



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ-

Campus Maracanaú

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ENERGIAS RENOVAVEIS

ANDRÉ LUIS LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DAS VÍSCERAS DE TILAPIA
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA**

MARACANAÚ

2017

ANDRÉ LUIS LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DAS VÍSCERAS DE TILÁPIA
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Energias Renováveis, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em energias renováveis. Área de concentração: Energias Renováveis.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção.

MARACANAÚ

2017

Dados Internacionais de
Catalogação na Publicação Instituto
Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI

Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos

pelo(a) autor(a)

O48p Oliveira,
André Luis Lima de.

Produção de biodiesel a partir do óleo das vísceras de tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) via catálise enzimática / André Luis Lima de
Oliveira. - 2017.

88 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Energias
Renováveis, Campus Maracanaú, 2017.

Orientação: Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção.

1. Tilápia. 2. Biodiesel. 3. Transesterificação. 4. *Thermomyces*
lanuginosa. I. Título.

CDD 620.91

ANDRÉ LUIS LIMA DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DAS VÍSCERAS DE TILÁPIA
(*Oreochromis niloticus*) VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Energias Renováveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Energias Renováveis, área de concentração Energias Renováveis.

Aprovada em 04 / 08 / 2017.

BANCA EXAMINADORA



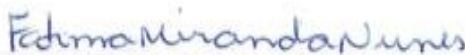
Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção (Orientador)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE



Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira UNILAB



Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes

Universidade Federal do Ceará - UFC

DEDICATÓRIA

A Deus.

Aos meus pais, José Alberto e Erandy, que muitas vezes se sacrificaram para que eu pudesse estar aqui.

Aos meus avós maternos e paternos (*In memoriam*), aos quais não tive a oportunidade de me despedir.

A minha namorada Irlanda Brandão, pois novamente estar ao meu lado e ser de fundamental importância nas minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ e FUNCAP pelo aporte financeiro a pesquisa.

Ao professor João Carlos, por ter sido além de orientador um amigo. Uma pessoa que acreditou em mim desde o começo, e por ter contribuído com as minhas conquistas acadêmicas e profissionais.

A professora Fátima Miranda Nunes, por ter me auxiliado no começo da Pós-Graduação em uma nova área do conhecimento.

Ao professor Aluisio Marques da Fonseca pelas valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Energias Renováveis pelo crescimento intelectual.

Ao meu braço direito na pesquisa, a técnica em meio ambiente e graduanda em Química, Micaelle Licia dos Santos Bezerra, pela amizade e dedicação ao projeto.

A professora Vera Lucia, do Instituto Federal do Piauí, por fazer questão de se fazer presente de forma pessoal e profissional desde a graduação até este momento.

Aos meus amigos Alison Batista, Caio, Francisco Holanda, Jonas, Mauricio e Rafael pela amizade, assessoria na pesquisa e momentos de descontração.

Aos professores e alunos do LAQAMB, em especial a Mayara e a Rita, pelo suporte fornecido no desenvolvimento desta pesquisa.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

Neste trabalho buscou-se um método para o aproveitamento dos resíduos pesqueiros (vísceras de peixe) para a produção de biodiesel. Inicialmente o estudo consistiu na extração do óleo das vísceras do peixe conhecido popularmente como tilápia, onde a partir de 413 g de material obteve-se 124 g de óleo bruto. A determinação das propriedades físico-químicas deste óleo revelou acidez de 5,53%, peróxido de 35,66 meqO₂/Kg, iodo de 64,27gl₂/100g e saponificação no valor de 198,98 mgKOH/g de óleo. O óleo bruto foi submetido a um processo de refino, onde a etapa inicial foi uma neutralização, resultando em 72 g de óleo neutralizado, seguida de etapa de branqueamento, que gerou 63 g de óleo refinado, o que representa 14,52% de rendimento em relação a massa de víscera. Na caracterização físico-química do óleo refinado foi verificado acidez de 0,37%, peróxido 6,12 meqO₂/Kg e iodo de 64,01 gl₂/100g e saponificação de 209,41 mgKOH/g de óleo. A composição química em ácidos graxos do óleo refinado foi determinada a partir de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), onde os ácidos graxos majoritários foram: mirístico (3,58%), palmitoléico (7,44%), palmítico (25,39%), linolênico (0,88%), linoleico (10,17%), oleico (38,27%), esteárico (6,73%), aracdônico (0,51%), cis-8,11,14-eicosatrienóico (0,6%) e o cis-11-Eicosenóico (1,76%). A caracterização físico-química do biodiesel revelou viscosidade cinemática de 4,0802 mm²/s a 40°C, massa específica 0,85 g/cm³, ponto de fulgor 99,2°C, temperatura de escoamento de 3°C e índice de acidez de 0,35 mgKOH/g. A etapa seguinte do trabalho foi o estudo da transesterificação por catálise enzimática utilizando a lipoenzima da espécie *Thermomyces lanuginosa*, Lipoenzima TL IM. Na etapa de otimização do processo, montou-se um planejamento experimental baseado no modelo fatorial de dois níveis com três pontos centrais. Os resultados foram mensurados em gráficos de Pareto, superfície e contorno. De acordo com o gráfico de Pareto, os três fatores mais impactantes foram a quantidade de enzima, a proporção óleo/metanol em conjunto com o co-solvente e a proporção óleo/metanol. Ao analisar-se os gráficos de superfície e contorno, concluiu-se que se mantendo os fatores intermediários de cada condição a ser analisada poderia ter-se-á um rendimento máximo de 80%. Para confirmar os resultados obtidos na otimização, foi realizado um estudo cinético. Nesta etapa, fixou-se a concentração de enzima e o co-solvente utilizado. O estudo revelou que a

temperatura ótima de reação é de 45°C, obteve-se um rendimento de 90% em 140 minutos de reação. O estudo cinético mostrou ainda que a reação segue um modelo cinético reacional de primeira ordem. A energia de ativação encontrada nos experimentos foi de 43,84KJ.

Palavras-chaves: Tilapia; biodiesel; transesterificação; *Thermomyces lanuginosa*

ABSTRACT

First of all, the work constituted in a method development for a fishing residues, such as fish entrails for biodiesel production. Initially, the study focused to an oil extraction from the fish entrails popularly known by Tilapia, on this experiment 413 grams of material was achieved 124 grams of gross oil after the extraction. The physical-chemistry determination of the specific oil evidenced the acidity of 5,53% , peroxide level 35,66 meq O₂/Kg, iodine value of 64,27gl₂/100g and saponification number of 198,98 mgKOH/g of oil. Furthermore, the gross oil was subjected to a refining process, which consisted initially of a neutralization stage, resulting in 72 grams of neutralized oil, followed by the bleaching process that originates 63 grams of refined oil that represents 14,52% of yield relative to entrails mass. Then, the physical-chemistry characterization of refined oil was verified the expressive modification of the parameters, such as the acidity 0,37%, peroxide level 6,12 meqO₂/Kg, iodine value 64,01 gl₂/100g and saponification number 209,41 mgKOH/g of oil. With regard to chemical composition in fatty acids from refined oil was determined from gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In which the majoritary fatty acids were: myristic (3,58%), palmitoleic (7,44%), palmitic (25,39%), linolenic (0,88%), Linoleic (10,17%), oleic (38,27%), stearic (6,73%), arachnid (0,51%), cis-8,11,14-eicosatrienoic (0,6%) and cis-11-eicosenoic (1,76%). The physical-chemistry characterization of the biodiesel indicated the kinematic viscosity of 4,0802 mm²/s in the temperature of 40 °C or 313,15 K, specific mass 0,85 g/cm³, flash point 99,2°C or 372,35 K, flow temperature 3°C or 276,15 K and acidity 0,35 mgKOH/g. Following, the next stage of work was study the transesterification by enzymatic catalysis utilizing Lipozyme TL IM enzim. The optimization process was used the experimental planning based on the factorial model with two levels and three central points. The results were measured in Pareto graphics relating surface and contour. On condition that, the most breakthroughs factors were the enzyme quantity, oil/methanol proportion in conjunction with co-solvent and oil/methanol proportion. In sum, After analyzing the surface and contour graphics, was concluded that keeping the intermediates factors of every single condition to be analyzed there could be a maximum yield of 80%. In fact, to confirmate all obtained results of optimization was realized a kinetic study. The next stage, was fixed the enzymatic concentration and co-solvente utilized to achieve a

better yield. The study revealed that excellent temperature of this reaction is 45 °C, and also the yield of this specifications was 90% in 140 minutes of reaction. Overall, the kinetic study explained by all the results that the kinetic model reactional follows the first order. The activation energy found in the experiments was 43,84KJ.

Keys-Words: Tilapia-biodiesel; transesterification; *Thermomyces lanuginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo).....	22
Figura 2: Produção de pescado de 2001 a 2006 em toneladas (t).....	23
Figura 3: Sistema de cultivo em tanque rede	24
Figura 4: Preços médios dos leilões de biodiesel.....	28
Figura 5: Produção Regional de Biodiesel – 2015	29
Figura 6: Participação de matérias-primas para a produção de biodiesel (%)	29
Figura 7: Mecanismo reação de transesterificação	31
Figura 8: Viscondensímetro.....	44
Figura 9: Analisador de ponto de fulgor ISL FP93 5G2	45
Figura 10: iSL CPP 5Gs® para determinação de ponto de fulgor	46
Figura 11: Procedimento experimental.....	49
Figura 12: Tanque de armazenamento de tilápia	50
Figura 13: Etapas de pré-tratamento da matéria prima. A: vísceras congeladas; B: Vísceras após trituração; C: Fases orgânicas e aquosa após aquecimento	51
Figura 14: Óleo bruto de tilápia	51
Figura 15: Cromatograma do óleo refinado de tilápia	55
Figura 16: Espectro de Infravermelho do biodiesel de tilápia	58
Figura 17: Espectro RMN H^1 do óleo de tilápia	60
Figura 18: Espectro RMN H^1 do biodiesel do óleo de tilápia	61
Figura 19: Gráfico de Pareto	63
Figura 20: Gráficos de contorno e superfície para relação proporção MeOH:Óleo vs Temperatura ($^{\circ}C$)	64
Figura 21: Gráfico de contorno e superfície para relação % enzima vs MeOH Óleo	65
Figura 22: Gráficos de contorno e superfície para relação % enzima vs Temperatura ($^{\circ}C$).....	66
Figura 23: Gráfico de contorno e superfície para relação % Enzima vs co-solvente.....	67
Figura 24: Gráfico de contorno e superfície para relação MeOH:Óleo vs co-solvente	68
Figura 25: Acompanhamento cinético da reação a $27^{\circ}C$	69
Figura 26: Acompanhamento cinético da reação a $35^{\circ}C$	70
Figura 27: Reação a $45^{\circ}C$	70

Figura 28: Reação a 55°C	71
Figura 29: Gráfico de barras para conversão em 200min em diferentes temperaturas	72
Figura 30: Gráficos lineares para a determinação da ordem de reação.....	74
Figura 31: Gráfico de Arrhenius para determinação da Energia de Ativação	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de peixes de cativeiro no Ceará de 2001 a 2015 em toneladas	23
Tabela 2: Especificações para o Biodiesel	27
Tabela 3: Principais Características dos catalisadores utilizados na transesterificação	34
Tabela 4: Modelo fatorial proposto na pesquisa para otimização da reação de transesterificação enzimática	47
Tabela 5: Caracterização físico-química do óleo de tilápia	53
Tabela 6: Perfil Cromatográfico do óleo de tilápia refinado	56
Tabela 7: Caracterização do óleo e biodiesel de tilápia	56
Tabela 8: Acidez e temperaturas de fulgor e escoamento do óleo e biodiesel de tilápia	57
Tabela 9: Velocidade específica e ordem de reação	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SPA: Secretaria da Pesca e Agricultura

SDA: Secretária do Desenvolvimento Agrário

MPA: Movimento dos Pequenos Agricultores

DNOCS: Departamento Nacional de Obras contra a Seca

NUTEC: Fundação de Núcleo de Tecnologia do Ceará

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

AOCS: American Oil Chemistry Society

ANP: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM: American Society for Testing and Materials

LISTA DE SÍMBOLOS

mg: miligrama

°C: Graus Celsius

mL: mililitro

KOH: Hidróxido de potássio

I.A: Índice de acides

A.G.L: Ácidos Graxos Livres

V: Volume

F: Fator de correção

P: massa

meq: miliequivalente

Na₂S₂O₃: Tiosulfato de sódio

I.P: Índice de Peróxido

I.S: Índice de Saponificação

CG/EM: Cromatografo Gasoso com Espectrometro de Massas acoplado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1 Produção de tilápia no Ceará	22
3.2 Problemática dos rejeitos da piscicultura.....	24
3.3 Biodiesel	26
3.4 Catálise homogênea.....	32
3.6 Catálise enzimática	33
3.7 Fatores que alteram a catálise enzimática	35
3.7.1 Efeito do metanol	35
3.7.2 Efeito do co-solvente	36
3.7.3 Efeito da Temperatura.....	36
3.8 Análise fatorial.....	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 Obtenção da matéria-prima.....	38
4.2 Extração e Pré-tratamento do óleo	38
4.3 Obtenção do óleo refinado	39
4.3.1 Neutralização	39
4.3.2 Branqueamento	39
4.4 Metodologias Analíticas Pré e Pós-tratamento	40
4.4.1 Índice de Acidez	40
4.4.2 Índice de Peróxido	41
4.4.3 Índice de Iodo pelo método de Wijjs	41

4.4.4 Índice de saponificação	42
4.5 Perfil Cromatográfico.....	43
4.6 Caracterização do biodiesel.....	44
4.6.1 Massa Específica a 20 °C e Viscosidade Cinemática a 40 °C	44
4.6.2 Viscosidade dinâmica a 20°C e 40°C	44
4.6.3 Ponto de fulgor	45
4.6.4 Ponto de fluidez.....	45
4.6.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	46
4.6.6 Ressonância magnética nuclear protônica (RMN – ¹ H).....	46
4.7 Otimização da reação de transesterificação enzimática.....	46
4.8 Cinética da transesterificação enzimática	48
4.9 Procedimento Experimental.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 Processamento do pescado em peixarias locais.	50
5.2 Extração e Pré-tratamento das vísceras de tilápia.....	50
5.3 Obtenção do óleo refinado	52
5.4 Caracterização físico-química do óleo	53
5.5 Perfil Cromatográfico do óleo de tilápia refinado	55
5.6 Caracterização do Biodiesel.....	56
5.7 Otimização da reação de transesterificação	62
5.8 Cinética da transesterificação.....	68
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A necessidade da energia em suas diversas derivações está diretamente ligada ao desenvolvimento da civilização ao longo dos séculos. Na sociedade moderna, o uso destas fontes se tornou tão fundamental quanto a alimentação. A crescente busca por combustíveis, oriundos em quase totalidade de fontes fósseis, força a busca por alternativas que visem suprir a demanda energética (XU; LI; SUN, 2016).

O alto consumo agregado a crise do petróleo na década de 1970 impulsionou novamente a pesquisa por fontes alternativas de energia. A viabilidade de uso desses novos combustíveis estava associada a algumas características, como: ser uma fonte limpa de energia, baixo custo e oriundo de fontes renováveis. Dentre as possibilidades estudadas, uma fonte que atende as exigências é a biomassa (POUSA et al. 2007).

Entende-se por biomassa como toda e qualquer matéria orgânica originada de matéria viva, que tem por finalidade especialmente a produção de combustível. Esta matéria pode ser de origem animal, vegetal ou microbiológica (SUAREZ et al., 2009). O combustível produzido através dos óleos é o biodiesel. O biodiesel é o produto da reação denominada transesterificação, onde um óleo reage com um álcool de cadeia curta em presença de catalisador (DABDOUB e BRONZEL, 2009).

Em termos da reação de transesterificação, os álcoois mais utilizados são o metanol e etanol. O metanol é mais utilizado na produção em escala comercial, pois como ele é um nucleófilo mais forte, ele é mais reativo, o que faz com que o biodiesel seja produzido em menor tempo e empregando-se menor temperatura. A sua desvantagem encontra-se na sua alta toxicidade. No Brasil, o álcool mais utilizado é o etanol. As suas vantagens estão no fato de ser menos tóxico, renovável e produzir um combustível com maiores índices de cetano e lubricidade. Uma desvantagem do uso do etanol está no fato de ocorrer uma maior dispersão da glicerina, o que acaba dificultando a sua remoção (LÔBO et al., 2009).

Para que ocorra de forma satisfatória, a reação de transesterificação precisa de catalisadores. Os aceleradores de reação mais utilizados na produção de biodiesel são os químicos. As principais rotas químicas são a ácida e a básica (DABDOUB e BRONZEL, 2009). Geralmente, utiliza-se uma solução alcóolica ácida

ou básica a uma temperatura de 70°C por uma hora. Estudos comprovaram que após a reação foram obtidos rendimentos superiores a 93% de biodiesel. Apesar deste rendimento, a rota química está deixando de ser a rota primária, pois existem alguns problemas em relação a sua utilização, dentre quais citam-se: problemas de corrosão devido as águas de lavagem, presença de produtos inorgânicos, consumo de energia e dificuldade em separar a glicerina da fase orgânica.

O uso de catalisadores enzimáticos enfatiza a busca de uma indústria química sustentável sobre o alicerce da química verde, onde a procura por compostos específicos está no topo dos interesses. Neste contexto, a utilização de enzimas como catalisadores industriais é uma alternativa promissora em relação a química tradicional. As vantagens das enzimas são muitas, dentre as quais destacam-se a seletividade e alta atividade em condições experimentais muito leves tais como baixa pressão e temperatura e meio reacional. As lipases são as enzimas mais utilizadas. Um dos motivos que levaram o seu destaque estar o fato de que as lipases exibem uma ampla especificidade, tendo, portanto, uma gama de substratos. Devido a esta abrangência, as lipases podem ser utilizadas em diversas reações em vários segmentos industriais como a de biocombustíveis, alimentícias e farmacêuticas (LAFUENTE, 2009).

No âmbito das questões ambientais, segundo a APROBIO (2016), o uso de 7% de biodiesel no diesel de petróleo ocasiona a diminuição de 60% na liberação de gases poluentes. Em termos de monóxido de carbono, estima-se a redução de 65 mil toneladas ao ano com o uso do B10, que consiste na adição de 10% de biodiesel ao diesel de petróleo.

Mesmo o biodiesel sendo uma fonte promissora em substituição ao diesel do petróleo algumas questões ainda são levantadas. Existe o impasse do uso dos óleos de origem vegetal, pois muitos deles podem ter uso como combustível ou na alimentação. Questões econômicas também estão envolvidas, pois o custo de produção das oleaginosas é cerca de uma vez e meia maior do que para a produção de diesel de petróleo (XUE, 2013).

Em contrapartida, os óleos de origem animal são produtos de menor valor agregado, pois em oposição as oleaginosas, que são fontes de extração primária, os óleos de origem animal são geralmente coprodutos da produção. Dentre as gorduras animais, sobressaem-se a gordura de peixe, onde este coproduto é mais utilizado na

fabricação de ração animal e em alguns casos é rejeitado, o que ocasiona grandes impactos ambientais (BRAGA, 2012).

No estado do Ceará, o peixe de cativeiro mais cultivado é a tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A produção anual gira em torno de 170 mil toneladas. Portanto, o uso do óleo extraído das vísceras da tilápia para a produção de biodiesel se torna viável, pois agrega questões econômicas, políticas, ambientais e sociais.

Visando essas questões, este trabalho objetivou propor uma forma mais eficaz de se produzir ésteres metílicos de ácidos graxos visando o seu uso como biodiesel. Utilizou-se como matéria-prima o óleo extraído das vísceras de tilápia e como catalisador enzimas imobilizadas da levedura *Thermomyces lanuginosa*, mais especificamente a Lipoenzima TL IM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O trabalho apresentou como objetivo geral a otimização dos principais parâmetros que regem a reação de transesterificação. Nesta pesquisa, o óleo utilizado como matéria-prima foi obtido por extração a quente das vísceras da tilápia (*Oreochromis niloticus*). O catalisador utilizado nos experimentos foi a lipoenzima imobilizada da levedura *Thermomyces lanuginosa*, Lipoenzima TL IM.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter o óleo através das vísceras do peixe utilizando o método da extração a quente;
- Refinar o óleo obtido na extração;
- Produzir ésteres metílicos para as análises de viscosidade, massa específica, ponto de fulgor, ponto de fluidez, além das espectroscopias IV e RMN H^1 .
- Caracterizar físico-química em termos de acidez, peróxido, índice de iodo e saponificação dos óleos bruto e refinado, índice de acidez, viscosidade cinemática, massa específica, ponto de fulgor e temperatura de escoamento para o biodiesel;
- Otimizar a partir do modelo fatorial a reação de transesterificação utilizando como catalisador a Lipoenzima TL IM avaliando os parâmetros temperatura, quantidade de enzima, proporção de metanol no óleo e utilização de co-solvente;
- Estudar a cinética da reação de transesterificação enzimática para obter as velocidades específicas, a ordem de reação e a energia de reação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Produção de tilápia no Ceará

Acompanhando o governo federal no desenvolvimento do setor pesqueiro, o governo estadual do Ceará criou, em janeiro de 2011, a Secretaria da Pesca e Aquicultura (SPA). Até então, o Estado contava apenas com uma coordenadoria da pesca vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Agrário (SDA) (SDA, 2016). Dentre as atribuições da SPA consta-se:

- A execução de políticas e diretrizes para o desenvolvimento sustentável da pesca do Estado;
- Promoção de estudos e pesquisas de novas tecnologias;
- Promoção do cadastro dos pescadores junto com o Movimentos dos Pequenos Agricultores (MPA);
- Fiscalização da pesca marinha, continental e costeira estaduais ou delegadas pela União.

Com esses incentivos, a produção pesqueira do estado cresceu, e como consequência adquiriu posição privilegiada entre os estados nordestinos. Em termos de produção nacional o Ceará responde por cerca de 7% desta, o que representa 20% da produção nordestina. O pescado de maior produção no Ceará é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) (ADECE, 2016).

