

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

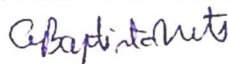
ORIENTADOR: DANILO LUIZ FLUMIGNAN

COORIENTADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

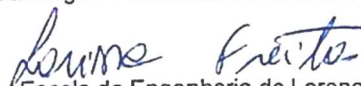
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



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 $AGL_{PALMA} = 6.1\% \text{ w/w}$; $AGL_{OGR} = 1.2\% \text{ w/w}$), peroxide value ($IP_{PALMA} = 17.1 \text{ meq-g/kg}$; $IP_{OGR} = 36.0 \text{ meq-g/kg}$) and water ($H_2O_{PALMA} = 1.5\% \text{ w/w}$; $H_2O_{OGR} = 2.1\% \text{ w/w}$). 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	<i>Caracterização do biocatalisador</i>	50
4.4.6	<i>Hidroesterificação</i>	52
4.4.7	<i>Métodos comparativos</i>	54
4.4.8	<i>Caracterização do biodiesel</i>	56
4.4.9	<i>Análise estatística</i>	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Recebimento e caracterização das matérias-primas	59
5.1.1	<i>Perfil composicional</i>	60
5.1.2	<i>Teor de ácidos graxos e índice de acidez</i>	62
5.1.3	<i>Índice de peróxido</i>	62
5.1.4	<i>Teor de água</i>	63
5.1.5	<i>Composição de ácidos graxos na posição sn-2 das matérias-primas</i>	64
5.1.6	<i>Teor de mono-, di- e triglicerídeos</i>	65
5.2	Obtenção, escolha e caracterização do biocatalisador	65
5.2.1	<i>Efeito do pH na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3)</i>	67
5.2.2	<i>Efeito da temperatura na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3)</i>	68
5.2.3	<i>Efeito da concentração do tampão na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3)</i> ...	69
5.2.4	<i>Efeito do tempo de incubação na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) para avaliação da estabilidade do pH</i>	70
5.2.5	<i>Efeito do tempo de incubação na atividade do látex bruto de <i>Carica papaya</i> (P_3) para avaliação da estabilidade térmica</i>	72
5.2.6	<i>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})</i>	74
5.3	Hidroesterificação	75
5.3.1	<i>Etapa 1: Reação de hidrólise</i>	75
5.3.2	<i>Etapa 2: Reação de esterificação</i>	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 do 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.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

O biodiesel é definido como ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais¹¹. Este combustível apresenta propriedades físico-químicas e um conteúdo energético semelhante ao diesel fóssil, que possibilita seu uso puro ou misturado com diesel sem a necessidade de grandes modificações nos motores de ignição por compressão (motor diesel)¹². Mundialmente, a nomenclatura BXX é empregada para identificar a concentração de biodiesel nas misturas, onde XX é a porcentagem em volume do biodiesel adicionado ao diesel. Por exemplo, B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente¹³.

O biodiesel oferece algumas vantagens em relação ao diesel de petróleo, tais como: (i) renovável, não tóxico e biodegradável; (ii) maior oxigênio, que melhora a eficiência de combustão; (iii) redução nas emissões de dióxido de carbono em até 78% com base no ciclo de vida; (iv) estímulo ao desenvolvimento rural ao restaurar terras marginais e ao gerar empregos; (v) maior número de cetano, que reduz o tempo de ignição; (vi) produção local e em pequena escala em cada país; (vii) maior ponto de inflamação, que o torna seguro para transporte, manuseio, distribuição, utilização e armazenamento; (viii) menor teor de enxofre, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e material particulado, que reduz os riscos de câncer e defeitos neonatais devido à combustão menos poluente e (ix) propriedades superiores de lubricidade, que diminui o desgaste e aumenta a eficiência do motor¹⁴.

Este combustível é produzido pela transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador homogêneo básico ou ácido, heterogêneo básico ou ácido ou por enzimas¹. Porém, convencionalmente é produzido por catálise alcalina requerendo óleos refinados ou óleos com teores de ácidos graxos livres e água menores a 2,5% e 0,5%, respectivamente, pois valores por acima destes limites conduzem reações secundárias indesejáveis que diminuem a conversão de ésteres³.

Hoje em dia, o 85% da produção mundial de biodiesel provem da União Europeia; seguido de países como Estados Unidos, Brasil, Alemanha, Indonésia, e França que são também os principais consumidores deste biocombustível¹.

No caso particular de Brasil, a indústria de biodiesel apenas usa o 63% de sua capacidade produtiva, sendo a região com maior produção e capacidade nominal o Centro-Oeste (196.544,3 m³/mês), seguido pelo Sul (192.198,3 m³/mês). Embora na região Sudeste esteja localizado os maiores centros urbanos e consumidores de biodiesel, a indústria nessa região tem uma capacidade nominal pequena, de aproximadamente 39.383,9 m³/mês¹⁵.

2.2 Matérias-primas usadas na produção de biodiesel

O material inicial usado na produção de biodiesel são óleos e gorduras, fontes naturais renováveis que podem ser produzidos localmente de maneira sustentável¹⁶. Em geral, a composição destes óleos e gorduras compreendem cerca do 90 a 98% de triglicerídeos e pequenas quantidades de diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídios, carotenóides, tocoferóis, água e outras impurezas^{11,17}.

Os triglicerídeos são formados por um mol de glicerol e três mol de ácidos graxos com comprimento da cadeia carbônica e número de ligações insaturadas variáveis³. Usualmente, os ácidos graxos encontrados nestes triglicerídeos são ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3)¹⁸. Porém as quantidades destes ácidos graxos variam entre matérias-primas (**Tabela 1**), proporcionando propriedades físico-químicas diferentes¹⁹.

Tabela 1. Teor de óleo nas sementes, produtividade e composição química de algumas matérias-primas.

Matéria-prima	Teor de óleo (%)	Produtividade (L/ha/ano)	Perfil composicional (%)					
			C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Girassol	25-35	952		5-8	2-6	15-40	30-70	3-5
Palma	30-60	5950	0,5-2,0	35-48	3-7	36-44	9-14	0-0,2
Soja	15-35	446	-	6-10	2-5	20-30	50-60	5-11
Oliva	45-70	1212	-	9-10	2-3	72-85	10-12	0-1
Pinhão-mansão	30-40	1892	14-15	-	0-13	34-46	14-15	0-0,3
Algodão	18-25	325	-	23-28	0,8-0,9	13-18	57	0-0,2
Frango	-	-	3	20	3	38	-	-

Fonte: Adaptado de Atabani *et al.* (2012)¹⁴ e Ambat *et al.* (2018)².

Atualmente, existem mais de 350 cultivos oleaginosos identificados no mundo inteiro como fontes potenciais para a produção de biodiesel, os quais podem ser classificadas de acordo com a origem e a geração¹.

Com respeito à origem, as matérias-primas são divididas em quatro categorias: óleos vegetais (comestíveis e não comestíveis), gorduras animais, óleos residuais ou reciclados e óleos derivados de microrganismos oleaginosos (microalgas, bactérias, leveduras e fungos)¹⁴.

Com respeito à geração, as matérias-primas são divididas em três categorias: primeira, segunda e terceira geração. Desta forma, os óleos vegetais comestíveis são considerados a primeira geração por serem os primeiros cultivos usados na produção de biodiesel. Enquanto, a segunda geração compreende os óleos vegetais não comestíveis, gorduras animais e óleos residuais. Mais recentemente, os óleos de microrganismos oleaginosos são considerados a terceira geração¹.

Algumas matérias-primas usadas na produção de biodiesel de cada categoria são apresentadas na **Figura 1**.

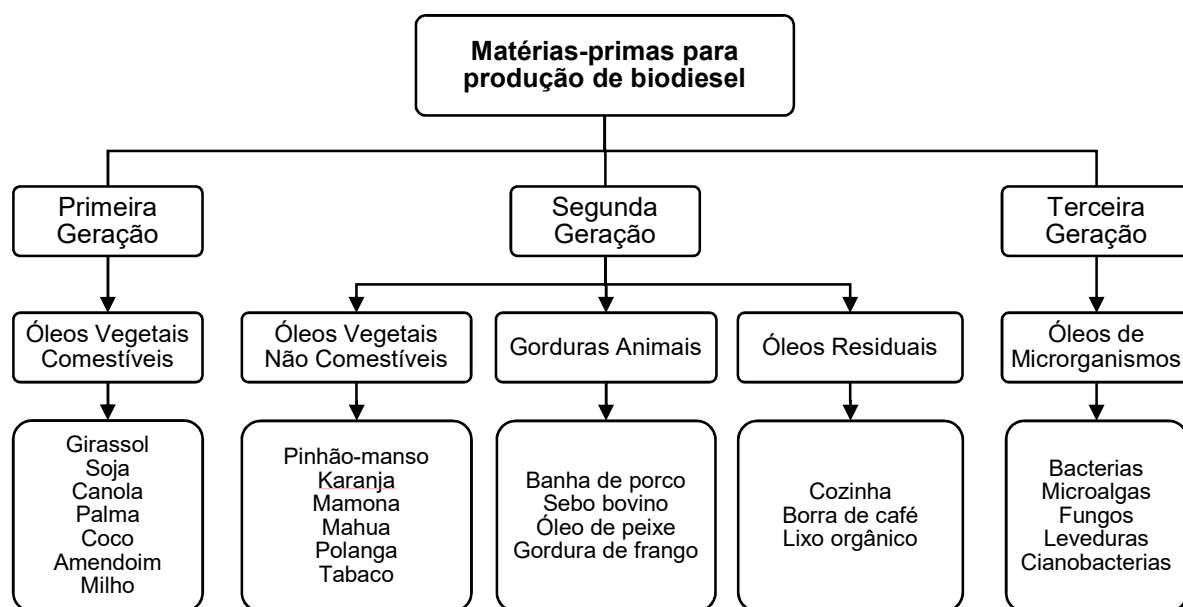


Figura 1. Classificação das matérias-primas usadas na produção de biodiesel. Fonte: adaptado de Atabani *et al.* (2012)¹⁴ e Karmakar *et al.* (2019)¹.

Apesar da extensa variedade de matérias-primas acessíveis para a produção de biodiesel, hoje em dia as matérias-primas de primeira geração ou óleos vegetais comestíveis dominam o mercado global de biodiesel²⁰. Por exemplo, no Brasil aproximadamente 68% do biodiesel produzido é a partir da soja e 32% a partir de outros óleos e gorduras de segunda geração (**Figura 2**)²¹.

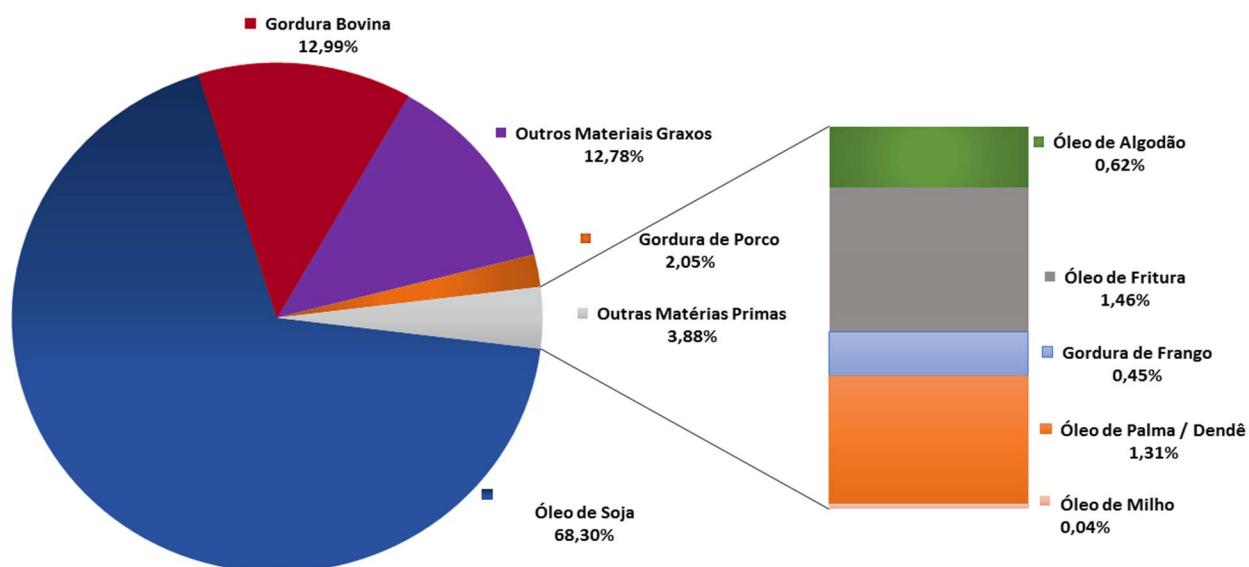


Figura 2. Perfil de matérias-primas usadas na produção de biodiesel no Brasil (2019). Fonte: extraído do boletim mensal do Biodiesel da Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP²¹.

Usualmente, os preços destes óleos vegetais comestíveis representam cerca do 70 a 80% do custo total de produção de biodiesel, uma vez que são submetidos a processos de refinamento que envolvem várias etapas como desodorização, branqueamento, neutralização e degomagem^{4,18}.

A redução desses custos pode ser alcançada através do uso de matérias-primas mais econômicas. No entanto, os óleos e gorduras com menores preços contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos livres e água que prejudicam o rendimento e a qualidade do biodiesel. Por conseguinte, a escolha da matéria-prima é um passo chave na produção de biodiesel, que afeta vários fatores incluindo custo, rendimento, composição e pureza do biodiesel produzido².

Esta escolha pode ser realizada através da análise de vários parâmetros, tais como: (i) teor de óleo nas sementes; (ii) produtividade por unidade de área; (iii) ciclo de vida da planta; (iv) composição química e propriedades físicas do óleo; (v) localização geográfica, potencial agrícola, clima e condições locais do solo; (vi) processo químico empregado e (vii) criação de emprego^{1,14}.

A **Tabela 2**, resume as principais vantagens e desvantagens entre os diferentes tipos de matéria-prima levando em consideração os parâmetros anteriormente mencionados.

Tabela 2. Comparação entre os diferentes tipos de matérias-primas.

Matéria-prima		Vantagens	Desvantagens
Primeira geração	Óleos vegetais comestíveis	- Baixo teor de AGL e água - Rendimento e qualidade boa	-Custo alto -Alta demanda como fonte de alimento -Cultivados em terras aráveis -Competição por água e solo
	Óleos vegetais não comestíveis	-Custo médio -Inadequado para consumo -Rendimento e qualidade boa -Pode ser cultivado em terras marginais	-Pode ter alto teor de AGL -Competição por água e solo
Segunda geração	Gorduras animais	-Custo baixo -Propriedades não corrosivas -Alta grau de saturação	- Alto teor de AGL
	Óleos residuais	-Custo baixo -Elimina a necessidade de serem descartados -Alta abundância	- Alto teor de AGL e água -Disponibilidade dispersa
Terceira geração	Óleos microbiais	-Maior rendimento por área -Menores custos de colheita e transporte -Cultivados em terras marginais não aráveis -Alta grau de saturação -Baixo impacto ecológico	-Custo alto na infraestrutura -Isolamento de espécies -Modificação genética

Fonte: adaptado de Atabani *et al.* (2012)¹⁴, Pinzi *et al.* (2014)²² e Karmakar *et al.* (2019)¹.

Em vista do relatado acima, as matérias-primas mais adequadas para a produção de biodiesel são aqueles óleos vegetais brutos com maior produtividade por área como o óleo de palma ou óleos de baixo custo, como os óleos residuais de fritura²³. Essas matérias-primas em geral possuem elevados teores de ácidos graxos livres e água, portanto, são catalogadas como matérias-primas de baixa qualidade. Desta forma, estes óleos foram selecionados para execução do presente trabalho.

2.2.1 Óleo de palma

A palma (*Elagis guineenses*) comumente chamada dendezeiro é uma planta pertencente à família das *Arecaceae*. Esta palmeira é originária da costa ocidental da África, porém no Brasil é vastamente cultivada no norte da Bahia e no estado de Pará^{24,25}. Seu fruto conhecido como dendê apresenta dois tipos de óleos com propriedades físico-químicas diferentes entre si: (i) o óleo de palma, extraído da polpa ou mesocarpo, com um teor de 20 a 22% e (ii) o óleo de palmiste, extraído da amêndoa ou endosperma, com um teor de 38 a 55%²⁵.

Com respeito ao óleo de palma, sua principal aplicação é na área alimentícia como margarinas, massas de sorvetes, achocolatados, gorduras para fritura e panificação; mas também pode ser usado na fabricação de cosméticos, produtos de higiene e limpeza, fármacos, lubrificantes e combustíveis¹⁷. Esse óleo vem ganhando interesse na produção de biodiesel por apresentar uma produtividade dez vezes maior que a da soja e pela diminuição da sua qualidade causada pela rápida degradação enzimática durante o armazenamento, uma vez que é extraído²⁶.

2.2.2 Óleo residual de fritura (OGR)

A produção mundial de óleos e gorduras é cerca de 197 milhões de toneladas, a maior parte desses óleos são usados na fritura de alimentos e depois são descartados. Durante a fritura, o óleo é aquecido a temperaturas elevadas (de 150 a 200 °C) por um tempo relativamente longo ocasionando diversas mudanças físico-químicas dependendo do tempo de exposição e da composição do óleo²⁷. As alterações físicas incluem o aumento da viscosidade e do calor específico, bem como a mudança da tensão superficial e da cor. Enquanto as alterações químicas, os óleos são submetidos principalmente a três tipos de reações durante a fritura que causam a formação de compostos indesejados²⁸. Por exemplo: na hidrólise, parte da água dos alimentos dissolvida no óleo induz a clivagem dos glicerídeos gerando ácidos graxos livres e glicerol²⁷; na oxidação, parte do oxigênio do ar dissolvido no óleo reage com glicerídeos insaturados formando vários produtos de oxidação²⁹; e na termólise, parte dos ácidos graxos saturados aquecidos a altas temperaturas e em ausência de oxigênio são degradados a compostos polares voláteis²⁸. Grande parte desse óleo é descartado de forma inadequada diretamente na rede do esgoto ou lançado em lixões juntamente com outros resíduos. Essas ações tem levado a sérios impactos no meio ambiente, destruindo e desequilibrando ecossistemas. Por exemplo: na água afeta todo processo de fotossínteses e o desenvolvimento dos seres vivos que habitam naquele lugar da contaminação, pois se forma uma película superficial diminuindo a área de contato entre a superfície da água e o ar, impedindo assim a entrada de luz solar e a troca de gases; no solo, contribui na formação de enchentes e na alteração do metabolismo da plantas³⁰. Esses óleos também vêm ganhando interesse na produção de biodiesel por apresentar um preço de até três vezes menor quando comparado com óleos vegetais virgens e pode minimizar a contaminação da água e dos solos ³¹.

2.3 Tecnologias usadas na produção de biodiesel

A aplicação de óleos vegetais como combustíveis começou em 1900, quando o inventor do motor a diesel, Rudolf Diesel, testou o óleo de amendoim no motor de ignição por compressão³. No entanto, alguns problemas operacionais foram relatados, como: a combustão incompleta, formação de depósitos de carbono e diminuição da eficiência de lubrificação³². Estes problemas foram associados principalmente à alta viscosidade, baixa volatilidade e baixa estabilidade contra a oxidação destes óleos¹².

Tentativas para superar esses problemas incluíram o uso de misturas e microemulsões; estes métodos físicos visavam diminuir a viscosidade, mas não conseguiram resolver o problema de depósitos de carbono e poluição por lubrificação. Consequentemente, outros métodos foram desenvolvidos como a pirólise e a transesterificação. No entanto, o craqueamento térmico era bastante complicado para operar e gerava produtos secundários sem valor comercial¹⁷. Algumas vantagens e desvantagens destas diferentes tecnologias são apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Comparação entre as principais tecnologias usadas na produção de biodiesel.

Tecnologias	Vantagens	Desvantagens
Uso direto e misturas	-Portabilidade da natureza líquida -Teor de calor (~80% do combustível diesel) -Prontamente disponível	-Maior viscosidade -Menor volatilidade -Reatividade de cadeias de hidrocarbonetos insaturados
Microemulsões	-Melhores padrões de pulverização durante a combustão -Viscosidades mais baixas	-Menor número de cetano -Menor teor de energia
Pirólise	-Processo simples -Sem poluentes -Quimicamente semelhante à gasolina	-Custo de equipamento elevado -Baixa pureza -Requer altas temperaturas -Rendimento moderado
Transesterificação	-Propriedades próximas com diesel -Alta eficiência de conversão -Menor custo -Maior número de cetano -Emissões mais baixas -Maior eficiência de combustão	-Eliminação do subproduto (glicerol e águas residuais)

Fonte: adaptado de Leung *et al.* (2010)⁴ e Lin *et al.* (2011)³³.

Dentre as quatro tecnologias, a conversão química do óleo em seu éster graxo correspondente, ou seja, a transesterificação foi o processo mais viável para resolver o problema de alta viscosidade e baixa volatilidade. Ademais, é atualmente o método usado a escala industrial para a produção de biodiesel.

2.3.1 *Uso direto e misturas*

Os óleos vegetais podem ser usados diretamente para operar um motor ou misturados com combustível diesel para reduzir a viscosidade e melhorar o desempenho do motor¹¹.

2.3.2 *Microemulsões*

Uma microemulsão é uma dispersão coloidal de microestruturas fluidas opticamente isotrópicas com dimensões geralmente na faixa de 1 a 150 nm, formadas espontaneamente a partir de dois líquidos imiscíveis e um ou mais componentes anfifílicos iônicos ou não iônicos³. Estas microemulsões podem ser preparadas pela mistura de óleos vegetais com um éster e um dispersante (co-solvente) ou de óleos vegetais com um álcool e um surfactante, com ou sem a presença de diesel¹¹.

2.3.3 *Pirólise (craqueamento térmico)*

A pirólise é a conversão de uma substância orgânica em outra através da aplicação de energia térmica (300 a 1300 °C) na ausência de oxigênio e com ajuda ou não de um catalisador^{3,11}. O material pirolisado pode ser qualquer tipo de biomassa, como óleos vegetais, gorduras animais, ácidos graxos naturais e ésteres metílicos de ácidos graxos³. A decomposição térmica de triglicerídeos produz alcanos, alquenos, alcadienos, compostos aromáticos e ácidos carboxílicos¹¹.

2.3.4 *Transesterificação*

A transesterificação ou alcoólise é a reação entre um álcool de cadeia curta e um triglicerídeo para formar ésteres de ácidos graxos e glicerol (**Figura 3**). Este processo envolve um número consecutivo de reações reversíveis, nos quais os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, posteriormente em monoglicerídeos e no final em glicerol^{3,32}. Uma vez que as reações são reversíveis, um excesso de álcool é necessário para deslocar o equilíbrio no sentido da formação de ésteres. Muitos álcoois podem ser usados nesta reação, incluindo metanol, etanol, propanol e butanol. Porém, o metanol é usado com maior frequência devido seu baixo custo e as vantagens físico-químicas, como sua polaridade e menor cadeia³.

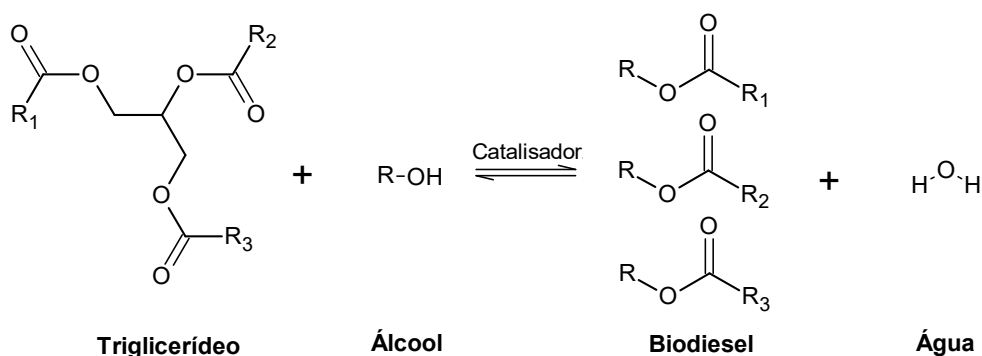


Figura 3. Reação geral de transesterificação de triglicerídeos. R₁, R₂, R₃ e R representam grupos alquila e o catalisador pode ser alcalino, ácido ou enzimático. Fonte: adaptado de Ma e Hanna (1999)³.

