

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/08/2021.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Aplicação da Lipase *Carica papaya* visando à Síntese de Biodiesel a partir da
Hidroesterificação de Matérias-primas de Baixa Qualidade**

CAMILA ANDREA TABARES MUNIVE

Dissertação de Mestrado

2019

CAMILA ANDREA TABARES MUNIVE

Aplicação da Lipase *Carica papaya* visando à Síntese de Biodiesel a partir da
Hidroesterificação de Matérias-primas de Baixa Qualidade

Dissertação apresentada ao Instituto de Química à
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan

Co-orientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

M963a Munive, Camila Andrea Tabares
Aplicação da lipase *Carica papaya* visando à síntese de biodiesel a partir da hidroesterificação de matérias-primas de baixa qualidade / Camila Andrea Tabares Munive. – Araraquara : [s.n.], 2019
103 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Danilo Luiz Flumignan
Coorientador: Ariela Veloso de Paula

1. Biocombustíveis. 2. Biodiesel. 3. Hidrólise. 4. Esterificação (Química). 5. Lipase. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Aplicação da Lipase *Carica papaya* visando à Síntese de Biodiesel a partir da Hidroesterificação de Matérias-primas de Baixa Qualidade"

AUTORA: CAMILA ANDREA TABARES MUNIVE

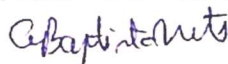
ORIENTADOR: DANILO LUIZ FLUMIGNAN

COORIENTADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

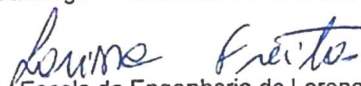
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN
Campus de Matão / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão



Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profª. Drª. LARISSA DE FREITAS
Departamento de Engenharia Química / Escola de Engenharia de Lorena - USP - Lorena

Araraquara, 06 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Camila Andrea Tabares Munive

Nome em citações bibliográficas: Tabares C, CA Tabares

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017 - 2019 Mestrado em Química
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP
São Paulo, Brasil

2010 - 2016 Graduação em Química
Universidade do Atlântico, UA
Barranquilla, Colômbia

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2019 Curso de curta duração em – Calibração multivariada de 2ª ordem
(Carga horaria: 12 horas)
Universidade Estadual Paulista, UNESP
São Paulo, Brasil

2018 Curso de curta duração em – Aplicação Industrial de Planejamento de
Experimentos e Otimização de Processos
(Carga horaria: 8 horas)
XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática
Florianópolis, Brasil

2017 Curso de curta duração em - Escola de Quimiometria Aplicada a
Espectroscopias que Obedecem a Lei de Beer-Lambert
(Carga horaria: 40 horas)
Universidade Estadual Paulista, UNESP
São Paulo, Brasil

2012 Curso de curta duração em - Espectrometria de massa: do átomo a um ser vivo. Avança essa surpresa
(Carga horaria: 8 horas)
Universidade Industrial de Santander, UIS
Bucaramanga, Colômbia

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2017 - 2019 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
Vínculo: Bolsista
Enquadramento Funcional: Mestrado
(Carga horaria: 40 horas semanais)
Regime: Dedicação exclusiva

2014 Laboratório de Controle de Qualidade triple A – Análise Físico-Química
Enquadramento Funcional: Assistente técnico
(Carga horaria: 40 horas semanais)
Regime: Dedicação exclusiva

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos (Resumo)

1. CA Tabares, LK dos Santos, AV Paula, DL Flumignan. Potencial biocatalítico do látex *Carica papaya* na hidroesterificação de óleos e gorduras. In: XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2018, Florianópolis, Brasil. Anais do XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2018.
2. Tabares C, Angulo E, Fontalvo M, Mendoza DL. Transesterificação enzimática do óleo de *Chlorella* com a lipase auto-imobilizada do látex de *Carica papaya* (Plantae: Caricaceae). In: 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2017, São Paulo, Brasil. Anais da 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2017.

3. Tabares C, Angulo E, Fontalvo M, Mendoza DL. Indução da produção de lipídios totais em culturas de *Chlorella* sp. para usar na obtenção de biodiesel. In: IX Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação em Química, 2015, Havana, Cuba. Anais da IX Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação em Química, 2015.

EVENTOS

Participação em eventos científicos

1. Participação no Workshop em Bioenergia e Quimiometria, 2019 (Outra).
2. Apresentação de Pôster/Painel no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2018 (Congresso). Potencial biocatalítico do látex *Carica papaya* na hidroesterificação de óleos e gorduras.
3. Apresentação Oral no 46º Congresso Mundial de Química, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e 49ª Assembleia Geral da IUPAC, 2017 (Congresso). Transesterificação enzimática do óleo de *Chlorella* com a lipase auto-imobilizada do látex de *Carica papaya* (Plantae: Caricaceae).
4. Participação na Escola de Quimiometria aplicada a espectroscopia que obedecem a lei de Beer-Lambert, 2017 (Outra).
5. Apresentação Oral no XIX Encontro Nacional e XIII Internacional de Grupos de Pesquisa – RedCOLSI, 2016 (Encontro). Obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de triglicerídeos da microalga *Chlorella* sp. utilizando catálise básica convencional e catálise enzimática.
6. Apresentação Oral no XIII Encontro Estadual de Grupos de Pesquisa, "Gerando conhecimento para construir a paz" – RedCOLSI nodo Atlântico, 2016 (Encontro). Obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de triglicerídeos da microalga *Chlorella* sp. utilizando catálise básica convencional e catálise enzimática.
7. Apresentação de Pôster/Painel no IX Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação em Química, 2015 (Congresso). Indução da produção de lipídios totais em culturas de *Chlorella* sp. para usar na obtenção de biodiesel.