Figura 1: *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)



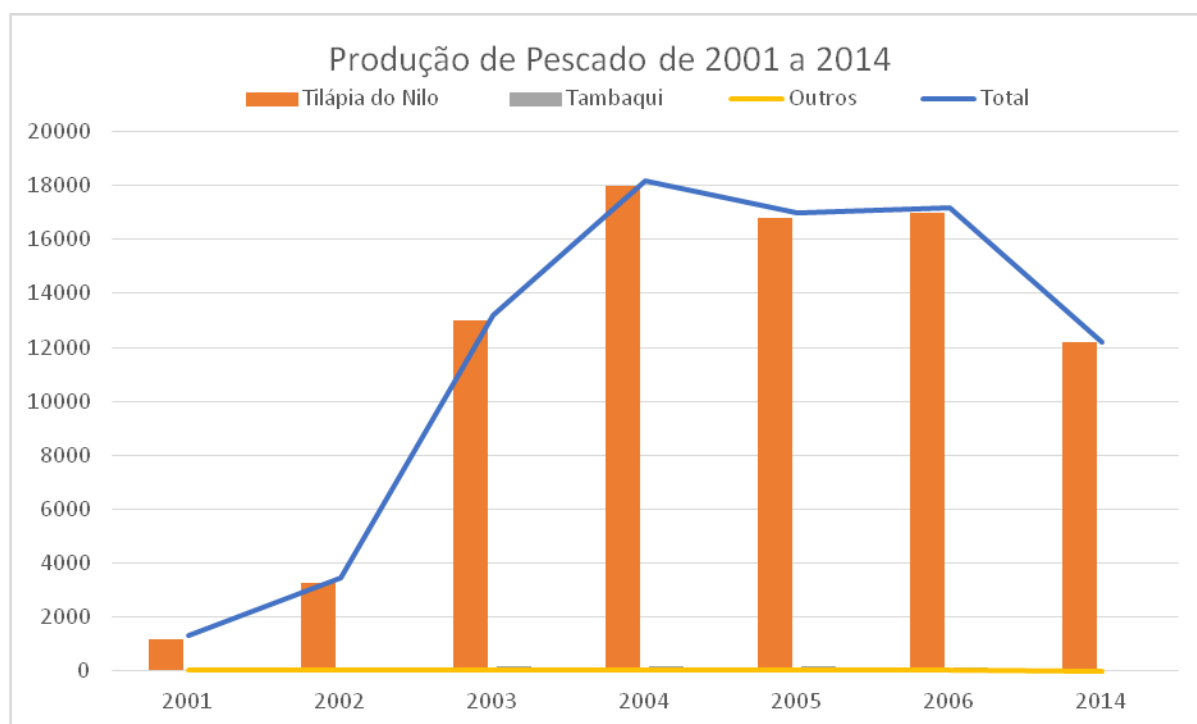
Fonte: Espécies – Piscicultura Pesca Maravilhosa

Em um panorama histórico, O DNOCS/CE contabilizou as espécies de água doce mais cultivadas no estado do Ceará durante os anos de 2001 a 2007. Observa-se que a tilápia, é de longe, a espécie de cativeiro mais cultivada (DNOCS, 2016).

Tabela 1: Produção de peixes de cativeiro no Ceará de 2001 a 2006 em toneladas

Espécie	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Tilápia do Nilo	1169	3273	13000	18000	16800	17000
Tambaqui	103,5	124	149	149	149	142
Outros	22	26,5	32	32	32,5	35
Total	1294,5	3423,5	13181	18181	16981,5	17177

Fonte: DNOCS (2007 e 2014)

Figura 2: Produção de pescado de 2001 a 2014 em toneladas (t)

Fonte: (Compilado DNOCS (2007 e 2015))

Corroborando com os dados apresentados anteriormente e analisando o histórico de produção, o Estado do Ceará se tornou o maior produtor nacional de tilápia de cativeiro. Segundo Carioca et al. (2010), o grande número de açudes no estado, principalmente de açudes públicos é um fator que impacta positivamente para o desenvolvimento da atividade de piscicultura da região.

Dados de 2015 mostram que apesar da seca que perdura há 4 anos no semiárido nordestino, a produção de tilápia de cativeiro e na pesca extrativa renderam juntas 12900 toneladas (DNOCS, 2016).

O cultivo de peixes, mais especificamente a tilápia, é remota a dois mil anos antes de Cristo. Existem registros históricos do cultivo de tilápia pelos egípcios em

tanques, onde eram usados para a alimentação da população (JÚNIOR E JÚNIOR, 2006).

Atualmente, a produção de tilápia ocorre pelo sistema de tanques redes. Este sistema de cultivo utilizado na piscicultura possibilita o aproveitamento de ambientes aquáticos já existentes, como por exemplo um açude usado no abastecimento de uma cidade ou no reservatório de usinas hidrelétricas. Outra vantagem do uso desse sistema usado na criação de tilápia são a produção de peixes com maior biomassa. A figura 3 apresenta um sistema de tanque rede (MARENGONI, 2006).

Figura 3: Sistema de cultivo em tanque rede



Fonte: Manoel Pedrosa, EMBRAPA (2015)

3.2 Problemática dos rejeitos da piscicultura

As indústrias que trabalham no processamento do pescado enfrentam sérios problemas na questão do correto manejo dos resíduos, pois muitas vezes existe a falta de visão de que esse material possui grande potencial econômico (DIAS, 2009).

Segundo DIAS (2009), o aproveitamento de resíduos de pescados no Brasil é pequeno, em torno de 50%, e que depende da forma de processamento e da

espécie. A biomassa obtida no país é descartada durante o processo de enlatamento ou em outras linhas de produção, como a filetagem. Dentre esses resíduos englobam-se a cabeça, vísceras, nadadeira, cauda, coluna vertebral, barbatana, escamas e restos de carne.

Do beneficiamento do peixe, o material sólido obtido é destinado principalmente a alimentação animal, mas também pode ser usado na produção de fertilizantes ou produtos químicos. Dependendo da espécie, principalmente em peixes marinhos de águas frias, tal como salmão, este rejeito pode ser também manipulado para ser utilizado na alimentação, pois em sua composição pode conter quantidade significativas de ácidos graxos da família ômega 3 (ω -3) (PESSATI et al, 2001).

Os resíduos sólidos orgânicos ocasionam sérios problemas ambientais, dentre esses a contaminação devido a decomposição do material. Esta decomposição ocasiona, em algumas condições, a formação de “chorume”, uma mistura de ácidos orgânicos. O chorume além de remover oxigênio do ambiente, é rico em nutrientes, o que acarreta em crescimento de microrganismos e consequentemente ocasiona um desequilíbrio nesse sistema (DECKER, 2016).

Ainda segundo Pessati et al. (2001), o óleo de peixe apresenta grande potencial para ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel, pois contem em sua composição ácidos graxos de cadeia longa, e por ser uma fonte abundante no Brasil.

Conforme já mencionado, a tilápia do Nilo é o peixe mais cultivado do Brasil. No seu beneficiamento, somente 30% corresponde ao filé e os 70% compreendem os resíduos (FELTES et al., 2010). O termo resíduos representa o produto gerado que possui baixo valor. Entre os resíduos do beneficiamento do peixe encontram-se a cabeça, a carcaça, nadadeiras, escamas e as vísceras (VIDOTTI e BORINI, 2006). Na tilápia, a cabeça, a carcaça e as vísceras compreendem cerca de 54% do material residual (ARRUDA, 2004).

O uso das vísceras de tilápia para a produção de biodiesel, além do viés econômico, pois agrega valor a um resíduo, tem um forte apelo ambiental por evitar o despejo deste material sem prévio tratamento no meio ambiente. Há relatos de que essas vísceras são lançadas nos mananciais, enterradas ou simplesmente deixadas pelo solo (VIDOTTI e GONÇALVES, 2006).

A utilização do biodiesel permite economia com a importação de petróleo e óleo diesel, além dos efeitos positivos associados a redução da poluição ambiental e questões sociais, pois gera alternativas de empregos em áreas menos atraentes para outras atividades econômicas. Além do mais, acarreta economia para regiões mais afastadas, pois o custo de se manter estações que utilizam óleo diesel é elevado (MME, 2016).

3.3 Biodiesel

Os biocombustíveis são uma alternativa viável para a substituição dos combustíveis fósseis. Dentre as fontes de biocombustíveis conhecidas, o biodiesel é uma das que apresenta maior destaque (SONG et al., 2016).

Segundo Silva et al. (2016), o biodiesel pode ser definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos. As fontes de óleos para a produção desse biocombustível podem ser vegetais ou animais. O outro reagente utilizado na reação é um álcool de cadeia curta tal como o metanol e o etanol. A reação acontece utilizando-se um catalisador.

No Brasil, a agência reguladora dos combustíveis, onde se enquadra o biodiesel, é a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). A agência foi criada em 1997, mas entrou em exercício em 2008. A ANP é vinculada ao Ministério de Minas e Energias. No ano de 2005, a agência teve suas atribuições expandidas para os biocombustíveis.

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), programa lançado pelo governo federal, tinha como objetivo inicial introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. Com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, o principal resultado dessa primeira fase foi a definição de um arcabouço legal e regulatório. Conforme a Lei nº 13.623/2006, o percentual de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo tem que ser 8% (ANP, 2017).

Para ser considerado biodiesel no Brasil, a mistura de ésteres deve obedecer às especificações da Resolução ANP nº 7, de 19.03.2008. A tabela 2 (Pag. 27) apresenta as especificações exigidas. Alguns parâmetros foram suprimidos da tabela pois as análises não foram realizadas neste trabalho (ANP, 2008).

Tabela 2: Especificações para o Biodiesel

Característica	Unidade	Limite
Massa específica a 20°C	Kg/m ³	850-900
Viscosidade cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0
Ponto de fulgor, mín.	°C	100
Índice de acidez, máx.	mgKOH/g	0,5
Índice de lodo	gl ₂ /100g	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	h	6
Teor de éster, mín.	% massa	95%

Fonte: Dados computados da ANP (2008)

Dentre as características positivas que o biodiesel apresenta destacam-se a integração entre o social, o econômico e o ambiental. O biodiesel é eficiente, pois apresenta índice de cetano semelhante ao do diesel de petróleo. Ele é biodegradável, onde 90% do seu material se decompõe em cerca de 21 dias. Em comparação com a emissão de compostos tóxicos emitidos pela queima de petróleo, o biodiesel apresenta menores valores e toxicidade muito baixa em relação ao diesel (SANTANA et al., 2016).

No âmbito econômico, quando se inseriu o biodiesel na matriz energética brasileira, houve um incremento na geração de emprego e renda, pois agregou-se, principalmente, valor as matérias-primas. Outra consequência notória é a redução das importações de óleo cru e diesel refinado (LIMA et al., 2015).

Segundo Lopes et al. (2008), a utilização de biocombustíveis como o biodiesel, reduzem a emissão de poluentes tóxicos para a atmosfera, assim como os danos ao solo, as águas, lençóis freáticos, fauna e flora são protegidos quando se usam óleos residuais, como o óleo de fritura, para a geração de biodiesel.

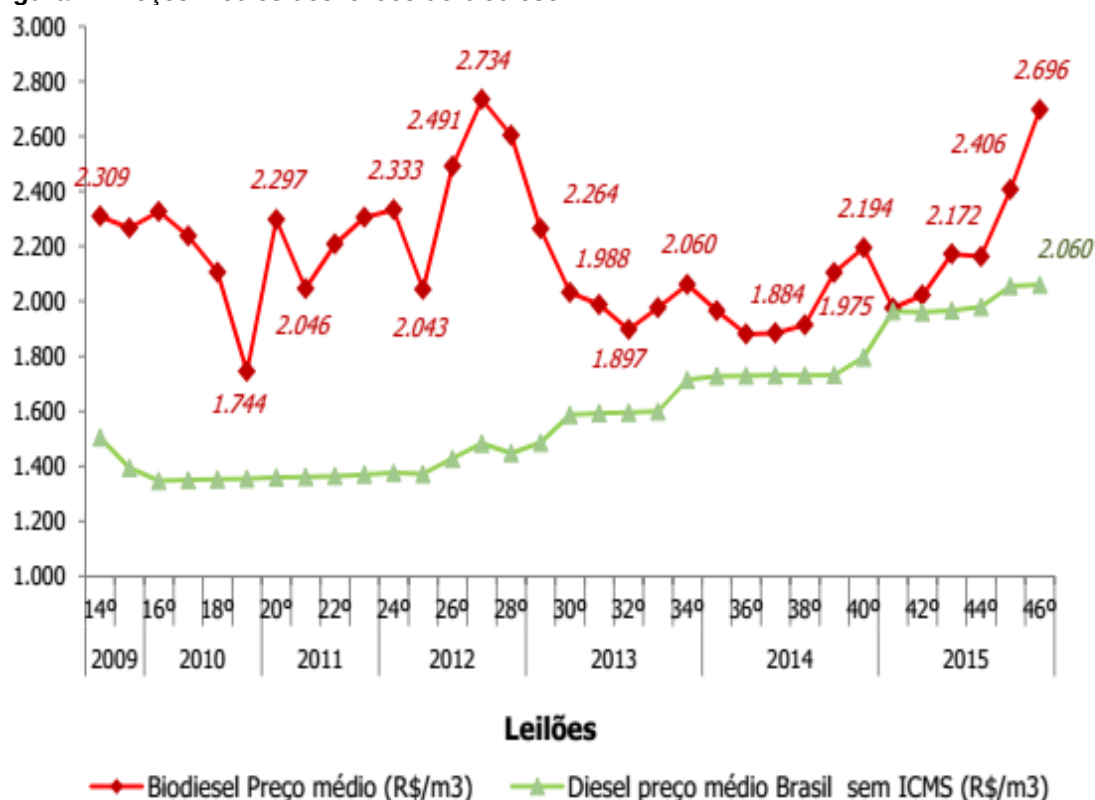
No setor do agronegócio, este responde em grande parte pelo consumo de combustíveis fósseis. Segundo dados da Empresa de Pesquisas Energéticas (EPE), do Ministério de Minas e Energias, no ano de 2013, o Brasil consumiu mais de 48 milhões de diesel de petróleo, deste montante, 5,9 milhões foi empregado no setor do agronegócio. Este valor representa 14,25% do total produzido.

Já no ano de 2015, foram produzidos 3,9 bilhões de litros de biodiesel, o que representa um aumento de 15% em relação a 2014. Já foram produzidos 21,3 bilhões de toneladas desde 2005, ano de implementação do Programa Nacional de

Produção e Uso do biodiesel (PNPB). Com este montante, o Brasil manteve-se como o segundo maior produtor e consumidor mundial, ficando apenas atrás dos EUA. (EPE, 2015).

Numa análise de mercado, o gráfico da figura 4 (Pag. 28) apresenta o valor médio do m³ de biodiesel e do diesel de petróleo de 2009 a 2015. A forma que a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) comercializa esses biocombustíveis são através de leilões.

Figura 4: Preços médios dos leilões de biodiesel



Fonte: ANP (2016)

Em termos de produção, as campeãs de produção de biodiesel são as regiões Centro-Oeste e Sul. Até fevereiro de 2017, somente estas duas regiões consumiram 83% de todo o biodiesel no corrente ano. A figura 5 (Pag. 29) apresenta o percentual produzido em cada região do Brasil.

Figura 5: Produção Regional de Biodiesel – 2015

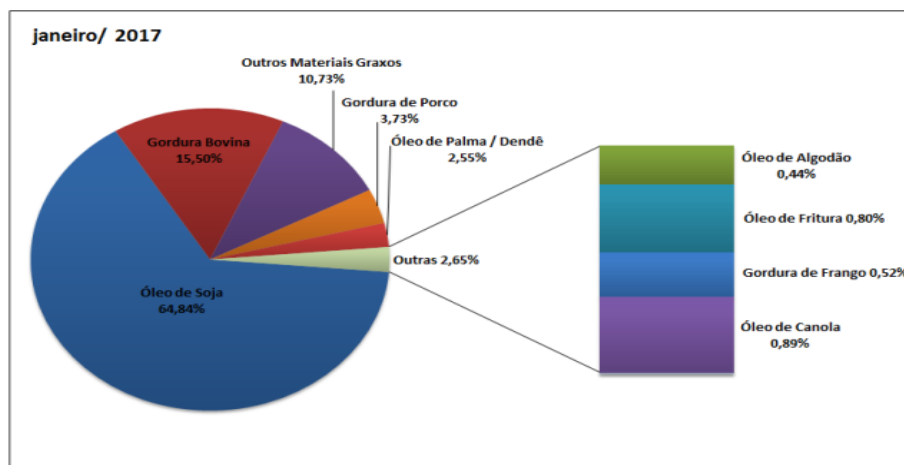
Região	Capacidade autorizada (m ³)	Produção Mensal de Biodiesel ¹ (m ³)	Demanda B100 ² (m ³)
Centro-Oeste	243.638	113.702	35.846
Nordeste	37.954	20.108	48.638
Norte	20.130	188	25.548
Sudeste	82.833	24.078	109.437
Sul	243.370	97.284	57.825
TOTAL	627.924	255.361	277.293

Fonte: ANP

No Ceará, a única usina autorizada a funcionar era a PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEIS, descontinuada de suas operações em novembro de 2016. A usina localizava-se na cidade de Quixadá, e sua capacidade de produção era de 301,71m³/ dia de biodiesel. Atualmente, a maior usina de produção de biodiesel encontra-se no Estado do Mato Grosso, onde a sua capacidade de produção diária é de 1352m³/dia.

De acordo com Santana et al. (2016), a oleaginosa mais utilizada para a produção de biodiesel é a soja. A principal queixa em relação a sua utilização está no fato de haver competição com seu uso na alimentação.

No Brasil, dados levantados pela EPE através do Ministério de Minas e Energias e da ANP mostrou que em fevereiro de 2017, a principal fonte de produção de biodiesel foi a soja. A figura 6 (Pag. 30) apresenta a quantidade de biodiesel produzido através de sebo bovino, que antes era um material de descarte.

Figura 6: Participação de matérias-primas para a produção de biodiesel (%)

Fonte: ANP (2017)

Uma potencial fonte de produção de biodiesel e derivados se encontram nos óleos residuais dos peixes. Uma fonte deste óleo encontra-se na tilápia, onde o óleo extraído de suas vísceras possui potencial para produção de biodiesel. Dados levantados por Santos et al. (2010) mostram que a tilápia é o peixe mais cultivado do país, onde sua produção corresponde a 38% do total. As vísceras correspondem de 7,5 a 15% da massa corpórea, e deste montante até 45% é óleo que pode ser usado para produzir biodiesel.

Para Santana et al. (2016), apesar de todas as vantagens do biodiesel frente ao diesel de origem fóssil, é importante mencionar-se algumas desvantagens: os valores de NOx são maiores no biodiesel; o custo de produção é mais elevado, fazendo com que o biodiesel seja economicamente menos viável.

Como já mencionado, o biodiesel pode ser produzido a partir de uma fonte vegetal, animal e os óleos residuais. Por regra, os óleos de origem vegetal utilizados na produção de biodiesel são os que possuem elevado peso molecular. No mundo, existem cerca de 280 espécies aptas para serem utilizadas na produção do biocombustível, mas as espécies mais utilizadas são a soja, o girassol e o milho. Destas espécies a mais amplamente utilizada é a soja, que apesar de possuir um conteúdo proteico maior, é a mais cultivada tendo seus custos de produção reduzidos (TEIXEIRA, 2011).

No Brasil, a soja é também a espécie mais cultivada. Esta oleaginosa possui apenas 20% de seu conteúdo em óleo. O girassol, muito cultivado em Portugal, possui conteúdo que varia de 35-40% de peso em óleo (TEIXEIRA, 2011).

Espécies como o girassol e a soja, que são espécies ricas em ácidos graxos poli-insaturados e proteínas, respectivamente, podem chegar a faltar na casa do consumidor, pois a demanda por alimentos saudáveis é crescente (TEIXEIRA, 2011).

Uma alternativa para a produção de biodiesel está nas gorduras animais, tais como o sebo bovino e o óleo de peixe. O sebo bovino apresenta tal expectativa pois é um coproduto dos abatedouros e conseqüentemente é vendido a preços muito baixos.

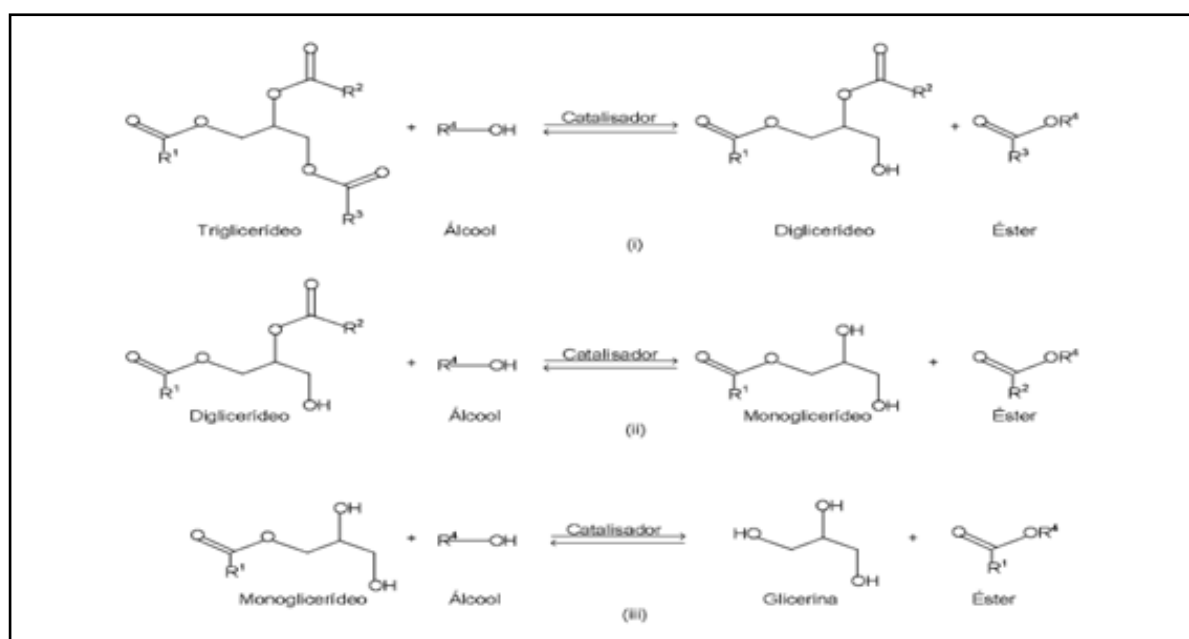
Outra vantagem do sebo bovino é em seu uso não alimentar, pois existem preocupações referentes a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina (BSE). Uma desvantagem do uso de sebo bovino é seu elevado conteúdo em ácidos graxos saturados, que o torna sólido na temperatura ambiente sendo necessário seu aquecimento e conseqüente consumo de energia para seu armazenamento.

No tocante as matérias-primas animais, os óleos de peixe são uma promissora alternativa para compor a matriz de matérias-primas para a produção de biodiesel. Pesquisas realizadas pela Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC) em 2010 mostraram o relevante potencial das vísceras do peixe como fontes de matéria-prima para produção de biodiesel, pois no peso total do pescado, 10% da sua massa são vísceras, 50% é óleo de onde obtêm-se rendimento de 90% de biodiesel (MARTINS, 2012).

