. dos et al. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p.16-26, mar. 2017.

SANTOS, Jaime Marcos Bohn dos. **Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*Acrocomia aculeata*) empregando enzima livre**. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SANTOS, Jose C. S. dos et al. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p.918-927, jun. 2015.

SANTOS, José Cleiton Sousa dos. **Otimização de biocatalizadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e**

químicas. 2015. 333 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SANTOS, J. P. C. dos; VIANA, S. M.; SOUSA, M. N. Produção de biodiesel a partir da gordura de frango pelo método de transesterificação heterogênea. p. 10376-10383. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015.

SANTOS, Joanna Silva et al. Glicerólise de óleo de peixe catalisada por lipase comercial de *Rhizomucor miehei* em meio com surfactante de grau alimentício. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p.46-51, nov. 2013.

SANTOS, José Cleiton Sousa dos. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SILVA, Alex Rodrigues; PRADOS, Carolina Porto; FIGUEREDO, Kytéria Sabina Lopes de. Estudo do tratamento do sebo de frango para obtenção de biodiesel. **Revista Cultural e Científica do Unifacex**, v. 13, n. 1, p.157-172, out. 2015.

SILVA, Tatiana Aparecida Rosa da. **Biodiesel de óleo residual: produção através da transesterificação por metanólise e etanolise básica, caracterização físico-química e otimização das condições reacionais**. 2011. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SILVEIRA, Sandro Dourado. **Produção de biodiesel de óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) via esterificação seguida de transesterificação metílica com catalisador básico**. 2014. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SCHULER, Alexandre Ricardo Pereira. **Processo de transesterificação metílica alcalina de óleos vegetais e gorduras animais e caracterização quantitativa de biodieseis**. 2010. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SCHUMACHER, Leon G.; GERPEN, Jon Van; ADAMS, Brian. Biodiesel fuels. **Renewable Energy: Focus Handbook**, v. 58, p. 36–59, 2009.

SOARES, Fabiana Andreia Schäfer de Martini. **Interesterificação química e enzimática de misturas de estearina de palma, óleo de coco e óleo de canola para formulação de margarinas com baixa concentração de isômeros *trans***. 2014. 316 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

SOUZA, Maria Cristiane Martins de. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. 2013. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SOUZA, L. T. A. **Enzymatic synthesis of *Jatropha curcas* biodiesel by ethylic route**. 2010. 118 f. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

TERRAZAS, Werner Damião Morhy. **Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante *Pichia pastoris***. 2012. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, Araraquara, 2012.

TEIXEIRA, Sandra Juliana Vieira. **Hidrólise Enzimática das Proteínas da *Dreche***. 2011. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Controle de Qualidade na Especialidade de Água e Alimentos, Universidade do Porto, Porto, 2011.

TIBURCIO, Breno Aragão. **Atores sociais, agricultura familiar e desenvolvimento territorial: uma análise do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel**. 2011. 234 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade). Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

TOMEI, Julia; HELLIWELL, Richard. Food versus fuel? Going beyond biofuels. **Land Use Policy**, v. 56, p.320-326, nov. 2016.

TOMIELLO, C. R. **Potencial do óleo de frango como Matriz Lipídica para Produção de Biodiesel**. 2014. 51p. Monografia de Conclusão de Curso-Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2014.

VALLE, Camila Peixoto do. **Síntese e caracterização de éstres lubrificantes a partir da modificação do óleo da mamona (*Ricinus communis*) e óleo das vísceras da Tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

VERDASCO-MARTÍN, Carlos M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p.75-86, jul. 2016.