8. Apresentação Oral no XII Encontro Estadual de Grupos de Pesquisa, “Inovação e empreendimento para uma sociedade inclusiva – RedCOLSI nodo Atlântico”, 2015 (Encontro). Produção de biodiesel usando como fonte de triglicerídeos a microalga *Chlorella* sp. e como biocatalisador a lipase obtida a partir do látex de *Carica papaya*.
9. Participação no IV Semana da Química na Universidade do Atlântico, 2015 (Encontro).
10. Participação no I Congresso Latino-americano e XIV Encontro Nacional de Estudantes de Química – CONLEQ e ENEQUIM, 2012 (Congresso).

Organização de eventos científicos

1. I Semana da Química na Universidade do Atlântico – Colômbia, 2012 (Encontro).
2. II Semana da Química na Universidade do Atlântico – Colômbia, 2013 (Encontro).
3. III Semana da Química na Universidade do Atlântico – Colômbia, 2014 (Encontro).

A Deus, por seu infinito amor.

*Aos meus queridos pais, **Sergio e Delis**, por todo amor, dedicação e apoio incondicional ao longo de minha vida.*

*A minha avó **Ofélia**, pelo carinho, conselhos e orações.*

*Às minhas irmãs, **Karen e Mariana**, por ser o motor de minha vida.*

*Ao meu amor **Dylan**, pela confiança, paciência e motivação constante.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos caminhos certos, coragem para acreditar e força para não desistir;

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan, pela oportunidade, disponibilidade e conhecimento transmitido durante o mestrado;

À minha co-orientadora, a Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula, por cada um de seus ensinamentos, por sua disponibilidade, paciência e apoio incondicional;

A todos os funcionários do Instituto de Química da UNESP, em especial aos funcionários e colegas do Centro de Monitoramento e Pesquisa de Qualidade de Combustíveis, Petróleo e Derivados – CEMPEQC, pela convivência amigável e experiências acrescentadas;

A todos meus companheiros do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e às técnicas do Laboratório de Processos e Bioengenharia, Adriana e Ana, que sempre me acolheram com carinho e pelo auxílio constante;

A minha família, que apesar das dificuldades sempre priorizaram os meus estudos e acreditaram no meu potencial;

A meus amigos, pela amizade, por todo apoio, todo carinho e por sempre estarem ao meu lado nos momentos que tanto precisei;

À família Perez Sarabia, em especial a Rita e Verena, por tudo que já fizeram por mim e pelo carinho com que me acolheram nas suas casas e na sua família;

Aos professores membros da banca examinadora, pela participação e disposição na avaliação desta dissertação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante o desenvolvimento desta pesquisa;

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A obtenção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade tornou-se um desafio, pois métodos convencionais de produção requerem óleos ou gorduras com baixo teor de ácidos graxos livres e água. Como resultado, nos últimos anos foram desenvolvidas outras tecnologias alternativas, sendo uma delas a hidroesterificação. Este processo envolve duas etapas (hidrólise e esterificação), que permitem o uso de qualquer matéria-prima independentemente do teor de ácidos graxos livres e água, além de gerar produtos com elevada pureza. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da lipase de *Carica papaya* na síntese de biodiesel a partir da hidroesterificação de matérias-primas de baixa qualidade. A primeira etapa da pesquisa consistiu na caracterização do óleo de palma bruto e do óleo residual de fritura. Nesta fase, as matérias-primas avaliadas foram consideradas de baixa qualidade por apresentar elevados teores de ácidos graxos livres ($AGL_{PALMA} = 6,1\%$ m/m; $AGL_{OGR} = 1,2\%$ m/m), índice de peróxido ($IP_{PALMA} = 17,1$ meq-g/kg; $IP_{OGR} = 36,0$ meq-g/kg) e de água ($H_2O_{PALMA} = 1,5\%$ m/m; $H_2O_{OGR} = 2,1\%$ m/m). A segunda etapa, envolveu a caracterização do látex bruto de mamão, onde a maior atividade (491,2 U/g) foi alcançada a pH 6 e 8,5 na faixa de 30 a 60 °C. Ademais, observou-se que mais do 70% dessa atividade foi mantida após de 24 h de incubação a pH 8,5 e 35 °C. Na terceira etapa, foram realizadas reações de hidrólise, empregando um planejamento fatorial completo 2^3 e ampliado para metodologia de superfície de resposta. Os maiores teores de ácidos graxos livres obtidos foram de 43,6% m/m (eficiência = 83,7%) para óleo de palma e de 60,7% m/m (eficiência = 98,9%) para o óleo residual, atingidos a 35 °C, razão mássica tampão/óleo 0,22 (1,1 g/5,0 g), tampão Tris-HCl 0,18 mol/L (pH 8,5) e carga enzimática de 137 U/g (27,5% m/m) durante 24 h de reação. Em seguida, foi efetuada a esterificação destes ácidos graxos via catálise ácida e enzimática. O teor de éster obtido foi de 43,3% m/m (eficiência = 99,3%) e 32,1% m/m (eficiência = 87,0%) para o óleo de palma e de 53,7% m/m (eficiência = 89,3%) e 41,1% m/m (eficiência = 69,2%) para o óleo residual na catálise ácida e enzimática, respectivamente. Finalmente na quarta etapa, visando a comparação dos resultados obtidos com outras rotas de produção, foram realizadas reações de transesterificação alcalina, transesterificação enzimática e hidroesterificação subcrítica/enzimática. Nesta fase, confirmou-se que a eficiência na hidroesterificação usando sistemas catalíticos, não catalíticos ou mistos não depende da qualidade da matéria-prima (eficiência > 60%). Caso contrário aconteceu na transesterificação alcalina, onde a eficiência foi afetada pelo teor de ácidos graxos ($E_{PALMA} = 5,3\%$; $E_{OGR} = 81,8\%$) e na enzimática pela inibição da enzima provocada pelo excesso de metanol ($E_{PALMA} = 14,2\%$; $E_{OGR} = 12,0\%$). Desta maneira, os resultados deste estudo forneceram informações interessantes sobre a aplicação da lipase de *Carica papaya* na hidrólise e esterificação de matérias-primas de baixa qualidade, uma enzima pouco descrita na literatura com potencial de aplicação em diferentes setores industriais.