Para corroborar e aumentar o interesse pela pesquisa na área de biocombustíveis oriundos de óleo de peixes, um documento lançado pela FAO sobre a produção pesqueira no Brasil revelou que o país apresentará um aumento de 104% até 2025, valor este superior a expectativa da produção na América Latina e Caribe, e que segundo os pesquisadores obterão um aumento de cerca de 39,9% (FAO, 2016).

Quimicamente, o biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos (quando se usa metanol ou etanol) obtidos da reação denominado transesterificação. A transesterificação é uma reação catalisada por ácidos, bases, enzimas, catalisadores sólidos como as zeólitas dentre outros. A reação ocorre em três etapas, onde são formados dois intermediários, os diglicerídeos e os monoglicerídeos. Além dos ésteres de ácidos graxos obtidos no final da reação é obtida também a glicerina. A figura 7 apresenta o esquema reacional da reação.

Figura 7: Esquema reacional da reação de transesterificação



Fonte: ALVES (2012)

A partir da sua análise infere-se que a proporção estequiométrica da reação é 3 mols de álcool para 1 mol de triglicerídeos. Como o objetivo da reação é a obtenção máxima dos ésteres metílicos ou etílicos, adiciona-se um excesso de álcool, o que acarretará um deslocamento do equilíbrio para a formação de produtos (ALVES, 2012).

Na primeira etapa tem-se a quebra do triglicerídeo, base dos óleos e gorduras, liberando uma molécula do éster e uma molécula de diglicerídeo. Na etapa 2, o diglicerídeo formado na etapa anterior reage com outra molécula de álcool para a liberação do segundo éster e a formação do monoglicerídeo. A terceira e última etapa da reação envolve a liberação da terceira molécula de éster e de uma molécula de glicerina. Em termos da lei de velocidade, a equação cinética pode ser descrita segundo a fórmula 3.1.

$$v = - \frac{d[TG]}{dt} = k_1[TG][AL]^3 - k_2[GL][E]^3 \quad \text{Eq. 3.1}$$

Em que v é a velocidade, $[TG]$ a concentração de triglicerídeo, $[AL]$ a concentração de álcool, $[GL]$ a concentração de glicerina e $[E]$ a concentração de éster.

Quando metanol é adicionado em excesso, a reação reversível pode ser desconsiderada.

O outro produto formado é a glicerina, com alto valor agregado é muito utilizada em indústrias de síntese de resinas, aplicações farmacêuticas, indústria de cosméticos, alimentícias dentre outros (BIODIESELBR, 2016).

3.4 Catálise homogênea

Como já mencionado, o biodiesel é o produto da reação de transesterificação. Para que a reação ocorra de forma hábil, são utilizados catalisadores. Os catalisadores podem ser divididos em duas categorias: catalisadores homogêneos e heterogêneos. Na catálise homogênea utiliza-se ácidos, bases, carbonatos dentre outros (DEGIRMENBASI et al, 2015).

Na catálise básica, devido a problemas de formação de sabão, os óleos necessariamente precisam passar pelo processo de refinamento, para que assim se tenha teores mais baixos de ácidos graxos livres (ATADASHI et al., 2013). Fukuda et

al. (2001) recomendam que as matérias-primas utilizadas na catálise alcalina possuam acidez de até 4 mg KOH/g.

Quando se possuem matérias-primas com maiores teores de ácidos graxos livres, é preferível a utilização da catálise ácida. Os ácidos clorídrico, sulfúrico, sulfônico e fosfórico estão entre os mais utilizados na catálise homogênea da transesterificação. Além da vantagem do uso de ácidos na catálise ácida em matérias-primas mais degradadas, esta rota é preferível na produção de biodiesel com características pré-definidas. Uma desvantagem do uso de ácidos como catalisadores é a presença de água na reação, pois pode ocorrer a hidrólise (FUKUDA et al., 2001).

3.6 Catálise enzimática

Os catalisadores enzimáticos, mais especificamente as lipoenzimas imobilizadas, vem se mostrando uma fonte potencial para uso na obtenção de biodiesel. Dentre as principais vantagens da utilização desse tipo de catalisador estão a não formação de resíduos, como ocorre na catálise básica, a fácil separação das fases, e o reaproveitamento da enzima. Devido a sua especificidade pode ser utilizada em óleos que possuam altas taxas de ácidos graxos livres. Uma desvantagem está no fato do alto custo da enzima, o que encareceria o valor final do produto em escala industrial (LAM et al., 2010).

O uso da catálise enzimática torna-se atraente quando se coloca em destaque os problemas ocasionados pela catálise homogênea. Problemas de corrosão nos tanques de armazenamento, formação de produtos indesejáveis, contaminação das águas de lavagem fazem com que o biodiesel se afaste das características de ser um “amigo da natureza” (GOG et al., 2012; ANTCZAK et al., 2009).

Para efeito de comparação, a partir do trabalho de Aarthy et al. (2014), foi montada a tabela 3 que relaciona algumas características das catálises ácida, básica e enzimática. Nota-se que o uso de enzimas se torna viável para óleos que possuem um teor de ácidos graxos livres mais elevados, como os óleos residuais do pescado. Outra característica relevante da catálise enzimática, é que a temperatura ambiente já fornece condições adequadas para a produção de biodiesel. Outra

observação acerca da temperatura está no fato de haver menor custo com consequente valor final menor.

Tabela 3: Principais Características dos catalisadores utilizados na transesterificação

Parâmetro	Método Químico		
	Ácido	Alcalino	Enzimático
% Biodiesel	>90%	>96%	>96%
Ácidos Graxos Livres	Convertido em Biodiesel	Forma sabão	Convertido em biodiesel
Parâmetro	Método Químico		
	Ácido	Alcalino	Enzimático
Água no substrato	Interfere na reação	Interfere na reação	Sem influência
Purificação ésteres metílicos	Necessária lavagem	Necessária lavagem	Não é necessário
Recuperação Glicerina	Complexo e pouco glicerol	Complexo e pouco glicerol	Fácil e muito glicerol
Tempo de reação	Rápido	Rápido	Lento
Temperatura de reação	>100°C	60- 80°C	20- 50°C
Recuperação de catalisador	Difícil	Difícil	Fácil
Reuso catalisador	Não	Não	Sim
Custo do catalisador	Baixo	Baixo	Alto

Fonte: Dados compilados e traduzidos de AARTHY et. al. 2014

De acordo com Gog et al. (2012), existem dois tipos de lipases: as lipases extracelulares e as lipases intracelulares. Nas lipases extracelulares, a enzima foi previamente extraída e purificada a partir dos microrganismos vivos. As lipases intracelulares são caracterizadas pela permanência no interior das células.

Dentre as enzimas pesquisadas e utilizadas na indústria, a Lipozyme TL IM (TLL) é imobilizada da levedura *Thermomyces lanuginosus*. Ela é considerada uma enzima versátil e amplamente utilizada em processos industriais e em testes laboratoriais (FU et al 2014).

A TLL é uma proteína que consiste da ligação entre 269 aminoácidos. Seu peso molecular é 31700g/ mol. A enzima é estável e sua atividade se estende até 60°C. Sua atividade máxima é registrada em pH 9. Para a maioria das enzimas, uma

imobilização prévia se faz necessária. O objetivo da imobilização é a sua reutilização, onde a enzima imobilizada deve ser suficientemente estável para ser reutilizada em nova reação (LAFUENTE, 2010).

A especificidade da lipoenzima TL IM, onde de acordo com Lafuente (2010) são as posições 1 e 3 do triglicerídeo. A reação com o grupo 2 ocorre principalmente pela mudança do grupo acila para a posição 1.

A lipoenzima TL IM destaca-se na produção industrial devido as suas propriedades de seletividade. Segundo ZANOTTO (2003) os principais tipos de seletividade são:

- Quimiosseletividade, onde o sitio ativo da enzima possui afinidade com um determinado grupo funcional ocasionando assim a preservação de outras áreas da molécula que normalmente reagiriam em um outro tipo de catálise.
- Regiosseletividade, pois devido à complexidade da sua estrutura tridimensional, as enzimas conseguem distinguir os grupos funcionais quimicamente iguais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula-substrato.
- Enantiosseletividade. Sendo as enzimas consideradas catalisadores quirais devido elas serem formadas por L- aminoácidos, acarretam que qualquer tipo de quiralidade ou pró-quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato.

3.7 Fatores que alteram a catálise enzimática

3.7.1 Efeito do metanol

Como já mencionado, a transesterificação catalisada por enzimas é a que apresenta maior número de características positivas com relação ao meio ambiente, pois é necessário menor consumo energético e a especificidade enzima-substrato. Os álcoois utilizados nas reações de transesterificação são de cadeia curta, como o metanol, etanol, propanol e butanol. O metanol e o etanol são os que mais se destacam. Dentre os dois, o metanol é o mais utilizado, pois reage mais facilmente com o triglicerídeo, permite a melhor separação da glicerina e melhora a atividade enzimática devido a sua polaridade. Mas apesar do metanol em excesso deslocar o

equilíbrio para a formação de produtos pode também desativar a enzima quando estiver em excesso. Uma forma de se evitar a desativação é a adição fracionada do metanol durante a reação (KO et al., 2012).

3.7.2 Efeito do co-solvente

As reações de transesterificação não ocorrem com fase homogênea, pois os reagentes são parcialmente imiscíveis. Este fato provoca uma velocidade de reação menor, onde como alternativa primária se faz a elevação da temperatura, para se diminuir a viscosidade do óleo. A utilização dessa prática acarreta em maior consumo energético e consequente aumento no preço do produto final. Uma alternativa para esta situação está na utilização dos co-solventes, que dissolvem as fases e facilitam a reação (ROOSTA e SABZPOOSHAN, 2016).

Segundo Teixeira (2011), a presença de um solvente hidrofóbico, como o hexano, poderia levar a um aumento no rendimento da reação, pois se controlaria a difusão do álcool pelos centros ativos da enzima. Um detalhe a ser observado pelo pesquisador é que a concentração de co- solvente deverá ser baixa, pois um excesso acabaria em inativação da enzima.

Ainda segundo Teixeira (2011), o uso de co- solventes na transesterificação ocasiona a conversão simultânea de ácidos graxos livres e ligados na molécula de triglicerídeo, o que sugere que possam ser utilizados óleos que possuam um teor mais elevado de ácidos graxos livres.

Neste trabalho, os co-solventes estudados foram o hexano, o tolueno e o éter-etílico.

3.7.3 Efeito da Temperatura

Em sistemas reacionais, a temperatura é um dos fatores mais importantes, pois o seu aumento fornece mais energia ao sistema. As moléculas irão aumentar sua energia cinética e consequentemente colidirão de forma mais efetiva e em maior frequência (CHANG, 2006).

Nas reações catalisadas por enzimas, o controle da temperatura é de suma importância para que o processo obtenha resultados satisfatórios. Para embasar a importância deste controle, Sun e Hun (2017) obtiveram a 70°C rendimento máximo para sua transesterificação enzimática, mas quando se aumentou a temperatura

para 100°C, o rendimento caiu para 5,2%. A explicação apontada pelos autores foi que o aumento excessivo da temperatura provoca desativação gradual da enzima, onde deve haver um ponto de temperatura crítica onde essa se desativa totalmente.

3.8 Análise fatorial

Ao se estudar a otimização de uma reação, muitas vezes é necessário o estudo da influência dos fatores envolvidos de forma isolada e suas interações. Dependendo do número de variáveis e repetições, o número de experimentos pode tornar a pesquisa muito longa ou inviável, já que alguns reagentes são caros ou não estão disponíveis com tanta facilidade.

Uma alternativa para contornar esse problema é o uso de modelos estatísticos. Neste trabalho o modelo utilizado foi o fatorial. Segundo Figueiredo Filho (2010), a principal função da análise é reduzir uma grande quantidade de variáveis observadas a um número reduzido de fatores.

De acordo com Filho e Júnior (2010) existem dois tipos de modelo fatorial:

- Completo: onde se obtêm respostas em todas as combinações de fatores;
- Fracionados: onde o programa gera apenas uma fração dos dados. O modelo fracionado é útil quando as condições operacionais são limitadas.

Dentre as várias formas de expressar os resultados de uma análise fatorial, três das mais utilizadas são os gráficos de Pareto, superfície e contorno. Em um gráfico de Pareto, os resultados são apresentados em forma de barras horizontais organizados do maior para o menor. O gráfico de Pareto é útil para identificação dos valores ou condições de maior impacto, mas não prediz se as variáveis de interesse impactam de forma positiva ou negativa (MINITAB, 2016)

Um gráfico de contorno é um tipo de gráfico que pode ser utilizado para se explorar a relação potencial entre três variáveis. Este tipo de gráfico apresenta a relação tridimensional projetada em duas dimensões onde são apresentadas duas variáveis nos contornos (x e y) e a resposta do problema é apresentado por contornos (MINITAB, 2016). Um gráfico de superfície é um gráfico em 3D onde se permite explorar a relação potencial entre três variáveis.

4 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas as instalações do Laboratório de Análises Químicas e Meio Ambiente (LAQMB) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Campus Maracanaú) e do Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes Professor Ícaro de Souza Moreira (NPL) da Universidade Federal do Ceará. Nesta seção foram abordadas as etapas práticas da pesquisa compreendendo os processos de extração para obtenção da matéria-prima, obtenção do produto final e caracterização das espécies envolvidas. Também foram apresentados os equipamentos utilizados na quantificação e caracterização do biodiesel obtido.

4.1 Obtenção da matéria-prima

As vísceras de tilápia foram coletadas em uma peixaria no bairro Presidente Kennedy, em Fortaleza- Ceará. A matéria prima encontrava-se sem a bile e esta foi armazenada em um freezer para garantir a sua conservação até o processo de extração do óleo.

4.2 Enzima

A enzima utilizada no trabalho foi a lipoenzima TL IM. O catalisador foi doado pela Universidade Federal do Ceará. O material enzimático encontrava-se na forma sólida e estava armazenado em um frasco em ambiente de nitrogênio.

4.3 Extração e Pré-tratamento do óleo

Para o estudo da transesterificação, o óleo de tilápia passou por processos físicos e químicos que compreendem desde sua purificação até obtenção do óleo refinado.

Na fase de extração, as vísceras foram trituradas em um liquidificador comum. A pasta formada foi aquecida em uma temperatura de 60°C por 90 minutos. Após esse tempo, observou-se a formação de três fases. Uma fase superior líquida, uma fase inferior líquida e uma fase sólida no fundo do recipiente.

Para promover a separação da fase superior menos densa em que se encontrava o óleo, adicionou-se hexano a mistura. Em seguida, esta solução foi

colocada em um funil de decantação. Após a decantação e remoção das fases indesejadas, a solução foi filtrada utilizando-se papel de filtro comum e preenchido com sulfato de sódio anidro para remoção da umidade residual. O hexano foi separado da fração oleosa por rotoevaporação sob pressão reduzida. Denominou-se óleo bruto o material obtido.

4.4 Obtenção do óleo refinado

Visando obter uma matéria-prima de melhor qualidade para a produção de biodiesel, o óleo bruto foi submetido a um processo de refino, que consistiu de neutralização seguida de branqueamento. Estas etapas seguiram as recomendações dispostas pela American Oil Chemistry Society (AOCS), método Ca 9b-52.

4.4.1 Neutralização

Previamente à etapa de neutralização, foi calculado o índice de ácidos graxos livres (AOCS Ca 5a-40). Com o valor desse índice e conhecendo-se a massa do óleo, foi adicionado a esta uma quantidade pré-determinada de solução aquosa de hidróxido de sódio a 20%. A tabela contendo o valor de ácidos graxos livres e a quantidade de base a ser adicionada encontra-se na seção ANEXOS. A mistura foi agitada a 250 rpm por 45 minutos à temperatura ambiente. Logo após, a mistura foi aquecida a 60°C por 12 minutos sob agitação de 60 rpm. Decorrido esse tempo, o óleo permaneceu em repouso a mesma temperatura por uma hora. A mistura foi então centrifugada e o sobrenadante separado, sendo denominado de óleo neutralizado.

4.4.2 Branqueamento

Ao óleo neutralizado foram adicionadas as terras ativadas nas proporções de 5% de argila, 3% de sorbicyl e 1% de diatomita totalizando 9% em relação a massa de óleo. A mistura foi aquecida a 100°C sob pressão reduzida, em agitação constante por 30 minutos. Após este tempo a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi denominado óleo refinado.

4.5 Metodologias Analíticas Pré e Pós-tratamento

As metodologias analíticas foram aplicadas para o óleo bruto e refinado, sendo estas:

4.5.1 Índice de Acidez

O índice de acidez é definido como a massa (mg) de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de óleo ou gordura (MOURA, 2010).

De acordo com Machado, Chaves e Antoniassi (2015) o índice de acidez está ligado ao grau de conservação de um óleo. Para os pesquisadores o refino se torna importante pois acarreta em uma diminuição significativa da acidez.

Na determinação do índice de acidez foi utilizado o método AOCS Cd 3d-63 (1988). Uma alíquota de 2,0 g do óleo bruto foi solubilizada em 25 mL de uma solução binária éter etílico/etanol na proporção 2:1. Em seguida adicionou-se quatro gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. As amostras foram tituladas com solução padronizada de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (ou $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ quando o volume gasto na titulação foi inferior a 0,5 mL) até o aparecimento de uma coloração rósea persistente por 30 segundos.

O índice de acidez foi expresso em miligramas de KOH por grama de óleo (mgKOH/g), e foi calculado segundo a equação abaixo:

$$I.A\left(\frac{\text{mg KOH}}{\text{g}}\right) = \frac{V * f * M * 56}{P} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Em que V representa o volume em mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01M, f é o fator de correção da solução de hidróxido de sódio, M a concentração molar da solução alcalina e P a massa em gramas da amostra.

Outra forma de se expressar a acidez é através da porcentagem de ácidos graxos livres (%AGL). Considerando-se que a média dos pesos molares dos ácidos graxos presentes em um óleo seja o peso molar do ácido oleico, a equação pode ser descrita como:

$$\%AGL = \frac{V * f * M * 28,2}{P} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Ou resumindo-se os termos:

$$\%AGL = 0,503 * IA \quad (\text{Eq. 4.3})$$

4.5.2 Índice de Peróxido

O índice de peróxido é um dos parâmetros mais utilizados para medir o estado de oxidação de óleos e gorduras. Segundo Malacrida e Jorge (2006), o índice de peróxidos nos óleos não deve ultrapassar o valor de 10 meq/ 1000g de amostra.

No processo de oxidação, os ácidos graxos insaturados, principalmente os ácidos graxos que possuem duas ou mais insaturações, são oxidados formando hidroperóxidos inodoros e insípidos, os quais são degradados a compostos secundários com maior estabilidade. Assim como a análise de acidez, a análise do índice de peróxido traz informações sobre o grau de degradação do óleo vegetal e consequentemente do biodiesel (FATTAH et al., 2014).

Para medir o índice de peróxido, 5,00 g ($\pm 0,05$) de óleo foram solubilizados em uma solução binária de ácido acético/clorofórmio 3:2. Adicionou-se em seguida 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Deixou-se em repouso por 1 minuto e então adicionou-se 30 mL de água destilada previamente aquecida e resfriada. Titulou-se com solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 mol. L^{-1} até o aparecimento uma coloração amarela. Após aparecimento desta cor, foi adicionada solução de amido e continuou-se a titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ até o desaparecimento da coloração azul (A.O.C.S. método Cd 8-53).

O índice de peróxido foi expresso em miliequivalentes por 100 g de amostra (meq/100g). Este valor foi obtido a partir da equação 4.4. Em que A é o volume de tiosulfato de sódio em mL gasto na titulação da amostra, B é o volume de tiosulfato de sódio em mL gasto na titulação do branco, f é o fator de conversão da solução de tiosulfato de sódio e P a massa em gramas da amostra.

$$IP = \frac{(A - B) * N * f * 1000}{P} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

4.5.3 Índice de Iodo pelo método de Wijjs

O índice de iodo também é uma medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no óleo ou na gordura. É determinado como o número de gramas de iodo absorvido por 100 g de gordura ou óleo (AOCS, 1995).

Pesou-se aproximadamente 0,25 g de óleo em um erlenmeyer de 500mL com tampa e adicionou-se 10 mL de clorofórmio. Em seguida transferiu-se, com auxílio de bureta, 25 mL de solução de Wijjis. Tampou-se e agitou-se cuidadosamente com movimentos de rotação, assegurando a perfeita homogeneização. A mistura permaneceu em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100mL de água recentemente fervida e resfriada. A etapa seguinte consistiu na titulação com solução tiossulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Quando a cor surgiu, adicionou-se de 1 a 2 mL de solução indicadora de amido 1% e continuou-se a titulação até o completo desaparecimento da cor azul. Em paralelo, determinou-se a análise do branco.

Para a determinação do índice de iodo, utilizou-se a equação 4.5.

$$II = \frac{(B - A) * N * f * 12,69}{P} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Em que B é o volume gasto na titulação do branco, A o volume gasto na titulação da amostra, N a concentração em normalidade da solução de tiossulfato de sódio, f o fator de correção e P o peso em gramas da amostra. O valor 12,69 é o miliequivalente de iodo em 100g de óleo.

4.4.4 Índice de saponificação

Para a análise do índice de saponificação utilizou-se a norma AOCS Cd 3 – 25, sendo 2,00 g de óleo pesados seguida da adição de 50mL de solução alcoólica de KOH 4% m/v. A mistura permaneceu em refluxo por uma hora. Posteriormente adicionou-se indicador fenolftaleína, e como titulante solução de HCl 0,5 mol. L⁻¹. A titulação continuou até o aparecimento de uma coloração rósea.

O índice de saponificação pode ser calculado utilizando a seguinte expressão:

$$I.S = \frac{(B - A) * 28,06 * f}{P} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Em quem VB é o volume do branco, VA o volume de HCl gasto na titulação da amostra, f é o fator de conversão e P é a massa da amostra.

O índice de saponificação revela um dado importante sobre o grau de conservação de um óleo. A partir do valor de I.S é possível encontrar-se o peso molecular do triglicerídeo. Para se encontrar esse resultado utiliza-se a equação 4.7 (ALMEIDA, 2010).

$$\text{Massa molecular} = \frac{168000}{IS} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

4.5 Perfil Cromatográfico

Para a quantificação e identificação dos ácidos graxos presentes no óleo de tilápia refinado foi utilizada a técnica analítica cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). Para a preparação da amostra, utilizou-se a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL- método 3).