A transesterificação pode ser realizada com a presença ou não de um catalisador. Os processos não catalíticos incluem reações subcríticas ou supercríticas, as quais podem produzir uma alta taxa de conversão em um curto período de tempo; no entanto, as temperaturas e pressões de operação são bastante elevadas. Por outra parte, os processos catalíticos incluem catalisadores que mantêm o mesmo estado de fase com os reagentes (catalisadores homogêneos) e catalisadores que permanecem em diferentes fases com os reagentes (catalisadores heterogêneos) durante o processo de reação¹⁹.

A catálise homogênea alcalina é o processo mais empregado na produção de biodiesel em escala industrial, porém apresenta sensibilidade à presença de ácidos graxos livres e água. Isso porque, teores superiores de ácidos graxos (> 2,5%) e água (0,5%) promovem a formação de sabão, produzindo assim a redução do rendimento de reação e dificultando o processo de separação. Em contraste, a catálise homogênea ácida pode ser usada em substratos com elevados teores de ácidos graxos livres, no entanto, o processo exibe taxas de reação baixas. Assim mesmo, a catálise heterogênea tem a capacidade da reutilização do catalisador, além da facilidade na separação e purificação do biodiesel quando comparado com a homogênea, porém os catalisadores alcalinos seguem apresentando sensibilidade à presença de ácidos graxos livres e os catalisadores ácidos têm uma preparação tediosa com baixa concentração de sítios ativos e elevado custo. Enquanto à catálise enzimática, ela pode gerar produtos com elevada pureza sob condições mais suaves de reação e com a possibilidade de reuso do catalisador, no entanto o custo destas enzimas são elevados^{4,27,34}.

A seleção da rota de produção de biodiesel por transesterificação depende basicamente da qualidade e natureza da matéria-prima, a **Tabela 4** mostra as vantagens e desvantagens de cada uma das delas.

Tabela 4. Comparação entre os diferentes tipos de catálise usados na produção de biodiesel.

Tipo de catalise		Catalisador	Vantagens	Desvantagens
Catalítico - Homogênea	Alcalina	KOH NaOH	- Rendimento alto - Custo baixo - Taxa de reação alta - Condições moderadas de operação	- Geração de efluentes - Sensível a AGL e água - Necessidade de purificação - Sem possibilidade de reuso - Tóxico para o ambiente
	Ácida	HCl H ₂ SO ₄	- Alto rendimento - Custo baixo - Taxa de reação média - Insensível a AGL e água - Catalise simultânea de esterificação e transesterificação	- Geração de efluentes - Corrosão do equipamento - Necessidade de purificação - Sem possibilidade de reuso - Temperaturas médias
	Enzimática	Lipases livres	- Alto rendimento - Baixo consumo de energia - Alta pureza do produto	- Custo alto - Inibição por álcoois - Sem possibilidade de reuso
Catalítico - Heterogênea	Alcalina	Óxidos metálicos, zeólitas alcalinas e argilas	- Alto rendimento - Custo médio - Taxa de reação alta - Possibilidade de reuso - Pode ser usado em processos contínuos - Não corrosivo - Fácil separação	- Sensível a AGL e água - Necessidade de purificação - Temperatura alta - Pressão alta - Lixiviação de catalisador - Limitações de difusão
	Ácida	Polímeros inorgânicos e carbonos sulfonados	- Alto rendimento - Custo médio - Taxa alta de reação - Insensível a AGL e água - Possibilidade de reuso - Pode ser usado em processos contínuos - Catalise simultânea de esterificação e transesterificação	- Custo alto - Preparação tediosa - Concentração de sítios ativos baixa - Lixiviação de catalisador - Limitações de difusão
	Enzimática	Lipases imobilizadas	- Alto rendimento - Insensível a AGL e água - Possibilidade de reuso - Pode ser usado em processos contínuos - Baixo consumo de energia - Alta pureza do produto - Fácil separação	- Custo alto - Inibição por álcoois - Taxa baixa de reação
Não catalítico	Subcrítica ou Supercrítica	Sem catalisador	- Alta taxa de reação - Insensível a AGL e água - Menor número de etapas de processamento	- Temperatura alta - Pressão alta - Custo alto de equipamento - Consumo de energia alto

Fonte: adaptado de Lam *et al.* (2010)³⁴, Leung *et al.* (2010)⁴ e Fonseca *et al.* (2019)²⁷.

Mas recentemente, outro processo de produção de biodiesel chamado hidroesterificação surgiu como alternativa para viabilizar o uso de matérias-primas de segunda geração com altos teores de ácidos graxos livres e água que asseguram um processo de produção com menor custo e sem etapas de purificação³⁵.

2.4 Hidroesterificação

A hidroesterificação é um processo empregado na produção de biodiesel que apresenta algumas vantagens em relação à transesterificação. Tais vantagens incluem: o uso de qualquer matéria-prima; alta pureza do glicerol obtido e um biodiesel isento de contaminações⁸. Esta tecnologia envolve duas etapas consecutivas, hidrólise e esterificação, as quais podem ser catalisadas por enzimas, ácidos, bases ou produzidas em processos não catalíticos sob condições de fluidos subcríticos ou supercríticos⁷.

Na primeira etapa (**Figura 4**), os glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos) presentes no óleo ou gordura são hidrolisados em meio aquoso para gerar ácidos graxos livres e glicerol, os quais são produtos com elevado valor agregado empregados usualmente como matérias-primas na indústria de cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos e detergentes⁷. A hidrólise destes óleos ou gorduras convencionalmente é realizada através de um processo chamado Colgate-Emery, que requer de temperaturas de 250 °C e pressões de 50 bar para alcançar altos rendimentos. No entanto, sob essas condições também ocorrem reações indesejáveis como a oxidação de triglicerídeos³⁶.

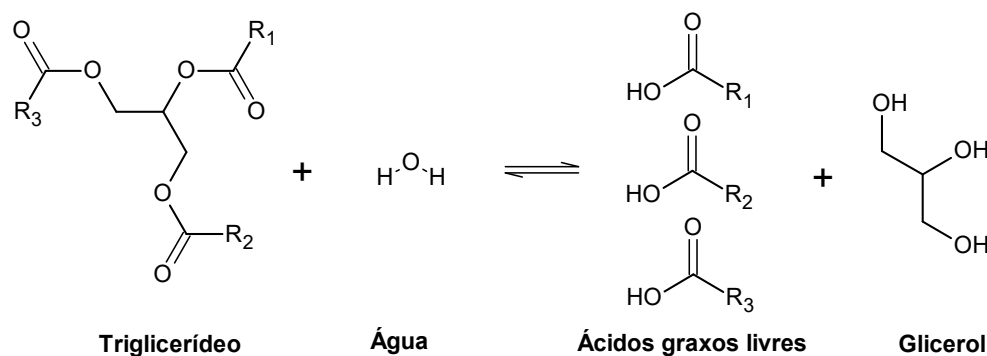


Figura 4. Reação geral de hidrólise de triacilglicerídeos. R₁, R₂ e R₃ representam grupos alquila e o catalisador pode ser alcalino, ácido ou enzimático. Fonte: adaptado de Pourzolfaghar *et al.* (2016)⁷.

Na segunda etapa (**Figura 5**), os ácidos graxos gerados na etapa anterior são esterificados com um álcool de cadeia curta para formar ésteres de ácidos graxos e água. Como as duas etapas são independentes, os produtos de reação não apresentam problemas de contaminação, resultando num glicerol e biodiesel com elevada pureza⁷. A esterificação destes ácidos graxos com álcoois de cadeia curta é realizada comumente usando catalisadores ácidos, como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico ou ácido sulfônico. No entanto, o uso destes catalisadores apresenta desvantagens, como toxicidade, corrosão dos equipamentos e a geração de efluentes de difícil tratamento³⁷.

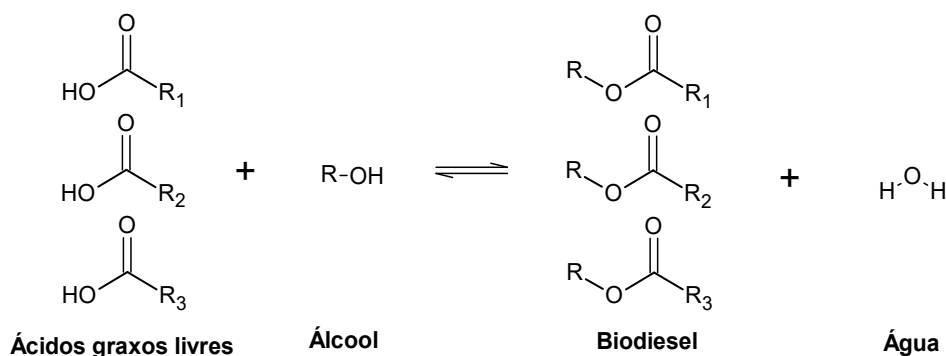


Figura 5. Reação geral de esterificação de ácidos graxos. R₁, R₂, R₃ e R representam grupos alquila e o catalisador pode ser alcalino, ácido ou enzimático. Fonte: adaptado de Pourzolfaghar *et al.* (2016)⁷.

Em contraste, a hidrólise e esterificação, catalisada por enzimas podem ocorrer a temperaturas mais baixas, reduzir o consumo de energia, consumir menos solventes e fornecer produtos mais limpos com um risco reduzido de reações indesejáveis. Entre os fatores mais importantes que influenciam estas reações estão as enzimas (tipo, método de preparo e concentração), o tempo, a temperatura, pH, razão molar dos substratos e taxa de mistura⁷. Estudos recentes sobre a hidrólise de matérias-primas de baixa qualidade sob diferentes condições de reação são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Hidrólise enzimática de matérias-primas de baixa qualidade.

Matéria-prima	Fonte de lipase	Condições de reação				Rendimento (%)	Ref.
		Óleo/tampão	T (°C)	t (h)	pH		
Óleo de cozinha	<i>C. rugosa</i>	1:1 (v/v)	30	10	7	100	38
	<i>Candida</i> sp.	1:1,2	40	15	-	-	39
	Lipozyme TL IM	-	40	-	7	61	40
Óleo de palma	<i>C. rugosa</i>	1:1	30	4	7	100	41
	<i>Jatropha curcas</i> L.	10%	40	2	8	95	42
	<i>Ricinus communis</i>	15,9 m/m	43,5	1,2	4,5	72	43
	<i>C. Rugosa</i> tipo VII	0,1 g/ml	45	1,5	7,5	97	44
Óleo de pinhão-mansão	<i>C. rugosa</i>	2:1	40	24	7,5	78	45
Óleo de mamona	<i>A. oryzae</i>	4:1	-	1	7	40	46
	<i>A. oryzae</i>	3:1	35-40	12	7	42	47
	<i>Jatropha curcas</i> L.	10%	40	2	8	24	42
Óleo de macaúba	Lipozyme	2:1	55	6	8	82	48

Fonte: adaptado de Lam *et al.* (2010)³⁴, Leung *et al.* (2010)⁴ e Fonseca *et al.* (2019)²⁷

Assim mesmo, estudos recentes sobre a esterificação de ácidos graxos provenientes de matérias-primas de baixa qualidade sob diferentes condições de reação são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Esterificação enzimática de matérias-primas de baixa qualidade.

Matéria-prima	Fonte de lipase	Condições de reação				Rendimento (%)	Ref.
		Ácido/álcool	T (°C)	t (h)	Álcool		
Óleo de cozinha	Novozym 435	1: 6	40	24	Etanol	89	50
	<i>Candida</i> sp.	1: 2	40	8	Metanol	96	51
	<i>Candida</i> sp.	-	40	40	Metanol	98	39
Óleo de palma	Novozym 435	1: 1,2	40	3	Metanol	98	6
	<i>Candida</i> sp.	1:3	40	30	Metanol	88	52
Óleo de pinhão-manso	Lipozyme IM	-	60	10	Metanol	86	53
Óleo de mamona	Lipozyme IM	1: 3	65	8	Etanol	98	54
Óleo de macaúba	<i>Rhizomucor miehei</i>	1: 2	40	8	Etanol	91	35
Ácido láurico	<i>Carica papaya</i>	1:20	55	24	Butanol	-	55
Ácido oleico	<i>Carica papaya</i>	1:1	50	1	Metanol	80	56

A continuação, um breve resumo sob as enzimas usadas na produção de biodiesel, as quais são chamadas lipases.

2.5 Lipases

As lipases (triacilglicerol hidrolase, EC 3.1.1.3) constituem um grupo diverso de enzimas obtidas a partir de fontes animais, vegetais ou de microrganismos como fungos, leveduras e bactérias⁵⁷. Ademais, pertencem à família das α/β -hidrolases (**Figura 6**), portanto⁵⁸:

- (i) Possuem uma estrutura composta por um núcleo quase paralelo de folhas β envolvidas em duas camadas de α -hélices;
- (ii) O sitio ativo é formado por três resíduos de aminoácidos (serina, aspartato ou glutamato e histidina);
- (iii) O resíduo serina, responsável pela catálise repousa numa curva entre uma folha β e uma α -hélice com uma sequência peptídica altamente conservada Gly-X-Ser-X-Gly;
- (iv) Apresenta uma tampa conformada por uma sequência peptídica de α -hélices hidrofílica que cobre o sítio ativo;
- (v) A tampa contém quatro bolsas de ligação para substrato (um orifício de oxianião e três bolsas que acomodam ácidos graxos ligados nas posições sn-1, sn-2 e sn-3).

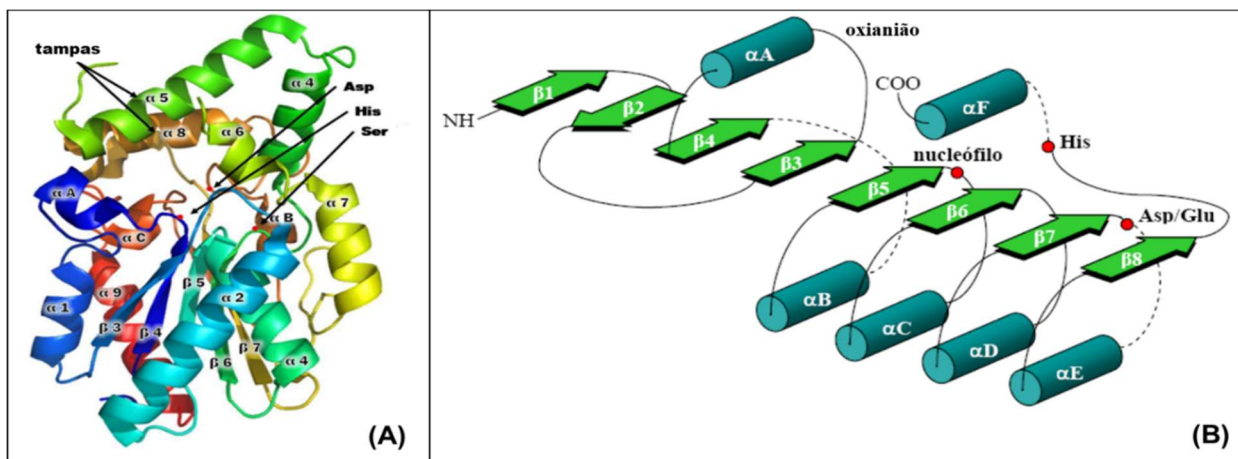


Figura 6. Dobramento clássico de α/β -hidrolase. (A) Estrutura terciária. (B) Estrutura secundária. Flechas (α -hélices); espirais ou cilindros (folhas β); círculos vermelhos (sitio ativo); Serina (Ser); Histidina (His); Aspartato (Asp); Glutamato (Glu).

Estas enzimas naturalmente catalisam a hidrólise de triglicerídeos na interface água e óleo. Porém, também podem atuar como catalisadores em reações de esterificação e transesterificação (alcoólise, acidólise e interesterificação), quando a quantidade de água no sistema é suficientemente baixa para deslocar o equilíbrio no sentido da síntese⁵⁹.

O mecanismo catalítico das lipases, na hidrólise ou síntese envolve duas etapas, acilação e desacilação (**Figura 7**).

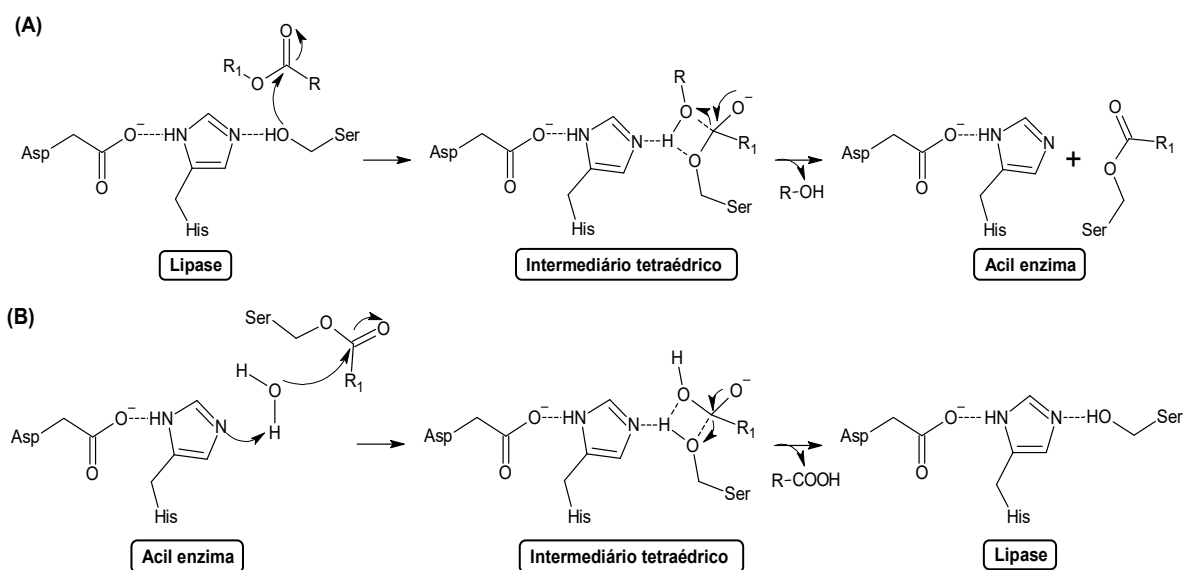


Figura 7. Mecanismo catalítico de hidrólise ou síntese em lipases. (A) Acilação. (B) Desacilação. Fonte: Adaptado de Campillo- Alvarado (2013)⁶⁰.

Na etapa de acilação, ocorre um ataque nucleofílico do resíduo hidroxílico da serina sobre o carbono da ligação éster do glicerídeo susceptível formando um intermediário tetraédrico, em seguida uma molécula de álcool (monoglicerídeos, diglicerídeos ou glicerol) é liberado e um complexo acil-enzima é formado. E na etapa de desacilação, o grupo hidroxila do aceitador de acila (água, álcool, glicerídeos ou ácido graxo) ataca ao complexo acil-enzima formando outro intermediário tetraédrico, em seguida o produto (triglicerídeo, éster ou ácido graxo) é liberado e a enzima é regenerada^{60,61}.

Adicionalmente, estas enzimas apresentam a capacidade de atuar de forma seletiva sobre diferentes substratos, isto é controlado pelas propriedades da enzima a nível molecular, a estrutura do substrato e também por fatores que afetam a ligação enzima-substrato⁶². Neste sentido, as lipases podem ser classificadas de acordo com sua seletividade em:

(i) *Lipases regiosseletivas*

São aquelas que tem a capacidade de discriminar entre as posições externas e a posição interna do esqueleto do triglicerídeo. Elas podem ser de dois tipos: não-específicas e 1,3-específicas. As lipases não-específicas, são aquelas que podem hidrolisar o ácido graxo em qualquer posição. Enquanto as lipases 1,3-específicas, são aquelas que apenas podem hidrolisar os ésteres primários, ou seja, os ácidos graxos da posição sn-1 e sn-3 no triglicerídeos⁶³.

(ii) *Lipases tiposseletivas*

São aquelas que tem a capacidade de discriminar entre diferentes ácidos graxos de comprimento da cadeia e grau de insaturação determinada⁶².

(iii) *Lipases estereosseletivas*

São aquelas que têm a capacidade de discriminar entre enantiômeros e substratos racêmicos⁶⁴.

Dentre as diferentes lipases, as lipases vegetais tem sido foco de muita atenção devido às vantagens que apresenta sobre as lipases animais e microbianas, como sua especificidade, baixo custo, disponibilidade e facilidade na purificação⁶⁵. No entanto, a principal desvantagem da implantação destas enzimas em grande escala é o baixo teor enzimático em sementes. As *Caricaceae* ou *Euphorbiceae* superam essa desvantagem, pois suas enzimas estão disponíveis em grandes quantidades em seu látex⁶⁶.

2.5.1 Lipase de *Carica papaya*

O mamoeiro, conhecido cientificamente como *Carica papaya* é uma planta arborecente pertencente à família das *Caricaceae* de caule macio e não ramificado, capaz de crescer de 5 a 20 metros de altura (**Figura 8A**). Esta árvore é nativa da América central; porém é amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro por sua fruta comestível conhecida como papaia ou mamão e por seu látex, uma fonte rica de proteases usadas na indústria alimentícia e farmacêutica⁶⁷.

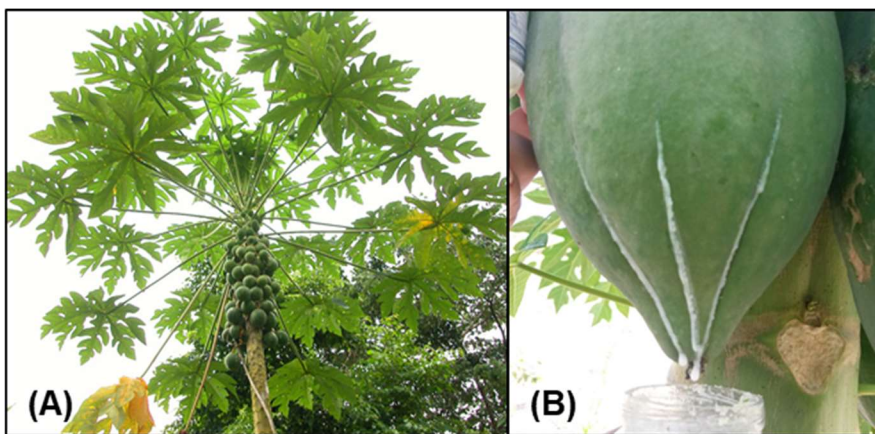


Figura 8. *Carica papaya*. (A). Mamoeiro (B). Mamão. Fonte: elaborado pela autora.

O látex de mamão é um líquido tixotrópico de aparência leitosa, encontrado frequentemente nas partes aéreas do mamoeiro, incluindo frutos não maduros (**Figura 8B**). Este látex contém cerca de 85% de água, 15% de massa seca e uma grande variedade de enzimas com composição variável dependente da idade ou sexo do mamoeiro, da variedade e localização geográfica das culturas, assim como da hora do dia em que a coleta é realizada^{67,68}.