Palavras-chaves: Hidrólise. Esterificação. Óleos brutos. Óleos residuais. Lipase de *Carica papaya*.

ABSTRACT

The production of biodiesel from low-quality raw materials has become a challenge because conventional production methods require oils or fats with low free fatty acids and water. As a result, in recent years we have developed alternative technologies, one of the hidroesterificação. This process involves two steps, fatty acid hydrolysis followed by esterification, which allows the use of any raw material regardless of the free fatty acid and water content, as well as generating high purity products. In this context, the objective of this work was to evaluate the application of *Carica papaya* lipase in biodiesel synthesis from the hidroesterification of low quality raw materials. The first stage of the research consisted of the characterization of crude palm oil and frying waste oil. At this step, the raw materials evaluated were considered poor quality because it has high levels of free fatty acids $AGL_{PALMA} = 6.1\%$ w/w; $AGL_{OGR} = 1.2\%$ w/w), peroxide value ($IP_{PALMA} = 17.1$ meq-g/kg; $IP_{OGR} = 36.0$ meq-g/kg) and water ($H_2O_{PALMA} = 1.5\%$ w/w; $H_2O_{OGR} = 2.1\%$ w/w). The second stage involved the characterization of crude papaya latex, where the greatest activity (491.2 U/g) was achieved at pH 6 and 8.5 in the range 30 to 60 °C. Moreover, it was observed that over 70% of this activity was maintained after 24 h of incubation at pH 8.5 and 35 °C. In the third stage, hydrolysis reactions were performed using a complete 2^3 factorial design and expanded for response surface methodology. The highest levels of free fatty acids obtained were 43.6% w/w (efficiency = 83.7%) for palm oil and 60.7% w/w (efficiency = 98.9%) for waste oil, reached at 35 °C, buffer/oil mass ratio 0.22 (1.1 g / 5.0 g), Tris-HCl buffer 0.18 mol/L (pH 8.5) and enzymatic load of 137 U/g (27.5% w/w) during 24 h reaction. Then, the esterification of these fatty acids was performed by acid and enzymatic catalysis. The ester content obtained was 43.3% w/w (efficiency = 99,3%) and 32.1% w/w (efficiency = 87,0%) for palm oil and 53.7% w/w (efficiency = 89.3%) and 41.1% w/w (efficiency = 69,2%) for waste oil in acid and enzymatic catalysis, respectively. Finally, in the fourth stage, in order to compare the results obtained with other production routes, alkaline transesterification, enzymatic transesterification and subcritical/enzymatic hidroesterification reactions were performed. At this step it was confirmed that the efficiency of hidroesterification using catalytic, non-catalytic or mixed systems does not depend on the quality of the raw material (efficiency > 60%). Otherwise it happened in alkaline transesterification, where the efficiency was affected by fatty acid content ($E_{PALMA} = 5.3\%$; $E_{OGR} = 81.8\%$) and in enzymatic by the enzyme inhibition caused by excess methanol ($E_{PALMA} = 14.2\%$; $E_{OGR} = 12.0\%$). Thus, the obtained results provided important information about the application of *Carica papaya* lipase in the hydrolysis and esterification of low quality raw materials, an enzyme little described in the literature with potential application in different industrial sectors.

Keywords: Hydrolysis. Esterification. Crude oils. Waste oils. Lipase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação das matérias-primas usadas na produção de biodiesel.....	23
Figura 2	– Perfil de matérias-primas usadas na produção de biodiesel no Brasil	24
Figura 3	– Reação geral de transesterificação de triglicerídeos	29
Figura 4	– Reação geral de hidrólise de triacilglicerídeos	31
Figura 5	– Reação geral de esterificação de ácidos graxos.	32
Figura 6	– Dobramento clássico de α/β -hidrolases	34
Figura 7	– Mecanismo catalítico de hidrólise ou síntese em lipases	34
Figura 8	– <i>Carica papaya</i>	36
Figura 9	– Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho.....	42
Figura 10	– Sistema de reação na análise da posição sn-2	46
Figura 11	– Sistema de reação na hidrólise das matérias-primas.	53
Figura 12	– Sistema de reação na esterificação das matérias-primas.	53
Figura 13	– Sistema de reação nos métodos comparativos	54
Figura 14	– Matérias-primas de baixa qualidade.....	59
Figura 15	– Teor de ácidos graxos saturados e insaturados nas matérias-primas.....	61
Figura 16	– Teor de mono-, di- e triglicerídeos nas matérias-primas.	65
Figura 17	– Biocatalisadores obtidos a partir do látex fresco de <i>Carica papaya</i>	66
Figura 18	– Avaliação dos biocatalisadores obtidos.....	66
Figura 19	– Efeito do pH na atividade hidrolítica do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃)	67
Figura 20	– Efeito da temperatura na atividade hidrolítica do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃).	69
Figura 21	– Efeito da concentração do tampão na atividade hidrolítica do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃).....	70
Figura 22	– Estabilidade do pH a 30°C do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃).....	71
Figura 23	– Box plot da estabilidade do pH a 30 °C do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃).	72
Figura 24	– Estabilidade termina a pH 8,5 do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃).....	72