Nesse procedimento, 100 mg de óleo foram solubilizados em 3 mL de hexano. Em seguida, adicionou-se 4 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio 0,5 M. A mistura foi colocada em banho-maria a 65 °C por 5 minutos. Após resfriamento adicionou-se 5 mL de solução esterificante. Então, agitou-se a mistura por 30 segundos e em seguida novamente aqueceu-se a 65 °C por 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 4 mL de solução de cloreto de sódio saturado, agitou-se por 30 segundos e adicionou-se em seguida hexano. Após esses procedimentos, o tubo contendo a mistura permaneceu em repouso para a separação das fases. Após a decantação, a fração superior foi removida e esta foi injetada no cromatografo.

Previamente a injeção do analito no cromatografo, realizou-se uma cromatografia em camada delgada (CCD) para visualizar possíveis impurezas. Nesta análise, injetou-se através de um capilar uma pequena fração de solução hexânica de óleo e outra do analito, ambas na mesma altura, em uma placa de sílica gel da marca Macherey-Nagel, Alemanha. O eluente utilizado foi uma mistura de hexano/acetato de etila na proporção 10:1.

As análises em CG/EM foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu, equipado com injetor split/splitless. Hélio 6.0 foi utilizado como gás de arraste; temperaturas de operação foram: injetor 250° C, detector 280 °C, interface 280 °C e fonte a 280°C. O programa de aquecimento do forno da coluna foi 80 °C (temperatura inicial, 0 min); aumentando 5°C/min até 180 °C e 20 °C/min até 280 °C;

velocidade linear média, 30 cm/s; volume de injeção de 1 μ L com razão de split de 1:50. A coluna utilizada foi OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Os compostos foram identificados por comparação entre seus espectros de massa com aqueles registrados na espectroteca do equipamento da literatura (ADAMS, 2007).

4.6 Caracterização do biodiesel.

4.6.1 Massa Específica a 20 °C e Viscosidade Cinemática a 40 °C

A massa específica a 20 °C e a viscosidade cinemática a 40 °C das amostras foram determinadas segundo a norma ASTM D-7042-16e1. Para as determinações utilizou-se viscodensímetro digital Stabinger (Figura 8), modelo SVM 3000, da Anton Paar, Áustria, que mede massa específica e viscosidade cinemática (ASTM INTERNATIONAL, 2016). O procedimento consistiu em injetar 5 mL da amostra na célula do equipamento. A leitura é realizada diretamente no visor do equipamento.

Figura 8: Viscondensímetro



Fonte: Autor (2017)

4.6.2 Viscosidade dinâmica a 20°C e 40°C

Nas análises de combustíveis a viscosidade é de suma importância para sua caracterização, pois viscosidade e combustão possuem relação direta para fluídos combustíveis. Tal relação está associada a capacidade de um combustível de baixa viscosidade atuar de maneira menos danosa sobre os bicos injetores durante o processo de vaporiza e difusão do ar, garantindo uma queima mais eficiente. (ABREU et al., 2011).

Para se determinar a viscosidade dinâmica utiliza-se a viscosidade cinemática e a massa específica. Estes dados são relacionados a partir da seguinte equação.

$$\alpha = \rho * \mu \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Onde α é a viscosidade dinâmica, ρ é a massa específica e μ é a viscosidade cinemática.

4.6.3 Ponto de fulgor

Segundo a ANP, o ponto de fulgor é a menor temperatura na qual a amostra vaporiza-se em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável junto com o ar quando se aplica uma centelha.

Para a determinação do ponto de fulgor do biodiesel, utilizou-se um analisador de ponto de fulgor automatizado da Instrumentation Scientific de Laboratories ISL modelo FP93 5G2 (Figura 9). A análise seguiu a norma da ASTM D93, onde foram utilizados 70 mL de biocombustível sendo registrada a temperatura quando a amostra se inflamou.

Figura 9: Analisador de ponto de fulgor ISL FP93 5G2



Fonte: HASE (2010)

4.6.4 Ponto de fluidez

Denomina-se o ponto de fluidez a menor temperatura em que ainda se observa o movimento do fluido.

Para a determinação do ponto de fluidez, foi utilizado o método ASTM D97. Foram utilizados 50 mL de biodiesel no equipamento iSL CPP 5Gs® (Figura 10) (Pag. 46).

Figura 10: iSL CPP 5Gs® para determinação de ponto de fulgor



Fonte: Autor (2017)

4.6.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos a partir da disposição das amostras solubilizadas em MeOH em pastilhas de brometo de potássio (KBr). As análises foram realizadas em um espectrofotômetro FT-IR 100 PerkinElmer, na região de 4000 a 650 cm^{-1} no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR), pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.6.6 Ressonância magnética nuclear protônica (RMN ^1H)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) foram obtidos em espectrômetro Brucker® modelo DPX, operando na frequência de 500 MHz do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), pertencente à Universidade Federal do Ceará.

O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foi o clorofórmio, produzido pela Cambridge Isotope Laboratories.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo sinal de hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente clorofórmio em δ_{H} 7,27.

4.7 Otimização da reação de transesterificação enzimática

Na etapa de otimização da transesterificação enzimática do óleo das vísceras de tilápia foi elaborado um planejamento experimental com modelo fatorial 2^n . Neste, considerou-se 4 variáveis de interesse: %Enzima, proporção

óleo/metanol (m/m), temperatura (°C) e co-solvente. O modelo fatorial utilizado foi o de 2 níveis com um ponto central. Os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando 51 medidas. Para expressar a resposta, utilizou-se a percentagem de conversão em biodiesel (%conversão) após 72 horas de reação.

A tabela 4 (Pag. 47) apresenta as variáveis de interesse juntamente com os seus respectivos níveis de análise.

Tabela 4: Fatores de interesse proposto na pesquisa para otimização da reação de transesterificação enzimática

Variável de interesse	-1	0	+1
% Enzima	10%	20%	30%
Proporção óleo/metanol (m/m)	1:3	1:6	1:9
Temperatura (°C)	27°C	33,5°C	40°C
Co-solvente	Hexano	Tolueno	Éter- etílico

Fonte: Autor (2016)

A massa utilizada de óleo foi de 100 mg em cada experimento. A massa de enzima imobilizada variou de 10 a 30 mg. O volume de co-solvente foi fixado em 3,0 mL em cada experimento. Como metanol em excesso causa a desativação da enzima, foram realizadas 4 adições fixas (1 adição inicial + 1 a cada hora por 3 horas). Portanto, as adições de metanol foram fixadas em 35 uL para o valor mínimo (-1), 70 uL para o valor zero e 105 uL para o valor máximo (+1). O tempo de reação foi de 3 dias. Após o período, o material foi filtrado, a enzima lavada com hexano e o volume total acertado em 5,0 mL com hexano grau cromatográfico para posterior análise em cromatógrafo gasoso. Para a determinação da taxa de conversão a biodiesel foi utilizada a soma das concentrações dos ésteres metílicos palmitato, oleato e estearato, onde a concentração foi pré-determinada por uma curva de área do pico versus concentração. A enzima recuperada foi armazenada para posterior análise.

As análises foram realizadas utilizando-se um CG/FID da marca Thermo Scientific, equipado com injetor split/splitless. Nitrogênio 5.0 foi utilizado como gás de arraste; temperaturas de operação foram: injetor 200° C, detector 280 °C, interface 280 °C e fonte a 280°C. O programa de aquecimento do forno da coluna foi 180 °C (temperatura inicial, 0 min); aumentando 10°C/min até 240 °C e 2 °C/min até 260 °C; e depois a 10°C/ min até 280°C permanecendo nesta temperatura por 5

minutos. A velocidade linear média, 30 cm/s; volume de injeção de 1 µL com razão de split de 1:50. A coluna utilizada foi NST 05 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm).

Foi utilizado o programa Minitab 17 para a análise dos resultados.

4.8 Cinética da transesterificação enzimática

No estudo cinético da reação de transesterificação do óleo das vísceras de tilápia catalisada por lipoenzima TL IM utilizou-se os dados provenientes da otimização reacional.

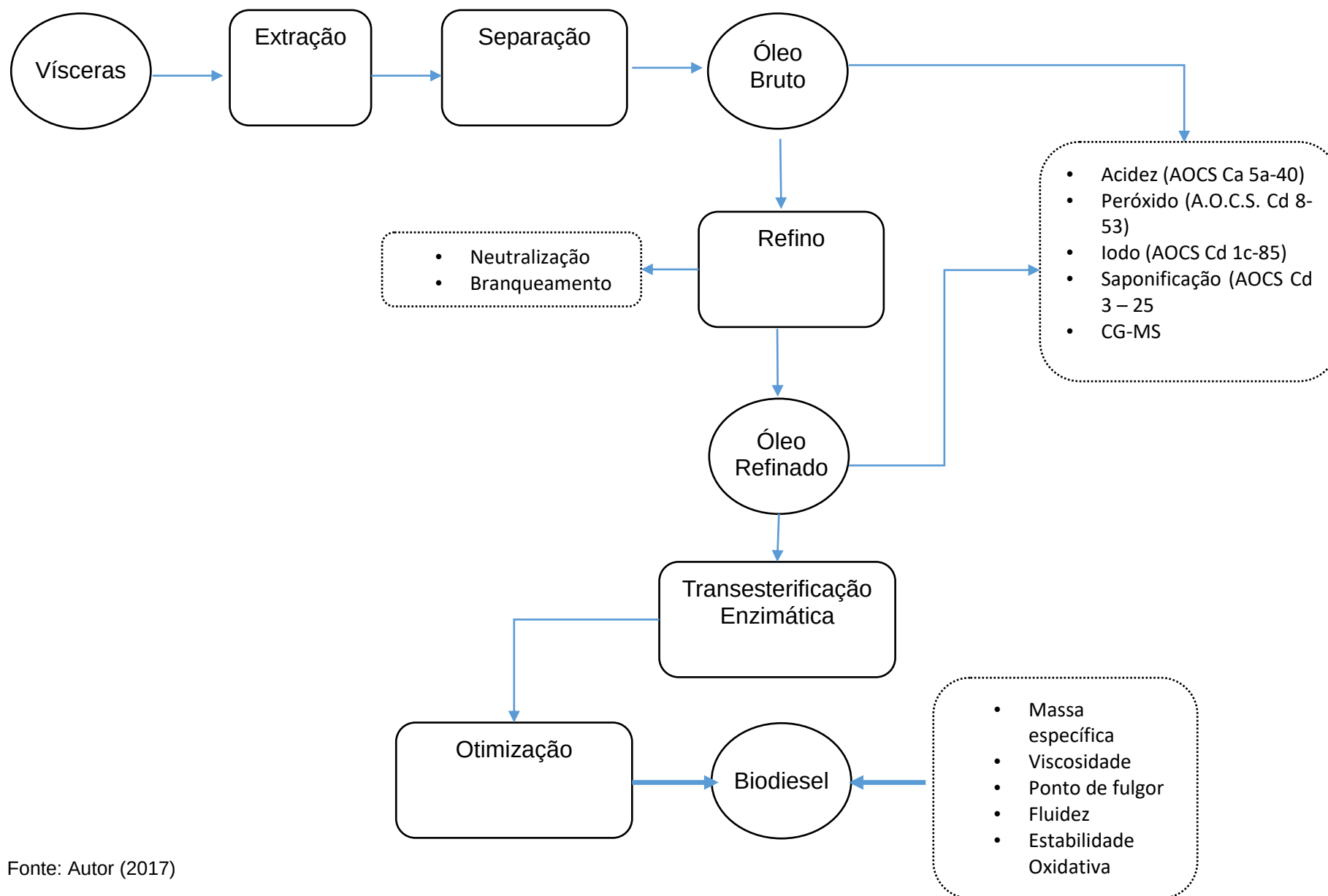
Com esses dados, foi utilizada uma massa de 0,1 g de óleo e 20 mg de enzima (correspondente a 20% m/m). Em seguida foram adicionados 3 mL de hexano e 7 µL de metanol (1+ 3 adições a cada hora). O experimento foi realizado nas temperaturas de 27 °C, 35 °C, 45 °C e 55 °C.

No monitoramento da reação foram usadas curvas padrões dos ésteres palmitato de metila, oleato de metila e estearato de metila, pois no óleo são responsáveis por mais de 70% de sua composição. Utilizou-se o mesmo CG/FID na mesma programação da etapa de otimização.

Após o tempo de estabilização reacional realizou-se a plotagem gráfica dos dados utilizando o programa Minitab 17 a fim de se determinara a ordem da reação. A seguir, as velocidades específicas foram medidas para cada temperatura e com estas um gráfico foi plotado para a determinação da energia de ativação da reação.

4.9 Fluxograma do Procedimento Experimental

Visando uma melhor compreensão a metodologia experimental foi resumida na Figura 11 (Pag. 49).

Figura 11: Procedimento experimental

Fonte: Autor (2017)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Processamento do pescado em peixarias locais.

O pescado processado em peixarias locais apresenta uma melhor qualidade para o consumidor final em virtude de o peixe ser criado, abatido e tratado na própria região. Mas devido ao local de venda, geralmente no centro urbano, como no caso das peixarias de Fortaleza, o material de descarte líquido, como a água de lavagem, é despejado na rede de esgoto ou em fossas sem prévio tratamento. Isso pode acarretar em problemas de contaminação da água e do solo. O material visceral, a pele e as barbatanas são despejados no lixo comum devido à falta de informação e de políticas públicas para o correto manejo desses resíduos.

Na cidade de Fortaleza, as peixarias cultivam a tilápia em pequenos tanques (Figura 12).

Figura 12: Tanque de armazenamento de tilápia



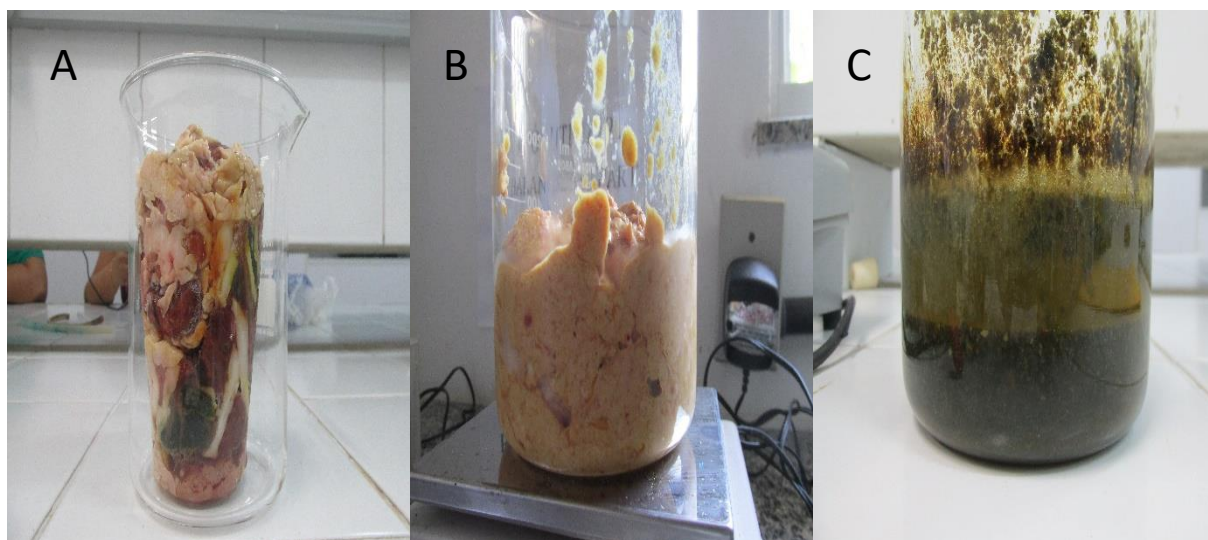
Fonte: Autor: (2016)

5.2 Extração e Pré-tratamento das vísceras de tilápia.

Conforme descrito na metodologia, as vísceras de tilápia (Figura 13A) foram trituradas utilizando-se um liquidificador comum. A pasta formada (Figura 13B) foi então aquecida pelo tempo informado e o resultado foi o aparecimento de duas

fases líquidas com distintas densidades (Figura 13C). A fase superior consistiu predominantemente de óleo.

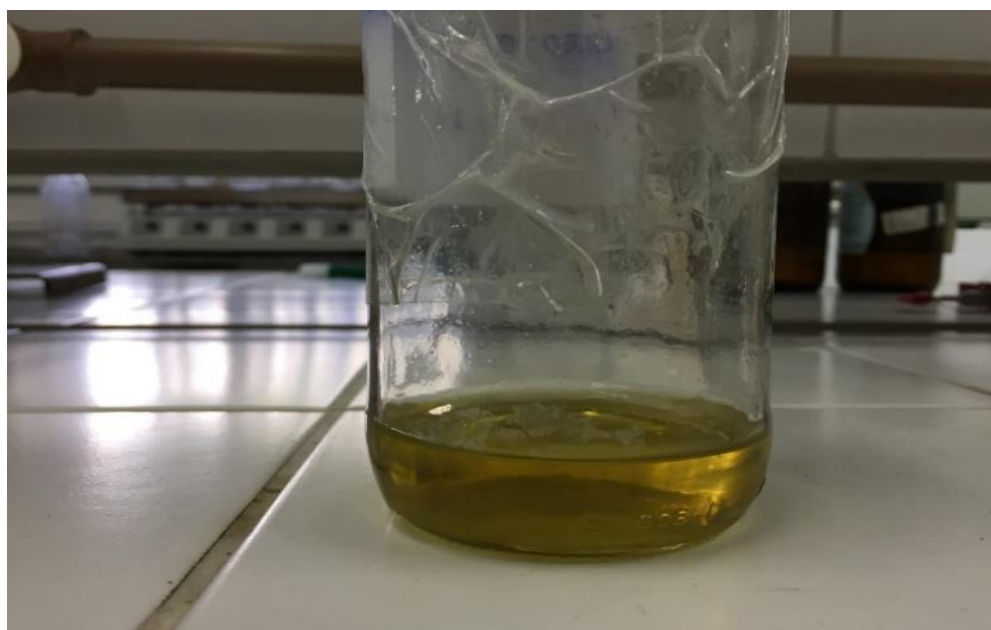
Figura 13: Etapas de pré-tratamento da matéria prima. A: vísceras congeladas; B: Vísceras após trituração; C: Fases orgânicas e aquosa após aquecimento



Fonte: Autor(2016)

Após a filtração, decantação e centrifugação, a fase orgânica diluída em hexano foi rotoevaporada sob pressão reduzida. Após esta etapa, obteve-se o óleo bruto, como ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Óleo bruto de tilápia



Fonte: Autor (2016)

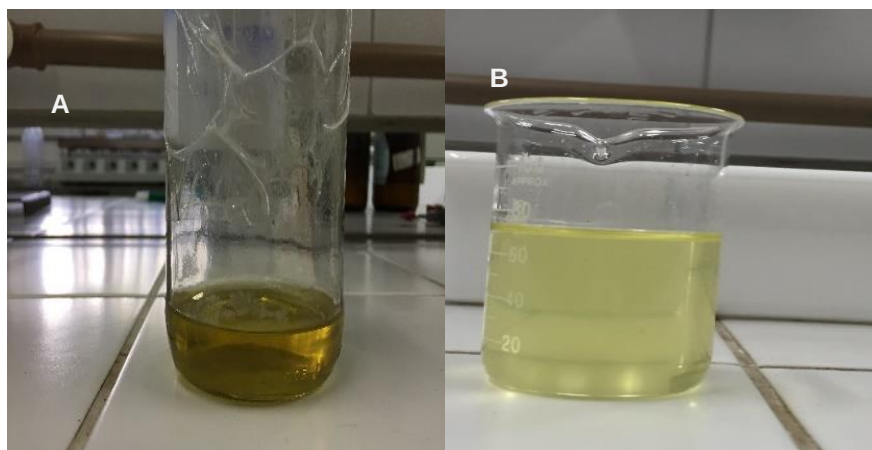
O rendimento mássico obtido foi de 30%, 413 g de vísceras extraídas renderam 124 g de óleo bruto. Este dado foi compatível com o encontrado por Feltes (2010), onde dependendo da massa corpórea da tilápia, obtiveram rendimentos em óleo de até 30% para peixes acima de 800 g. O melhoramento na forma da extração, como o uso de água e o aumento do tempo, podem ser fatores que venham a otimizar a extração do óleo. Em tese, é possível melhorar o percentual de óleo extraído em até 50%, Queiroz et al. (2016) citam esse rendimento.

5.3 Obtenção do óleo refinado

Dos 124 g de óleo bruto obtidos cerca de 114 g foram submetidos a etapa de refino. A primeira etapa do processo foi a neutralização, devido sua importância para a neutralização dos ácidos graxos livres (AGL) presentes no óleo. Além dos AGL, a etapa de neutralização é importante para a remoção de fosfolipídeos, compostos fenólicos e traços de metais. Caso o processo de neutralização não seja bem planejado, poderá ocorrer a formação de diglicerídeos, sabão e água, onde a água em excesso desencadeia a reação de hidrólise. Da massa inicial obteve-se 72 g de óleo neutralizado, representando 63,2% em massa.

A etapa de branqueamento tem a finalidade de remover os resíduos gerados na neutralização, pigmentos e peróxidos, sendo este último gerado na oxidação lipídica. A massa final obtida foi de 60 g, o que representa 83,3% em massa, ocasionando então uma diferença de 16,7% em relação a etapa anterior.

Considerando a massa inicial de vísceras e a massa de óleo refinado, obteve-se um rendimento de 14,5%. Teoricamente pode ser considerando um baixo rendimento, porém devido as significativas melhoras nas propriedades físico-químicas apresentadas no óleo refinado, torna-se viável utilizar o processo de refino. As figuras 15A e 15B (Pag. 53) apresentam o óleo bruto e refinado.

Figura 15: Óleo bruto e refinado de tilápia

Fonte: Autor (2016)

5.4 Caracterização físico-química do óleo

Segundo Ferreira (2012), não existe uma norma específica para a classificação dos óleos obtidos de fontes pesqueiras, mas mesmo com a inexistência de legislação existem parâmetros mínimos para o seu enquadramento. Buscando avaliar alguns importantes parâmetros do óleo das vísceras de tilápias foi realizada uma caracterização físico-química através da determinação dos índices de acidez (IA), peróxido (IP), iodo (II) e saponificação (IS). O teor de ácidos graxos (AGL) livres também foi mensurado.

A Tabela 5 apresenta os valores obtidos na caracterização para o óleo bruto e o refinado. A tabela contém ainda dados fornecidos pela literatura de outros óleos de peixe para comparação.