Dentre da variedade de enzima presentes no látex, apenas a fração não solúvel em água apresenta atividade hidrolítica, tal atividade é atribuída principalmente a quatro enzimas: uma esterase (CpEst), duas lipases (CpLip1; CpLip2) e uma fosfolipase (CpPLD1)⁶⁰. Além disso, esta fração contém espécies não proteicas como ácidos graxos saturados e insaturados, tocoferóis, tocotrienóis, álcoois triterpênicos, esteróis e a possível presença de cadeias curtas de poli-isopreno ligadas covalentemente a moléculas fosfolipídicas formando uma matriz polimérica⁶⁹.

Esse complexo lipolítico presente no látex possui várias vantagens em comparação com outras lipases, tais como^{60,70,71,72}:

- (i) Boa estabilidade numa ampla faixa de pH, temperatura, solventes orgânicos e à presença de outras enzimas;
- (ii) Relativamente econômica (1/3 do custo da *Candida rugosa* bruta e 1/30 da Novozym 435);
- (iii) Considerada “auto-imobilizadas” por estar ligada naturalmente a uma matriz não solúvel em água, portanto, não requer de suportes adicionais e podem ser recuperadas e reutilizadas;
- (iv) Seu tipo-, régio e estéreoosseletividade oferecem alta versatilidade em diversas reações bioquímicas;
- (v) Pode ser coletado de forma sustentável a partir do agro-resíduo do mamão de frutas doentes e verdes ou do resíduo gerado na etapa de remoção de substâncias insolúveis no processo de purificação da papaína.

Além disso, esta lipase tem sido amplamente utilizada na modificação de óleos vegetais ou gorduras animais (com base em 1-3 s e regiosseletividade). Ademais, como catalisador em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação de substratos não glicerolipídios e na resolução de compostos quirais⁷³. Desta forma, levando em consideração todas as vantagens e aplicações desta enzima o látex bruto e duas frações parcialmente purificado de *Carica papaya* foram selecionados para execução do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação da lipase de *Carica papaya* na síntese de biodiesel a partir da hidroesterificação de matérias-primas de baixa qualidade.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a qualidade dos óleos a serem usados como matérias-primas de baixa qualidade, através das análises do perfil composicional, teor de ácidos graxos livres, índice de acidez, índice de peróxido e teor de água;
- Caracterizar o biocatalisador escolhido mediante a dosagem da atividade hidrolítica a diferentes valores de pH, temperatura, tempo de incubação, concentração de tampão e quantidade de substrato;
 - Avaliar os biocatalisadores de *Carica papaya* através da determinação da atividade hidrolítica e umidade;
- Definir as melhores condições reacionais na hidrólise em reator de tanque agitado operando em modo batelada;
 - Avaliar o rendimento reacional mediante a determinação do teor de ácidos graxos livres;
- Esterificar os ácidos graxos obtidos em reator de tanque agitado operando em modo batelada por duas rotas diferentes, catalise ácida e enzimática;
 - Avaliar o rendimento reacional mediante a determinação do teor de ésteres produzidos;
- Realizar uma comparação com outras rotas de produção de biodiesel, convencionais e não convencionais;
 - Avaliar o rendimento reacional mediante a determinação do teor de ésteres produzidos.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Enzimas

A lipase de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich, lote: SLBL2143V) foi utilizada na determinação do perfil composicional na posição sn-2 do triglicerídeo. Assim mesmo, a lipase de *Carica papaya* foi usada como catalisadores na hidrólise de triglicerídeos, bem como na esterificação de ácidos graxos.

4.1.2 Substratos

O azeite de oliva (Carbonell®, lote: L72449-11821), adquirido no mercado foi empregado como substrato na dosagem da atividade hidrolítica. O óleo bruto de palma e o óleo residual oriundo do processo de fritura foram usados como matérias-primas de baixa qualidade nas reações de hidrólise e transesterificação. Assim mesmo, os ácidos graxos livres obtidos da hidrólise foram usados nas reações de esterificação.

4.1.3 Outros materiais e reagentes

Os demais reagentes, adquiridos comercialmente em grau analítico foram: acetona (Neon, lote: 41587), ácido acético (Chemicals, lote: 29508), ácido cítrico (Labsynth, lote: 180542), ácido clorídrico (J.T. Baker, lote: J26C22), ácido sulfúrico (Chemicals, lote: 29579), álcool etílico (Dinâmica, lote: 93060), álcool metílico (Sigma-Aldrich, lote: SHBC0287V), álcool terc-butilico (Sigma-Aldrich, lote: BCBN2894V), amido (Chemicals, lote: 180364), bicarbonato de sódio (Labsynth, lote: 185818), carbonato de potássio (Labsynth, lote: 185954), cloreto de cálcio (Labsynth, lote: 18738), cloreto de sódio (Labsynth, lote: 186538), éter etílico (Chemicals, lote: EZ0071), etilenoglicol (Sigma-Aldrich, lote: SZBA2720V), fenolftaleína (Labsynth, lote: 190142), fosfato de sódio bibásico (Química moderna, lote: 27610), fosfato de potássio monobásico (Labsynth, lote: 187854), goma arábica (Sigma-Aldrich, lote: SLBQ4460V), heptano (Neon, lote: 35629), hexano (Neon, lote: 37261), hidróxido de potássio (Labsynth, lote: 186950), hidróxido de sódio (Labsynth, lote: 163945), iodeto de potássio (Synth, lote: 216217), isooctano (Neon, lote: 35622), MSTFA (Fluka Analytical, lote: BCBJ86652V), sal biliar, lauril sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, lote: 57H1242), tricapina (Solutions Within, lote: LC9338), tiosulfato de sódio (Chemicals, lote: 75.704), tris base (Sigma-Aldrich, lote: SLBK4465V), 2,7-diclorofluoresceína (Sigma-Aldrich, lote: MKBQ2318).

4.2 Equipamentos

Na **Tabela 7**, são apresentados os equipamentos empregados no desenvolvimento dos experimentos descritos neste trabalho.

Tabela 7. Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

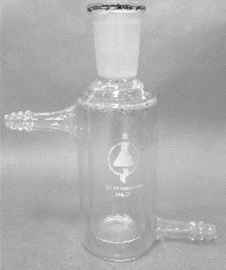
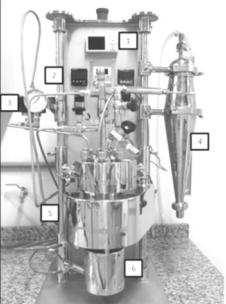
Equipamento	Análise	Fabricante	Modelo
 Analisador de umidade	Umidade do biocatalisador	Shimadzu	MOC63u
 Agitador magnético com aquecimento	Agitação e aquecimento	Kasvi	K40-1820H
 Balança analítica	Medidas de massa	Shimadzu	AUY220
 Banho termostatzado	Reações de hidrólise, esterificação e transesterificação	Solab	SL152
 Banho Dubnoff	Atividade hidrolítica	Ethik technology	304-TPA
 Centrifuga	Separação de fases	Hitachi	CR22N
 Cromatógrafo gasoso	Perfil composicional, Teor de éster	Shimadzu	GC-2010
 Estufa de secagem	Secagem	Quimis	Q317M
 pHmetro	Medidas de pH	Tecnal	TEC-2
 Titulador de Karl Fisher	Teor de água nas matérias-primas<	Metrohm Pensalab	831 KF

Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Reatores

Na **Tabela 8**, são apresentados os reatores usados no desenvolvimento dos experimentos descritos neste trabalho.

Tabela 8. Reatores utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Reator	Especificações	Reações
	Reator encamisado para tubo de centrifuga tipo Falcon Altura: 6 cm Diâmetro: 3 cm Capacidade máx: 50 mL	Reações de hidrólise na análise da posição sn-2 do triglicerídeo
	Reator encamisado de tanque agitado Altura: 6 cm Diâmetro: 2 cm Capacidade máx: 50 mL	Reações de hidrólise no planejamento
	Reator encamisado de tanque agitado Altura: 8,5 cm Diâmetro: 3,5 cm Capacidade máx: 80 mL Junta esmerilhada: 24/40	Reações de transesterificação alcalina
	Reator encamisado de tanque agitado de 3 bocas Altura: 5 cm Diâmetro: 2cm Capacidade máx: 10 mL Junta esmerilhada: 14/20	Reações de esterificação e transesterificação
	Reator hidrotérmico de alta pressão e alta temperatura (AlphaTec-RH-830) Temperatura máx: 270 °C Pressão máx: 100 bares Capacidade máx: 300 mL	Reações de hidrólise

Fonte: elaborado pela autora.

4.4 Procedimento experimental

Os experimentos descritos neste trabalho foram desenvolvimentos em quatro etapas consecutivas, as quais são apresentadas na **Figura 9**.

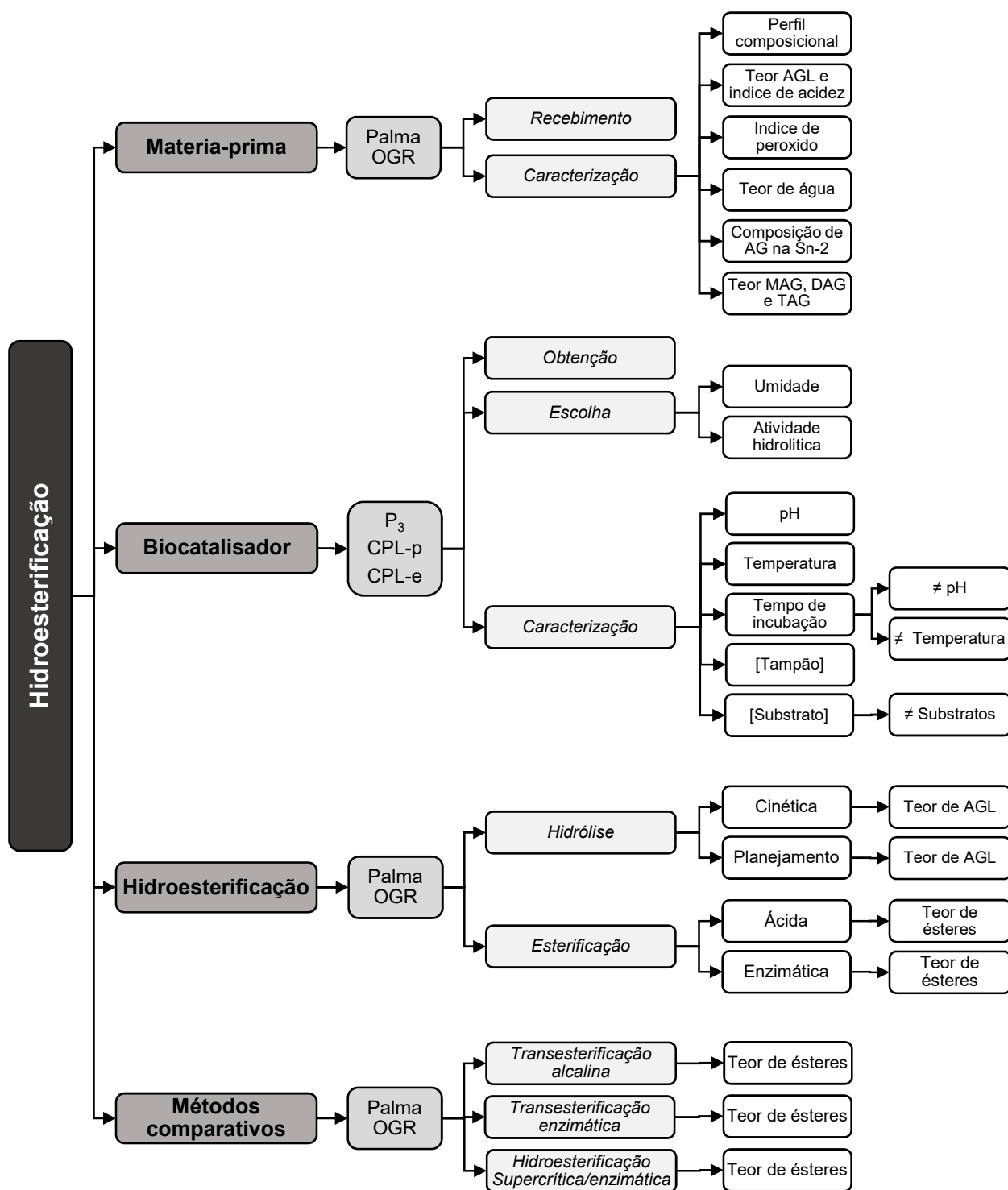


Figura 9. Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho. Fonte: elaborada pela autora.

4.4.1 Recebimento das matérias-primas

O óleo de palma bruto foi fornecido pela empresa Agropalma (Belém – Pará, Brasil) e o óleo residual de fritura foi adquirido do ponto de coleta de óleo residual no Instituto Federal de São Paulo – IFSP (Matão – São Paulo, Brasil). As amostras de óleo foram devidamente rotuladas e armazenadas a 21 °C sem exposição à luz.

4.4.2 Caracterização das matérias-primas

Para a avaliação da qualidade das matérias-primas escolhidas, o óleo de palma bruto e o óleo residual foram caracterizados através das seguintes análises:

a) Perfil composicional

A determinação do perfil composicional foi realizada de acordo com a metodologia descrita na ET ISO 12966⁷⁴, que requer a derivatização da amostra. A reação de metilação foi efetuada em balão de fundo chato acoplado a um condensador, usando aproximadamente 0,5 g de amostra e 2 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio 0,2 mol/L. A mistura foi aquecida até ebulição; logo foram adicionadas duas gotas de solução indicadora de fenolftaleína e solução metanólica de ácido sulfúrico 1,0 mol/L até o desaparecimento da cor rosa. A reação foi mantida em aquecimento durante 5 min; foram adicionados 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 5 mL de isooctano. Após a separação de fases, a fase orgânica foi coletada e analisada por CG-DIC sob as condições cromatográficas apresentadas na **Tabela 9**.

Tabela 9. Condições cromatográficas para análise do perfil composicional.

Parâmetro	Condição
Temperatura do injetor	250 °C
Programação da temperatura da coluna	Temperatura inicial: 60 °C por 2 min Rampa 1: 10 °C/min até 200 °C Rampa 2: 5 °C/min até 240 °C Temperatura final: 240 °C por 7 min
Temperatura do detector	350 °C
Gás de arraste	Hélio
Modo de injeção	Split 100:1
Velocidade linear do gás de arraste	29,6 cm/s
Fluxo do Gás de arraste	2 mL/min
Pressão	1001,1 kPa
Tempo total de análise	30 min
Coluna cromatográfica Stabilwax Restek (30 m x 0,25 mm x 25 µm) Fase estacionária de polietilenoglicol	

Fonte: elaborada pela autora.

A porcentagem individual de ácidos graxos contidos na amostra de óleo foi determinada pela **Equação 1**.

$$C_i (\%) = \frac{A_i}{\sum A} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

sendo: C_i = teor do ácido graxo i ; A_i = área do pico correspondente ao ácido graxo i ; $\sum A$ = soma da área de todos os picos.

A massa molar média de ácidos graxos e a massa molar do óleo foram calculadas através das **Equações 2 e 3**, respectivamente.

$$MMM = \sum [(M_i - 1) \times C_i] \quad \text{Equação (2)}$$

$$MMTAG = [(3 \times MMM) + 41] \quad \text{Equação (3)}$$

onde: MMM = massa molar média de ácidos graxos; M_i = massa molar do ácido graxo i ; C_i = teor do ácido graxo; $MMTAG$ = massa molar do óleo.

b) Teor de ácidos graxos livres e índice de acidez

O teor de ácidos graxos livres foi determinado conforme à norma AOCS Ca 5a-40⁷⁵. Uma amostra de 5 g de óleo foi transferida para um Erlenmeyer e foram adicionados 75 mL de neutralizado. Em seguida, a mistura foi titulada com hidróxido de sódio 0,2 mol/L sob agitação constante. O teor de ácidos graxos livres foi calculado através da **Equação 4**.

$$AGL (\%) = \frac{M \times V}{m_a} \times \text{Tipo de óleo} \quad \text{Equação (4)}$$

sendo: AGL = teor de ácidos graxos livres; M = concentração da solução titulante, em mol/L; V = volume gasto da solução titulante, em mL; m_a = massa de amostra, em g; Tipo de óleo = 28,2 (ácido oleico); 20,0 (ácido láurico) ou 25,6 (ácido palmítico).

O índice de acidez foi determinado levando-se em consideração o teor de ácidos graxos livres, através da **Equação 5**.

$$Acidez \left(\frac{mg \ NaOH}{kg} \right) = 1,99 \times AGL \quad \text{Equação (5)}$$

c) Índice de peróxido

A determinação do índice de peróxido foi realizada segundo o método AOCS Cd 8b-90⁷⁶. Aproximadamente 2 g de óleo, 50 mL da mistura ácido acético: isooctano nas proporções 3:2 (v/v) e 500 µL de solução saturada de iodeto de potássio foram transferidos para um Erlenmeyer. Em seguida, a mistura foi titulada com tiosulfato de sódio 0,01 eq-g/L até que a cor amarela quase desaparecesse. Depois, foram adicionados 500 µL de lauril sulfato de sódio, 500 µL de solução indicadora de amido e tiosulfato de sódio até que a cor azul desapareceu. O índice de peróxido foi determinado pela **Equação 6**.

$$Peroxido \left(\frac{meq-g}{kg} \right) = \frac{(V_a - V_b) \times N}{m_a} \times 1000 \quad \text{Equação (6)}$$

onde: V_a = volume gasto de titulante na amostra, em mL; V_b = volume gasto de titulante no branco, em mL; N = concentração da solução titulante, em eq-g/L; m_a = massa de amostra, em g.

d) Teor de água

O teor de água foi determinado pelo método de Karl Fisher coulométrico de acordo com a ASTM D6304⁷⁷. Uma amostra de 2 mL de óleo foi inserida diretamente no equipamento, com auxílio de uma seringa descartável. O teor de água foi calculado mediante a **Equação 7**.

$$H_2O (\%) = \frac{W}{1000 \times m_a} \quad \text{Equação (7)}$$

sendo: W = massa de água titulada, em g; m_a = massa da amostra, em g.

Visto que a lipase de *Carica papaya* exibe uma regiosseletividade 1,3-específica e o óleo de palma bruto apresenta um teor de glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos) variável^{24,60}, adicionalmente foram realizados os seguintes análises com a finalidade de conhecer o teor de glicerídeos das matérias-primas avaliadas, o rendimento teórico na hidrólise enzimática e os possíveis subprodutos desta reação.

e) Composição na posição sn-2 do triglicerídeo

A determinação da composição em ácidos graxos na posição sn-2 do triglicerídeo foi realizada segundo Caballero *et al.* (2014) com algumas modificações⁷⁸, que consiste na hidrólise da amostra utilizando a lipase 1,3-específica de pâncreas de porco. A reação foi realizada em um reator encamisado para tubo de centrifuga tipo Falcon de 50 mL, usando aproximadamente 100 mg de amostra, 1 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L a pH 8, 250 µL de sal biliar 0,05% m/v, 100 µL de cloreto de cálcio 2,2% m/v e 100 mg de lipase. A mistura foi mantida a 40 °C sob agitação constante durante 30 min (**Figura 10**).



Figura 10. Sistema de reação na análise da posição sn-2. Fonte: elaborado pela autora.

Posteriormente, a reação foi cessada com 1 mL de ácido clorídrico 6 mol/L, os glicerídeos foram extraídos com 3 mL de éter etílico e a mistura foi centrifugada a 5.000 × g durante 10 min. Em seguida, a fase orgânica foi aplicada a uma placa cromatográfica de sílica gel suportada em alumínio (Merck, lote: HX60116254). A placa foi desenvolvida com a mistura hexano: éter etílico: ácido acético nas proporções 70:30:1 (v/v/v) e revelada com 2,7-diclorofluoresceína 0,2% m/v. A banda correspondente aos monoglicerídeos foi raspada e eles foram extraídos com 2 mL de éter etílico. Após, a fase orgânica foi coletada, o solvente foi evaporado e o perfil composicional foi determinado conforme ao item 4.4.2.a.

f) Teor de mono-, di- e triglicerídeos

O teor de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos foi determinado de acordo com a metodologia descrita na ABNT NBR 15908⁷⁹. Aproximadamente 100 mg de amostra, 100 µL da solução estoque de etilenoglicol (25 mg/mL) e 100 µL da solução

estoque de tricaprina (8 mg/mL) foram transferidos para um vial de 10 mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL de MSTFA e após de 20 min de reação foram adicionados 8 mL de heptano. Depois, uma alíquota da mistura foi analisada por CG-DIC conforme as condições experimentais descritas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Condições cromatográficas para análise de mono-, di- e triglicerídeos.

Parâmetro	Condição
Programação da temperatura da coluna	Temperatura inicial: 50 °C por 1 min
	Rampa 1: 15 °C/min até 180 °C
	Rampa 2: 7 °C/min até 230 °C
	Rampa 3: 20 °C/min até 380 °C
	Temperatura final: 380 °C por 10 min
Temperatura do detector	380 °C
Gás de arraste	Hélio
Modo de injeção	On - column
Velocidade linear do gás de arraste	54 cm/s
Fluxo do Gás de arraste	2 mL/min
Pressão	1001,1 kPa
Tempo total de análise	30 min
Coluna cromatográfica Zebron ZB - 5HT INFERNO (30 m × 0,32 mm × 10 µm)	
Fase estacionária de 5 % fenil e 95 % dimetilpolisiloxano	

Fonte: elaborada pela autora.

O teor de mono-, di- e triglicerídeos foram determinados através da **Equação 8**.

$$C_j (\%) = \frac{\sum A_j}{\sum A} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

sendo: C_j = teor do glicerídeo j ; $\sum A_j$ = soma da área do pico correspondente aos glicerídeos j ; $\sum A$ = soma da área de todos os picos; j = monoglicerídeos ou diglicerídeos ou triglicerídeos.

Adicionalmente, foi possível calcular o rendimento teórico na hidrólise enzimática para ambas matérias-primas por meio da **Equação 9**.

$$R_{teórico} (\%) = 0,666 \times C_{TAG} + 0,444 \times C_{DAG} + 0,222 \times C_{MAG} \quad \text{Equação (9)}$$

onde: $R_{teórico}$ = rendimento teórico; C_{TAG} = teor de triglicerídeos, em %; C_{DAG} = teor de diglicerídeos, em %; C_{MAG} = teor de monoglicerídeos, em %.

4.4.3 Obtenção dos biocatalisadores

O látex bruto e as frações parcialmente purificadas de *Carica papaya* foram fornecidas pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais e Bioquímica de Macromoléculas da Universidade do Atlântico (Barranquilla – Atlântico, Colômbia). A coleta e obtenção dos diferentes biocatalisadores foram realizadas de acordo com Rivera *et al.* (2012) com algumas modificações⁸⁰. Os biocatalisadores foram devidamente rotulados e armazenados a -20 °C até o seu uso em reação.

a) Látex bruto de *Carica papaya* (P₃)

O látex bruto de mamão foi obtido diretamente de cultivos localizados no município de Juan de Acosta – Atlântico, Colômbia através de incisões longitudinais de 2 a 3 mm de profundidade na epiderme dos frutos verdes. Em seguida, o exsudado coletado foi armazenado em geladeira a 8 °C durante 5 dias para secagem. Após secagem, foi pulverizado e peneirado (Bertel, abertura: 250 µm, malha mesh: 60 µm).

b) Fração parcialmente purificada sem proteases (pCPL-p)

A fração livre de proteases foi obtida através da lavagem do látex bruto (P₃) com água destilada a 4 °C, seguido do centrifugado a 5.000 × g durante 20 min. O produto obtido foi liofilizado -46 °C a 0,098 mbar durante 48 h e posteriormente foi peneirado (Bronzinox, abertura: 425 µm, malha mesh: 40 µm).

c) Fração parcialmente purificada sem proteases nem estereases (pCPL-e)

A fração livre de proteases e estereases foi obtida através de duas etapas consecutivas. A primeira, consistiu na lavagem da fração parcialmente purificada livre de proteases (CPL-p) com a mistura terc-butanol:hexano na proporção 1:1 (v/v), seguido do centrifugado a 15.500 × g durante 10 min. A segunda, consistiu na lavagem da CPL-p com solução extratora (0,1 mol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 0,5% lauril sulfato de sódio), seguido do centrifugado a 15.500 × g durante 10 min. O produto obtido foi liofilizado a -46 °C a 0,098 mbar durante 48 h e posteriormente foi peneirado (Bronzinox, abertura: 425 µm, malha mesh: 40 µm).