Figura 25 – Box plot da estabilidade térmica a pH 8,5 do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃).	73
Figura 26 – Curva de saturação do látex bruto de <i>Carica papaya</i> usando diferentes substratos.....	74
Figura 27 – Perfis cinéticos na reação de hidrólise das matérias-primas.....	75
Figura 28 – Modelo linear - Diagrama de Pareto das matérias-primas	79
Figura 29 – Influência dos efeitos principais das matérias-primas.	79
Figura 30 – Modelo linear - Superfície de resposta e curvatura de contorno em função do teor de ácidos graxos livres.....	82
Figura 31 – Modelo quadrático - Diagrama de Pareto.....	84
Figura 32 – Modelo quadrático - Superfície de resposta e curvatura de contorno em função do teor de ácidos graxos livres.....	86
Figura 33 – Modelo quadrático - Perfis para valores previstos nas melhores condições de reação.	87
Figura 34 – Teor de ésteres obtidos na hidroesterificação ácida e enzimática	89
Figura 35 – Teor ésteres obtidos em diferentes métodos de produção.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Teor de óleo nas sementes, produtividade e composição química de algumas matérias-primas.	22
Tabela 2	– Comparação entre os diferentes tipos de matérias-primas.	25
Tabela 3	– Comparação entre as principais tecnologias usados na produção de biodiesel.	27
Tabela 4	– Comparação entre as diferentes catálises usadas na produção de biodiesel.	30
Tabela 5	– Hidrólise enzimática de matérias-primas de baixa qualidade.	32
Tabela 6	– Esterificação enzimática de matérias-primas de baixa qualidade.	32
Tabela 7	– Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.	40
Tabela 8	– Reatores utilizados no desenvolvimento deste trabalho.	41
Tabela 9	– Condições cromatográficas para análise do perfil composicional.	43
Tabela 10	– Condições cromatográficas para análise de mono-, di- e triglicerídeos.	47
Tabela 11	– Soluções tampões 0,1 mol/L usados no preparo da emulsão.	50
Tabela 12	– Proporção de substrato e água no preparo da emulsão	51
Tabela 13	– Variáveis e níveis no planejamento fatorial 2^3 - Reação de hidrólise das matérias-primas.	52
Tabela 14	– Condições cromatográficas para análise de ésteres totais.	56
Tabela 15	– Matriz do delineamento experimental para a hidrólise das matérias-primas de baixa qualidade usando o látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) como catalisador	58
Tabela 16	– Perfil composicional das matérias-primas.	60
Tabela 17	– Teor de ácidos graxos livres e índice de acidez nas matérias-primas	62
Tabela 18	– Índice de peróxido nas matérias-primas	63
Tabela 19	– Teor de água nas matérias-primas	63
Tabela 20	– Composição de ácidos graxos na posição Sn-2 das matérias-primas	64
Tabela 21	– ANOVA - Efeito do pH na atividade hidrolítica do P_3	68
Tabela 22	– ANOVA - Efeito da temperatura na atividade hidrolítica do P_3	69

Tabela 23 – ANOVA - Efeito da concentração do tampão na atividade hidrolítica do P ₃	70
Tabela 23 – ANOVA - Estabilidade do pH a 30°C do P ₃	71
Tabela 25 – ANOVA - Estabilidade térmica a pH 8,5 do P ₃	73
Tabela 26 – Resultados obtidos no delineamento experimental para a hidrólise das matérias-primas de baixa qualidade usando o látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P ₃) como catalisador	77
Tabela 27 – Modelo linear - Análise dos efeitos na hidrólise do óleo de palma e residual.	78
Tabela 28 – Modelo linear - Coeficientes de regressão na hidrólise do óleo palma e residual.	80
Tabela 29 – ANOVA - Modelo linear na hidrólise do óleo de palma e residual.....	81
Tabela 30 – Modelo quadrático - Análise dos efeitos na hidrólise do óleo de palma e residual.	83
Tabela 31 – Modelo quadrático - Coeficientes de regressão na hidrólise do óleo palma e residual.....	84
Tabela 32 – ANOVA - Modelo quadrático na hidrólise do óleo de palma e residual...85	
Tabela 33 – Resultados preditos e experimentais obtidos das melhores condições experimentais na hidrólise do óleo de palma e residual.....	87