Tabela 5: Caracterização físico-química do óleo de tilápia

Parâmetro	Unidade	Valores deste trabalho		Tilapia refinado		Truta arco-íris
		Bruto	Refinado	Souza (2014)	Menegazzo et al. (2014)	Segura (2012)
IA	mgKOH/g de óleo	11,01	0,74	0,43	-	-
AGL	%	5,53	0,37	0,32	0,07	1,47
IP	mEqO ₂ /Kg de óleo	35,66	6,1	9,21	6,72	1,97
II	gl ₂ /100g de óleo	64,27	64,01	80,96	83,19	94,97
IS	mgKOH/g de óleo	198,98	209,4	87,55	195,74	193,08

Fonte: Autor (2016)

O monitoramento da qualidade da matéria-prima está intrinsecamente ligado aos custos operacionais. Um óleo que não apresenta os padrões mínimos poderá ocasionar uma maior formação de sabão, maior gasto de catalisador e consequentemente um menor rendimento de produção. Portanto é essencial o monitoramento dos parâmetros físico-químicos do material de partida para que o biodiesel produzido atenda aos parâmetros mínimos exigidos, no Brasil pela ANP.

O óleo bruto de tilápia apresentou índice de acidez de 11,01 mgKOH/g, um valor alto, mas condizente com o tipo de óleo extraído utilizando aquecimento, onde nenhum processo químico esteve envolvido. O valor torna-se compatível com a quantidade de ácidos graxos livres presentes na amostra, que no presente trabalho foi de 5,53%. Uma justificativa para a elevada acidez é que o material foi submetido a processos de degradação devido a evisceração, o tempo da coleta até a extração e a forma de extração (extração térmica). Já após os processos de refinamento o óleo apresentou significativa redução de sua acidez, 0,74mg KOH/g. Valor pouco superior ao encontrado por Souza (2014). Menegazzo et al. (2014) encontraram teores de ácidos graxos livres bem inferiores aos determinados neste trabalho para o óleo de tilápia, mesmo utilizando processo semelhante ao deste trabalho, aquecimento de 40°C por 3 horas.

A oxidação da gordura é um processo auto catalítico que se desenvolve em aceleração crescente. Fatores como temperatura, enzimas, luz e íons metálicos influenciam na formação de radicais livres. Estes radicais livres ao se romperem formam produtos de massa molecular mais baixa, tais como aldeídos, cetonas, álcoois e ésteres, que são voláteis e responsáveis pelos maus odores, o ranço (FERRARI, 2004). Para se mensurar de forma indireta a quantidade de peróxido formada, utiliza-se o método da titulação com solução de tiosulfato de sódio. O valor obtido neste trabalho para o óleo refinado foi de 6,1 meq O₂. Este foi menor que o encontrado por Souza (2014), e maior que o de Segura (2012). A diferença entre os valores pode ser justificada pelo estado da víscera, o tempo que o óleo passou para ser analisado, forma de armazenamento, presença de água e outros contaminantes.

O índice de iodo está relacionado com o grau de insaturação de um óleo. Valores altos significa que a quantidade de ácidos graxos insaturados é elevada. A quantidade de insaturações influi em características físicas como o ponto de fusão, onde óleos mais insaturados são líquidos em temperatura ambiente. Por outro lado,

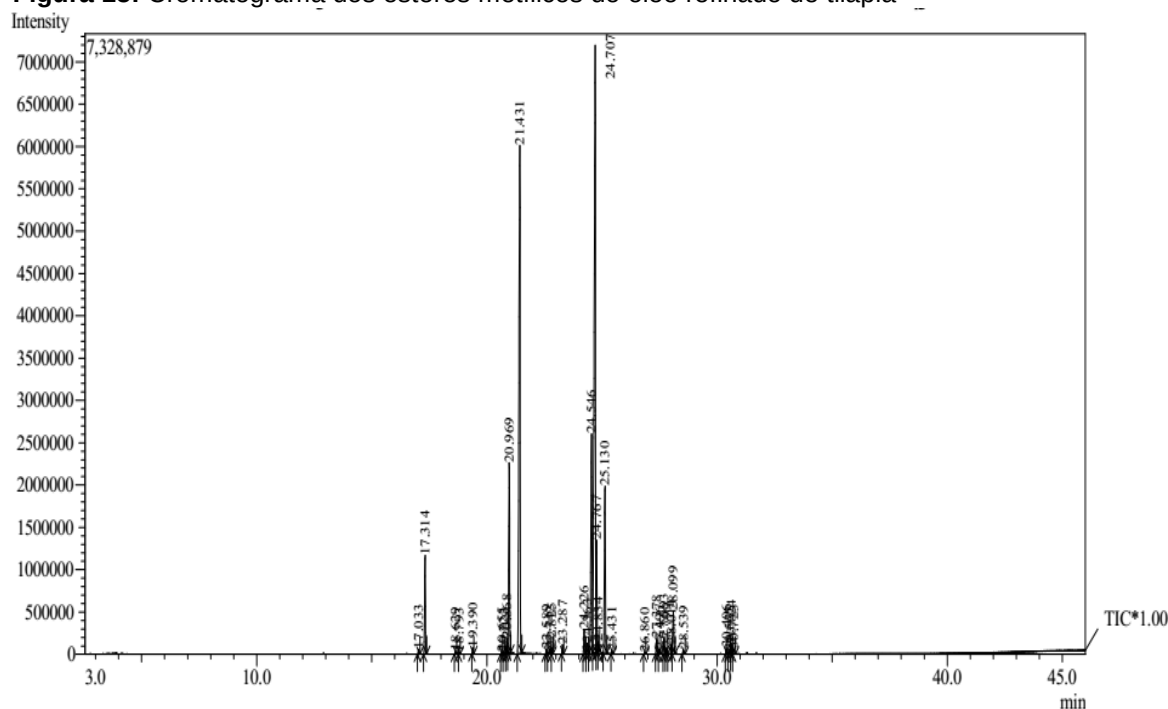
óleos mais insaturados requerem maiores cuidados no armazenamento e manuseio, pois os processos oxidativos se iniciam nas duplas ligações (ARAÚJO, 1995). Neste trabalho foi encontrado o valor de 64,27 e 64,01 $\text{gl}_2/100\text{g}$ de óleo. Os valores encontrados neste trabalho são inferiores aos de Souza (2014) e Menegazzo et al. (2014). Fatores como a degradação lipídica e os reagentes utilizados na análise podem justificar esse valor distinto do encontrado por outros pesquisadores.

O índice de saponificação também está relacionado com o estado de qualidade do óleo. Os índices encontrados para os óleos bruto e refinado foram praticamente os mesmos. Em comparação com os dados da literatura estes também foram semelhantes, exceto para os de Souza (2014). Um dado interessante que o índice de saponificação fornece é o valor médio da massa molar do triglicerídeo. A partir da equação 4.7 (Pag. 43), o valor encontrado foi $844,3 \text{ g.mol}^{-1}$.

5.5 Perfil Cromatográfico do óleo de tilápia refinado

A Figura 16 apresentou o cromatograma obtido da análise do óleo refinado de tilápia.

Figura 15: Cromatograma dos ésteres metílicos do óleo refinado de tilápia



Fonte: Autor (2016)

A tabela 6 (Pag. 56) apresenta a composição química do óleo de tilápia refinado em termos de seus ácidos graxos metilados.

Tabela 6: Perfil Cromatográfico do óleo de tilápia refinado

Ácidos Graxos		%
C14:0	Mirístico	3,58
C16:1	Palmitoléico	7,44
C16:0	Palmitico	25,39
C18:3n6	Linolênico	0,88
C18:2n6c/ C18:2n6t	Linoléico	10,17
C18:1n9c/ C18:1n9t	Oléico	38,27
C18:0	Estearico	6,73
C20:4n6	Aracdônico	0,51
C20:3n6	Cis-8,11,14-eicosatrienóico	0,6
C20:1n	Cis-11-Eicosenóico	1,76
Total		95,33

Fonte: Autor (2016)

Observa-se que os componentes majoritários foram os ácidos oléico e palmítico (>63% do total), sendo o primeiro insaturado e de maior proporção. A contribuição de insaturados para composição correspondeu a quase 60% do total, o que torna necessário o uso de antioxidantes como o hidroxitolueno butilado (BHT) para se preservar a vida útil do óleo, pois como já mencionado, os processos de degradação lipídica iniciam-se nos carbonos insaturados (PUPA, 2004).

5.6 Caracterização físico-química do óleo e biodiesel

A Tabela 7 apresenta os dados da caracterização do óleo e biodiesel de tilápia juntamente com os valores exigidos pela agência reguladora brasileira.

Tabela 7: Caracterização do óleo e biodiesel de tilápia

	Óleo		Biodiesel		ANP	Norma (ABNT)
	20°C	40°C	20°C	40°C		
Viscosidade dinâmica (mPa.s)	55,013	19,628	5,8203	3,4673		
Viscosidade cinemática (mm²/s)		22,218		4,0802	3 a 6	10441
Massa específica (Kg/m³)	898,9		850		850 a 900	7148/14065

Fonte: Autor (2017)

Para o biodiesel, a massa específica encontrada a 20°C foi inferior à de Martins et al. (2015), 877 Kg/m³. Mesmo a origem da matéria-prima sendo a mesma,

o valor de 850 Kg/m³ encontrado neste trabalho está dentro dos limites definidos pela ANP para o aspecto em questão.

Queiroz et al. (2016) em seu trabalho com óleo das vísceras de tilápia para a produção de biodiesel obteve 4,4 mm²/s para a viscosidade cinemática a 40°C do biodiesel. Apesar do valor encontrado neste trabalho ser inferior, ele está dentro da faixa-limite permitida pela legislação brasileira determinado pela ANP nº 7, de 19.03.2008.

A Tabela 8 apresenta os valores para acidez, o ponto de fulgor e o ponto de fluidez do óleo e biodiesel estudados neste trabalho. Assim, como a tabela anterior, os valores padrões da ANP e a norma de referência encontram-se disposta na tabela.

Tabela 8: Acidez e temperaturas de fulgor e escoamento do óleo e biodiesel de tilápia

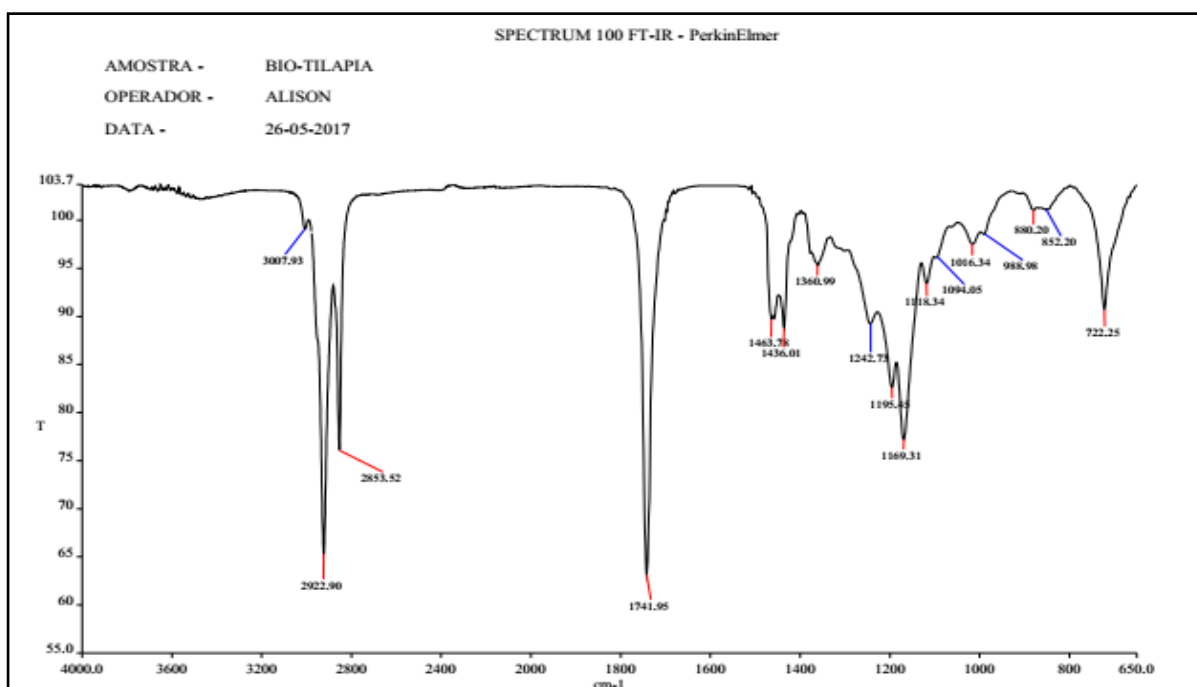
	Óleo	Biodiesel	ANP	Norma (ABNT)
Ponto de fluidez (°C, máx.)	5	3	6 ¹ -12 ²	11349
Ponto de fulgor (°C, mín.)		99,2	100	14598
Índice de acidez (mgKOH/g, máx.)	0,74	0,348	0,5	14448

Fonte: Autor (2017)

¹ Ponto de fluidez no inverno ² Ponto de fluidez no verão

A acidez foi compatível com o obtido por Santos et al. (2015), 0,343 mgKOH/g. Pelas semelhanças, infere-se que a reação de transesterificação utilizando-se um óleo de baixa acidez promoveu um biodiesel adequado as normas da ANP. O ponto de fulgor encontrado ficou abaixo do permitido pela ANP. Fazendo-se uma análise da metodologia de purificação do material, pode-se considerar como um fator determinante para uma combustão prévia do material a presença de resquícios de hexano. O ponto de fluidez obedece aos parâmetros exigidos pela agência reguladora brasileira.

As Figuras 16,17 e 18 (Pag. 58) apresentaram os resultados das análises espectroscópicas.

Figura 16: Espectro de Infravermelho do biodiesel de tilápia

Fonte: Autor (2017)

Pela análise do espectro, se observa fortes absorções em 2922 e 2853 cm^{-1} atribuídas a estiramentos de ligações C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) e outra em 1741 cm^{-1} oriunda de estiramento da ligação C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) de éster. Adicionalmente, uma absorção em 1169 cm^{-1} foi atribuída a ligação C-O, que juntamente com os outros dados, confirmam a presença de éster, corroborando com fortes indícios de formação de misturas ésteres metílicos (biodiesel). Para confirmar a formação desses produtos, as figuras 17 e 18 apresentam os espectros de RMN ^1H do óleo e biodiesel, respectivamente.

O espectro de RMN ^1H do óleo de tilápia (Fig. 17) exibiu sinais característicos de óleo graxo, como em δ_{H} 0,85 atribuído a hidrogênios metílicos terminais de cadeias de ácidos graxos; intenso sinal em δ_{H} 1,26 correspondente a hidrogênios metilênicos de cadeias carbônicas graxas; tripleto em δ_{H} 2,31 atribuído a hidrogênios metilênicos α -carbonila; multipletos em δ_{H} 4,15 e 4,30 de hidrogênio carbinólicos da porção glicerol do triacilglicerol; sinais entre δ_{H} 5,26 e 5,37 correspondentes a hidrogênios de carbonos sp^2 de duplas ligações. Estes dados corroboram com a estrutura de triacilgliceróis encontrados no referido óleo, que apresentam ácidos graxos esterificados com cadeias carbônicas saturadas e insaturadas. Analisando as Figura 18 e 17 verifica-se grande semelhança entre os espectros, com repetição dos sinais em δ_{H} 0,86 de hidrogênios metílicos terminais de cadeias de ácidos graxos; intenso sinal em δ_{H} 1,23 correspondente a hidrogênios

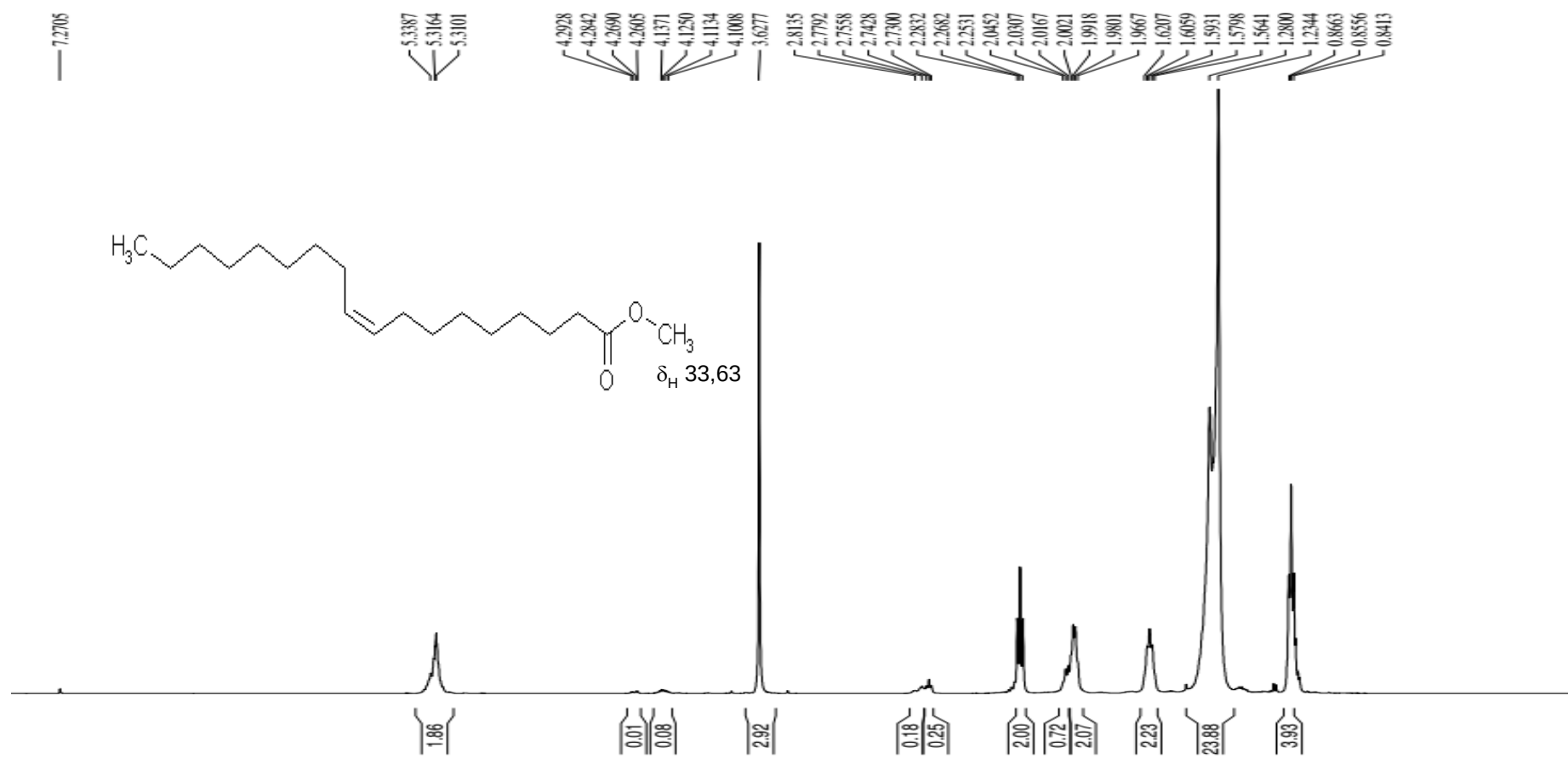
metilênicos de cadeias carbônicas graxas; tripleto em δ_H 2,27 atribuído a hidrogênios metilênicos α -carbonila. Porém, os multipletos em δ_H 4,15 e 4,30 de hidrogênio carbinólicos da porção glicerol do triacilglicerol praticamente desapareceram e um intenso sinal surgiu em δ_H 3,63, característico de hidrogênios metoxílicos, representando a quebra da cadeia do triacilglicerol e consequente formação de ésteres metílicos. Portanto, comparação entre os espectros das Figuras 17 e 18 provam que houve reação de transesterificação com formação de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) a partir do triacilglicerol (óleo de peixe).

Figura 17: Espectro RMN H^1 do óleo de tilápia ($CDCl_3$, 500MHz)



Fonte: Autor (2017)

Figura 18: Espectro RMN H^1 do biodiesel do óleo de tilápia ($CDCl_3$, 500MHz)



Fonte:

Autor

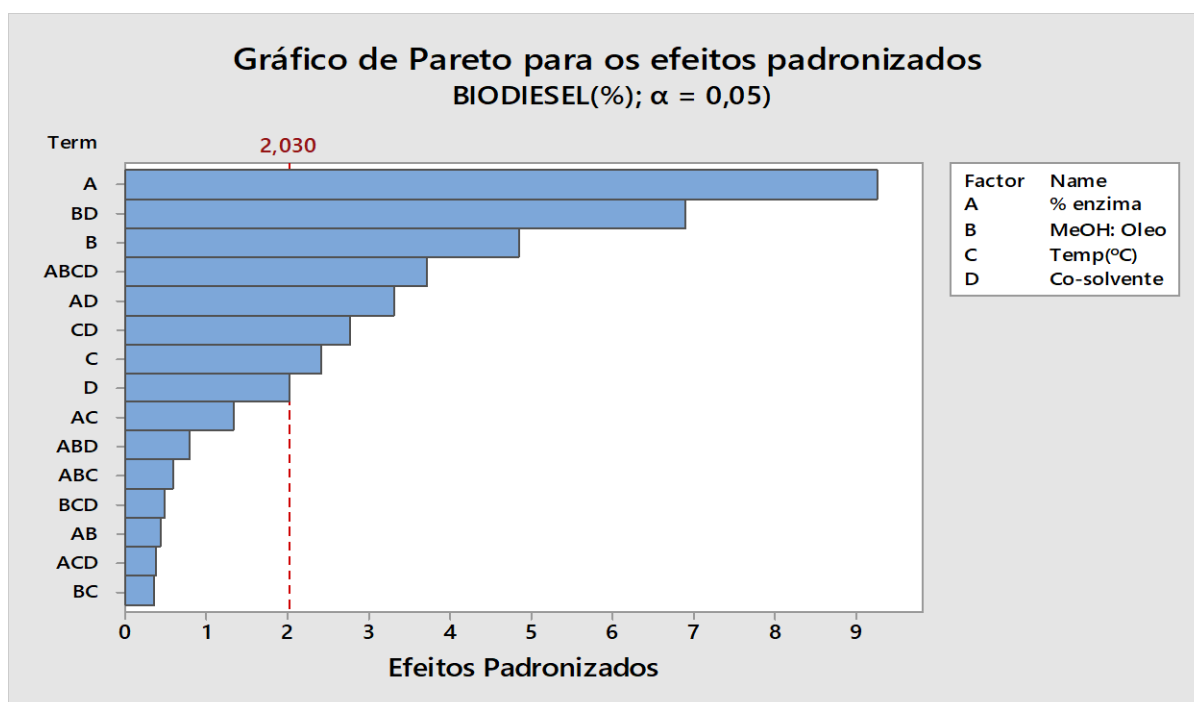
(2017)

5.7 Otimização da reação de transesterificação

Em busca de um combustível que não supra somente a questão ambiental, é importante que estudos de otimização sejam realizados para que o novo produto se torne atrativo para o mercado. No caso específico deste trabalho, o custo com reagentes, principalmente a enzimas, faz com que seja necessário a etapa de otimização do processo para que as melhores condições sejam determinadas.