4.4.4 Escolha do biocatalisador

Para a avaliação dos biocatalisadores obtidos na reação de hidrólise, ao látex bruto (P₃) e às duas frações parcialmente purificadas (pCPL-p e pCPL-e) foram realizados os seguintes análises:

a) Atividade hidrolítica

A determinação da atividade enzimática foi realizada através da titulação dos ácidos graxos liberados durante a reação hidrólise do azeite de oliva, conforme ao método descrito por Paula (2011)⁸¹. A reação foi efetuada em um banho Dubnoff a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 5 min. O meio reacional foi constituído por 1,25 g de água destilada, 1,25 g de azeite, 87 mg de goma arábica (7% com relação à massa de água), 2 mL de solução tampão 0,1 mol/L e 50 mg da enzima. Posteriormente, foram adicionados 10 mL da mistura etanol: acetona: água nas proporções 1:1:1 (v/v/v), 10 mL de hidróxido de potássio 0,05 mol/L e foi titulado o excesso de hidróxido com ácido clorídrico 0,05 mol/L.

A atividade hidrolítica foi calculada pela **Equação 10** e expressa em unidade de atividade (U), a qual é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por min nas condições de ensaio.

$$AH (U/g) = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000}{t \times m_a} \quad \text{Equação (10)}$$

onde: AH = atividade hidrolítica; V_b = volume gasto de titulante no branco, em mL; V_a = volume gasto de titulante na amostra, em mL; M = concentração da solução titulante, em mol/L; t = tempo de incubação, em min; m_a = massa de biocatalisador adicionado, em g.

Além disso, a atividade relativa foi determinada através da **Equação 11**.

$$\text{Atividade relativa (\%)} = \frac{AH_i}{AH_{max}} \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

sendo: AH_i = atividade hidrolítica i ; e AH_{max} = atividade hidrolítica máxima nas condições de ensaio.

b) Teor de umidade

O teor de água foi medido diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho durante 15 min a 105 °C. Adicionalmente, foi determinado o rendimento dos diferentes biocatalisadores obtidos levando em consideração a umidade, por meio da **Equação 12**.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m}{m_i} \times 100 \quad \text{Equação (12)}$$

onde: m = massa de látex fresco coletado, em g; e m_i = massa final do biocatalisador i após a secagem, em g; i = P₃ ou pCPL-p ou pCPL-e.

4.4.5 *Caracterização do biocatalisador*

Algumas propriedades de interesse do biocatalisador selecionado foram caracterizadas através da dosagem da atividade hidrolítica (item 4.4.4.a) variando:

a) pH

O efeito do pH sobre a atividade hidrolítica foi estudado pela dosagem da atividade empregando diferentes soluções tampão 0,1 mol/L no preparo da emulsão, com valores de pH na faixa de 4 a 10 (**Tabela 11**). O pH que apresentou a maior atividade foi chamado “pH ótimo”.

Tabela 11. Soluções tampões 0,1 mol/L usados no preparo da emulsão.

pH	Tampão	pKa
4,0 a 5,5	KC ₈ H ₇ O ₇ / K ₂ C ₈ H ₆ O ₇	4,77
6,0 a 7,5	KH ₂ PO ₄ / NaHPO ₄	7,21
8,0 a 9,0	Tris-HCl	8,06
9,5 a 10,0	NaHCO ₃ / K ₂ CO ₃	10,33

Fonte: elaborada pela autora.

b) Temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica foi estudada pela dosagem da atividade usando o pH ótimo (tampão H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0,1 mol/L para pH 6,0 e tampão Tris-HCl 0,1 mol/L para pH 8,5) a diferentes temperaturas de incubação, na faixa de 30 a 60 °C. A temperatura que apresentou maior atividade foi chamada “temperatura ótima”.

c) Concentração do tampão

O efeito da concentração do tampão sobre a atividade hidrolítica foi estudado pela dosagem da atividade empregando o pH ótimo (tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ para pH 6,0 e tampão Tris-HCl para pH 8,5) a diferentes concentrações do tampão no preparo da emulsão, na faixa de 0,05 a 0,20 mol/L.

d) Tempo de incubação para avaliar a estabilidade do pH

O efeito do tempo de incubação para avaliar a estabilidade do pH foi determinado pela dosagem da atividade residual depois da incubação do biocatalisador a 30 °C durante 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min a pH 6,0 (tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 mol/L) e pH 8,5 (tampão Tris-HCl 0,1 mol/L).

e) Tempo de incubação para avaliar a estabilidade térmica

O efeito do tempo de incubação para avaliar a estabilidade à temperatura foi determinado pela dosagem da atividade residual depois da incubação do biocatalisador a pH 8,5 (tampão Tris-HCl 0,1 mol/L) e diferentes valores de temperaturas de 30 a 60 °C durante 0,5, 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

f) Concentração e tipo de substrato para avaliar parâmetros cinéticos

O efeito da concentração e tipo de substrato sobre a atividade hidrolítica para avaliar alguns parâmetros cinéticos foi determinado pela dosagem da atividade a pH 8,5 (tampão Tris-HCl 0,1 mol/L) e temperatura de 30 °C, usando diferentes concentrações e tipos de substrato no preparo da emulsão (**Tabela 12**).

Tabela 12. Proporção de substrato e água no preparo da emulsão.

Substrato (% m/m)	Água (% m/m)	Teor de ácidos graxos (μM)		
		Azeite de oliva	Óleo de palma	Óleo residual
10 (0,25 g)	90 (2,25 g)	186	197	196
30 (0,75 g)	70 (1,75 g)	558	590	587
50 (1,25 g)	50 (1,25 g)	930	984	979
70 (1,75 g)	30 (0,75 g)	1302	1377	1371

Fonte: elaborada pela autora.

Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{\max}$ foram determinados pela representação gráfica da curva de saturação de uma enzima, que é representada pela velocidade de reação

em função da concentração de substrato empregando-se o ajuste por regressão no lineal do software Origin – versão 9.6.

4.4.6 Hidroesterificação

A produção de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir da hidroesterificação do óleo de palma bruto e do óleo residual de fritura envolveu duas etapas consecutivas:

a) Etapa 1: Reação de hidrólise

Inicialmente, foi monitorada a cinética da reação de hidrólise do óleo de palma bruto e do óleo residual de fritura durante 48 h. As reações foram realizadas em reator de tanque agitado de 50 mL operando em modo batelada a pH 8,5 e temperatura de 35 °C sob agitação constante de 800 rpm. O sistema reacional foi constituído por 20 g de óleo, 4,4 mL de solução tampão Tris-HCl 0,18 mol/L (razão molar tampão/óleo, 10:1), 308 mg de goma arábica e uma carga enzimática de 110 U/g de látex bruto de *Carica papaya* (P₃). As alíquotas coletadas a intervalos de 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas foram centrifugadas a 13.000 × g durante 10 min e o teor de ácidos graxos livres foi determinado (4.4.2.b).

Após, as melhores condições experimentais na hidrólise destas matérias-primas foram estabelecidas através de um planejamento fatorial. O delineamento aplicado foi um planejamento completo de dois níveis 2³ (três fatores, cada um em dois níveis) e ampliado para a metodologia de superfície de resposta. Além disso, para a estimativa do erro experimental foram executados quatro experimentos no ponto central. As variáveis independentes ou fatores escolhidos foram a razão mássica tampão/óleo (RM), a concentração do tampão (Tp) e a carga enzimática (C). Os valores codificados e não codificados das variáveis e níveis são descritos na **Tabela 13**. A variável dependente ou resposta foi o teor de ácidos graxos livres, o qual foi determinado pela **Equação 4**.

Tabela 13. Variáveis e níveis no planejamento fatorial 2³ - Reação de hidrólise das matérias-primas.

Variáveis	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Razão mássica tampão/óleo	0,02	0,22	0,51	0,80	1,00
Concentração do tampão (mol/L)	0,02	0,05	0,1	0,15	0,18
Carga enzimática (% m/m) ^a	0,5	6	14	22	27,5

^a Porcentagem de enzima com respeito à massa de óleo (5 g). Em um planejamento fatorial 2³ α = 1,68. Fonte: elaborada pela autora.

Todas as reações do planejamento foram efetuadas em reator de tanque agitado de 50 mL operando em modo batelada a pH 8,5 e temperatura de 35 °C durante 24 h sob agitação constante de 800 rpm e pressão ambiente (**Figura 11**). O sistema reacional foi constituído por 5 g de óleo, goma arábica (7% com relação à massa de tampão), solução tampão Tris-HCl e o látex bruto de *Carica papaya* (P₃). Após da reação, o produto obtido foi centrifugado a 13.000 × g durante 10 min e a fase superior foi coletada para posterior determinação do teor de ácidos graxos livres (item 4.4.2.b).



Figura 11. Sistema de reação na hidrólise das matérias-primas. Fonte: elaborado pela autora.

b) Etapa 2: Reação de esterificação

Na segunda etapa, os ácidos graxos obtidos das melhores condições na hidrólise do óleo de palma e do óleo residual de fritura foram esterificados por duas rotas diferentes: (i) catálise ácida e (ii) enzimática. As reações foram realizadas em reator de tanque agitado de 10 mL operando em modo batelada e equipado com condensador (**Figura 12**).

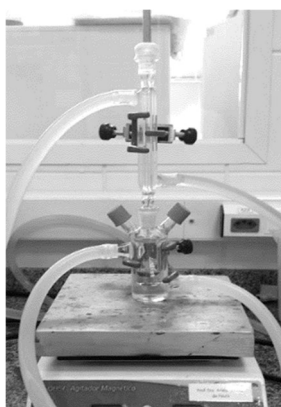


Figura 12. Sistema de reação na esterificação das matérias-primas. Fonte: elaborado pela autora.

i) Esterificação - Catalise ácida

As reações de esterificação por catálise ácida foram realizadas a 65 °C sob agitação constante de 300 rpm durante 60 min, conforme à metodologia descrita por Hassan *et al.* (2014)⁸². O sistema reacional foi constituído por 2 g de ácido graxo, 900 µL de metanol (razão molar álcool/ácido graxo, 3:1) e 20 mg de ácido sulfúrico concentrado (1% em relação à massa de ácido graxo). O produto da reação foi centrifugado a $5.000 \times g$ durante 20 min. A fase superior foi coletada, secada em estufa a 100 °C por 1 h e guardada em frasco âmbar para posterior caracterização.

ii) Esterificação - Catalise enzimática

As reações de esterificação por catálise enzimática foram realizadas a 40 °C sob agitação constante de 300 rpm durante 60 min, segundo o método proposto por Pinyaphong *et al.* (2011) com algumas modificações⁸³. O sistema reacional foi constituído por 2 g de ácido graxo, 300 µL de metanol (razão molar álcool/ácido graxo, 1:1), 600 mg de látex bruto de *Carica papaya* (20% em relação à massa de ácido graxo) e 580 µL de terc-butanol (20% em relação à massa de ácido graxo). O produto da reação foi centrifugado a $5.000 \times g$ durante 20 min. A fase superior foi coletada, seca em estufa a 100 °C por 1 h e guardada em frasco âmbar para posterior caracterização.

4.4.7 Métodos comparativos

Adicionalmente, visando a comparação de resultados foram obtidos ésteres metílicos a partir de óleo de palma bruto e óleo residual de fritura em reator de tanque agitado operando em modo batelada por três rotas diferentes (**Figura 13**):

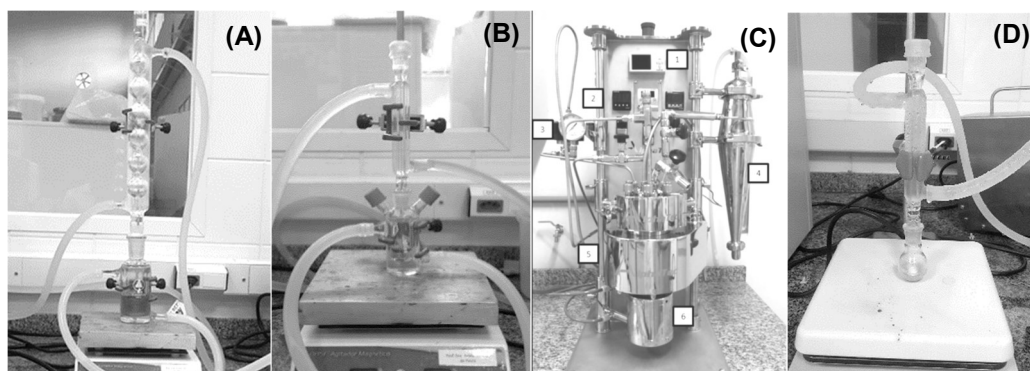


Figura 13. Sistema de reação nos métodos comparativos: (A) Transesterificação alcalina; (B) Transesterificação enzimática; (C) Hidroesterificação – Etapa 1: Hidrólise Subcrítica; (D) Hidroesterificação – Etapa 2: Esterificação enzimática. Fonte: elaborado pela autora.

a) Transesterificação - Catalise alcalina

A síntese de ésteres foi realizada de acordo com Garcia *et al.* (2006)⁸⁴. As reações foram efetuadas a 60 °C sob agitação constante de 300 rpm durante 60 min. O sistema reacional foi constituído por 20 g de óleo, 5,7 mL de metanol (razão molar álcool/óleo, 6:1) e 0,2 g de hidróxido de potássio (1% em relação à massa de óleo). Em seguida, o produto foi centrifugado a 5.000 × g por 20 min e fase superior foi submetida a um processo de lavagem que compreendeu três etapas. Na primeira etapa, os ésteres foram lavados com 20 mL de ácido clorídrico 5% m/m, na segunda com 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio e na terceira, com 25 mL água destilada. Em cada etapa a fase aquosa foi removida após da separação de fases e o procedimento foi repetido duas vezes. Após, o produto da lavagem foi centrifugado a 5.000 × g durante 20 min, seco em estufa a 100 °C por 1 h e guardado em frasco âmbar até sua caracterização.

b) Transesterificação - Catalise enzimática

A síntese de ésteres foi realizada conforme à metodologia descrita por Pinyaphong *et al.* (2011)⁸³. As reações foram efetuadas a 40 °C sob agitação constante de 300 rpm durante 24 h. O sistema reacional foi constituído por 3 g de óleo, 570 µL de metanol (razão molar álcool/óleo, 4:1), 600 mg látex bruto de *Carica papaya* (20% em relação à massa de óleo) e 770 µL de terc-butanol (20% em relação à massa de óleo). O produto da reação foi centrifugado a 5.000 × g durante 20 minutos, a fase superior foi coletada, secada em estufa a 100 °C por 1 h e guardada em frasco âmbar para posterior caracterização.

c) Hidroesterificação – Subcrítica/Enzimática

A hidrólise e esterificação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com o método descrito por dos Santos *et al.* (2016) e Pinyaphong *et al.* (2011)^{83,85}, respectivamente. As reações foram efetuadas na hidrólise em reator hidrotérmico de alta pressão e alta temperatura a 250 °C e 100 bar sob agitação constante de 700 rpm durante 120 min e na esterificação em reator de tanque agitado a 40 °C sob agitação de 300 rpm durante 60 min. O sistema reacional foi constituído na hidrólise por 20 g de óleo, 42 mL de água (razão molar água/óleo, 100:1) e na esterificação por 2 g de ácido graxo, 300 µL de metanol (razão molar álcool/ácido graxo, 1:1), 600 mg de látex bruto de *Carica papaya* (20% em relação à massa de ácido graxo) e 580 µL de terc-butanol (20% em relação à

massa de ácido graxo). O produto da reação foi centrifugado a $5.000 \times g$ durante 20 min. A fase superior foi coletada, seca em estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h e guardada em frasco âmbar para posterior caracterização.

4.4.8 Caracterização do biodiesel

Após processo produtivo reacional, os ésteres metílicos (biodieseis) obtidos das diferentes rotas foram caracterizados através da seguinte análise:

a) Teor de éster

A determinação do teor de éster total foi realizada segundo o método EN ISO 14103⁸⁶. Aproximadamente 0,1 g de amostra, 0,1 g de nonadecanoato de metila e 10 mL de tolueno foram transferidos para um vial de 20 mL. Em seguida, uma alíquota da mistura foi analisada por CG-DIC conforme as condições cromatográficas apresentadas na **Tabela 14**.

Tabela 14. Condições cromatográficas para análise de ésteres totais.

Parâmetro	Condição
Temperatura do injetor	250 °C
Programação da temperatura da coluna	Temperatura inicial: 60 °C por 2 min Rampa 1: 10 °C/min até 200 °C Rampa 2: 5 °C/min até 240 °C Temperatura final: 240 °C por 7 min
Temperatura do detector	350 °C
Gás de arraste	Hélio
Modo de injeção	Split 100:1
Velocidade linear do gás de arraste	29,6 cm/s
Fluxo do Gás de arraste	2,0 mL/min
Pressão	1001,1 kPa
Tempo total de análise	30 min
Coluna cromatográfica ZB-5HT INFERNO (30 m x 0,32 mm x 10 µm) Fase estacionária 5% fenil e 95% dimetil policiclohexanol n° 314134	

Fonte: elaborada pela autora.

A porcentagem individual de ésteres contidos na amostra de óleo foi determinada pela **Equação 13**.

$$\text{Éster (\%)} = \frac{\sum A_e - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{m_{PI}}{m_a} \times 100 \quad \text{Equação (13)}$$

sendo: $\sum A_e$ = soma da área do pico correspondente aos ésteres i ; A_{PI} = área do pico correspondente nonadecanoato de metila (19,5 min); m_{PI} = massa do nonadecanoato de metila, em mg; m_a = massa de amostra, em mg.

4.4.9 *Análise estatística*

Os dados brutos foram processados e as medidas de tendência central foram determinadas utilizando o software Microsoft Office Home e Student Excel 2010 (Licença: X16-53284-01). Além disso, a análise estatística dos resultados obtidos na caracterização do biocatalisador e na hidrólise das matérias-primas foram realizadas, com um nível confiança do 95%:

a) Biocatalisador

A avaliação da normalidade (Teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Teste Leneve), assim como a análise de variância (ANOVA) e a comparação de medias (Teste Tukey) foram realizadas empregando o software de livre distribuição R Project - versão 3.5.2 (<https://www.r-project.org>).

b) Planejamento fatorial – Reações de hidrólise

Em quanto ao planejamento, uma vez selecionados os valores dos níveis, a matriz do delineamento experimental foi gerada usando o software Statistica – versão 10 (StatSoft Inc., licença: STA999K347150W) (**Tabela 15**). As primeiras colunas de dados fornecem a ordem padrão e aleatório dos experimentos, respectivamente; as próximas três colunas fornecem os níveis codificados e as três seguintes os níveis em escala natural. Quatro experimentos foram conduzidos no nível do ponto central, codificado como “0”, para a estimativa do erro experimental e seis experimentos nos pontos axiais, codificado como “ $\pm 1,68$ ” para a avaliação de um modelo de segunda ordem.

A significância estatística dos efeitos dos fatores e da interação sobre a resposta, bem como o ajuste dos modelos matemáticos e análise de variância da reação de hidrólise das duas matérias-primas também foram realizados usando o software Statistica.

Tabela 15. Matriz do delineamento experimental para a hidrólise das matérias-primas de baixa qualidade usando o látex bruto de *Carica papaya* (P₃) como catalisador^a.

Ordem padrão	Ordem aleatório	Variáveis independentes					
		Codificadas			Não codificadas ^b		
		X ₁	X ₂	X ₃	RM (m/m)	Tp (mol/L)	C (% m/m)
1	12	-1	-1	-1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,05	6 (30 U/g)
2	16	1	-1	-1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,05	6 (30 U/g)
3	11	-1	1	-1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,15	6 (30 U/g)
4	14	1	1	-1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,15	6 (30 U/g)
5	1	-1	-1	1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,05	22 (110 U/g)
6	18	1	-1	1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,05	22 (110 U/g)
7	4	-1	1	1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,15	22 (110 U/g)
8	13	1	1	1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,15	22 (110 U/g)
9	9	-1,68	0	0	0,02 = 0,1 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)
10	10	1,68	0	0	1,00 = 5,0 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)
11	8	0	-1,68	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,02	14 (70 U/g)
12	6	0	1,68	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,18	14 (70 U/g)
13	7	0	0	-1,68	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	0,5 (3 U/g)
14	2	0	0	1,68	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	27,5 (137 U/g)
15	5	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)
16	15	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)
17	17	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)
18	3	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)

^a As reações foram realizadas a 35°C e pH 8,5 (Tris-HCl) durante 24 horas.

^b RM = razão mássica água/óleo; Tp = concentração do tampão; C = carga enzimática.

Fonte: elaborada pela autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi detalhado na metodologia, o desenvolvimento deste estudo dividiu-se em quatro etapas consecutivas: (i) recebimento e caracterização das matérias-primas; (ii) obtenção, escolha e caracterização do biocatalisador; (iii) produção de ésteres metílicos através da hidroesterificação das matérias-primas avaliadas; (iv) produção de ésteres metílicos através de outros métodos comparativos.

5.1 Recebimento e caracterização das matérias-primas

Na primeira etapa, as matérias-primas de baixa qualidade, ou seja, o óleo de palma bruto e o óleo residual de fritura oriundo de atividades domésticas foram recebidas, ambos óleos apresentaram consistência e cor diferente (**Figura 14**).

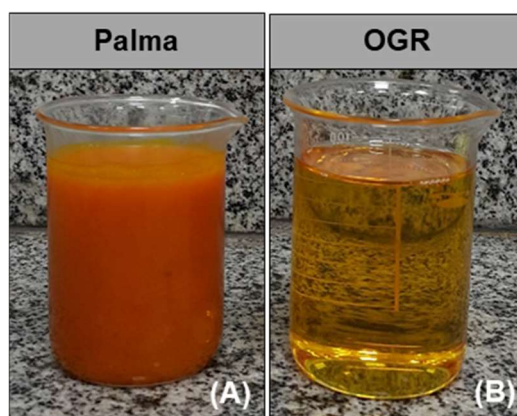


Figura 14. Matérias-primas de baixa qualidade. (A) Óleo de palma bruto, fornecido pela empresa Agropalma. (B) Óleo residual oriundo de atividades domésticas, fornecido pelo IFSP (Campus Matão).

No caso do óleo de palma bruto, a cor laranja-vermelhada e a consistência semissólida são atribuídas a quantidades elevadas de carotenóides (especialmente α - e β -carotenos) e ácidos graxos saturados (principalmente ácido palmítico), respectivamente^{24,87,88}. De acordo com a literatura, o óleo de palma bruto contém de 500 a 700 mg/kg de carotenóides e cerca de 50% de ácidos graxos saturados^{87,89}. Valores superiores quando comparado com óleos usualmente empregados no processo de fritura como a soja, que contém de 20 a 50 mg/kg de carotenoides e cerca de 15% de ácidos graxos saturados^{2,90,91}.

No caso do óleo residual, a coloração mais escura (amarela-laranjada) quando comparado com óleos refinados é um indicativo do grau de degradação dele, pois o uso

repetido destes óleos em fritura por imersão originam reações complexas indesejáveis, as quais produzem peróxidos que por sua vez se descompõem em produtos secundários responsáveis pela variação da coloração⁹².