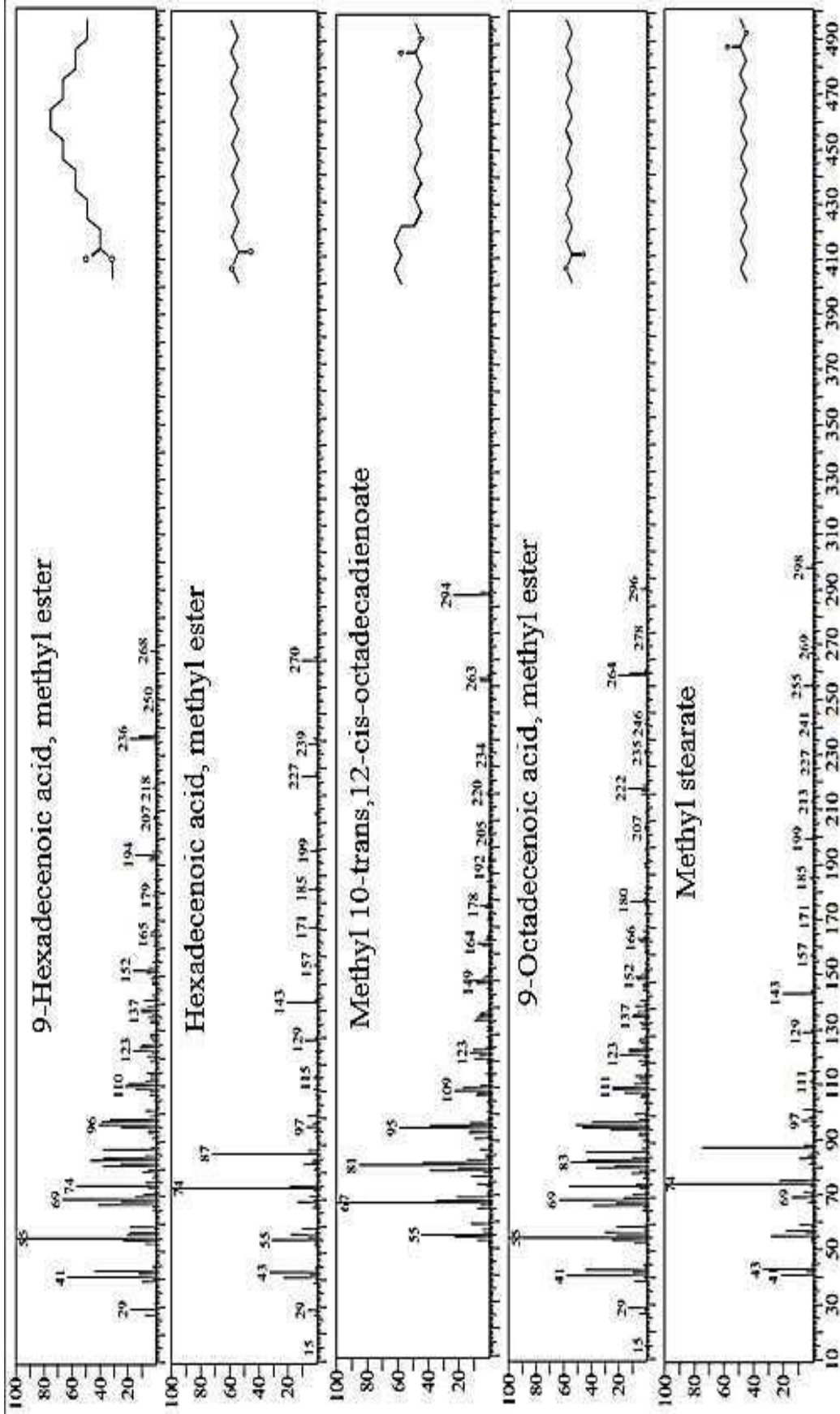
VERMA, Puneet; SHARMA, M. p. Comparative analysis of effect of methanol and ethanol on Karanja biodiesel production and its optimisation. **Fuel**, v. 180, p.164-174, set. 2016.

VÉRAS, Ilvania Costa. **Expressão heteróloga de lipases modificadas para melhoramento do processo de produção enzimática de biodiesel**. 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

WENLEI, X; NING, M. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p 890-896, 2010.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Espectros obtidos na Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa - (CG-EM) a partir do óleo de frango.



8.2 Anexo 2 - Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade

GL	V1																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240				
V2	1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	244.7	245.4	245.9	248.0	251.1	252.2	253.3	253.8				
	2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.298	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.448	19.471	19.479	19.492				
	3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.680	8.572	8.549	8.538				
	4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.954	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.803	5.717	5.688	5.643				
	5	6.608	5.736	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.558	4.464	4.431	4.382				
	6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.050	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.874	3.774	3.740	3.687				
	7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.445	3.340	3.304	3.249				
	8	5.318	4.459	4.066	3.839	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.150	3.043	3.005	2.947				
	9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.936	2.826	2.787	2.727				
	10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.774	2.661	2.621	2.559				
	11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.646	2.531	2.490	2.428				
	12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.544	2.426	2.384	2.319				
	13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.459	2.339	2.297	2.230				
	14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.388	2.266	2.223	2.155				
	15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.328	2.204	2.161	2.090				
	16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.276	2.151	2.108	2.035				
	17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.230	2.104	2.059	2.011				
	18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.191	2.063	2.017	1.943				
	19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.155	2.026	1.980	1.905				
	20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.124	1.994	1.948	1.870				
	21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.096	1.965	1.919	1.839				
	22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.071	1.838	1.892	1.811				
	23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.048	1.914	1.868	1.785				
	24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.509	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.027	1.892	1.846	1.762				
	25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.007	1.872	1.826	1.740				
	26	4.225	3.368	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.118	2.094	2.072	1.990	1.853	1.807	1.720				
	27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	1.974	1.836	1.790	1.702				
	28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	1.959	1.820	1.774	1.685				
	29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	1.945	1.806	1.759	1.669				
	30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.932	1.792	1.744	1.654				
	40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.839	1.693	1.637	1.544				
	50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.784	1.634	1.576	1.478				
	60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.748	1.594	1.534	1.430				
	80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.703	1.545	1.482	1.370				
	100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.676	1.515	1.450	1.333				
	120	3.920	3.072	2.680	2.447	2.290	2.175	2.087	2.016	1.959	1.910	1.869	1.834	1.803	1.775	1.750	1.659	1.495	1.429	1.307				
	240	3.881	3.033	2.642	2.409	2.252	2.136	2.048	1.977	1.919	1.870	1.829	1.793	1.761	1.733	1.708	1.614	1.445	1.375	1.290				

* V1 é o grau de liberdade da variável analisada e V2 é o grau de liberdade residual com significância a 95% de confiança.