Em um processo reacional existem variáveis que influenciam em maior ou menor proporção, positivamente ou negativamente, sendo a verificação deste tipo de comportamento muito relevante. Uma das técnicas que ajuda no entendimento do comportamento dessas variáveis é o planejamento estatístico experimental. O uso do planejamento experimental se torna extremamente útil quando há muitas variáveis de interesses, pois o número de combinações necessárias (dependendo da quantidade de pontos) pode tornar a pesquisa muito longa ou inviável (CASTRO, 2009). Neste trabalho buscou-se compreender a interdependência entre as variáveis utilizando como técnica estatística uma análise fatorial 2^4 com 3 pontos centrais.

Os resultados desta etapa do trabalho foram apresentados nas formas de gráficos de Pareto, de superfícies e de contornos. O Gráfico de Pareto na figura 11 (Pag. 63) mostra os efeitos estimados das variáveis dosagem de enzima, proporção óleo/metanol, temperatura e co-solvente, além das interações entre as variáveis. A resposta analisada foi a porcentagem da conversão de óleo em biodiesel. A função do gráfico de Pareto é verificar se essas variáveis, isoladas ou em conjunto, são significativas para o processo a um nível de confiança de 95%. Para que um parâmetro seja considerado significativo, seu valor deve ser maior ao valor apresentado na linha vertical. No caso deste gráfico, maior que 2,030.

Figura 19: Gráfico de Pareto

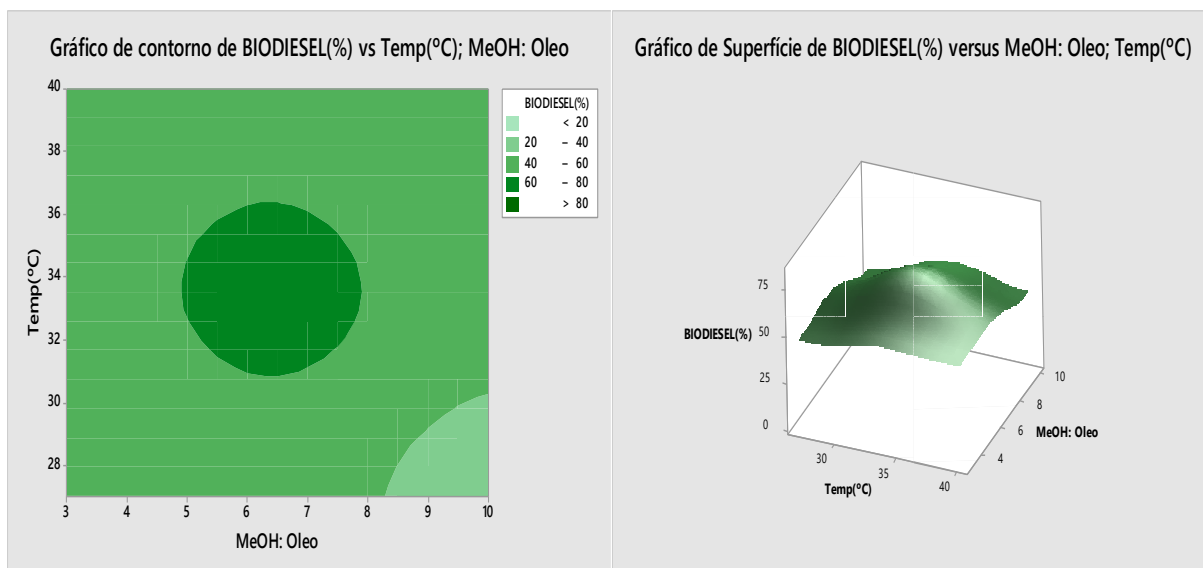
Fonte: Autor (2016)

Segundo o gráfico, o fator que mais influenciou foi a percentagem de enzima seguido pela combinação proporção óleo: metanol e tipo de co-solvente. É importante observar a interação AC (%Enzima+Temperatura), onde notou-se um decaimento significativo na influência da quantidade de enzima. Este fato foi justificado pelo uso de temperaturas acima do ponto ótimo da enzima, onde o excesso de calor pode desativa-la ou reduzir sua atividade.

O gráfico de Pareto apresenta somente os fatores mais significativos para o processo, mas este não faz distinção se tal variável influência de forma positiva ou negativa na resposta. Como no caso do presente estudo o fator resposta da análise foi a taxa de conversão a biodiesel, o gráfico de Pareto apresentou os dados que mais influenciaram na conversão. Portanto, as variáveis analisadas influenciaram de forma positiva no processo.

Para confirmação dos resultados obtidos pelo gráfico de Pareto, utilizou-se os gráficos de contornos e superfícies.

Figura 20: Gráficos de contorno e superfície para relação proporção MeOH:Óleo vs Temperatura (°C)

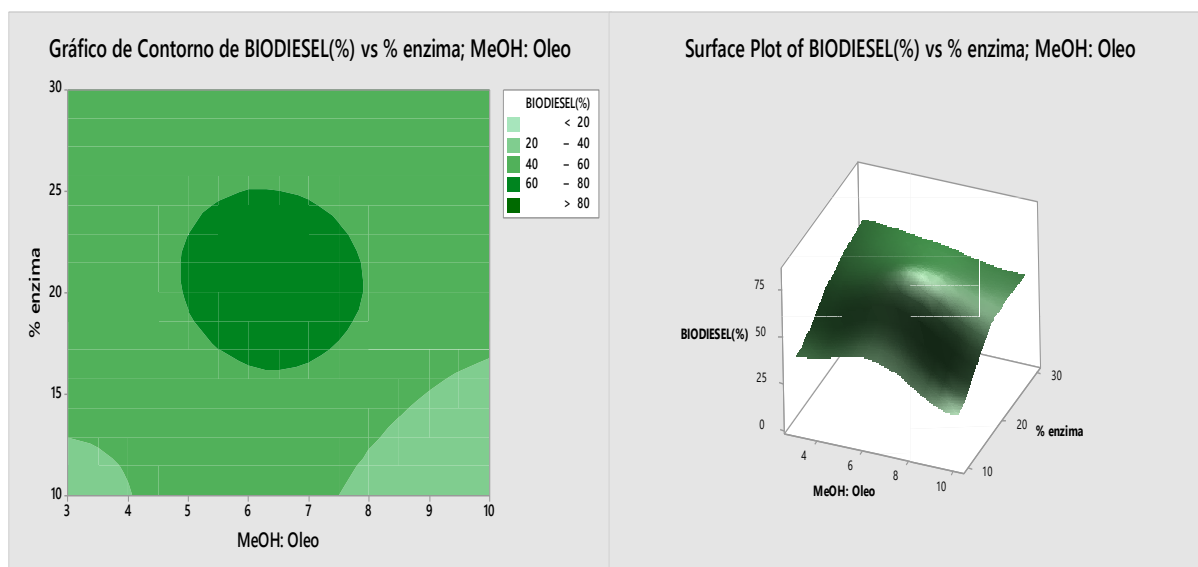


Fonte: Autor (2016)

Infere-se pela interpretação dos gráficos na figura 20 que a região mais escura representou a relação proporção MeOH:Óleo e temperatura onde as maiores taxas de conversão a biodiesel (>80%) foram obtidas. No caso específico dos gráficos da figura 20, mantendo-se uma faixa de temperatura entre 32 a 36°C e proporção MeOH:Óleo com média de 1:6, obteve-se rendimentos de até 80% em biodiesel. Estas conclusões foram confirmadas ao analisar o gráfico de superfície 3D. Em suma, assim como no gráfico de contorno, a região central foi a que possuiu as maiores taxas de conversão, tal fato foi visualizado ao se observar a região central, pois esta foi a que apresentou a maior concavidade. Basri et al. (2013) utilizando a mesma enzima, lipoenzima TL IM, chegaram a resultados semelhantes utilizando temperaturas entre 50 a 65°C. Observou-se que mantendo uma temperatura constante, rendimentos entre 60 a 80% foram obtidos quando se mantiveram a proporção MeOH:Óleo em 1:6. Quando se diminuiu este valor houve uma queda no rendimento, e quando próximo da proporção 1:9 chegou a 40%. Este fato foi justificado pelo fato de o excesso de metanol provocar a desidratação, e consequente desnaturação, da enzima (BASRI et al., 2013).

Os gráficos da Figura 21 (Pag. 65) ilustram as interações entre a quantidade de enzima e a proporção óleo metanol.

Figura 21: Gráfico de contorno e superfície para relação % enzima vs MeOH Óleo



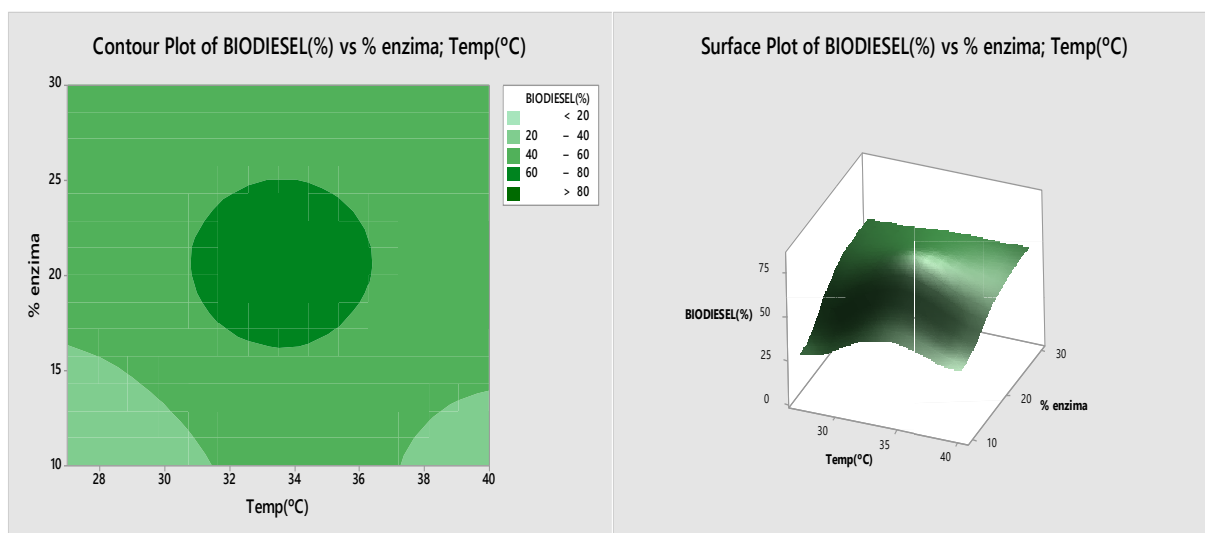
Fonte: Autor (2016)

Os valores intermediários de cada variável sugeriram um rendimento de até 80% na transesterificação enzimática. Ao se analisar o trabalho de Basri et al. (2013), os mesmos ao estudarem a otimização do processo, obtiveram um rendimento de 88,6% utilizando 24,7% de enzima. Corroborando com os gráficos anteriores, observou-se que o rendimento da reação decresce quando se utilizam elevadas quantidades de metanol. Na região da proporção 1:3, a taxa de conversão girou em torno de 40%. Este valor é semelhante ao encontrado quando se utilizam quantidades em excesso de metanol.

A quantidade de metanol na reação interferiu em duas vertentes. A primeira tratou da sua função como reagente. Como já conhecido, a proporção estequiométrica da reação é 1 mol de triglicerídeo para 3 mols de álcool. Quando uma quantidade inferior deste reagente foi adicionada ao sistema, não se formaram ésteres metílicos em quantidade suficiente e ocorreu também a formação de outros produtos, como diglicerídeos e monoglicerídeos. Ao adicionar-se um excesso de metanol, como 1:6, observou-se uma elevação no rendimento da reação. Essa quantidade se torna viável pois se encontra em quantidades suficientes para deslocar o equilíbrio e não desnaturar a enzima. A alta concentração de álcool na enzima diminuiu sua eficiência, como pode ser comprovada pela análise dos gráficos.

Os gráficos da figura 22 apresentaram as interações entre as variáveis %Enzima e temperatura. Observou-se mais uma vez pelos gráficos que valores intermediários das variáveis acarretaram em rendimentos de biodiesel em torno de 80%.

Figura 22: Gráficos de contorno e superfície para relação % enzima vs Temperatura (°C)

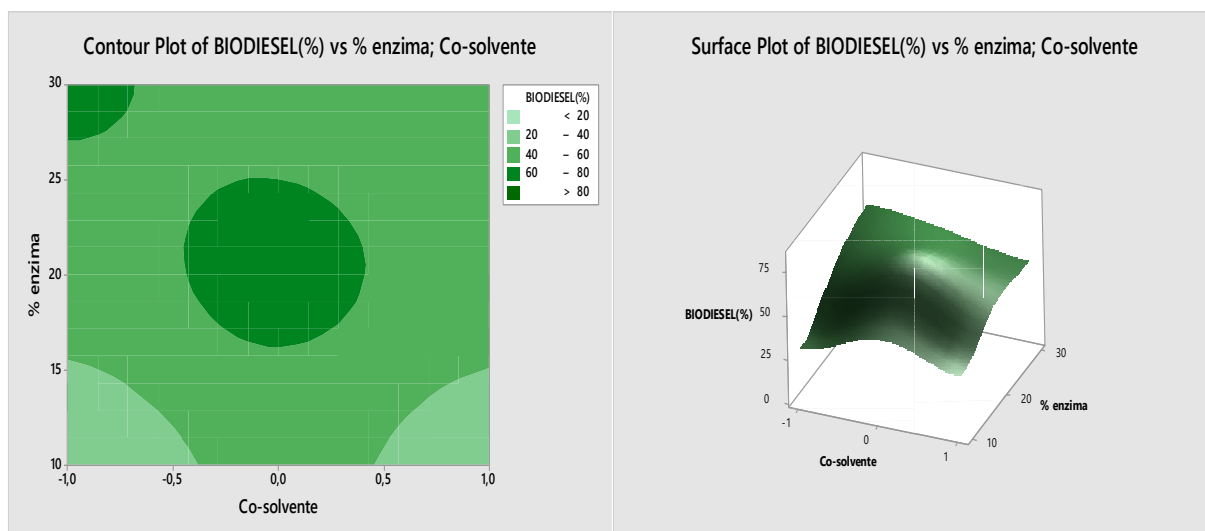


Fonte: Autor(2016)

O uso de temperaturas elevadas danifica a estrutura das enzimas. Wang et al. (2015) afirmaram que os rendimentos máximos são obtidos quando se utilizam temperaturas ótimas para a atividade enzimática. Xu et al. (2009) ao estudarem a lipoenzima TL IM mencionaram que a temperatura ótima da enzima é em torno de 40°C. No planejamento fatorial, as temperaturas de trabalho escolhidas variaram de 27 a 40°C, o que pode ser considerado como fator essencial para a faixa de rendimento encontrada. No quesito concentração do catalisador, a quantidade de enzima influenciou positivamente na reação. No presente trabalho buscou-se a menor quantidade possível onde obtém-se a maior taxa de conversão. Na faixa de concentração estudada, uma adição de 20% de lipoenzima TL IM ao meio reacional é suficiente para converter o óleo a biodiesel.

A figura 23 (Pag. 67) apresentou os gráficos da interação do co-solvente com a enzima na transesterificação. Como é de conhecimento, a utilização de co-solvente na transesterificação auxilia no processo reacional melhorando a solubilidade metanol/óleo.

Figura 23: Gráfico de contorno e superfície para relação % Enzima vs co-solvente



Fonte: Autor (2016)

A utilização de co-solvente no processo de transesterificação auxilia no processo reacional melhorando a solubilidade metanol/óleo. Uma elevação na temperatura aumenta a solubilidade, mas em consequência acarreta, além dos danos a enzima, um maior custo operacional e um preço final mais elevado.

A presença de co-solventes na reação tem como função principal facilitar a interação dos reagentes e o contato com o catalisador. Ao adicionar-se um co-solvente, as moléculas do soluto têm suas interações intermoleculares, no caso de moléculas apolares as forças de dispersão de London ou dipolo-induzido, diminuídas dispersando as moléculas no meio, reduzindo a viscosidade e aumentando a superfície de contato.

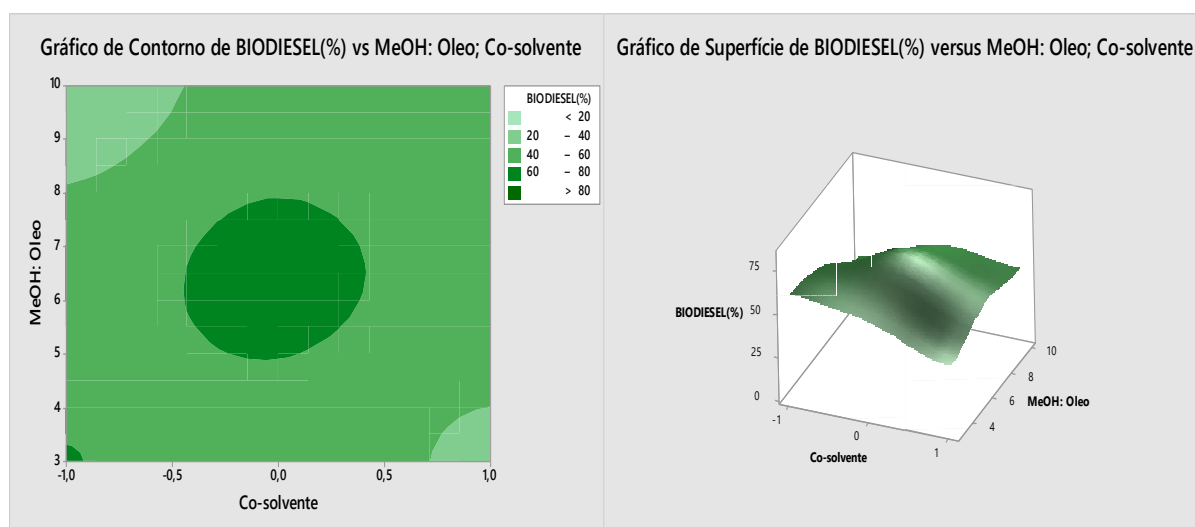
Nos experimentos realizados neste trabalho, testou-se como co-solvente hexano, tolueno e éter etílico, sendo hexano o menos polar e éter etílico o mais polar.

Após interpretação dos gráficos, observaram-se duas áreas em que o rendimento da reação pôde chegar a 80%. Apesar da área onde a utilização de hexano como co-solvente predizer uma maior quantidade de enzima, e devido aos problemas de saúde acarretados pelo uso dos solventes hexano e tolueno (como danos ao sistema nervoso central, rins e fígado por exposição repetida ou prolongada, ser tóxico aos organismos aquáticos) (MANAHAN, 2013). Com o uso correto dos EPI, EPC e das normas corretas de segurança, o hexano acabou

tornando-se uma boa opção para tal fim, pois seu custo é menor e pode ser reaproveitado em outras áreas da produção, como a fase de extração do óleo.

Os gráficos apresentados na figura 24 indicaram que houve uma predominância do tolueno em relação aos outros solventes empregados. Como os gráficos exploram a interação do co-solvente com o metanol, justifica-se os resultados obtidos pelo fato do tolueno possuir uma polaridade intermediária, o que favorece a solubilização entre metanol e o óleo.

Figura 24: Gráfico de contorno e superfície para relação MeOH:Óleo vs co-solvente



Fonte: Autor (2016)

5.8 Cinética da reação de transesterificação

Sem a utilização de catalisadores, as reações para a formação de ésteres são lentas. Nesse tipo de reação, diversos catalisadores podem ser utilizados, tais como as bases e os ácidos. Uma alternativa para ao uso destes catalisadores são as enzimas imobilizadas. Uma vantagem para o uso de enzimas é a necessidade de condições operacionais brandas em comparação as utilizadas em catálises ácidas e alcalinas. Como o uso de enzimas apresenta como principal desvantagem o seu alto custo, um estudo cinético torna-se apropriado para o conhecimento do progresso da reação (SKORONSKI et al. (2010).

Neste trabalho buscou-se avaliar os melhores parâmetros para que a reação de transesterificação catalisada pela lipoenzima TL IM fosse utilizada em seu potencial máximo. Em etapa prévia, o objetivo foi rastrear entre os parâmetros reacionais aqueles que mais influenciaram no rendimento.

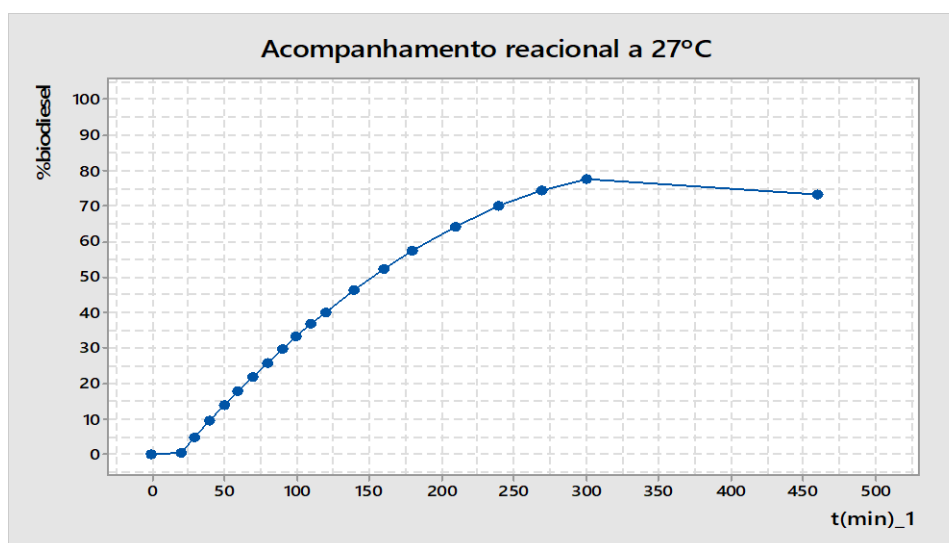
Determinados tais parâmetros, o passo seguinte foi realizar o estudo cinético fixando-se os valores de concentração de enzima, proporção óleo:metanol e co-solvente que resultaram em melhores rendimentos.

Os experimentos foram realizados em um agitador orbital com controle de temperatura. Em tempos pré-determinados, retirou-se a parte líquida da reação, adicionou-se em uma proveta e completou-se para o volume inicial com hexano. Em seguida retirava-se uma alíquota de 100 μL para um balão de 5 mL e preenchia-se com hexano grau espectroscópico, e realizou-se a análise no cromatografo gasoso.