Após do recebimento, a qualidade das matérias-primas foi avaliada através das análises de perfil composicional, teor de ácidos graxos, índice de acidez, índice de peróxido e teor de água. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.1.1 Perfil composicional

A **Tabela 16** mostra os perfis composicionais das matérias-primas, os quais foram determinados por cromatografia gasosa. Encontrou-se que o ácido palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) constituem 83,8% da composição do óleo de palma. De modo similar, o ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) constituem 86,0% da composição do óleo residual.

Tabela 16. Perfil composicional das matérias-primas.

Ácidos graxos	MM (g/mol)	Teor em porcentagem (% m/m)	
		Palma	OGR
Ácido láurico (C12:0)	200,32	0,2	ND
Ácido mirístico (C14:0)	228,38	0,7	0,2
Ácido palmítico (C16:0)	256,43	40,6	12,4
Ácido esteárico (C18:0)	284,48	4,4	4,4
Ácido oleico (C18:1)	282,47	43,3	26,4
Ácido linoleico (C18:2)	280,45	9,7	47,1
Ácido linolênico (C18:3)	278,44	0,2	4,3
Outros		0,8	5,1
Massa molar média (g/mol)		268,7	270,1
Massa molar do triglicerídeo (g/mol)		847,3	851,2

ND = não detectado. Fonte: elaborado pela autora.

A partir do perfil composicional, foi possível realizar uma comparação com perfis de diferentes óleos relatados em outros trabalhos (ver **Tabela 1**). Nota-se que a composição em ácidos graxos do óleo de palma obtida concordou com a literatura, pois a porcentagem de ácido palmítico pode variar de 35 a 48% e de ácido oleico de 36 a 44%⁹⁴. Em relação ao óleo residual, foram encontradas semelhanças no perfil com óleo de soja, onde a porcentagem de ácido palmítico é cerca de 6 a 10%, de ácido oleico de 20 a 30% e de ácido linoleico de 50 a 60%⁹⁴. Esses resultados sugerem que o óleo

residual avaliado é composto principalmente por óleo de soja, o que é muito provável, já ele é um dos óleos mais produzidos no Brasil⁹³.

Adicionalmente, foi possível calcular a massa molar média dos ácidos graxos (MMM) e a massa molar do triglicerídeo (MTAG) nas matérias-primas. Os resultados revelaram que apesar de sua composição química diferenciada as massas molares foram semelhantes entre o óleo de palma bruto (MMM = 268,75 g/mol e MTAG = 847,26 g/mol) e o óleo residual (MMM = 270,06 g/mol e MTAG = 851,19 g/mol).

Por outro lado, a **Figura 15** exibe o teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, correspondentes às matérias-primas. Os resultados demonstram que a consistência semissólida do óleo de palma é devida ao seu elevado teor de ácidos graxos saturados (47%) em comparação com o óleo residual (18%), pois matérias-primas com teores superiores a 50% são sólidas a temperatura ambiente⁸⁸.

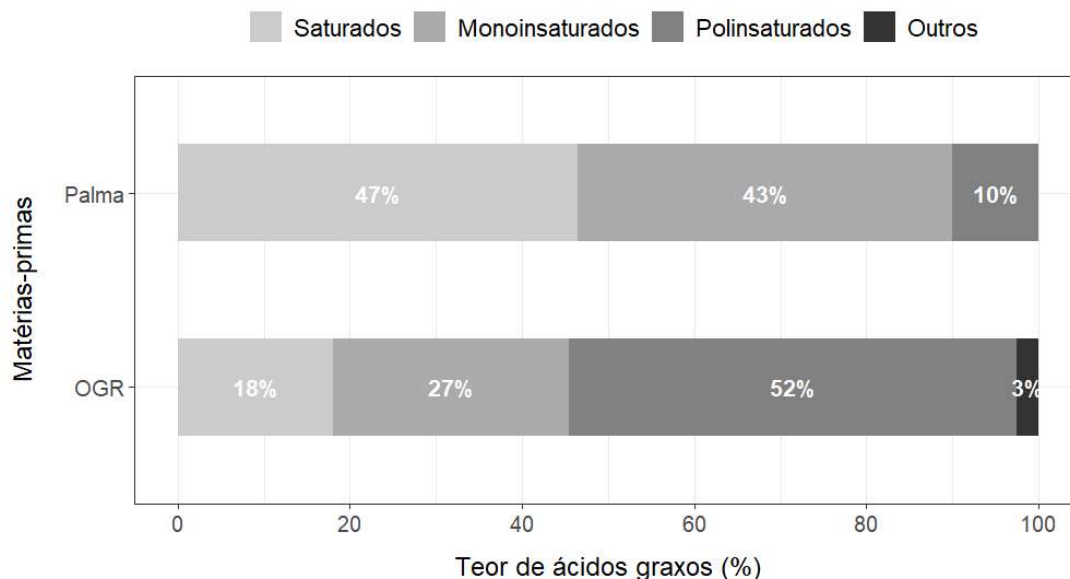


Figura 15. Teor de ácidos graxos saturados e insaturados nas matérias-primas. Fonte: elaborado pela autora.

Ademais, presume-se que o óleo de palma, com menor teor de ácidos graxos insaturados (10%) que o óleo residual (52%), apresenta maior estabilidade à oxidação que o óleo residual. Isso porque matérias-primas com elevados teores de ácidos graxos polinsaturados tem menor resistência à oxidação¹⁴.

5.1.2 Teor de ácidos graxos e índice de acidez

A quantidade máxima de ácidos graxos livres aceitáveis num sistema homogêneo alcalino é inferior a 2,5% m/m. Matérias-primas com teores de ácidos graxos por acima desse valor precisam de tratamento antes do processo de transesterificação, pois quanto maior seja a acidez do óleo, menor é a eficiência de conversão⁴. Os resultados obtidos na determinação do teor de ácidos graxos livres e índice de acidez nas matérias-primas são observados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Teor de ácidos graxos livres e índice de acidez nas matérias-primas

Matéria-prima	Ácidos graxos livres (% m/m)	Índice de Acidez (mg NaOH/g)
Palma	6,1 ± 0,04	12,1 ± 0,09
OGR	1,2 ± 0,03	2,4 ± 0,06

Os dados são expressos como média ± IC (n = 3, α = 0,05). Fonte: elaborada pela autora.

Como esperado, o teor de ácidos graxos no óleo de palma ficou dentro da faixa reportada na literatura, que se encontra entre 2,3 a 6,7% m/m⁹⁵. No entanto, a produção de biodiesel pela rota convencional não é viável, dado que valores elevados de ácidos graxos livres (> 2,5% m/m) promovem a inativação do catalisador e a formação de reações indesejáveis como a saponificação^{3,96}. Estes resultados sugerem que o óleo foi obtido de frutos danificados e submetidos a uma forte ação hidrolítica, visto que alguns estudos relatam a presença de uma lipase endógena em frutos de dendezeiros que causa aumento nos níveis de ácidos graxos livres no óleo de palma bruto^{95,97,98}. Em relação ao óleo residual, ele exibiu um teor abaixo do critério requerido para a reação de transesterificação (< 5,0 mg NaOH/g), mas acima do critério permitido para óleos refinados (≤ 0,6 mg NaOH/g)^{4,101}. Estes resultados revelam que a produção de biodiesel por transesterificação alcalina é um processo viável nesta matéria-prima. Além disso, que o alto teor encontrado neste óleo quando comparado com óleos refinados foi produto da hidrólise do óleo pela exposição à água procedente dos alimentos e às elevadas temperaturas durante o processo de fritura⁹⁹.

5.1.3 Índice de peróxido

O índice de peróxido é um indicador do grau de oxidação da matéria-prima. Verificou-se na **Tabela 18** que ambas matérias-primas exibiram valores acima do limite permitido em óleo refinados (< 10 meq-g/kg)¹⁰¹.

Tabela 18. Índice de peróxido nas matérias-primas

Matéria-prima	Índice de peróxido (meq-g/kg)
Palma	17,1 ± 1,46
OGR	36,0 ± 1,28

Os dados são expressos como média ± IC (n = 3, α = 0,05).

Fonte: elaborada pela autora.

O elevado índice de peróxido no óleo de palma sugere que o óleo levava um longo tempo armazenado; alguns estudos relataram que o índice de peróxido aumenta de forma quase linear com o aumento do tempo de armazenamento¹⁰⁰. Com relação ao óleo residual, o elevado índice deve-se à presença de compostos oxidados produto da oxidação do óleo durante o processo de fritura²⁸.

5.1.4 Teor de água

No caso do teor de água, ambas matérias-primas exibiram um teor superior a 0,5% m/m (**Tabela 19**). A presença de água no óleo de palma favorece a ação hidrolítica, gerando assim ácidos graxos livres¹⁰². Enquanto ao óleo residual, o elevado teor corresponde à exposição do óleo à água dos alimentos durante o processo de fritura¹⁰³.

Tabela 19. Teor de água nas matérias-primas

Matéria-prima	Teor de água (% m/m)
Palma	1,5 ± 0,02
OGR	2,1 ± 0,01

Os dados são expressos como média ± IC (n = 3, α = 0,05).

Fonte: elaborada pela autora.

Desta forma, os dados confirmam que os óleos usados neste estudo são matérias-primas de baixa qualidade e sua implementação no procedimento convencional, ou seja, a reação de transesterificação por catálise alcalina não é aconselhável pelo menos para o óleo de palma. Assim, a hidroesterificação é a rota mais adequada para produção de biodiesel a partir destas matérias-primas.

Além da avaliação da qualidade, foram realizadas análises do teor de glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos) e da composição de ácidos graxos na posição sn-2 do triglicerídeo nas matérias-primas. Os resultados são apresentados a seguir.

5.1.5 Composição de ácidos graxos na posição sn-2 das matérias-primas

De acordo com a literatura, a lipase de *Carica papaya* apresenta regiosseletividade 1,3-específica, ou seja, apenas pode hidrolisar os ésteres primários do triglicerídeo. Este tipo de enzima, na reação de hidrólise, libera ácidos graxos na posição sn-1 e sn-3 para gerar monoglicerídeos com ácidos graxos na posição sn-2 do glicerol. Estes monoglicerídeos são emulsificantes que tem um valor agregado maior do que a glicerina e são amplamente usados na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos^{60,73}.

Visando conhecer os ácidos graxos da posição sn-2 nas matérias-primas, foi realizada uma hidrólise com a enzima 1,3-específica de pâncreas de porco. A composição em ácidos graxos na posição sn-2 do triglicerídeo para cada matéria-prima se observa na **Tabela 20**.

Tabela 20. Composição de ácidos graxos na posição Sn-2 das matérias-primas.

Ácidos graxos	Teor em porcentagem (% m/m)	
	Palma	OGR
Ácido palmítico (C16:0)	24,5	14,6
Ácido esteárico (C18:0)	3,8	4,8
Ácido oleico (C18:1)	63,0	57,0
Ácido linoleico (C18:2)	8,7	23,5

Fonte: elaborada pela autora.

O óleo de palma apresentou uma composição maioritária de ácido oleico (63,0%) e palmítico (24,5%) na posição sn-2 do glicerol, constituindo cerca do 87,5% da composição total. Para o óleo residual, o ácido oleico (57,0%) e linoleico (23,5), constituíram 80% da composição total.

Estes resultados referem que os monoglicerídeos obtidos na hidrólise das matérias-primas com a lipase de *Carica papaya* deveria ser maiormente monoglicerídeos com ácido oleico e palmítico na posição sn-2 para o óleo de palma e com ácido oleico e linoleico para o óleo residual. Esses monoglicerídeos em particular são coprodutos com alto valor agregado com aplicações industriais que incluem emulsificação de alimentos, cosméticos e preparações de fármacos⁶¹.

5.1.6 Teor de mono-, di- e triglicerídeos

A **Figura 16** mostra os resultados obtidos na análise do teor de mono-, di- e triglicerídeos nas matérias-primas. Observa-se que óleo de palma evidenciou uma porcentagem menor de triglicerídeos (54%) e maior de diglicerídeos (35%) em comparação com o óleo residual que foi de 86% e 9%, respectivamente.

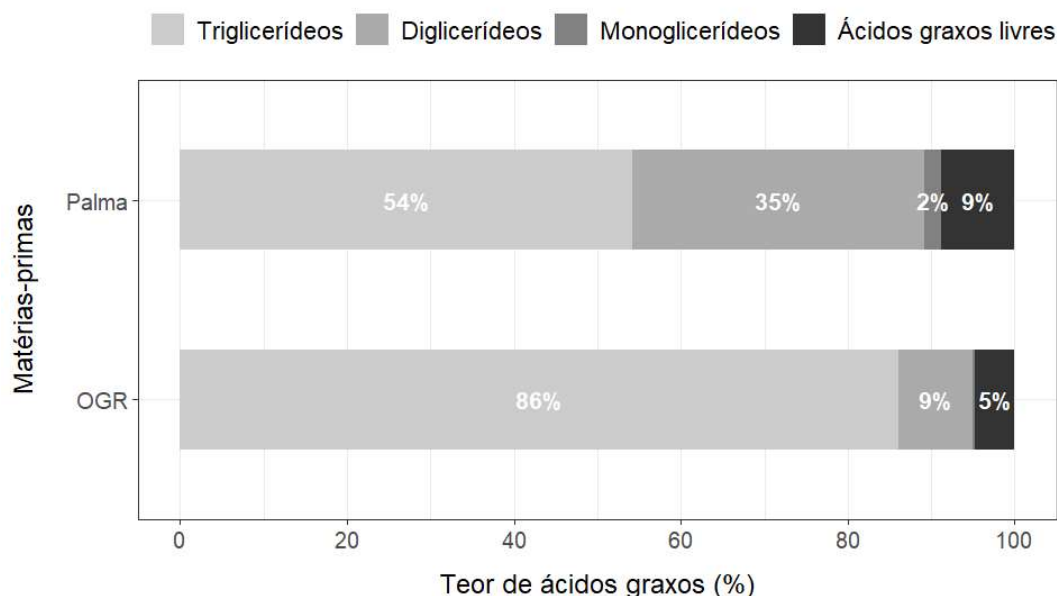


Figura 16. Teor de mono-, di- e triglicerídeos nas matérias-primas. Fonte: elaborada pela autora.

Estes resultados sugerem que a hidrólise no óleo palma pela ação hidrolítica das enzimas foi incompleta, ou seja, aproximadamente 35% dos triglicerídeos presentes no óleo foram hidrolisados gerando apenas ácido graxos e diglicerídeos. Em quanto ao óleo residual, o leve aumento do teor de diglicerídeos (9%) em comparação com os óleos refinados indica que chegou a ocorrer a hidrólise no óleo, mas a reação não aconteceu por muito tempo.

5.2 Obtenção, escolha e caracterização do biocatalisador

Na segunda etapa, três biocatalisadores foram obtidos a partir do látex fresco de *Carica papaya* extraído de cultivos localizados no município de Juan de Acosta – Atlântico, Colômbia. O primeiro biocatalisador, chamado P₃, foi obtido pela secagem do látex fresco; enquanto aos outros dois biocatalisadores, pCPL-p e pCPL-e, foram obtidos pela purificação parcial do P₃.

Observa-se na **Figura 17**, que cada um deles apresentou uma aparência e tamanho de partícula diferente. P_3 , exibiu uma coloração branca com um tamanho de partícula próxima a 250 μm e densidade mais alta. As demais frações, pCPL-p e pCPL-e, exibiram uma coloração esverdeada com um tamanho de partícula próxima a 425 μm e densidade mais baixa.

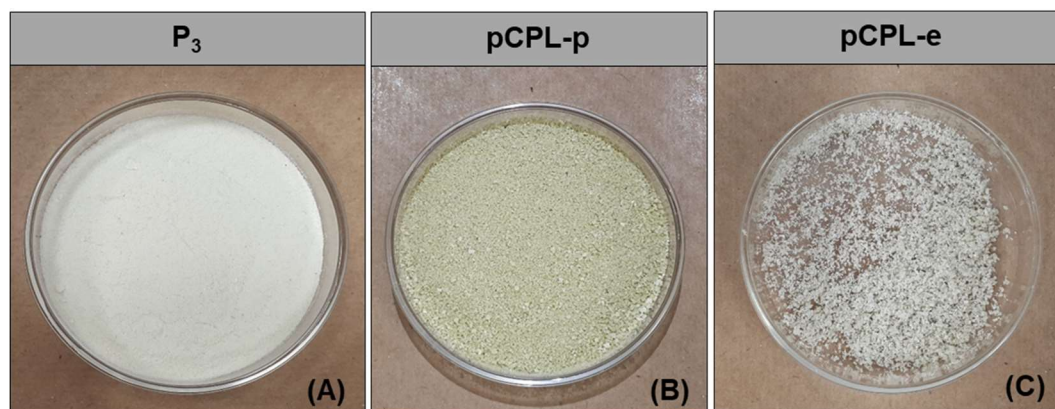


Figura 17. Biocatalisadores obtidos a partir do látex fresco de *Carica papaya*: (A) látex bruto; (B) primeira fração parcialmente purificada, livre de proteases; (C) segunda fração parcialmente purificada, livre de proteases e estereases. Fonte: elaborada pela autora.

Após da obtenção dos biocatalisadores, estes foram avaliados em relação a seu rendimento e atividade hidrolítica (**Figura 18**).

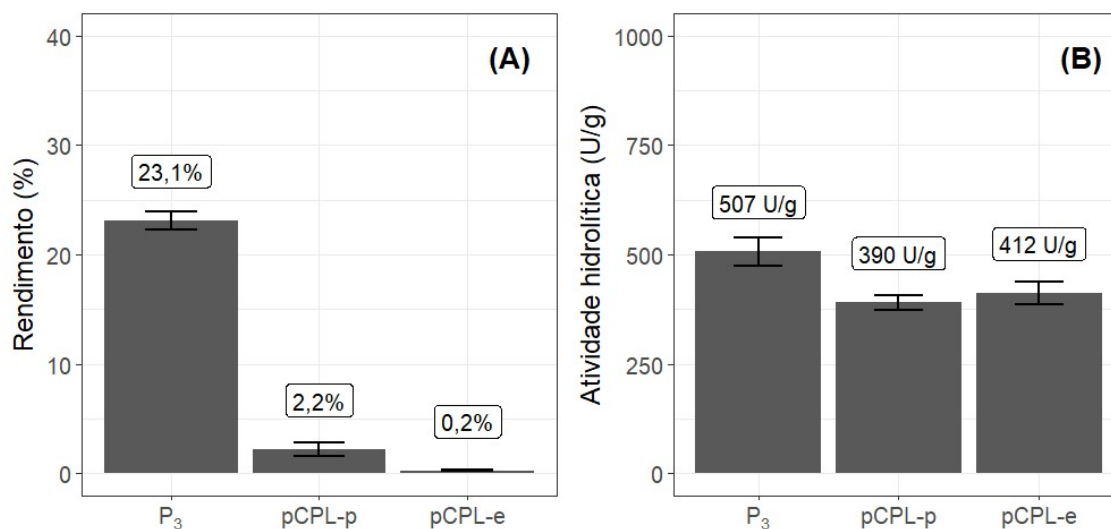


Figura 18. Avaliação dos biocatalisadores obtidos: (A) Rendimento; (B) Atividade hidrolítica. P_3 = látex bruto; pCPL-p = fração livre de proteases; pCPL-e = fração livre de proteases e estereases. O rendimento foi obtido com respeito à massa inicial de látex fresco extraído e a atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão Tris-HCl 0,1 mol/L durante 5 min a pH 8,5 e 37 °C. Os dados representam a média $\pm$ IC ($\alpha = 0,05$). Fonte: elaborada pela autora.

O látex bruto de mamão apresentou um rendimento e atividade (23%; 507 U/g) maior em comparação com a fração parcialmente purificada livre de proteases (2,2%; 390 U/g) e a fração parcialmente purificada livre de proteases e esterases (0,2%; 412 U/g). Estes resultados denotam que o estresse do congelamento e desidratação do látex durante o processo de liofilização nas etapas de purificação pode ter provocado mudanças conformacionais irreversíveis no complexo lipolítico, que levaram à desnaturação das proteínas e consequentemente causou a perda de atividade catalítica¹⁰⁴.

Assim, P₃ foi selecionada para o desenvolvimento das seguintes etapas deste estudo, as quais incluíram a avaliação da influência do pH, temperatura, concentração do tampão, tempo de incubação, concentração de substrato e tipo de substrato sobre a atividade hidrolítica, bem como a catálise das reações de hidrólise e esterificação do óleo de palma bruto e o óleo residual.

5.2.1 Efeito do pH na atividade do látex bruto de *Carica papaya* (P₃)

Na **Figura 19** são visualizados os resultados obtidos na dosagem da atividade hidrolítica do látex bruto de mamão em função do pH, onde as maiores atividades obtidas foram de $512,1 \pm 8,0$ U/g no pH 6 (tampão fosfato) e de $506,6 \pm 10,5$ U/g no pH 8,5 (tampão Tris-HCl).

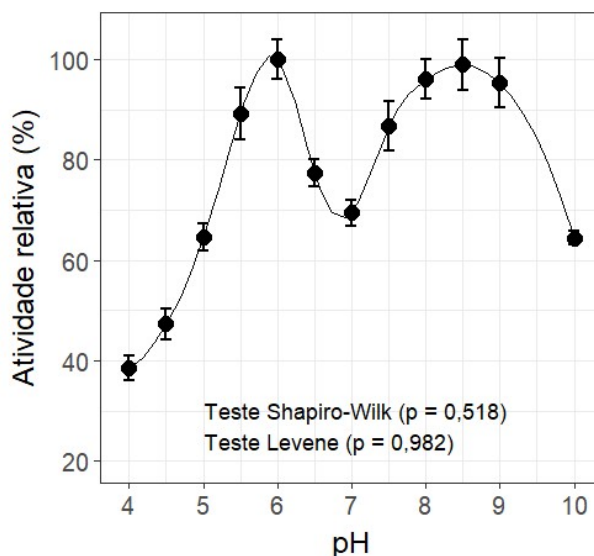


Figura 19. Efeito do pH na atividade hidrolítica do látex bruto de *Carica papaya* (P₃). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão 0,1 mol/L durante 5 minutos a 37 °C. $A_{max} = 512$ U/g. Os dados representam a média $\pm$ IC ($\alpha = 0,05$; $n = 3$). Fonte: elaborada pela autora.

Como esperado, o látex bruto de mamão apresentou uma variação significativa da atividade hidrolítica dependendo do tampão empregado (**Tabela 21**). Isso porque, o sítio ativo das enzimas geralmente possui resíduos de aminoácidos particularmente sensíveis à ação do pH. As variações do pH no meio reacional podem alterar o estado de ionização desses grupos, modificando como consequência sua conformação e provocando a variação da atividade hidrolítica^{105,106}.

Tabela 21. ANOVA - Efeito do pH na atividade hidrolítica do P₃.

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
pH	11	14021	1274,7	551,8	$< 2 \times 10^{-16}$
Resíduos	24	55	2,3	-	-
Total	35	14076	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

O teste de Tukey revelou que a atividade hidrolítica do látex no pH 6 e na faixa de pH de 8 a 9 não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Por esse motivo, os dois valores de pH ótimos obtidos, ou seja, pH 6 e 8,5 foram usados na avaliação do efeito da temperatura e da concentração do tampão. Na literatura, os trabalhos apenas relatam como pH ótimo a faixa alcalina encontrada entre o pH 8 e 9^{49,70,107}. Presume-se que essas diferenças podem estar relacionadas com a presença de outras enzimas hidrolíticas, as quais podem ser provenientes da região, das condições ambientais de cultivo e da parte de extração do látex. Estudos anteriores relataram que a composição e a atividade hidrolítica do látex pode mudar dependendo do local de cultivo do mamão⁶⁸.