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama
C	Variável independente carga enzimática
DAG	Diglicerídeos
HE-EA	Hidroesterificação enzimática/ácida
HE-EA-L	Hidroesterificação enzimática/ácida – modelo linear
HE-EA-Q	Hidroesterificação enzimática/ácida – modelo quadrático
HE-EE	Hidroesterificação enzimática/enzimática
HE-EE-Q	Hidroesterificação enzimática/enzimática – modelo quadrático
HS-EA	Hidroesterificação subcrítica/ácida
HS-EE	Hidroesterificação subcrítica/enzimática
MAG	Monoglicerídeos
MMM	Massa molar média de ácidos graxos
MTAG	Massa molar de triglicerídeos
P₃	Látex bruto de <i>Carica papaya</i>
pCPL-p	Fração parcialmente purificada livre de proteases
pCPL-e	Fração parcialmente purificada livre de proteases e estereases
RM	Variável independente razão mássica tampão/óleo
TA	Transesterificação ácida
TAG	Triglicerídeos
TE	Transesterificação enzimática
Tp	Variável independente concentração do tampão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Biodiesel	21
2.2 Matérias-primas usadas na produção de biodiesel	22
2.2.1 Óleo de palma	25
2.2.2 Óleo residual de fritura (OGR)	26
2.3 Tecnologias usadas na produção de biodiesel	27
2.3.1 Uso direto e misturas	28
2.3.2 Microemulsões	28
2.3.3 Pirólise (craqueamento térmico)	28
2.3.4 Transesterificação	28
2.4 Hidroesterificação	31
2.5 Lipases	33
2.5.1 Lipase de <i>Carica papaya</i>	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAIS E METODOS	39
4.1 Materiais	39
4.1.1 Enzimas	39
4.1.2 Substratos	39
4.1.3 Outros materiais e reagentes	39
4.2 Equipamentos	40
4.3 Reatores	41
4.4 Procedimento experimental	42
4.4.1 Recebimento das matérias-primas	43
4.4.2 Caracterização das matérias-primas	43
4.4.3 Obtenção dos biocatalisadores	48
4.4.4 Escolha do biocatalisador	49

4.4.5	Caracterização do biocatalisador	50
4.4.6	Hidroesterificação	52
4.4.7	Métodos comparativos	54
4.4.8	Caracterização do biodiesel	56
4.4.9	Análise estatística	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Recebimento e caracterização das matérias-primas	59
5.1.1	Perfil composicional	60
5.1.2	Teor de ácidos graxos e índice de acidez	62
5.1.3	Índice de peróxido	62
5.1.4	Teor de água	63
5.1.5	Composição de ácidos graxos na posição sn-2 das matérias-primas	64
5.1.6	Teor de mono-, di- e triglicerídeos	65
5.2	Obtenção, escolha e caracterização do biocatalisador	65
5.2.1	Efeito do pH na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3)	67
5.2.2	Efeito da temperatura na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3)	68
5.2.3	Efeito da concentração do tampão na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) ...	69
5.2.4	Efeito do tempo de incubação na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) para avaliação da estabilidade do pH	70
5.2.5	Efeito do tempo de incubação na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) para avaliação da estabilidade térmica	72
5.2.6	Efeito da concentração e tipo de substrato na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) para avaliação de parâmetros cinéticos (K_m/V_{max})	74
5.3	Hidroesterificação	75
5.3.1	Etapa 1: Reação de hidrólise	75
5.3.2	Etapa 2: Reação de esterificação	88
5.4	Métodos comparativos	89
6	CONCLUSÕES	91
7	TRABALHOS FUTUROS	92
8	REFERENCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os combustíveis fósseis como petróleo, gás natural e carvão constituem grande parte da matriz energética usada no mundo inteiro¹. No entanto, a natureza finita das reservas destes recursos, as necessidades energéticas mundiais e as crescentes preocupações ambientais pelo aumento das emissões antropogênicas de dióxido de carbono têm incentivado a busca de outras fontes de energias baseadas em processos sustentáveis, renováveis e amigáveis com o ambiente, sendo uma opção promissora o biodiesel².

O biodiesel é um biocombustível composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, atrativo por proceder de uma fonte biológica renovável, ser biodegradável, não tóxico e contribuir na redução das emissões de dióxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e material particulado³. Este biocombustível é produzido convencionalmente pela transesterificação de óleos vegetais refinados com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador alcalino⁴. Porém, o principal desafio associado à comercialização deste biocombustível é seu elevado custo de produção, sendo a matéria-prima o representante com maior destaque (cerca de 75% do custo total de produção)⁵. A redução destes custos pode ser alcançada através da implementação de matérias-primas, tecnologias e/ou catalisadores alternativos no processo de produção.

No caso das matérias-primas, a atenção têm sido direcionada para o uso de óleos vegetais brutos com maior produtividade por área, como o óleo de palma ou para óleos e gorduras de baixo custo, como o óleo residual de fritura⁶. Esses óleos geralmente apresentam elevados teores de ácidos graxos livres e água; entretanto a produção de biodiesel por catálise alcalina não é mais um processo viável, visto que as matérias-primas requerem pré-tratamento e o produto de reação de etapas adicionais de purificação, que acabam aumentando o custo de produção¹.

No caso das tecnologias, a hidroesterificação é uma alternativa que atraiu a atenção por permitir o uso de qualquer matéria-prima independentemente do teor de ácidos graxos livres e água, além de gerar produtos com elevada pureza. Este processo pode ser desenvolvido através de sistemas catalíticos (enzimáticos), não catalíticos (com água e metanol subcrítico ou supercrítico) e mistos (um sistema diferente em cada etapa

do processo, por exemplo: subcrítica ou supercrítica/química, enzimática/química, subcrítica ou supercrítica/enzimática, entre outros)⁷.