A conversão das áreas dos picos em parte por milhão foi feita através de uma curva de calibração (ANEXOS). As análises foram realizadas até que se observasse uma estabilização na concentração de ésteres.

A figura 25 apresenta o acompanhamento cinético-reacional na temperatura de 27°C.

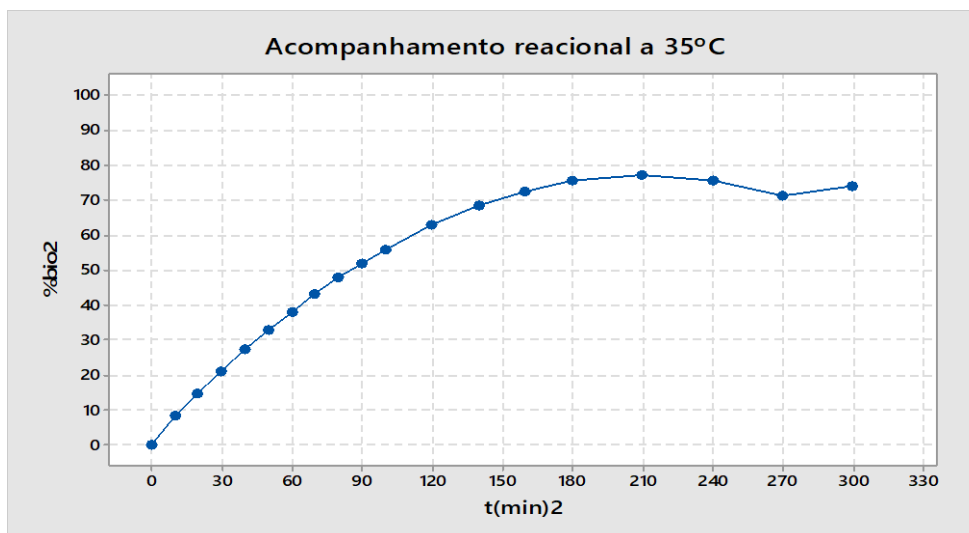
Figura 25: Acompanhamento cinético da reação a 27°C



Fonte: Autor (2017)

Inferiu-se pela interpretação do gráfico que em 300 min de reação foi obtida a conversão máxima (80%) de óleo a ésteres metílicos, na temperatura de 27 °C.

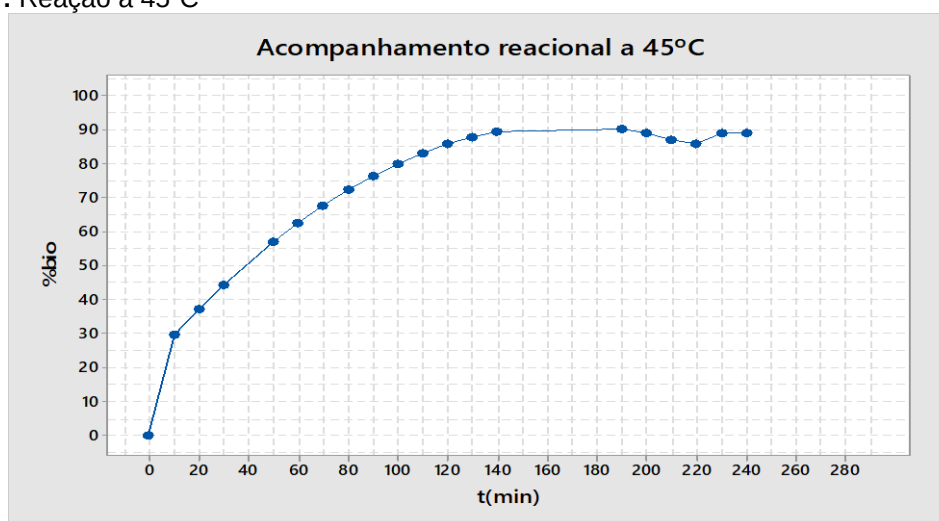
No gráfico da Figura 26 (Pag. 70) foi ilustrado o comportamento cinético da reação a uma temperatura superior, 35°C.

Figura 26: Acompanhamento cinético da reação a 35°C

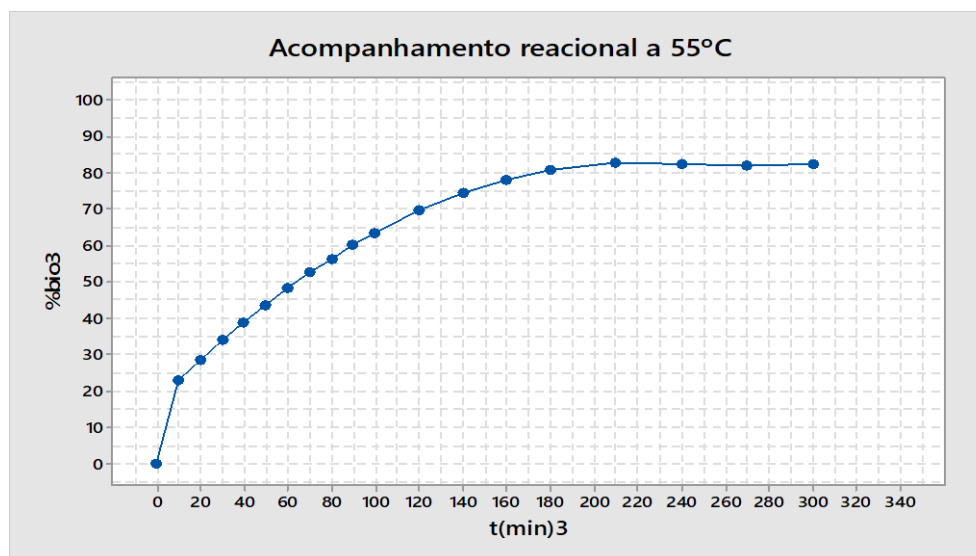
Fonte: Autor (2017)

Assim como na reação a 27°C a taxa de conversão máxima atingida foi de 80%, mas em um tempo 90 minutos inferior. Isso significou que a 35°C a velocidade reacional ascendeu sem prejudicar a eficiência do catalisador.

O estudo cinético também avançou para outras temperaturas superiores, 45°C e 55°C, com o objetivo de se determinar a temperatura ótima para atividade enzimática da lipoenzima TL IM. Os gráficos das Figuras 27 e 28 apresentam os resultados obtidos para 45 e 55 °C, respectivamente.

Figura 27: Reação a 45°C

Fonte: Autor (2017)

Figura 28: Reação a 55°C

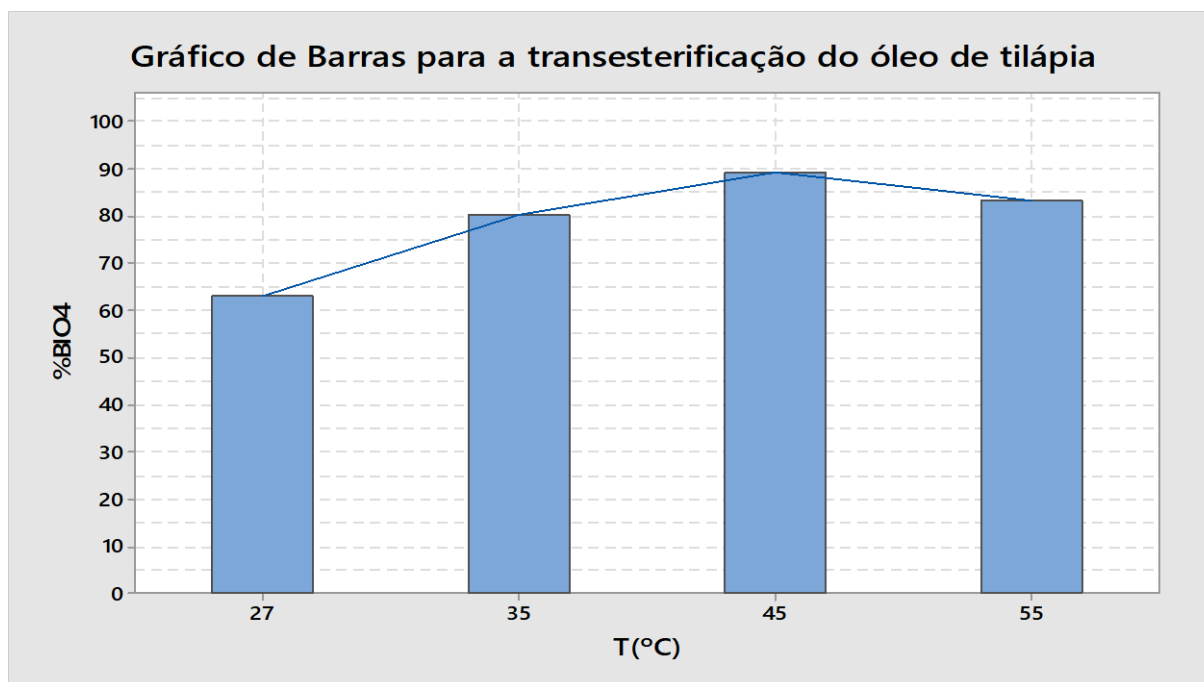
Fonte: Autor (2017)

Observou-se uma taxa de conversão de 90% em ésteres metílicos na temperatura de 45 °C, o que não ocorre quando aumentou-se a temperatura para 55 °C, onde é verificado uma manutenção da conversão (80%) em relação as temperaturas de 27 e 35 °C. Esse comportamento pode ser justificado considerando-se a influência da temperatura sobre dois fatores, positivamente sobre a velocidade reacional e negativamente sobre a estabilidade enzimática. O aumento natural da velocidade de reação pela elevação da temperatura foi observado de 27 a 45 °C, mas acima desta a temperatura passou a atuar negativamente devido as mudanças estruturais ou conformacionais no sítio ativo da enzima. Portanto, em temperaturas na faixa de 45°C, a enzima atingiu seu ponto ótimo, acarretando em máxima eficiência reacional. Em temperaturas superiores sua eficiência começou a decrescer.

Para corroborar com as discussões apresentadas, Basri et al. (2012) em seus estudos com lipoenzima TL IM, que avaliaram dentre outros fatores a temperatura, encontraram a 55°C uma taxa de conversão máxima 74,63%. Rong et al. (2010) com a mesma enzima, encontraram conversões próximas a 90% ao utilizarem 20% de enzima a uma temperatura de 40°C por um período de oito horas. O mesmo rendimento foi obtido em nosso estudo em um tempo quase quatro vezes menor (2,3 horas ou 140 min) a 45 °C. Wang, Wu e Zong (2008) utilizando óleo de milho obtiveram um rendimento de 85,6% após oito horas de reação a uma temperatura de 35°C.

Para ilustrar os efeitos da eficiência em função da temperatura, plotou-se o gráfico representado na figura 29. Neste, a conversão obtida em 200 minutos foi relacionada com as temperaturas em estudo. Com exceção da temperatura de 27°C, todas as outras já haviam resultado em estabilização neste tempo.

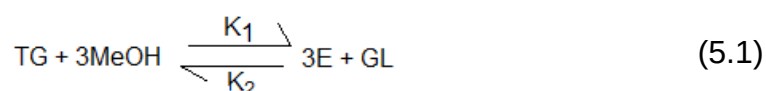
Figura 29: Gráfico de barras para conversão em 200min em diferentes temperaturas



Fonte: Autor (2017)

Após a determinação das curvas cinéticas para a reação de transesterificação enzimática, a etapa seguinte foi analisar a cinética da reação para determinação da ordem de reação, velocidade específica e energia de ativação.

De acordo com Liu et al. (2010), um modelo aceito para o estudo cinético de uma reação de transesterificação é o modelo Ping Pong bi bi. Embora os resultados encontrados nas análises terem sido taxas de conversão a ésteres metílicos, neste modelo cinético levou-se em conta a taxa de decaimento da concentração do óleo (C_a) e a concentração de metanol. Considerando-se a equação global da reação, têm-se:



Onde TG é o triacilglicerol, MeOH o metanol, E representa o éster e GL a glicerina. Portanto, a lei de velocidade para a decomposição do substrato será:

$$V_{\text{TG}} = K[\text{TG}]^n[\text{MeOH}]^m \quad (5.2)$$

Onde V_{TG} é a velocidade de decomposição do triglicerídeo, k é a velocidade específica da reação, $[TG]$ é a concentração do triglicerídeo, n é a ordem de reação para o triglicerídeo, $[MeOH]$ é a concentração de metanol e m é ordem de reação para o metanol.

Como o metanol foi utilizado em excesso, a equação 5.2 foi reduzida para:

$$V_{TG} = K'[TG]^n \quad (5.2)$$

Em que K' é $k.[MeOH]^m$. Como adicionou-se metanol em excesso, considerou-se que sua concentração permaneceu praticamente constante.

Os passos seguintes apresentam a rota matemática para a obtenção da equação 5.8.

A $[TG]$ pode ser substituída por $[TG] = [TG]_0(1-x)$, onde x é a taxa de decomposição do triglicerídeo. Portanto:

$$-\frac{d[TG]}{dt} = k'([TG]_0(1-x))^n \quad (5.3)$$

$$\frac{d[TG]_0(1-x)}{dt} = -k'([TG]_0(1-x))^n \quad (5.4)$$

$$[TG]_0 \frac{dx}{dt} = -k'([TG]_0(1-x))^n \quad (5.5)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{-k'}{[TG]_0}([TG]_0(1-x))^n \quad (5.6)$$

Onde $\frac{-k'}{[TG]_0} = k''$.

Então

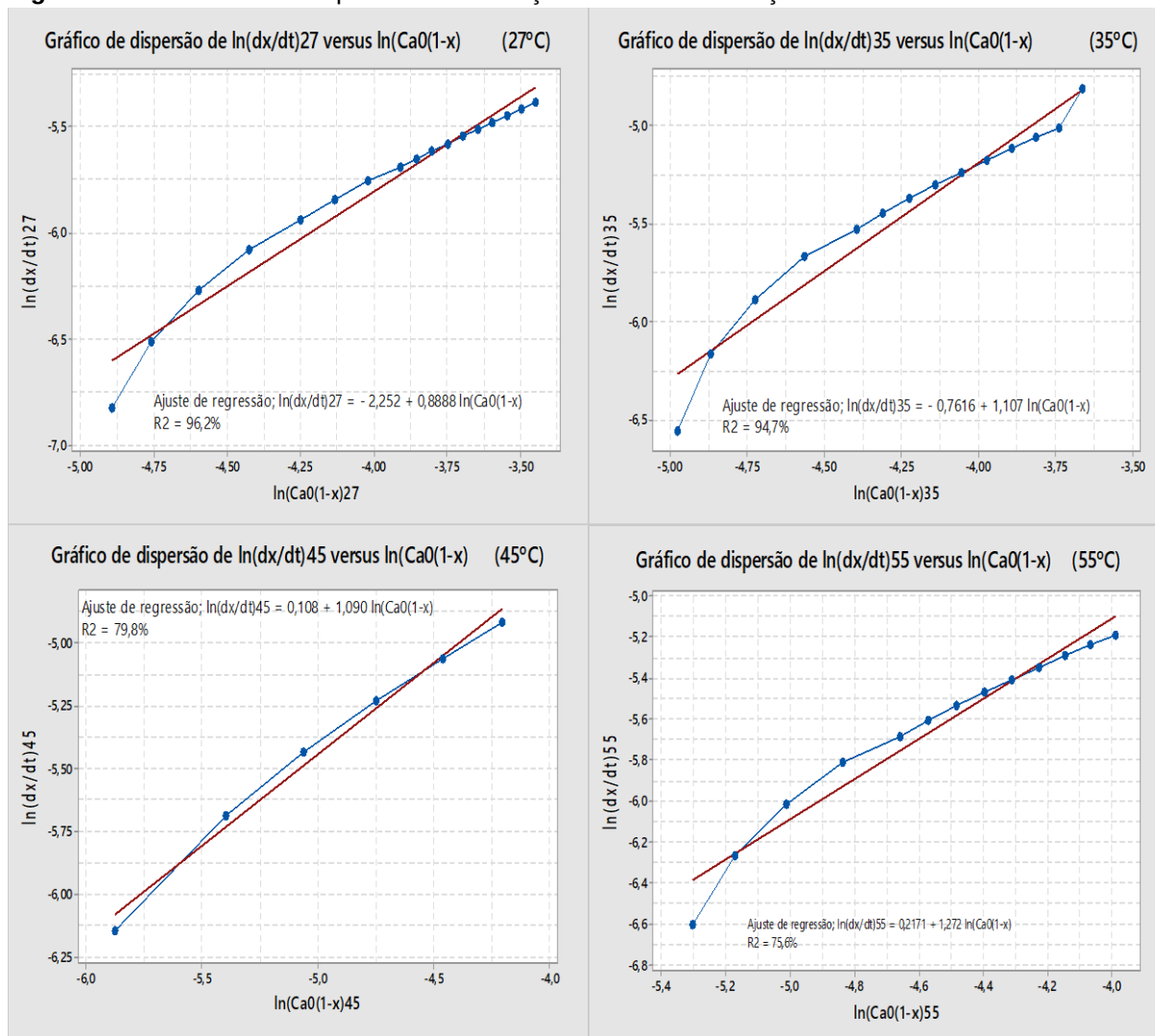
$$\frac{dx}{dt} = k''([TG]_0(1-x))^n \quad (5.7)$$

Aplicando o logaritmo natural (ln) na equação 5.7 obtém-se a equação linear:

$$\ln \frac{dx}{dt} = n \ln([TG]_0(1-x)) + k'' \quad (5.8)$$

Com a equação linear definida, onde utilizou-se o programa Minitab 17, traçou-se os gráficos de $\ln(dx/dt)$ vs $\ln([TG]_0(1-x))$ para as quatro temperaturas utilizadas no estudo.

Figura 30: Gráficos lineares para a determinação da ordem de reação



Fonte: Autor (2017)

A tabela 9 apresenta os valores da ordem de reação e da velocidade específica para cada temperatura.

Tabela 9: Velocidade específica e ordem de reação

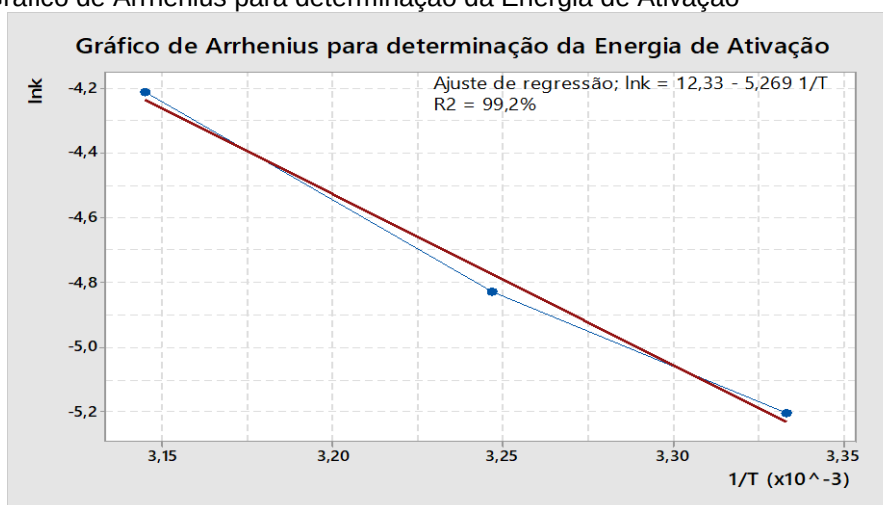
T(°C)	k(min ⁻¹)	Ordem
27	0,0055	0,888
35	0,008	1,107
45	0,0148	1,09
55	0,009	1,272

Fonte: Autor (2017)

Pelos dados dos gráficos da figura 29 e tabela 9, infere-se que a reação de transesterificação enzimática é uma reação de pseudo-primeira ordem, pois considerou-se que devido ao excesso de metanol utilizado a sua concentração permaneceu praticamente constante ao longo da reação. Analisando-se trabalhos de outros autores, como Liu et al. (2010), que utilizando a lipoenzima TL IM e a novozym 435 também encontraram uma cinética de pseudo-primeira ordem. Zeng, Yang e Fang (2017) em seus estudos de transesterificação utilizando metóxido de sódio (CH_3ONa) como catalisador, encontraram valores semelhantes para a ordem de reação. Portanto, a remodelação da transesterificação para uma reação de primeira ordem torna-se compatível para justificar o modelo cinético.

Utilizando-se a equação de Arrhenius, determinou-se a energia de ativação para a reação através do método do gráfico apresentado na figura 31. Para a determinação deste parâmetro cinético, não foi utilizada a temperatura de 55 °C, pois nesta já havia indícios de degradação enzimática comprovada pelo decréscimo da eficiência, tornando os dados não confiáveis.

Figura 31: Gráfico de Arrhenius para determinação da Energia de Ativação



Fonte: Autor (2017)

A partir da equação da reta fornecida pela figura 31, e utilizando-se a equação 5,9, determinou-se que a energia de ativação da reação como sendo de 43,8 KJ/mol. Valor abaixo do que o encontrado por Liu et al. (2010) que foi de 51,71KJ/mol, e maior que o encontrado por Basri et al. (2012) que foi de 16,85KJ/mol.

$$\ln k = - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \quad (5.9)$$

CONCLUSÃO

O método de extração utilizado neste trabalho foi satisfatório por revelar bons rendimentos e não utilizar solventes orgânicos tóxicos, permitindo ainda a possibilidade de aproveitamento dos resíduos. Os parâmetros físico-químicos de qualidade do óleo foram condizentes com os encontrados por outros pesquisadores, o que significa que a matéria-prima utilizada estava em bom estado de conservação.

Apesar do processo de refino reduzir de forma significativa o rendimento final em óleo a sua utilização se faz necessária, visto que houve uma melhora significativa nos parâmetros analisados.

Os parâmetros encontrados para o biodiesel, mesmo não condizentes com algumas especificações mínimas da norma nacional, mostraram que o biodiesel produzido através da matéria-prima em estudo possui potencial para uso como biocombustível.

Observou-se no estudo da otimização da transesterificação enzimática que se mantendo valores intermediários dos parâmetros analisados obtêm-se uma conversão considerável a biodiesel. Isto revela uma economia dos materiais utilizados, principalmente em relação as enzimas que possuem valor elevado.

Através do estudo cinético, verificou-se que a reação apresentou uma cinética de pseudo-primeira ordem, uma energia de ativação de 44 kJ.mol^{-1} e rendimentos de até 90%.

Este estudo demonstrou que com a continuação das pesquisas a utilização de catalisadores enzimáticos em suas atividades máximas podem ser utilizadas como substitutos dos catalisadores ácidos e alcalinos.

Portanto, o trabalho aqui apresentado, fomenta a sua continuação, pois como demonstrado, possui grande potencial para uso prático no futuro.