5.2.2 Efeito da temperatura na atividade do látex bruto de *Carica papaya* (P₃)

Na **Figura 20** são apresentados os resultados obtidos na dosagem da atividade hidrolítica do látex bruto de mamão em função da temperatura a pH 6 e 8,5. Nota-se que, independentemente do pH, a temperatura na faixa estudada de 30 a 60 °C não teve um efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a atividade hidrolítica do látex bruto (**Tabela 22**). Estes resultados diferem do reportado na literatura, pois alguns autores reportaram uma maior atividade hidrolítica a 55 °C^{70,108,109}. Esta diferença pode ser proveniente do tempo de dosagem da atividade que foi de 5 min ou da composição enzimática do látex.

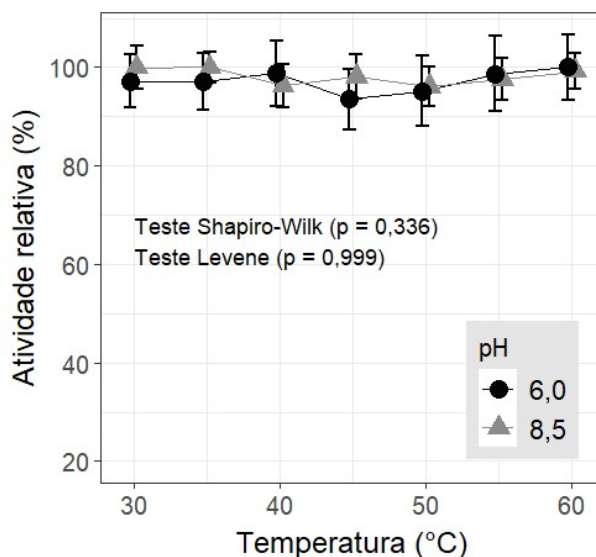


Figura 20. Efeito da temperatura na atividade hidrolítica do látex bruto de *Carica papaya* (P_3). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão 0,1 mol/L durante 5 minutos a pH 6 e 8,5. Os dados representam a média $\pm$ IC ($\alpha = 0,05$; $n = 3$). $A_{\max} = 512$ U/g. Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 22. ANOVA - Efeito da temperatura na atividade hidrolítica do P_3 .

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Temperatura	6	78,3	13,0	2,27	0,059
pH	1	10,3	10,3	1,79	0,189
Resíduos	34	195,3	5,7	-	-
Total	41	283,9	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

5.2.3 Efeito da concentração do tampão na atividade do látex bruto de *Carica papaya* (P_3)

Na **Figura 21** são exibidos os resultados obtidos na dosagem da atividade hidrolítica do látex bruto de mamão em função da concentração do tampão a pH 6 e 8,5. Observa-se que os perfis de atividade de cada pH foram contrários, ou seja, na medida que a concentração do tampão aumentou a atividade foi maior a pH 6 e menor a pH 8,5. Estes resultados indicam que a conformação de pelo menos uma das lipases presentes no látex em meio ácido é mais estável quando diminui a interação da água com os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio catalítico; por outro lado, em meio básico, é mais estável quando aumenta a interação da água com os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio catalítico¹¹⁰.

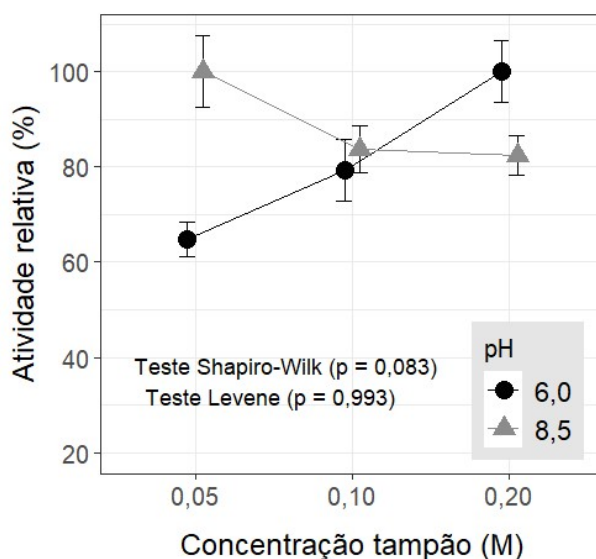


Figura 21. Efeito da concentração do tampão na atividade hidrolítica do látex bruto de *Carica papaya* (P_3). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão a pH 6 e 8,5 durante 5 minutos a 37 °C. Os dados representam a média $\pm$ IC ($\alpha = 0,05$; $n = 3$). $A_{\max} = 585,17$ U/g. Fonte: elaborada pela autora.

A análise de variância destes resultados (**Tabela 23**), evidenciou um efeito significativo na concentração do tampão, o pH e a interação deles sobre a atividade da enzima ($p < 0,05$). Com relação ao teste de Tukey, verificou-se que não existem diferenças significativas na atividade hidrolítica do látex em ambos pH quando a concentração do tampão é 0,1 mol/L ($p > 0,05$). Por esse motivo, essa concentração foi usada na avaliação da estabilidade do pH e da temperatura.

Tabela 23. ANOVA - Efeito da concentração do tampão na atividade hidrolítica do P_3 .

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Concentração do tampão	2	343,2	171,6	32,38	$1,46 \times 10^{-5}$
pH	1	241,2	241,2	45,51	$2,06 \times 10^{-5}$
Interação	2	2120,4	1060,2	200,03	$6,10 \times 10^{-10}$
Resíduos	12	63,6	5,3	-	-
Total	17	2768,4	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

5.2.4 Efeito do tempo de incubação na atividade do látex bruto de *Carica papaya* (P_3) para avaliação da estabilidade do pH

Na **Figura 22** são apresentados os resultados obtidos na dosagem da atividade hidrolítica do látex bruto de mamão em função do tempo de incubação a pH 6,0 e 8,5. Identificou-se que em ambos pH mais de 62% da atividade inicial do látex bruto foi mantida após de 120 min de incubação.

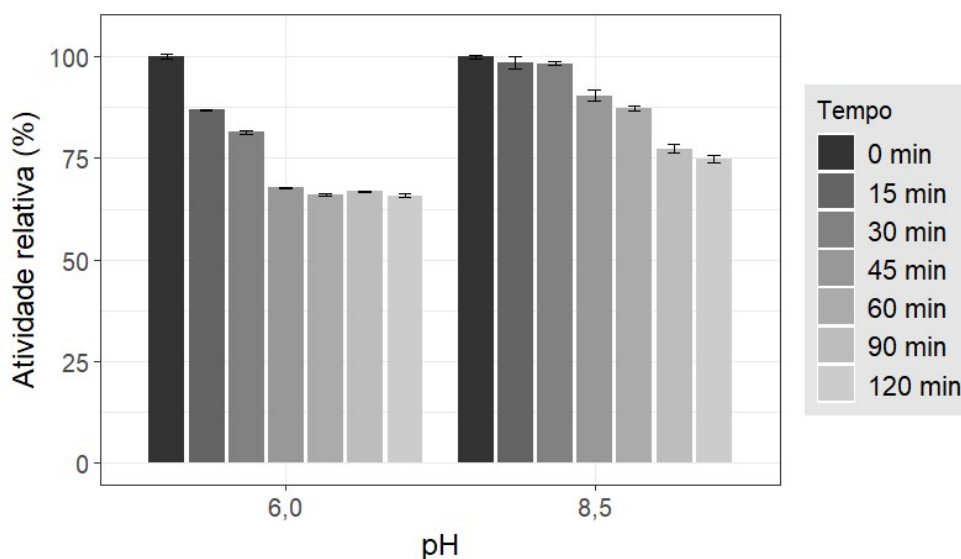


Figura 22. Estabilidade do pH a 30°C do látex bruto de *Carica papaya* (P₃). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão 0,1 mol/L a pH 6,0 e 8,5 durante 5 minutos a 37 °C. Os dados representam a média ± DP. A_{max} = 537,65 U/g. Fonte: elaborada pela autora.

Análise de variância destes dados (**Tabela 23**), evidenciou um efeito significativo do pH, do tempo de incubação e da interação deles sobre a atividade hidrolítica do látex bruto de mamão ($p < 0,05$).

Tabela 24. ANOVA - Estabilidade do pH a 30°C do P₃

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
pH	1	1815	1815,0	1095,1	$< 2 \times 10^{-16}$
Tempo	6	4588	764,7	461,4	$< 2 \times 10^{-16}$
Interação	6	551	91,8	55,4	$3,02 \times 10^{-14}$
Resíduos	28	46	1,7	-	-
Total	41	7000	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

Na **Figura 23** observa-se uma representação mais clara dos resultados obtidos, pois o padrão de variação dos dados pode-se visualizar melhor ao graficar diagramas de caixa (Box plot). Neste gráfico descobriu-se que a atividade hidrolítica foi maior a pH 8,5 em todos os tempos de incubação, indicando que neste pH o complexo lipolítico presente no látex de mamão é mais estável. Devido a isto, o pH 8,5 foi usado na avaliação da estabilidade térmica.

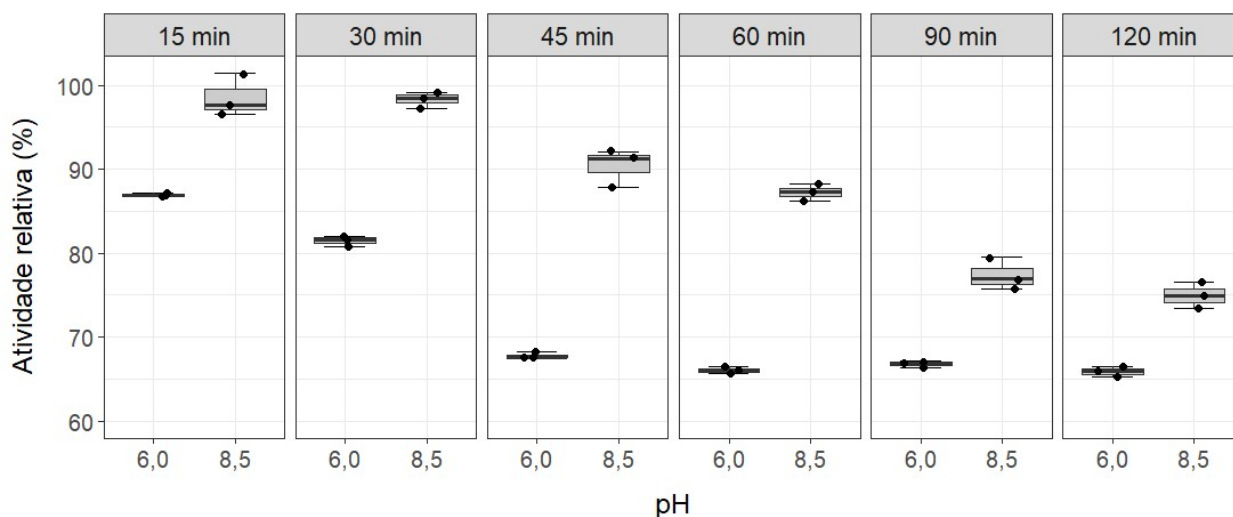


Figura 23. Box plot da estabilidade do pH a 30 °C do látex bruto de *Carica papaya* (P_3). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão 0,1 mol/L a pH 6,0 e 8,5 durante 5 minutos a 37 °C. $A_{\max} = 537,65$ U/g. Fonte: elaborada pela autora.

5.2.5 Efeito do tempo de incubação na atividade do látex bruto de *Carica papaya* (P_3) para avaliação da estabilidade térmica

Na **Figura 24** são exibidos os resultados obtidos na dosagem da atividade hidrolítica do látex bruto de mamão em função do tempo de incubação a diferentes temperaturas. Verificou-se que mais de 70% da atividade inicial foi mantida depois de 24 h e mais de 60% depois de 48 h de incubação a 30 °C.

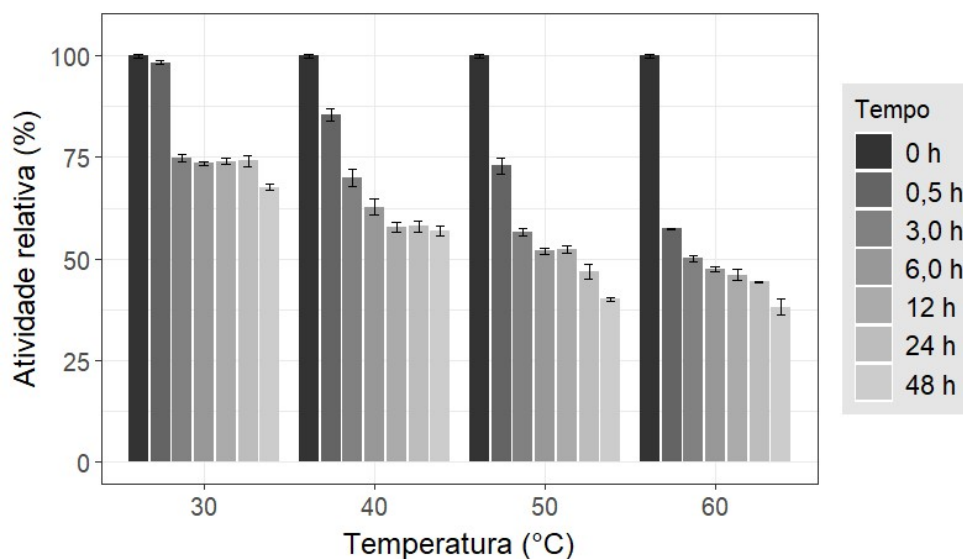


Figura 24. Estabilidade térmica a pH 8,5 do látex bruto de *Carica papaya* (P_3). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão 0,1 mol/L a pH 8,5 durante 5 minutos a 37 °C. Os dados representam a média $\pm$ DP. $A_{\max} = 397,49$ U/g. Fonte: elaborada pela autora.

Estudos anteriores observaram uma estabilidade térmica menor em comparação com os resultados obtidos, pois Rivera *et al.* (2014)¹⁰⁷ relatou que após de 1 h de incubação a 50 °C e pH 9,0 a atividade residual foi cerca do 40% da atividade inicial com um tempo de meia vida de 15 min. Em contraste, foi achado que após de 3 horas de incubação a 50 °C e pH 8,5 cerca do 57% da atividade residual foi mantida com um tempo de meia vida de 6 horas. A análise de variância destes resultados (**Tabela 25**), evidenciou um efeito significativo da temperatura, do tempo de incubação e da interação deles sobre a atividade hidrolítica do látex bruto de mamão ($p < 0,05$).

Tabela 25. ANOVA - Estabilidade térmica a pH 8,5 do P₃

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Temperatura	3	8027	2676	669,7	$< 2 \times 10^{-16}$
Tempo	6	21356	3559	890,9	$< 2 \times 10^{-16}$
Interação	18	1848	103	25,7	$< 2 \times 10^{-16}$
Resíduos	56	224	4	-	-
Total	83	31455	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

Visto que as hidrólises enzimáticas são levadas até 24 e 48 h de reação, a **Figura 25** mostra os dados obtidos nesses tempos de incubação. Comprovou-se que a elevação da temperatura de 30 a 60 °C e do tempo de exposição de 24 a 48 h promove a desnaturação do complexo lipolítico, com perda da atividade.

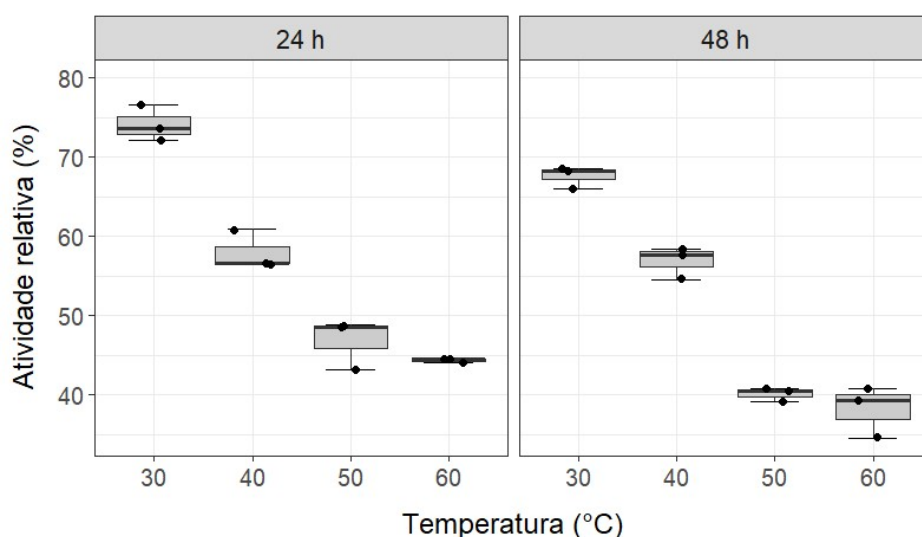


Figura 25. Box plot da estabilidade térmica a pH 8,5 do látex bruto de *Carica papaya* (P₃). A atividade foi medida pela hidrólise do azeite de oliva com tampão 0,1 mol/L a 8,5 durante 5 minutos a 37 °C. $A_{\text{max}} = 397,49$ U/g. Fonte: elaborada pela autora.

Além disso, corroborou-se que a temperatura de 30 °C é significativamente mais estável em comparação com as outras temperaturas, pois manteve maior atividade depois de 24 e 48 h de incubação.

5.2.6 Efeito da concentração e tipo de substrato na atividade do látex bruto de *Carica papaya* (P_3) para avaliação de parâmetros cinéticos (K_m/V_{max})

A cinética de Michaelis-Menten descreve a velocidade de muitas reações enzimáticas. Para estudar esta cinética é necessário avaliar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação, mantendo a quantidade de enzima constante. Na **Figura 26** são apresentados os gráficos de velocidade inicial (V_0) versus concentração de substrato para o azeite de oliva, o óleo de palma e residual.

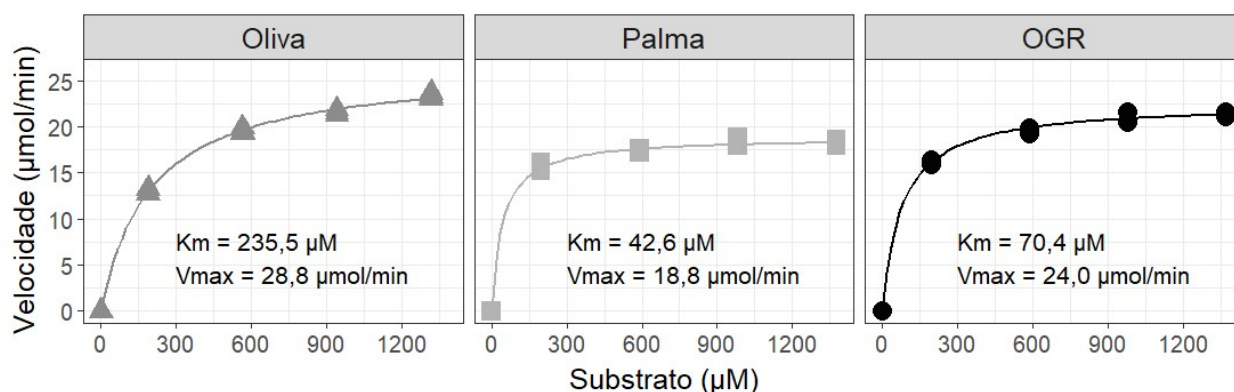


Figura 26. Curva de saturação do látex bruto de *Carica papaya* usando diferentes substratos. A atividade foi medida pela hidrólise do substrato com tampão pH 8,5 e 0,1 mol/L a 35 °C durante 5 minutos. Fonte: elaborada pela autora.

Comprova-se que as três curvas de saturação seguem o modelo de Michaelis-Menten, pois a baixas concentrações de substratos ($< 400 \mu M$) os valores de velocidade aumentam rapidamente, ou seja, poucos sítios ativos da enzima estão ocupados pelo substrato e a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de substrato, sendo assim, uma cinética de primeira ordem. Pelo contrário, a altas concentrações de substrato ($> 400 \mu M$), a velocidade da reação não depende mais da concentração do substrato porque todos os sítios ativos estão ocupados pelo substrato, sendo assim, uma cinética de ordem zero¹⁰⁵.

Nota-se também que o óleo de palma apresentou o menor valor de K_m (42,6 μM) em comparação com o óleo residual (70,4 μM) e azeite de oliva (235,5 μM). Estes resultados corroboram a tiposeletividade que tem o látex bruto de mamão pelos ácidos

graxos de cadeias curtas, pois o valor de K_m indica a afinidade que tem a enzima pelo substrato, quanto menor seja o valor de K_m , maior é a afinidade. Neste contexto, o complexo lipolítico do látex bruto teve maior afinidade pelo óleo de palma que contém cerca de 41% de ácidos graxos com cadeias menores a 17 carbonos em comparação com os outros substratos que contém cerca de 13% de ácidos graxos com cadeias menores a 17 carbonos. Quanto ao valor de V_{max} , ele indica o número de centros ativos disponíveis na enzima, observa-se que estes valores foram semelhantes; porém, o valor aumentou na medida que a afinidade foi menor, ou seja, entre maior seja a afinidade da enzima pelo substrato menos sítios ativos estão disponíveis.

5.3 Hidroesterificação

Na terceira etapa, foi efetuada a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir da hidroesterificação do óleo de palma bruto e do óleo residual. Este processo foi subdividido em duas fases, a hidrólise e esterificação.

5.3.1 Etapa 1: Reação de hidrólise

A cinética da reação de hidrólise das matérias-primas inicialmente foi monitorada durante 48 h (**Figura 27**). Apesar da maior afinidade do biocatalisador pelo óleo de palma, o teor de ácidos graxos depois de 48 horas de reação foi menor (36,9% m/m) quando comparado com o óleo de residual (59,4% m/m).

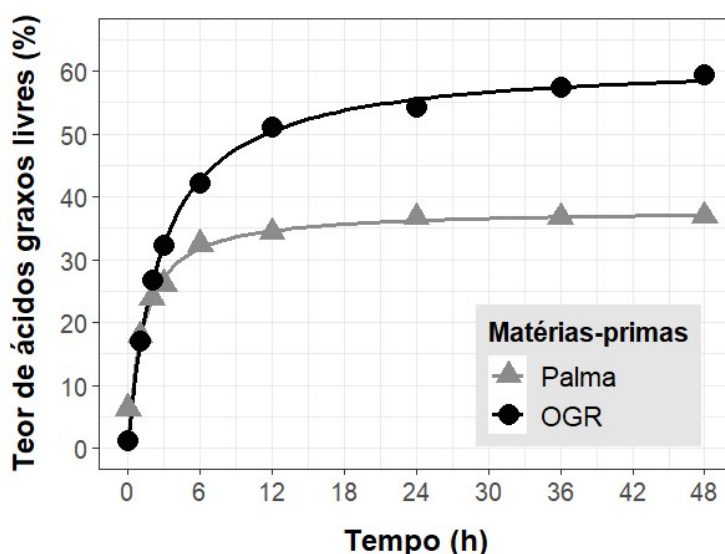


Figura 27. Perfis cinéticos na reação de hidrólise das matérias-primas. Condições de reação: $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$, Agitação = 1000 rpm, Tampão = Tris-HCl 0,18 M, biocatalisador = látex bruto de *Carica papaya* (P_3), Razão mássica tampão/óleo = 4,4 g/ 20 g e carga enzimática = 110 U/g. Fonte: elaborada pela autora.

Estes resultados revelam que o teor de diglicerídeos teve um efeito na hidrólise, pois o elevado teor no óleo de palma (DAG = 35%) em relação com o óleo residual (AGL DAG = 9%) poderia ter afetado de forma negativa a porcentagem de hidrólise. Nota-se também que a variação do teor de ácidos graxos de 24 a 48 h de reação em ambas matérias-primas não foi significativa, pois o teor no óleo de palma variou de 36,7% a 36,9% e no óleo residual de 54,2% a 59,4%. Devido a isto, o tempo de reação na hidrólise foi fixado em 24 h tanto no óleo de palma como no residual.