Dentre os diferentes sistemas, a hidroesterificação subcrítica ou supercrítica produz uma taxa elevada de conversão, porém são empregadas altas temperaturas e pressões gerando um elevado custo operacional⁸. Em contraste, a hidroesterificação enzimática ou enzimática/química pode gerar produtos com elevada pureza sob condições mais suaves de reação e com a possibilidade de reuso do catalisador⁷. No entanto, o elevado custo das lipases comerciais pode ser outra limitação do processo. Uma possibilidade a fim de sanar este inconveniente, é o uso de lipases vegetais como as lipases presentes no látex de *Carica papaya*, visto que são biocatalisadores de menor custo, amplamente disponíveis e de fácil extração da biomassa vegetal sem a necessidade de biotecnologias genéticas para produzi-las⁹. Além disso, esta lipase é considerada “naturalmente imobilizada” e pode ser obtida de forma sustentável dos frutos verdes de mamão ou dos resíduos gerados na indústria da papaína¹⁰.

Neste contexto, este estudo propõe uma configuração matéria-prima/tecnologia/catalisador inovadora na cadeia produtiva do biodiesel, visando a aplicação da lipase de *Carica papaya* na hidrólise e esterificação de matérias-primas de baixa qualidade.

6 CONCLUSÕES

- O óleo de palma bruto e o óleo residual são matérias-primas de baixa qualidade, pois apresentaram elevados teores de ácidos graxos livres (6,1 e 1,2% m/m), índice de peróxido (17,1 e 36,0 meq-g/kg) e de água (1,5 e 2,1% m/m), respectivamente.
- O látex bruto de mamão representa um biocatalisador com potencial para a hidrólise e esterificação de ácidos graxos. A máxima atividade (491,2 U/g) foi obtida no pH 6 e 8,5 na faixa de temperaturas de 30 a 60 °C. Além disso, foi possível observar que mais de 70% dessa atividade foi mantida depois de 24 h de incubação a pH 8,5 e temperatura de 30 °C.
- Na hidrólise, as melhores condições reacionais nas matérias-primas avaliadas, foram: temperatura de 35 °C; razão mássica tampão/óleo de 0,22 (1,1 g / 5,0 g); tampão Tris-HCl 0,18 mol/L a pH 8,5; carga enzimática de 137 U/g (27,5%) e 24 h de reação. Sob essas condições experimentais o maior teor de ácidos graxos livres alcançado foi de 46,3 m/m (eficiência = 83,7%) para o óleo de palma bruto e 60,7% m/m (eficiência = 98,9%) para o óleo residual.
- Na esterificação, os resultados obtidos empregando-se a rota ácida foram melhores do que a rota enzimática em ambas matérias-primas. A maior conversão foi 43,3% m/m (eficiência = 93,5%) no óleo de palma bruto e 53,7% m/m (eficiência = 88,5%) no óleo residual a 60°C, 1% m/m de ácido sulfúrico e 1 h de reação.
- A comparação das diferentes rotas de produção de biodiesel corroborou que a eficiência de reação na hidroesterificação usando sistemas catalíticos, não catalíticos ou mistos não depende da qualidade da matéria-prima (eficiência > 60%). Pelo contrário, na transesterificação alcalina a eficiência foi afetada pelo teor de ácidos graxos ($E_{PALMA} = 5,3\%$; $E_{OGR} = 81,8\%$) e na enzimática pela inibição da enzima provocada pelo excesso de metanol ($E_{PALMA} = 14,2\%$; $E_{OGR} = 12,0\%$).

8 REFERENCIAS

1. KARMAKAR, B.; HALDER, G. Progress and future of biodiesel synthesis : Advancements in oil extraction and conversion technologies. **Energy Conversion and Management**, v. 182, n. September 2018, p. 307–339, 2019.
2. AMBAT, I.; SRIVASTAVA, V.; SILLANPÄÄ, M. Recent advancement in biodiesel production methodologies using various feedstock: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, n. March, p. 356–369, 2018.
3. MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1–15, 1999.
4. LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, 2010.
5. GEBREMARIAM, S. N.; MARCHETTI, J. M. Economics of biodiesel production: Review. **Energy Conversion and Management**, v. 168, n. May, p. 74–84, 2018.
6. TALUKDER, M. M. R. et al. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 207–212, 2010.
7. POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.
8. DOS SANTOS, L. K. et al. Estado da arte da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 1, n. 28, p. 178, 2016.
9. MOUSSAVOU MOUNGUENGUI, R. W. et al. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, n. 5, p. 441–456, 2013.
10. MOUAIMINE, M. et al. Plant latex lipase as biocatalysts for biodiesel production. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 28, p. 1487–1502, 2016.
11. SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, 2000.

12. DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 1, p. 14–34, 2009.
13. ESCOBAR, J. C. et al. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1275–1287, 2009.
14. 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, 2012.
15. ANP. **Produção de Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: 12 set. 2019.
16. YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 7, p. 2741–2751, 2011.
17. BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, n. 6, p. 1815–1835, 2010.
18. KNOTHE, G.; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 58, p. 36–59, 2017.
19. SINGH, D. et al. Chemical compositions, properties, and standards for different generation biodiesels: A review. **Fuel**, v. 253, n. March, p. 60–71, 2019.
20. GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, n. 11, p. 1646–1653, 2008.
21. ANP. **Produção e fornecimento de biocombustíveis - Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>. Acesso em: 26 jun. 2019.
22. PINZI, S. et al. Latest trends in feedstocks for biodiesel production. p. 126–143, 2014.
23. FAIRLESS, D. The little shrub that could {textemdash} maybe. **Nature**, v. 449, n. October, p. 652–655, 2007.
24. EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and

- toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, n. 3–4, p. 319–341, 2002.
25. BERGMANN, J. C. et al. **Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks** **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2013.
 26. BARRETO, E. J. F.; PINHO, J. T.; TIAGO, G. L. **Tecnologias de Energias Renováveis**. [s.l: s.n.].
 27. FONSECA, J. M. et al. Biodiesel from waste frying oils: Methods of production and purification. **Energy Conversion and Management**, v. 184, n. December 2018, p. 205–218, 2019.
 28. KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K. Waste cooking oil - An economical source for biodiesel: A review. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 9, p. 2901–2913, 2006.
 29. KOH, E.; SURH, J. Food types and frying frequency affect the lipid oxidation of deep frying oil for the preparation of school meals in Korea. **Food Chemistry**, v. 174, p. 467–472, 2015.
 30. SALLES, F. S. F. Impacto Ambiental Causado por óleo Vegetal. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2010.
 31. ZHANG, Y. et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 229–240, 2003.
 32. MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.
 33. LIN, L. et al. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, n. 4, p. 1020–1031, 2011.
 34. LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 500–518, 2010.

35. AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.
36. ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947–953, 2001.
37. VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 12, p. 1615–1624, 2016.
38. MAHABUBUR, M. et al. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. **Energy Fuels**, v. 24, p. 2016–2019, 2010.
39. WANG, M. et al. Biodiesel production by combined fatty acids separation and subsequently enzymatic esterification to improve the low temperature properties. **Bioresource Technology**, v. 174, p. 302–305, 2014.
40. ZENEVICZ, M. C. P. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.
41. ADACHI, D. et al. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410–416, 2013.
42. DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 133–137, 2010.
43. SANTOS, K. C. et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462–470, 2013.
44. SERRI, N. A; KAMARUDIN, A H.; ABDUL RAHAMAN, S. N. Preliminary studies for production of fatty acids from hydrolysis of cooking palm oil using *Candida*

- rugosa* Lipase. **Journal of Physical Science**, v. 19, n. 1, p. 79–88, 2008.
45. KABBASHI, N. A. et al. Hydrolysis of *Jatropha curcas* oil for biodiesel synthesis using immobilized *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 95–100, 2015.
 46. PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 31–41, 2006.
 47. RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1–3, p. 93–99, 2009.
 48. RASPE, D. T.; CARDOZO FILHO, L.; DA SILVA, C. Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*acrocomia aculeata*). **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, 2013.
 49. NG, I. S.; TSAI, S. W. Investigation of lipases from various *Carica papaya* varieties for hydrolysis of olive oil and kinetic resolution of (R,S)-profen 2,2,2-trifluoroethyl thioesters. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 540–546, 2006.
 50. KOCHPEKA, D. M. et al. Production of Fatty Acid Ethyl Esters from Waste Cooking Oil Using Novozym 435 in a Solvent-Free System. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 12, p. 8074–8081, 2015.
 51. LIU, S. et al. Kinetic study on lipase-catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 43–50, 2014.
 52. TAN, T.; NIE, K.; WANG, F. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, n. 2, p. 109–116, 2006.
 53. GOFFERJÉ, G. et al. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude *Jatropha* oil by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 1–7, 2014.
 54. DE OLIVEIRA, D. et al. Optimization of Enzymatic Production of Biodiesel from Castor Oil in Organic Solvent Medium. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 113, 2004.

55. CARO, Y. et al. Plant lipases: Biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 693–703, 2002.
56. ARMENDÁRIZ-RUIZ, M. et al. Carica papaya by-products as new biocatalysts for the synthesis of oleic acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 4, p. 216–223, 2015.
57. WOOLLEY, P. Lipases; their structure, biochemistry and application. **sequence analysis of lipases, esterases and related proteins**, p. 27–28, 1994.
58. KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.
59. VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.
60. CAMPILLO-ALVARADO, G.; TOVAR-MIRANDA, R. Recent advances and applications of the lipolytic activity of Carica papaya latex. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 49–60, 2013.
61. SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 1998.
62. JENSEN, R. G.; DEJONG, F. A.; CLARK, R. M. Determination of lipase specificity. **Lipids**, v. 18, n. 3, p. 239–252, 1983.
63. MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–217, 1985.
64. SONNET, P. E. Lipase selectivities. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 6, p. 900–904, 1988.
65. VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 6, p. 308–317, 2003.
66. PAQUES, F. W. et al. Characterization of the lipase from Carica papaya residues.

Braz. J. Food Technol, p. 20–27, 2008.

67. EL MOUSSAOUI, A. et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 4, p. 556–570, 2001.
68. CARO, Y. et al. Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 8, p. 891–902, 2000.
69. BAROUH, N. et al. Neutral lipid characterization of non-water-soluble fractions of *Carica papaya* latex. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 9, p. 987–995, 2010.
70. ABDELKAFI, S. et al. *Carica papaya* Lipase: A Naturally Immobilized Enzyme. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 34–40, 2011.
71. GANDHI, N. N.; MUKHERJEE, K. D. Specificity of papaya lipase in esterification with respect to the chemical structure of substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 566–570, 2000.
72. AKIN-OSANAIYE, B. C.; NZELIBE, H. C.; AGBAJI, A. S. Production of ethanol from *Carica papaya* (pawpaw) agro waste: effect of saccharification and different treatments on ethanol yield. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 657–659, 2002.
73. DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. *Carica papaya* lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 493–499, 2006.
74. ETHIOPIAN STANDARDS. **EN ISO 12966: Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters**, 2017.
75. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Ca 5a-40: Free fatty acids** Champaign, 2012.
76. AOCS. **Official Method Cd 8b-90. Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method. Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils**, 2003.
77. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D6304: Standard test method for determination of water in petroleum products**,