Posteriormente, foi realizado um planejamento completo 2^3 e amplificado para a metodologia de superfície de resposta visando a identificação das variáveis mais significativas e a obtenção das melhores condições reacionais. As variáveis como temperatura, tempo e pH foram preestabelecidas levando em consideração os dados obtidos na caracterização do biocatalisador e o monitoramento da cinética. Enquanto as variáveis e níveis estudadas no planejamento, foram definidos de acordo com o relatado na literatura.

Na hidrólise de ácidos graxos um excesso de água é requerido para deslocar o equilíbrio para os produtos, porém, quantidades elevadas de água podem gerar um efeito de diluição na reação. Segundo Pourzofaghar *et al.* (2016)⁷, melhores porcentagens de hidrólise foram observadas quando a razão mássica tampão/óleo foi de 1:1 a 1:2. Assim mesmo, a concentração do tampão e quantidades muito pequenas ou exageradas de biocatalisador podem proporcionar efeito significativo nesta reação. De acordo com a caracterização do biocatalizador escolhido (item 4.4.5) bem como os trabalhos de Pinyaphong *et al.* (2009)¹¹¹, Pinyaphong *et al.* (2011)⁸³ e Su *et al.* (2014)¹¹² os melhores rendimentos foram obtidos usando um tampão Tris-HCl (pH 8,5) na concentração de 0,05 a 0,2 mol/L e uma porcentagem de enzima de 15 a 20% m/m. Levando em consideração o anterior, a razão mássica tampão/óleo (RM), concentração de tampão (Tp) e carga enzimática (C) foram selecionadas como variável de estudo.

A **Tabela 26** apresenta a matriz do planejamento com os valores codificados das variáveis, os valores reais utilizados em cada ensaio o teor de ácidos graxos e eficiência obtidos após de 24 h de reação. As colunas X_i , onde $i = 1, 2$ e 3 correspondem aos níveis codificados ($\pm 1,68$, ± 1 e 0); enquanto, as colunas RM, Tp e C correspondem aos respectivos valores reais.

Tabela 26. Resultados obtidos no delineamento experimental para a hidrólise das matérias-primas de baixa qualidade usando o látex bruto de *Carica papaya* (P₃) como catalisador^a.

Ensaio	Variáveis independentes						Variável dependente			
	Codificadas			Não codificadas ^b			AGL (%)		Eficiência ^c (%)	
	X ₁	X ₂	X ₃	RM (m/m)	Tp (mol/L)	C (% m/m)	Palma	OGR	Palma	OGR
1	-1	-1	-1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,05	6 (30 U/g)	21,7	26,9	41,7	43,8
2	1	-1	-1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,05	6 (30 U/g)	20,9	28,3	40,1	46,1
3	-1	1	-1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,15	6 (30 U/g)	21,0	31,9	40,3	52,0
4	1	1	-1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,15	6 (30 U/g)	23,3	23,8	44,8	38,8
5	-1	-1	1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,05	22 (110 U/g)	34,9	44,3	67,0	72,2
6	1	-1	1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,05	22 (110 U/g)	27,8	34,6	53,4	56,4
7	-1	1	1	0,22 = 1,1 g:5,0 g	0,15	22 (110 U/g)	39,4	56,7	75,7	92,4
8	1	1	1	0,80 = 4,0 g:5,0 g	0,15	22 (110 U/g)	28,0	38,5	53,8	62,8
9	-1,68	0	0	0,02 = 0,1 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)	34,2	30,6	65,7	49,9
10	1,68	0	0	1,00 = 5,0 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)	24,9	32,8	47,8	53,5
11	0	-1,68	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,02	14 (70 U/g)	25,2	27,5	48,4	44,8
12	0	1,68	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,18	14 (70 U/g)	24,6	35,4	47,2	57,7
13	0	0	-1,68	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	0,5 (3 U/g)	11,3	6,1	21,7	9,9
14	0	0	1,68	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	27,5 (137 U/g)	34,3	40,7	65,9	66,3
15	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)	24,9	34,5	47,8	56,2
16	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)	25,4	34,8	48,8	56,7
17	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)	24,8	34,3	47,6	55,9
18	0	0	0	0,51 = 2,5 g:5,0 g	0,10	14 (70 U/g)	25,0	35,0	48,0	57,1

^a As reações foram realizadas a 35°C e pH 8,5 (Tris-HCl) durante 24 h.

^b RM = razão mássica água: óleo; Tp = concentração do tampão; C = carga enzimática.

^c Eficiência da reação

Fonte: elaborado pela autora.

O teor de graxos obtidos no óleo de palma variou de 11,3% (ensaio 13) a 39,4% (ensaio 7) e no óleo residual de 6,1% (ensaio 13) a 56,7% (ensaio 7), segundo os tratamentos de razão mássica tampão/óleo (RM), concentração de tampão (Tp) e carga enzimática (C) aplicados nos 18 ensaios realizados no delineamento fatorial. Para o teor de ácidos graxos mais baixo obtido, a porcentagem de catalisador usada foi mínima, e para o teor mais alto obtido foi nas condições de -1 de RM, +1 de Tp e +1 de C.

a) Estágio linear

Após da realização dos experimentos fatoriais (ensaio 1 a 8) e o ponto central (ensaio 15 a 18), foi possível estimar o valor dos efeitos principais e suas interações no óleo de palma e residual. Além disso foi possível identificar as variáveis mais significativas no planejamento, os quais são apresentados na **Tabela 27**.

Tabela 27. Modelo linear - Análise dos efeitos na hidrólise do óleo de palma e residual.

Matéria-prima	Fatores	Efeitos	Erro padrão	t_{cal}	p-valor
Óleo de palma	Media	27,12352	0,099824	271,7126	0,000000
	Curvatura	-4,18735	0,345801	-12,1091	0,001212
	<i>Efeitos principais</i>				
	RM	-4,22639	0,199649	-21,1692	0,000231
	Tp	1,59376	0,199649	7,9828	0,004102
	C	10,76353	0,199649	53,9124	0,000014
	<i>Interações</i>				
	RM * Tp	-0,29881	0,199649	-1,4967	0,231385
	RM * C	-5,01173	0,199649	-25,1028	0,000139
	Tp * C	0,75353	0,199649	3,7743	0,032570
	RM * Tp * C	-1,88589	0,199649	-9,4460	0,002515
Óleo residual	Media	35,61471	0,108950	326,8916	0,000000
	Curvatura	-1,97700	0,377413	-5,2383	0,013541
	<i>Efeitos principais</i>				
	RM	-8,66966	0,217899	-39,7875	0,000035
	Tp	4,18575	0,217899	19,2096	0,000308
	C	15,77242	0,217899	72,3840	0,000006
	<i>Interações</i>				
	RM * Tp	-4,49578	0,217899	-20,6324	0,000249
	RM * C	-5,27830	0,217899	-24,2236	0,000154
	Tp * C	3,94857	0,217899	18,1211	0,000367
	RM * Tp * C	0,24233	0,217899	1,1121	0,347188

Fonte: elaborado pela autora.

Observou-se que em ambas matérias-primas todos os efeitos principais foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), sendo a carga enzimática (C) a variável com maior efeito. Enquanto as interações, notou-se que no óleo de palma todas as interações foram significativas com exceção da interação da variável razão mássica tampão/óleo com a variável concentração de tampão (RM * Tp). No óleo residual todas as interações de segunda ordem foram significativas, entretanto a interação terciária entre a variável razão mássica tampão/óleo com a variável concentração de tampão e a variável carga enzimática (RM * T * C) não se evidenciou significativa.

Uma representação mais clara dos resultados obtidos anteriormente é mostrada na **Figura 28**, onde a significância dos efeitos e das interações pode ser melhor visualizada pelo gráfico de Pareto. Neste gráfico, encontrou-se a significância dos efeitos e as interações são diferentes para cada matéria-prima. Por exemplo, no óleo de palma a ordem de significância foi $C > RM * C > RM > RM * Tp * C > Tp > Tp * C$, sendo o efeito principal C de maior significância e a interação (Tp * C) de menor significância. Por outro lado, no óleo residual a ordem de significância for $C > RM > RM * C > RM * Tp > Tp > Tp$

* C. Notou-se também que o efeito correspondente à curvatura foi significativo em ambas matérias-primas, sendo mais significativo no óleo de palma bruto que no óleo residual.

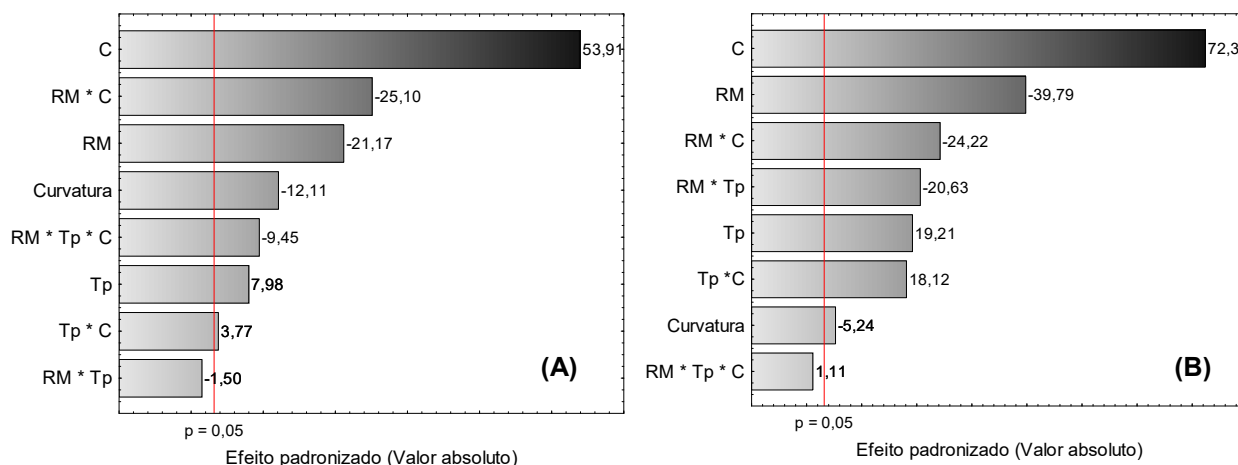


Figura 28. Modelo linear - Diagrama de Pareto das matérias-primas: Óleo de palma bruto (A) e Óleo residual (B). RM: razão mássica tampão/óleo; Tp: concentração do tampão; C: carga enzimática. Fonte: elaborada pela autora.

Na **Figura 29** é possível visualizar os gráficos das variáveis estudadas em resposta à liberação de ácidos graxos livres. Encontrou-se que ambas matérias-primas apresentaram uma influência semelhante das variáveis.

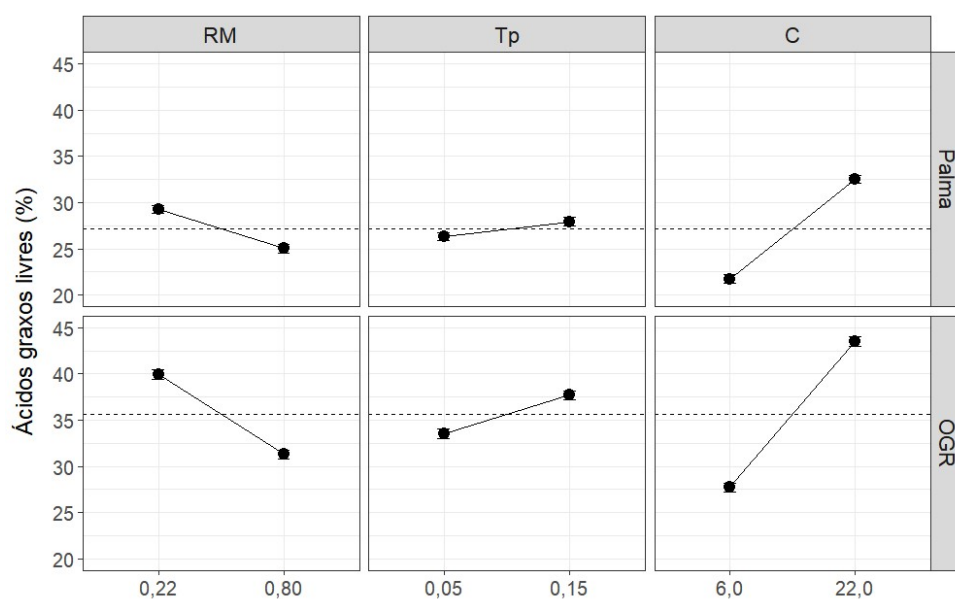


Figura 29. Influência dos efeitos principais das matérias-primas. RM: razão mássica tampão/óleo; Tp: concentração do tampão; C: carga enzimática. Fonte: elaborada pela autora.

Por exemplo, a carga enzimática (C) foi a variável que mais interferiu na hidrólise de triglicerídeos tanto no óleo de palma como no óleo residual; o efeito dessa variável foi positivo, o que significa que o aumento da porcentagem de catalisador favorece a geração de ácidos graxos livres. A segunda variável mais significativa foi a razão mássica tampão/óleo (RM), essa variável apresentou um efeito negativo, o que quer dizer que a diminuição da massa de tampão proporciona um aumento na produção de ácidos graxos livres. Finalmente, a variável com menos significância foi a concentração de tampão (Tp), o efeito dessa variável foi positivo, ou seja, o aumento da concentração do tampão favorece a reação de hidrólise.

Através dos resultados obtidos também foi possível calcular os coeficientes de regressão, realizar as análises de variância e construir as superfícies de respostas de ambas matérias-primas. A **Tabela 28** descreve os coeficientes do modelo de regressão para o óleo de palma bruto e o óleo residual. Observa-se que quase todos os termos de ambas matérias-primas foram estatisticamente significativos ao nível de confiança do 95% ($p < 0,05$) com exceção da interação secundária (RM * Tp) no óleo de palma e da interação terciária (RM * Tp * C) no óleo residual.

Tabela 28. Modelo linear - Coeficientes de regressão na hidrólise do óleo palma e residual.

Matéria-prima	Fatores	Coeficientes	Erro padrão
Óleo de palma	Media	27,12352	0,099824
	Curvatura	-2,09367	0,172901
	RM	-2,11320	0,099824
	Tp	0,79688	0,099824
	C	5,38176	0,099824
	RM * Tp	-0,14940	0,099824
	RM * C	-2,50587	0,099824
	Tp * C	0,37677	0,099824
	RM * Tp * C	-0,94294	0,099824
Óleo residual	Media	35,61471	0,108950
	Curvatura	-1,97700	0,377413
	RM	-8,66966	0,217899
	Tp	4,18575	0,217899
	C	15,77242	0,217899
	RM * Tp	-4,49578	0,217899
	RM * C	-5,27830	0,217899
	Tp * C	3,94857	0,217899
	RM * Tp * C	0,24233	0,217899

Fonte: elaborada pela autora.

Considerando os modelos com os parâmetros significativos, as equações a seguir descrevem o teor de ácidos graxos livres previsto em função das variáveis estudadas para ambos óleos.

$$AGL_{PALMA} = 18,00 - 2,49 X_{RM} - 49,3 X_{Tp} + 0,71 X_C + 102,6 X_{RM}X_{Tp} - 0,26 X_{RM}X_C + 5,03 X_{Tp}X_C - 8,06 X_{RM}X_{Tp}X_C$$

$$AGL_{OGR} = 15,18 + 17,79 X_{RM} + 58,1 X_{Tp} + 1,12 X_C - 168,2 X_{RM}X_{Tp} - 1,23 X_{RM}X_C + 4,41 X_{Tp}X_C + 1,04 X_{RM}X_{Tp}X_C$$

Na análise de variância (ANOVA), mostrada na **Tabela 29**, observa-se que os modelos descrevem a resposta AGL em função das variáveis estudadas (RM, Tp, C). A porcentagem de variação explicada foi de 99,7% e 99,8% para o óleo de palma e residual, respectivamente. Os F calculados e a regressão do modelo foram altamente significativos ($p < 0,0001$), satisfazendo os requisitos para a construção das superfícies de respostas e a curvatura de contorno.

Tabela 29. ANOVA – Modelo linear na hidrólise do óleo de palma e residual.

Matéria-prima	Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal	p-valor
Óleo de palma	Regressão	349	11	32	397,7	0,000
	Resíduos	0,24	3	0,080		
	Total		11			
Óleo residual	Regressão	814	11	74	779,5	0,000
	Resíduos	0,28	3	0,095		
	Total		11			

SQ: Soma de quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; Fcal: F calculado. Fonte: elaborada pela autora.

Com os modelos lineares propostos, foi possível gerar as superfícies de respostas levando em consideração as variáveis mais significativas em ambas matérias-primas, ou seja, as variáveis razão mássica tampão/óleo e carga enzimática. Os gráficos do óleo de palma bruto e residual são apresentados na **Figura 30**.

De acordo como os modelos observados, as maiores porcentagens de ácidos graxos livres podem ser obtidas usando o nível baixo da variável razão mássica tampão/óleo (RM), e o nível alto na variável carga enzimática (C) tanto no óleo de palma bruto como no óleo residual, isto é razão mássica tampão/óleo de 0,22 (1,1 g tampão e 5 g óleo) e a carga enzimática de 22% (110 U/g).

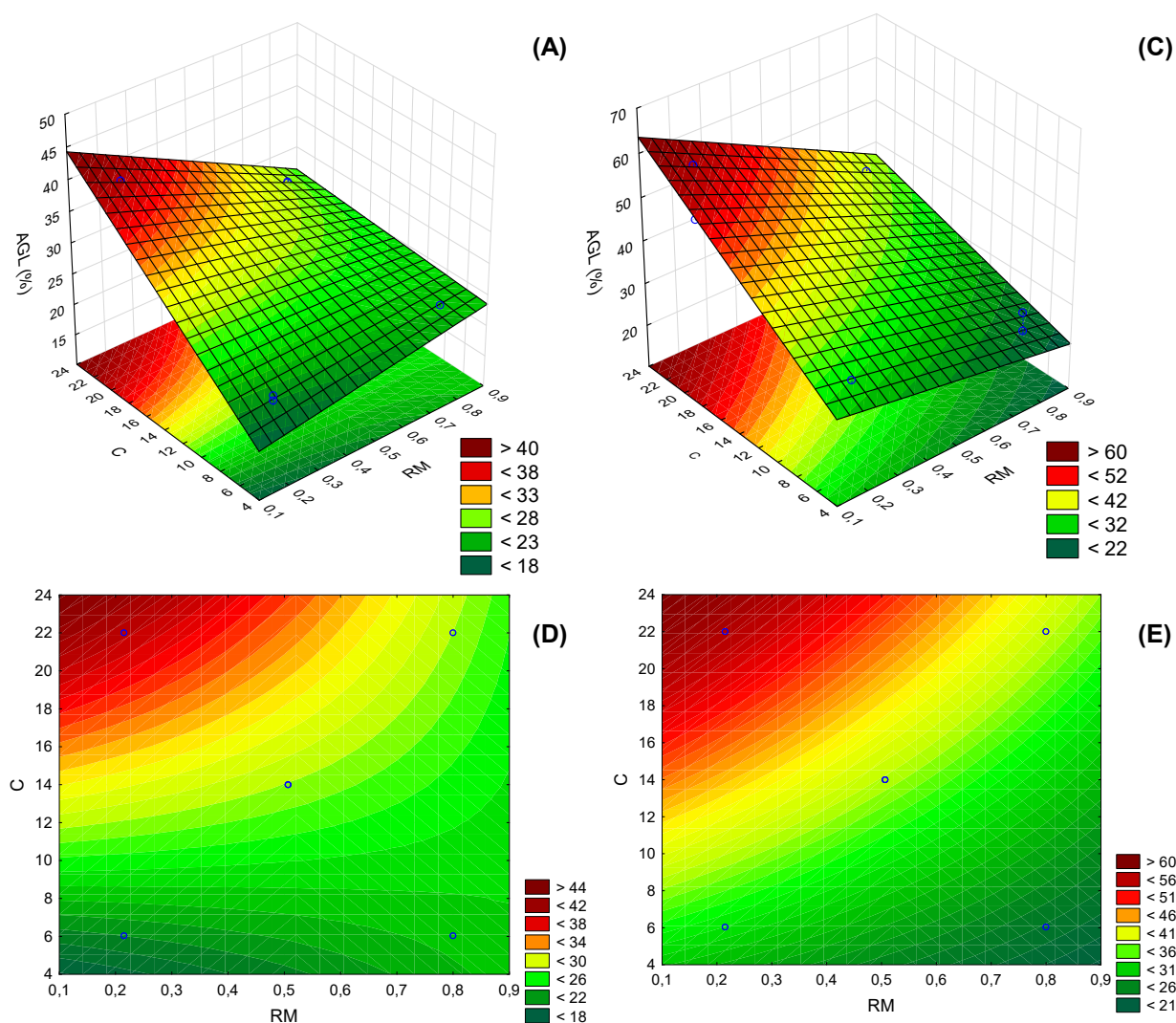


Figura 30. Modelo linear - Superfície de resposta e curvatura de contorno em função do teor de ácidos graxos livres das matérias primas levando em consideração as variáveis razão mássica tampão/óleo (RM) e carga enzimática (C): Óleo de palma bruto (A) e (B); Óleo residual (C) e (D). A variável concentração do tampão (Tp) foi mantida no nível alto, ou seja, 0,15 M. Fonte: elaborada pela autora.

Conforme observado na análise estatística e na significância do efeito de curvatura encontrado, foi necessário ajustar os dados a um modelo de segunda ordem, um planejamento composto central. Seis experimentos adicionais, chamados pontos axiais foram realizados para o óleo de palma e o óleo residual (Ensaio 9 a 14).

b) Estágio não linear

Na **Tabela 30** são apresentados os valores dos efeitos e as interações do modelo de segunda ordem. A anotação que aparece na tabela como (L) corresponde aos termos lineares, (Q) os termos quadráticos e (L) * (L) às interações entre as variáveis.

Tabela 30. Modelo quadrático - Análise dos efeitos na hidrólise do óleo de palma e residual.

Matéria-prima	Fatores	Efeitos	Erro padrão	t _{cal}	p-valor
Óleo de palma	Media	18,60188	0,140966	131,9604	0,000001
	<i>Efeitos principais</i>				
	RM (L)	-4,76341	0,152804	-31,1733	0,000073
	RM (Q)	3,75764	0,158773	23,6667	0,000165
	Tp (L)	0,80070	0,152804	5,2400	0,013529
	Tp (Q)	0,48802	0,158773	3,0737	0,054405
	C (L)	11,98053	0,152804	78,4045	0,000005
	C (Q)	-0,99760	0,158773	-6,2831	0,008141
	<i>Interações</i>				
	RM (L) * Tp (L)	-0,29881	0,199649	-1,4967	0,231385
	RM (L) * C (L)	-5,01173	0,199649	-25,1028	0,000139
	Tp (L) * C (L)	0,75353	0,199649	3,7743	0,032570
Óleo residual	Media	34,28051	0,153852	222,8151	0,000000
	<i>Efeitos principais</i>				
	RM (L)	-4,53201	0,166773	-27,1748	0,000109
	RM (Q)	0,99822	0,173287	5,7605	0,010396
	Tp (L)	4,40043	0,166773	26,3858	0,000119
	Tp (Q)	0,82765	0,173287	4,7762	0,017443
	C (L)	17,77578	0,166773	106,5870	0,000002
	C (Q)	-4,85732	0,173287	-28,0304	0,000100
	<i>Interações</i>				
	RM (L) * Tp (L)	-4,49578	0,217899	-20,6324	0,000249
	RM (L) * C (L)	-5,27830	0,217899	-24,2236	0,000154
	Tp (L) * C (L)	3,94857	0,217899	18,1211	0,000367

Fonte: elaborada pela autora.

No óleo residual os efeitos principais tanto lineares como quadráticos e as interações foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), fato também observado no óleo de palma com exceção do termo quadrático da concentração de tampão e a interação da razão mássica tampão/óleo com concentração de tampão (RM (L) * Tp (L)).