- lubricating oils, and additives by coulometric Karl Fischer titration.** West Conshohocken, 2007.
78. CABALLERO, E. et al. Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-type production catalysed by commercial immobilised lipases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–7, 2014.
 79. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15908: Biodiesel — Determinação do glicerol livre, mono-, di-, triacilgliceróis e glicerol total por cromatografia gasosa** Rio de Janeiro, 2015.
 80. RIVERA, I.; MATEOS-DÍAZ, J. C.; SANDOVAL, G. Plant Lipases: Partial Purification of Carica papaya Lipase. In: SANDOVAL, G. (Ed.). **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols**. Guadalajara: [s.n.]. p. 22.
 81. PAULA, A. V. DE. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada : otimização das condições reacionais e operacionais**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.
 82. HASSAN, S. Z.; VINJAMUR, M. Parametric effects on kinetics of esterification for biodiesel production : A Taguchi approach. **Chemical Engineering Science**, v. 110, n. January 2019, p. 94–104, 2014.
 83. PINYAPHONG, P.; SRIBURI, P.; PHUTRAKUL, S. Biodiesel fuel production by methanolysis of fish oil derived from the discarded parts of fish catalyzed by Carica papaya lipase. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 76, p. 466–472, 2011.
 84. GARCIA, C. M.; PROF, O.; SCHUCHARDT, U. F. Transesterificação de óleos vegetais. 2006.
 85. SANTOS, L. **Avaliação da Aplicação do Processo de Hidroesterificação na Produção de Biodiesel a partir de Matérias-Primas de Baixa Qualidade**. [s.l.] UNESP, 2016.
 86. ETHIOPIAN STANDARDS. **EN ISO 14103: Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents**, 2011.
 87. DUSSERT, S. et al. Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and

- seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. **Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 1337–1358, 2013.
88. MCNEILL, G. P. **Processing Solutions: Fractionation and Blended Oils**. Second Edi ed. [s.l.] AOCS Press, 2014.
 89. CHIU, M. C.; DE MORAIS COUTINHO, C.; GONÇALVES, L. A. G. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. **Desalination**, v. 245, n. 1–3, p. 783–786, 2009.
 90. ZIEGLER, V. et al. Alterações na Qualidade do Óleo , no Teor de Carotenoides e na Coloração de Grãos de Soja Armazenados em Diferentes Condições. **Conferência Brasileira de Pós-Colheita**, p. 215–222, 2014.
 91. OSAWA, C. C.; GUARALDO GONÇALVES, L. A.; RAGAZZI, S. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 593–599, 2006.
 92. DE MORAIS, V. S. et al. Cor astm: Um método simples e rápido para determinar a qualidade do biodiesel produzido a partir de óleos residuais de fritura. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 587–592, 2013.
 93. DA SILVA CÉSAR, A. et al. Competitiveness analysis of “ social soybeans ” in biodiesel production in Brazil. **Renewable Energy**, v. 133, 2019.
 94. YEBO, L.; KHANAL, S. K. **Bioenergy: Principles and Applications**. 2016.
 95. SAAD, B. et al. Determination of free fatty acids in palm oil samples using non-aqueous flow injection titrimetric method. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1407–1414, 2007.
 96. SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, v. 87, n. 12, p. 2355–2373, 2008.
 97. HENDERSON, J.; OSBORNE, D. J. Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability in vivo and in vitro. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1073–1078, 1991.
 98. MOHANKUMAR, C.; ARUMUGHAN, C.; KALEYSA RAJ, R. Histological localization of oil palm fruit lipase. **Journal of the American Oil Chemists'**

- Society**, v. 67, n. 10, p. 665–669, 1990.
99. FRITSCH, C. W. Measurements of frying fat deterioration: A brief review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 272–274, 1981.
 100. DONADON, J. R. et al. Armazenamento do crumbe em diferentes embalagens e ambientes: Parte II - Qualidades química. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 231–237, 2015.
 101. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. **Diário Oficial da União N° 184**, v. Resolução, p. 6, 2005.
 102. GIBON, V.; DE GREYT, W.; KELLENS, M. Palm oil refining. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 4, p. 315–335, 2007.
 103. CVENGROŠ, J.; CVENGROŠOVÁ, Z. Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, n. 2, p. 173–181, 2004.
 104. TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. DE M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.
 105. PINTO, G. F.; MENEZES, R. R. DE. **Cinética enzimática**. Rio de Janeiro: [s.n.].
 106. DZIALOWSKI, E. M.; CONNOR, M. P. O. Thermal time constant estimation in warming and cooling ectotherms. v. 26, p. 231–245, 2001.
 107. RIVERA, I. Caracterización de diversas fracciones del látex Carica papaya como biocatalizadores en la hidrólisis de triglicéridos. v. 65, n. March, p. 1–8, 2014.
 108. CARO, Y. et al. Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, p. 349–354, 2000.
 109. RIVERA, I. Characterization of different lipolytic fractions in Carica papaya. v. 65, n. March, p. 1–8, 2014.
 110. CONN, E.E.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. 4ª edição ed. [s.l.] Ed.

Edgard Bluncher Ltda., 1980.

111. PINYAPHONG, P.; PHUTRAKUL, S. Synthesis of cocoa butter equivalent from palm oil by *Carica papaya* lipase-catalyzed interesterification. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 36, n. 3, p. 359–368, 2009.
112. SU, E.; WEI, D. Production of fatty acid butyl esters using the low cost naturally immobilized *Carica papaya* lipase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 27, p. 6375–6381, 2014.