Por outro lado, uma representação dos resultados obtidos anteriormente foi realizada através de um gráfico de Pareto (**Figura 31**), os termos lineares estão associados à letra L e os quadráticos com a letra Q. Nesta gráfica, encontrou-se que ao igual que no modelo linear a significância dos efeitos e as interações são diferentes para cada matéria-prima. No óleo de palma a ordem de significância foi C (L) > RM (L) > RM (L) * C (L) > RM (Q) > C (Q) > Tp (L) > Tp (L) * C (L) > Tp (L) > Tp (L) * C (L) > Tp (Q), e no óleo residual foi C (L) > C (Q) > RM (L) > Tp (L) > RM (L) * C (L) > RM (L) * Tp (L) > Tp (L) * C (L) > RM (Q) > Tp (Q).

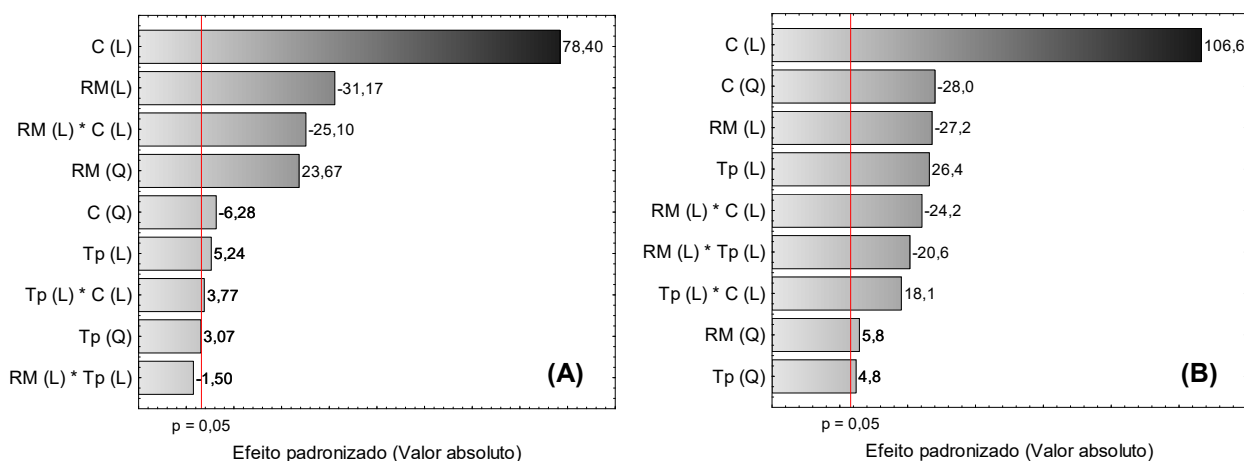


Figura 31. Modelo quadrático - Diagrama de Pareto: Óleo de palma bruto (A), Óleo residual (B). RM: razão mássica tampão/óleo; Tp: concentração do tampão; C: carga enzimática. Fonte: elaborada pela autora.

Através dos resultados do planeamento foi possível determinar os coeficientes de regressão para as duas matérias-primas. A **Tabela 31** descreve os coeficientes do modelo de regressão na hidrólise do óleo de palma e residual; os términos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos com a letra Q.

Tabela 31. Modelo quadrático - Coeficientes de regressão na hidrólise do óleo palma e residual.

Matéria-prima	Fatores	Coeficientes	Erro padrão
Óleo de palma	Media	18,60188	0,140966
	RM (L)	-2,38171	0,076402
	RM (Q)	1,87882	0,079387
	Tp (L)	0,40035	0,076402
	Tp (Q)	0,24401	0,079387
	C (L)	5,99026	0,076402
	C (Q)	-0,49880	0,079387
	RM * Tp	-0,14940	0,099824
	RM * C	-2,50587	0,099824
	Tp * C	0,37677	0,099824
Óleo residual	Media	34,28051	0,153852
	RM (L)	-2,26600	0,083386
	RM (Q)	0,49911	0,086644
	Tp (L)	2,20021	0,083386
	Tp (Q)	0,41383	0,086644
	C (L)	8,88789	0,083386
	C (Q)	-2,42866	0,086644
	RM * Tp	-2,24789	0,108950
	RM * C	-2,63915	0,108950
	Tp * C	1,97429	0,108950

Fonte: elaborado pela autora.

As equações em função dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos foram:

$$AGL_{PALMA} = 9,7 - 14,4 X_{RM} - 19,5 X_{Tp} + 1,4 X_C + 21,9 X_{RM}^2 + 98 X_{Tp}^2 - 0,01 X_C^2 - 10,2 X_{RM}X_{Tp} - 1,1 X_{RM}X_C + 40,9 X_{Tp}X_C$$

$$AGL_{OGR} = 5,1 + 17,5 X_{RM} + 20 X_{Tp} + 2,2 X_C + 5,8 X_{RM}^2 + 166 X_{Tp}^2 - 0,04 X_C^2 - 154 X_{RM}X_{Tp} - 1,1 X_{RM}X_C + 4,9 X_{Tp}X_C$$

Pela ANOVA apresentada na **Tabela 32**, observamos que os modelos descrevem a resposta AGL em função das variáveis estudadas. A porcentagem de variação explicada foi de 92,5% e 66,8% para o óleo de palma e residual, respectivamente. O F calculado foi altamente significativo ($p < 0,0001$) para o óleo de palma; no entanto, para o óleo residual não foi significativo ($p > 0,05$).

Tabela 32. ANOVA – Modelo quadrático na hidrólise do óleo de palma e residual.

Matéria-prima	Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal	p-valor
Óleo de palma	Regressão	704	17	41	13,4	0,000
	Resíduos	24,66	8	3,083		
	Falta de ajuste	24,42	5	4,885	61,3	0,003
	Erro puro	0,24	3	0,080		
	Total	701	17			
Óleo residual	Regressão	1462	17	86	2,6	0,09
	Resíduos	265,58	8	33,198		
	Falta de ajuste	265,30	5	53,060	558,8	0,00
	Erro puro	0,28	3	0,095		
	Total	1704	17			

SQ: Soma de quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; Fcal: F calculado.
Fonte: elaborada pela autora.

Com os modelos quadráticos propostos, foi possível gerar as superfícies de respostas levando em consideração as variáveis mais significativas em ambas matérias-primas, ou seja, as variáveis razão mássica tampão/óleo e carga enzimática. Os gráficos do óleo de palma bruto e residual são apresentados na **Figura 32**.

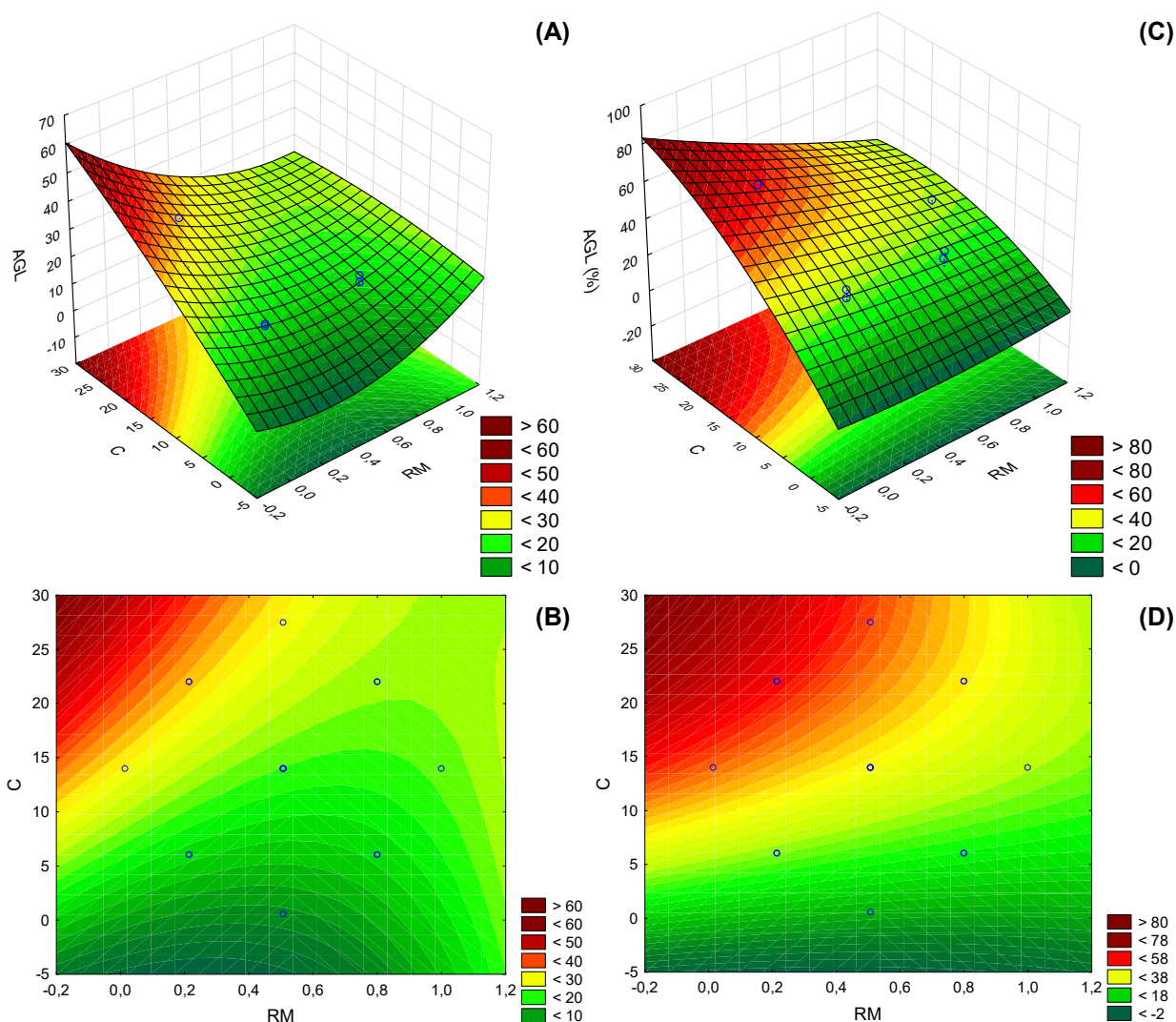


Figura 32. Modelo quadrático - Superfície de resposta e curvatura de contorno em função do teor de ácidos graxos livres das matérias primas levando em consideração as variáveis razão mássica tampão/óleo (RM) e carga enzimática (C): Óleo de palma bruto (A) e (B); Óleo residual (C) e (D). A variável concentração do tampão (Tp) foi mantida no nível alto (+ α), ou seja, 0,18 M. Fonte: elaborada pela autora.

A partir das análises da superfície de resposta foi possível determinar as condições de processo em que se obtém elevado teor de ácidos graxos livres. Tais condições são apresentadas na **Figura 33**, valores em que as variáveis RM, Tp e C proporcionam as características desejadas do processo. De acordo com a equação determinada, encontrou-se que o maior teor de ácido graxo que pode ser obtido é 38,5% para o óleo de palma e 63,9% para o residual sob as seguintes condições reacionais: RM = 0,22; Tp = 0,18 mol/L e C = 27,5%.

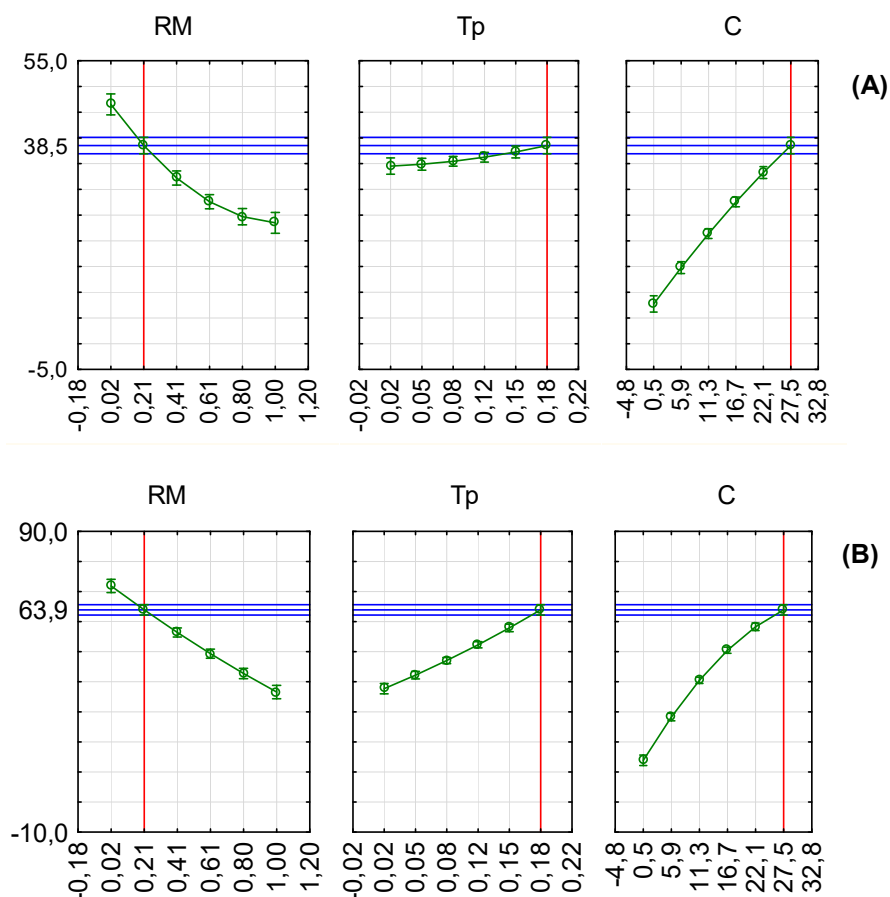


Figura 33. Modelo quadrático – Perfis para valores previstos nas melhores condições de reação: óleo de palma (A) e óleo residual (B). RM: razão mássica tampão/óleo; Tp: concentração do tampão; C: carga enzimática. Fonte: elaborado pela autora.

c) Validação

A **Tabela 33** mostra os resultados preditos e observados pelo ensaio de validação experimental. Para o modelo linear em ambas matérias-primas, o resultado experimental assemelhou-se ao resultado predito. Porém, para o modelo quadrático observou-se maior imprecisão do modelo na predição dos dados experimentais.

Tabela 33. Resultados preditos e experimentais obtidos das melhores condições experimentais na hidrólise do óleo de palma e residual.

Modelo	Matéria-prima	Condições de reação			AGL (%) predito	AGL (%) observado
		RM	Tp (M)	C (%)		
Linear	Palma	0,22	0,15	22%	39,4	39,6
	OGR	0,22	0,15	22%	56,51	56,2
Quadrático	Palma	0,22	0,18	27,5%	38,5	43,6
	OGR	0,22	0,18	27,5%	63,9	60,1

Fonte: elaborada pela autora.

Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados foram satisfatórios. O máximo teor de AGL (%) obtido para cada matéria-prima foi alcançado empregando-se uma porcentagem de 27,5% de biocatalisador. Estes resultados sugerem que uma carga enzimática maior pode atingir melhores rendimentos. No entanto, é importante destacar que a enzima de estudo apresenta uma regioseletividade 1,3-específica, ou seja, apenas pode hidrolisar as posições sn-1 e sn-3 no triglicerídeo. O máximo teor de ácidos graxos que tem a capacidade de hidrolisar seria 66,6%. Porém, o óleo de palma apresentou um teor de triglicerídeos cerca de 54% e de diglicerídeos de 35%, fato que promove um rendimento teórico abaixo de 66,6%. Isso porque apenas 66,6% dos triglicerídeos, 44,4% dos diglicerídeos e 22,2% dos monoglicerídeos podem ser hidrolisados. Levando em consideração essa porcentagem foi possível calcular a eficiência das diferentes condições reacionais de ambas matérias-primas (ver **Tabela 26**).

Desta forma, no óleo residual a eficiência foi cerca de 98,9% nas condições de reação quadrática e de 91,6% nas condições de reação linear; enquanto, ao óleo de palma, a eficiência foi cerca de 86,7% e 76,0% respectivamente. Além disso, trabalhar com uma porcentagem maior de enzima não é viável, uma vez que o custo do catalisador também influi significativamente no custo de produção de biodiesel. Embora o biocatalisador selecionado apresente um custo muito menor em comparação com as enzimas comerciais, o uso em excesso deste pode aumentar o custo do processo.

5.3.2 Etapa 2: Reação de esterificação

Posteriormente, os ácidos graxos obtidos na hidrólise foram esterificados usando um catalisador ácido (H_2SO_4) e um catalisador enzimático (P_3). A **Figura 34** mostra os teores de ésteres obtidos para cada matéria-prima usando os dois catalisadores. Observa-se que, tanto para o óleo de palma como para o óleo residual, o teor de ésteres produzidos por catálises ácidas (43,3% e 53,7%) foram maiores que os produzidos por catálises enzimáticas (32,1% e 41,1%), respectivamente. Ainda assim, a eficiência de conversão foi de 99,3% e 89,3% na esterificação por catálise ácida e de 87,0% e 69,2% por catálise enzimática para o óleo de palma e residual, respectivamente.

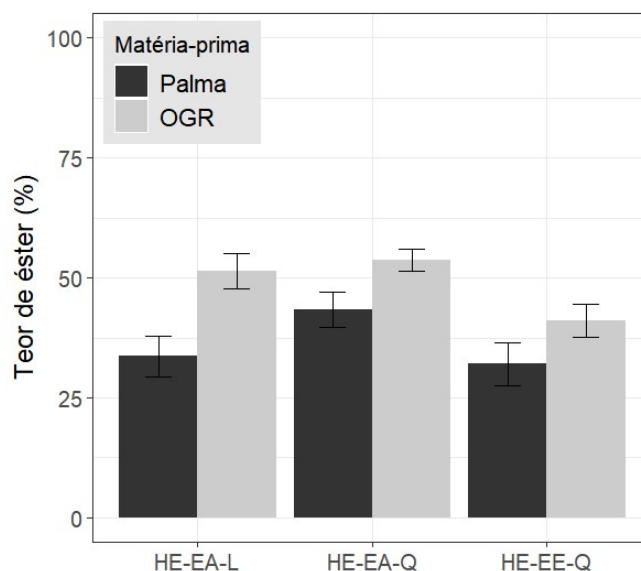


Figura 34. Teor de ésteres obtidos na hidroesterificação ácida e enzimática. HE-EA-L: hidroesterificação enzimática/ácida, HE-EA-Q: hidroesterificação enzimática/ácida, HE-EE-Q: hidroesterificação enzimática/enzimática. Os dados representam a média $\pm$ IC ($\alpha = 0,05$; $n = 3$). Fonte: elaborado pela autora.

Realizando uma comparação da produção de ésteres a partir dos ácidos graxos obtidos sob as melhores condições do modelo linear sobre as condições do modelo quadrático observou-se rendimentos equitativos, os quais foram superiores ao 80% para ambas matérias-primas. No óleo de palma, a eficiência foi de 84,8% no modelo linear e 99,3% no modelo quadrático; enquanto, no óleo residual, o rendimento foi de 91,3% no modelo linear e 89,3% no modelo quadrático.

5.4 Métodos comparativos

Por fim, na quarta etapa, foi efetuada a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir da transesterificação enzimática e alcalina, assim como da hidroesterificação subcrítica/enzimática e subcrítica/ácida. Em seguida, os teores de ésteres obtidos nestes processos foram comparados com os resultados da hidroesterificação enzimática/ácida e enzimática/enzimática, os quais são apresentados na **Figura 35**.

Como esperado, a transesterificação por catálise alcalina foi melhor para o óleo residual (81,8%) que para o óleo de palma (5,3%), devido ao teor de ácidos graxos presentes nas matérias-primas. O óleo residual apresentou um teor de ácidos graxos menor que 2,5%, sendo viável a transesterificação por catálise alcalina. Entretanto, o óleo de palma apresentou um teor de ácidos graxos acima de 2,5% levando à formação de

reações secundárias indesejáveis como a saponificação que tornaram inviável o processo de transesterificação alcalina.

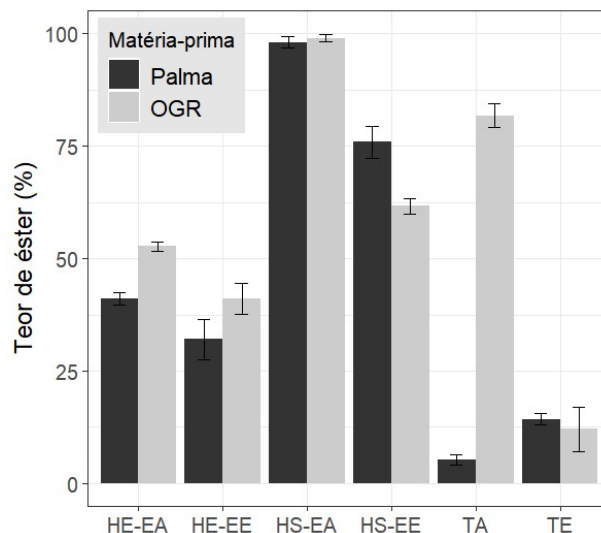


Figura 35. Teor ésteres obtidos em diferentes métodos de produção de biodiesel. HE-EA: hidroesterificação enzimática/ácida, HE-EE: hidroesterificação enzimática/enzimática, *HS-EA: hidroesterificação subcrítica/ácida, HS-EE: hidroesterificação subcrítica/enzimática, TA: transesterificação alcalina e TE: transesterificação enzimática. Os dados representam a média $\pm$ IC ($\alpha = 0,05$; $n = 3$). Fonte: elaborado pela autora e *dos Santos (2017)⁸⁵.

Com relação à hidroesterificação, observa-se que, de forma geral, independentemente do teor de ácido graxo no óleo empregado, os teores de ésteres gerados foram semelhantes. No entanto, as maiores conversões foram obtidas pela hidroesterificação subcrítica/ácida e subcrítica/enzimática apresentando um teor de ésteres de 98% e 75,9% para óleo de palma e de 98% e 61,6% para o óleo residual, respectivamente. Estes resultados indicam que no processo de hidroesterificação a primeira etapa, ou seja, a hidrólise subcrítica segue sendo melhor em comparação com a rota enzimática, a qual apresentou na hidroesterificação enzimática/ácida e enzimática/enzimática um teor de ésteres de 41,0% e 32,1% para o óleo de palma e de 52,7% e 41,1% para o óleo residual, respectivamente. Além disso, como mencionado anteriormente na segunda etapa da hidroesterificação, ou seja, a esterificação os resultados foram melhores na catalise ácida que na catalise enzimática. No entanto, é importante ressaltar que as condições de reação na esterificação enzimática não foram otimizadas, portanto, é possível obter resultados equivalentes com a catalise ácida.

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 ($E_{PALMA} = 14,2\%$; $E_{OGR} = 12,0\%$).

7 TRABALHOS FUTUROS

Com base nos conhecimentos adquiridos nesta pesquisa, à sugestão de trabalhos futuros são apresentados a continuação:

- Desenvolvimento metodológico para separação de glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos) e ácidos graxos livres visando a melhora da qualidade do biodiesel na hidroesterificação enzimática com lipases 1,3-específicas e o aproveitamento dos coprodutos com valor agregado;
- Estabelecimento das melhores condições reacionais na esterificação de ácidos graxos livres usando o látex bruto de *Carica papaya* como catalisador em reator de tanque agitado operando em modo batelada;
- Avaliação da reutilização do látex bruto de *Carica papaya* tanto na hidrólise como na esterificação em reator de tanque agitado operando em modo batelada;
- Estabelecimento das melhores condições reacionais na hidroesterificação enzimática empregando o látex bruto de *Carica papaya* como catalisador em diferentes tipos de reatores e modos operacionais;
- Avaliação as reações de hidrólise e esterificação em reator de tanque agitado operando em modo batelada, usando as frações parcialmente purificadas de *Carica papaya* como catalisador.

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.