REFERÊNCIAS

AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, [s.l.], v. 92, n. 8, p.1591-1601, ago. 2014. Elsevier.

ABREU, F.L.B.et al. Avaliação da viscosidade dinâmica de biodiesel–rota etílica–e outros óleos utilizando-se duas abordagens. 2011.

Adams, R.P.; Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy.4th ed. Allured: Carol Stream, 2007.

ADECE- Agência de Desenvolvimento do Estado do Ceará, disponível em <<http://www.adece.ce.gov.br/>> acesso em 10/07/2016.

ALMEIDA, A.P. **Etanolise do óleo de côco: estudo das variáveis de processo**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

ALVES, C.T. **Transesterificação de Óleos e Gorduras Residuais via rotas metílica e etílica utilizando o catalisador Aluminato de Zinco, em presença ou não de CO 2 supercrítico**. 2012. 213 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Official Method Cd 8-53. 4th. ed. Champaign, USA: [s.n.].

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 6th editio ed. [s.l: s.n.].

ANP, 2016d. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Leilões de Biodiesel. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=70020&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1394203021962>. Acesso em 09 mar.de 2016.

ANP, 2016e. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Boletim Mensal do Biodiesel. Fevereiro de 2016. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?dw=65299>. Acesso em 12 fev. de 2016.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Biodiesel. Disponível em <http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em 25 abril de 2017.

ANTCZAK, M.S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis–key factors affecting efficiency of the process. **Renewable energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

APROBIO. **Benefícios do Biodiesel**. 2015. Disponível em: <<http://aprobio.com.br/beneficios-do-biodiesel/>>. Acesso em: 07 jul. 2016.
 ARAUJO, J.M.A. Química De Alimentos: Teoria E Pratica. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 335p.

ARRUDA, L.F. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ASTM INTERNATIONAL. ASTM D7042-16e1. Standard Test Method for Dynamic Viscosity and Density of Liquids by Stabinger Viscometer (and the Calculation of Kinematic Viscosity). West Conshohocken, PA, USA: [s.n.].

ASTM INTERNATIONAL. Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis. West Conshohocken, PA, USA: ASTM International, 1988.

ASTM INTERNATIONAL. Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity). West Conshohocken, PA, USA: ASTM International, 1996. v. 71.

ATADASHI, I.M. et al. The effects of catalysts in biodiesel production: A review. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.14-26, jan. 2013. Elsevier BV.

BASRI, M. et al. Optimization and kinetic study on the synthesis of palm oil ester using Lipozyme TL IM. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 85-86, p.214-219, jan. 2013.

BIODIESELBR. **Glicerina - Sub-produto do biodiesel**. 2006. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>>. Acesso em: 20 set. 2016.

BRAGA, E.A.S. **Caracterização das águas de lavagem provenientes da etapa de purificação da produção de biodiesel de óleo de tilápia**. 2012. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CARIOCA J.O.B. et al. Sustainable Aquaculture for Microalgae, Biofuels and Feed Productions in International Microalgae and Biofuels Workshop (Anais) 2010.

CASTRO, B.C.S. **Otimização das Condições da Reação de Transesterificação e Caracterização dos Rejeitos dos Óleos de Fritura e de Peixe para Obtenção de Biodiesel**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CHANG, R. **Química Geral - Conceitos Essenciais**. Trad. 4.ed. Maria J. F. Rebelo, et. all. McGraw-Hill, 2006.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.776-792, abr. 2009.

DECKER, A.T. et al. Impactos ambientais dos resíduos de pescado. **Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2016.

DEGIRMENBASI, N. et al. Biodiesel synthesis from canola oil via heterogeneous catalysis using functionalized CaO nanoparticles. **Fuel**, [s.l.], v. 153, p.620-627, ago. 2015.

DIAS, F.P. **APROVEITAMENTO DE VÍSCERAS DE TILÁPIA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

DNOCS. **Produção de Tilápia**. Disponível em: <<http://www2.dnocs.gov.br/ultimas-noticias/3076-noticia-site-antigo-3500>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

ENCINAR, J.M. et al. Transesterification of rapeseed oil in subcritical methanol conditions. **Fuel Processing Technology**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.40-46, fev. 2012. Elsevier

ENERGIA, Ministério de Minas e. **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel: Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/perguntas.html>>. Acesso em: 07 jul. 2016.

FAO. **Produção da aquicultura no Brasil poderá crescer 104% até 2025, destaca levantamento da FAO**. 2016. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/producao-da-aquicultura-no-brasil-podera-crescer-104-ate-2025-destaca-levantamento-da-fao/>>. Acesso em: 20 set. 2016.

FATTAH, I.R. et al. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 356-370, 2014.

FELTES, M.M.C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.19-23, nov. 2004.

FERREIRA, E.O. et al. Extração e caracterização do óleo das vísceras do peixe tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) produzido no Açude Castanhão-CE. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012.

FILHO, D.B.F.; SILVA JÚNIOR, José Alexandre da. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. **Opinião Pública**, Campinas, v. 16, n. 1, p.160-185, jun. 2010.

FU, X. et al. Investigation of Lipozyme TL IM-catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 4, p. 553-559, 2014.

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

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 10-16, 2012.

HASE. **PT HASE UTAMA INDONESIA**. ISL FP 170 5G2 Abel Flash Point. Disponível em <http://www.haseutama.com/?products=fp170-5g2-abel-flash-point>. Acesso em 04 de maio de 2017.

KO, C. et al. Impact of methanol addition strategy on enzymatic transesterification of jatropha oil for biodiesel processing. **Energy**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.375-379, dez. 2012.

LAFUENTE, R.F. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 62, n. 3-4, p.197-212, mar. 2010. Elsevier

LAFUENTE, R.F. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 45, n. 6-7, p.405-418, dez. 2009.

LAM, M. K. et al. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.500-518, jul. 2010.

LIMA, L.P. et al. Opacidade da fumaça de um trator agrícola funcionando com três fontes de biodiesel como combustível. **Ciência & Tecnologia**, v. 7, n. 1, 2015.

LIU, Y. et al. Transesterification for biodiesel production catalyzed by combined lipases: optimization and kinetics. **AIChE journal**, v. 56, n. 6, p. 1659-1665, 2010.

LÔBO, I.P. et al. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, [s.l.], p.1596-1608, 14 jul. 2009.

MACHADO, G.; CHAVES, J.B.P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu/physical and chemical characterization and fatty acid composition of babassu oil. **Ceres**, v. 53, n. 308, 2015.

MALACRIDA, C.R.; JORGE, N. Influência da relação superfície/volume e do tempo de fritura sobre as alterações da mistura azeite de dendê-óleo de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.724-730, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

MANAHAN, S. **Química ambiental**. 9. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 944p.

MARENGONI, N. G. Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, n. 210, p. 127-138, 2006.

MARTINS, G. et al. Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 42, p.154-157, fev. 2015. Elsevier BV.

MARTINS, G.I. **Potencial de extração de óleo d e peixe para produção de b iodiesel**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Energia na Agricultura, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2012.

MENEGAZZO, M.L. et al. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 157, p.100-104, ago. 2014. Elsevier

MINITAB. **Fundamentos do gráfico de Pareto**. Disponível em: <<http://support.minitab.com/pt-br/minitab/17/topic-library/quality-tools/quality-tools/pareto-chart-basics/>>. Acesso em: 26 set. 2016.

MINITAB. **O que é um gráfico de contorno?** Disponível em: <<http://support.minitab.com/pt-br/minitab/17/topic-library/basic-statistics-and-graphs/graphs-of-three-variables/contour-plots/contour-plot/>>. Acesso em: 26 set. 2016.

MME, 2016a. Ministério das Minas e Energia. Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis. Disponível em <http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>. Acesso em 02 fev. 2016.

MOURA, B, S. **Transesterificação Alcalina de Óleos Vegetais para Produção de Biodiesel: Avaliação Técnica e Econômica**. 2010. 146 f, Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia Química-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

PESSATTI, M.L. et al. Aproveitamento dos subprodutos do pescado. **Meta**, v. 11, 2001.

POUSA, G.P.A.G et al. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, [s.l.], v. 35, n. 11, p.5393-5398, nov. 2007. Elsevier BV.

PUPA, J.M.R. Óleos e gorduras na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, p. 69-73, 2004.

QUEIROZ, F.G. et al. Aproveitamento dos resíduos da tilapicultura para produção de biodiesel: caracterização e avaliação de misturas com biodiesel de mamona. **Blucher Engineering Proceedings**, v. 3, n. 2, p. 639-645, 2016.

RONG, D. I. N. G. et al. Transesterification of Swida wilsoniana oil with methanol to biodiesel catalyzed by Lipozyme TL IM in MgCl₂-saturated solution. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 38, n. 3, p. 287-291, 2010.

ROOSTA, A.; SABZPOOSHAN, I. Modeling the effects of cosolvents on biodiesel production. **Fuel**, [s.l.], v. 186, p.779-786, dez. 2016. Elsevier BV.

RUSCHEL, C.F.C. et al. Otimização de transesterificação double step process (tdsp) to the production of biodiesel through doehlert experimental design. **Química Nova**, [s.l.], p.267-372, 2016. GN1 Genesis Network.

SANTANA, H.S. et al. Transesterification reaction of sunflower oil and ethanol for biodiesel synthesis in microchannel reactor: Experimental and simulation studies. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 302, p.752-762, out. 2016. Elsevier

SANTOS, C.E. et al. Oil from the acid silage of Nile tilapia waste: Physicochemical characteristics for its application as biofuel. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 80, p.331-337, ago. 2015. Elsevier BV.

SANTOS, L.D. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) in Nile tilapia diets: productive performance, chemical and fatty acids composition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

SDA- Secretaria de Desenvolvimento Agrário do Estado do Ceará. Disponível em <<http://www.sda.ce.gov.br/>>. Acesso em 10/07/2016.

SEGURA, J.G. **Extração e caracterização de óleos de resíduos de peixes de água doce**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SILVA, W.C. et al. Thermal degradation of ethanolic biodiesel: Physicochemical and thermal properties evaluation. **Energy**, [s.l.], v. 114, p.1093-1099, nov. 2016. Elsevier

SKORONSKI, E. et al. Kinetic study of the production of the aliphatic ester n-amyl octanoate by direct esterification using the enzyme Lipozyme TL IM as catalyst. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 4, p. 897-902, 2010.

SONG, C. et al. Evaluation of hydrolysis-esterification biodiesel production from wet microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 214, p.747-754, ago. 2016. Elsevier

SOUZA, E.G. **Geração de biodiesel e biogás a partir dos resíduos do processamento de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SUAREZ, P.A. Z. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.768-775, mar. 2009.

SUN, S.; HU, B. A novel method for the synthesis of glyceryl monocaffeate by the enzymatic transesterification and kinetic analysis. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 214, p.192-198, jan. 2017.

TEIXEIRA, J.I. **Utilização de Co-solventes na Produção de Biodiesel a partir de Óleo Residual e Etanol por Catálise Enzimática**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologias da Proteção Ambiental, Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2011.

VIDOTTI, R. M.; BORINI, M. S. M. Aparas da filetagem da tilápia se transformam em polpa condimentada. **Panorama da Aquicultura**, [s.l.], v. 16, n. 96, p. 38-41, 2006.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. **Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Continental Instituto de Pesca-APTA-SAA. São José do Rio Preto, SP, Brasil**, 2006.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M.H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 15, p.7232-7237, out. 2008. Elsevier BV.

WANG, Z. et al. Study on Lipozyme TL IM-catalyzed esterification of oleic acid and glycerol for 1,3-diolein preparation. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 127, p.11-17, maio 2016. Elsevier.

XU, W.D.; ZENG, J.; LIU, D.Y. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent-free medium. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 1, p. 45-48, 2004.

XU, Y.; LI, G.X.; SUN, Z.Y. Development of biodiesel industry in China: Upon the terms of production and consumption. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 54, p.318-330, fev. 2016. Elsevier.

XUE, J. Combustion characteristics, engine performances and emissions of waste edible oil biodiesel in diesel engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 23, p.350-365, jul. 2013. Elsevier.

ZANOTTO, S.P.. **Utilização de enzimas e microorganismos para a obtenção de compostos oticamente ativos**. 2003. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ZENG, Dan; YANG, Liu; FANG, Tao. Process optimization, kinetic and thermodynamic studies on biodiesel production by supercritical methanol transesterification with CH₃ONa catalyst. **Fuel**, [s.l.], v. 203, p.739-748, set. 2017. Elsevier BV.

ANEXOS

Anexo 1: Tabela de Refino da AOCS 1

DEFINITION AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS

A.O.C.S. Official Method Ca 9b-52

Formerly Ca 2b-44
Revised April 1949

Refining Loss

Definition: This method determines the loss of free fatty acids, oil and impurities when the sample is treated with alkali solutions under the specific conditions of the test.

Scope: Applicable only to extracted soybean oil.

Note: All references in this method are to A.O.C.S. Official Method Ca 9a-52.

A. Apparatus:

1. As described in Section A.

B. Solutions:

1. As described in Section B, except that only 14° Bé lye soln. is required.

C. Procedure:

1. The general procedure for conducting the refining test on extracted soybean oil is as directed in A.O.C.S. Official Method Ca 9a-52 (expeller and hydraulic soybean oil) except for variations in the amount of lye soln. used and the agitation time in the hot bath. Two refinings are made using 87.5% (7/8) and 86.6% (2/3) of the maximum of 14° Bé NaOH. Refer to Table 4 to determine the correct amount

TABLE 4
Weight of Lye in Grams Per 100 Grams of Oil—Extracted Soybean Oil

F.F.A.†	14° 87.5% X	14° 86.6%	Acid % F.F.A.†	14° 87.5%	14° 86.6%
.1	5.2	3.9	2.6	9.6	7.3
.2	5.3	4.1	2.7	9.8	7.4
.3	5.5	4.2	2.8	9.9	7.6
.4	5.7	4.3	2.9	10.1	7.7
.5	5.9	4.5	3.0	10.3	7.8
.6	6.0	4.6	3.1	10.5	8.0
.7	6.2	4.7	3.2	10.6	8.1
.8	6.4	4.9	3.3	10.8	8.2
.9	6.6	5.0	3.4	11.0	8.4
1.0	6.7	5.1	3.5	11.2 x 5	8.5
1.1	6.9	5.3	3.6	11.4	8.6
1.2	7.1	5.4	3.7	11.5	8.8
1.3	7.3	5.5	3.8	11.7	8.9
1.4	7.5	5.7	3.9	11.9	9.1
1.5	7.6	5.8	4.0	12.1	9.2
1.6	7.8	5.9	4.1	12.2	9.3
1.7	8.0	6.1	4.2	12.4	9.5
1.8	8.2	6.2	4.3	12.6	9.6
1.9	8.3	6.4	4.4	12.8	9.7
2.0	8.5	6.5	4.5	12.9	9.9
2.1	8.7	6.6	4.6	13.1	10.0
2.2	8.9	6.8	4.7 PEIXE	13.3 x 5	10.1
2.3	9.0	6.9	4.8	13.5	10.3
2.4	9.2	7.0	4.9	13.7	10.4
2.5	9.4	7.2	5.0	13.8	10.5

CÁLCULO SALINHO:

I - 500g óleo / 56g de Soda a 20%

II - $\frac{56g \times 0.1 (10\%)}{0.20 (20\%)} = 28g \text{ Soda } 20\% + 40\% \text{ Excesso} = 39.2g \text{ P/100}$

I - 500g óleo / 66g de Soda a 20%

II - $\frac{66g \times 0.1 (10\%)}{0.20 (20\%)} = 33.25g \text{ Soda } 20\% + 40\% \text{ Excesso} = 46.55g$

CÁLCULO P/ PEIXE

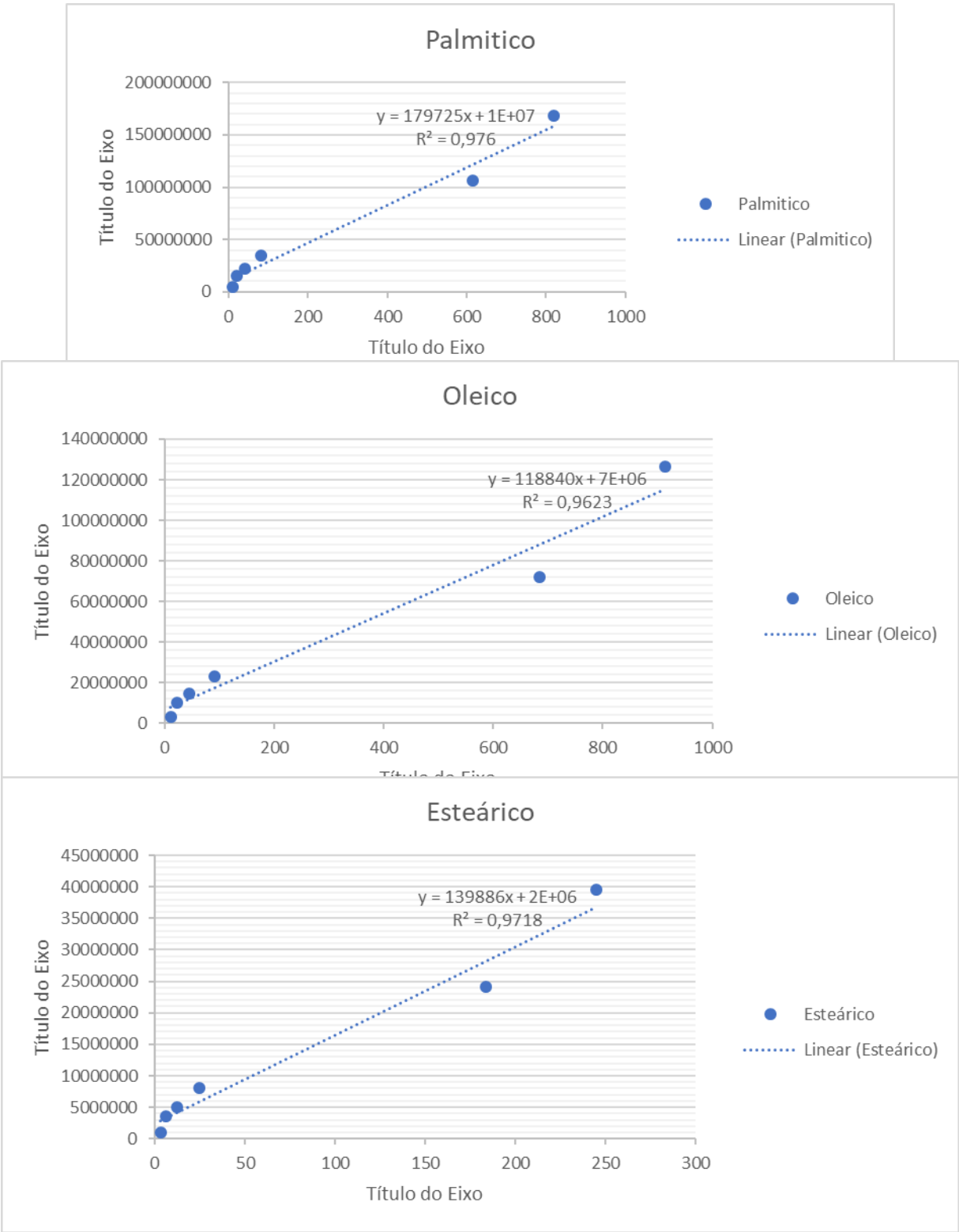
Anexo 2: Tabela de otimização 1

	Dosagem de enzima(%)	Óleo: metanol	Temperatura	Co-solvente	Massa da amostra	[óleo]	[Biodiesel]	%
1	30	10	27	-1	0,3407			
2	10	10	40	-1	0,1065	10650	2475,65428	23,24558
3	30	10	40	-1	0,1173	11730	5854,63188	49,91161
4	30	3	27	-1	0,1085	10850	7589,33448	69,94778
5	10	10	27	1	0,1086	10860	2842,83958	26,17716
6	10	3	27	-1	0,1058	10580	5309,94279	50,1885
7	10	3	27	1	0,1099	10990	4063,35163	36,97317
8	10	3	27	1	0,1019	10190	3337,78539	32,7555
9	30	10	40	1	0,1057	10570	4959,88058	46,92413
10	20	6,5	33,5	0	0,1139	11390	7965,27707	69,9322
11	10	10	40	-1	0,1116	11160	1775,63031	15,91067
12	30	10	40	1	0,1176	11760	6240,72241	53,06737
13	10	10	27	-1	0,1107	11070	1816,0054	16,40475
14	10	10	40	1	0,1179	11790	5471,91924	46,41153
15	30	3	40	1	0,1077	10770	5441,46566	50,52429
16	20	6,5	33,5	0	0,1087	10870	4814,18079	44,28869
17	30	3	27	1	0,1095	10950	5964,7163	54,4723
18	10	3	40	-1	0,1087	10870	5993,8529	55,14124
19	30	3	27	-1	0,1292	12920	9833,01778	76,10695
20	30	3	27	-1	0,1117	11170	8791,09734	78,70275
21	10	3	40	1	0,1074	10740	2749,8063	25,60341
22	30	3	40	-1	0,1073	10730	7633,90676	71,14545
23	10	3	40	-1	0,1258	12580	6846,09893	54,4205
24	30	10	27	1	0,1045	10450	5301,47182	50,73179
25	10	10	40	1	0,1058	10580	4951,24348	46,79814
26	10	3	27	1	0,1072	10720	3639,2719	33,94843
27	10	3	27	-1	0,118	11800	2850,58047	24,15746

28	10	10	27	-1	0,1116	11160	981,166608	8,791815
29	30	3	27	1	0,1019	10190	5071,2141	49,76658
30	30	3	40	1	0,1013	10130	4269,77233	42,14978
31	10	10	27	1	0,1086	10860	3392,84818	31,2417
32	30	3	40	-1	0,1022	10220	7814,67164	76,4645
33	10	3	40	-1	0,1111	11110	7836,8656	70,53884
34	30	10	40	1	0,1134	11340	4188,37673	36,93454
35	30	10	40	-1	0,109	10900	7553,22544	69,29565
36	10	3	40	1	0,1014	10140	2787,07276	27,48592
37	10	3	27	-1	0,1232	12320	2727,04993	22,13515
38	30	3	40	1	0,1073	10730	5227,97268	48,72295
39	10	10	27	-1	0,1094	10940	908,103828	8,300766
40	30	10	40	-1	0,111	11100	5959,50529	53,68924
41	10	10	40	-1	0,1065	10650	1338,83376	12,57121
42	10	10	40	1	0,1106	11060	3624,60073	32,77216
43	30	3	27	1	0,1028	10280	3073,46087	29,89748
44	20	6,5	33,5	0	00/jan	10950	8996,13	82,15644
45	30	3	40	-1	0,1028	10280	7403,627	72,01972
46	10	3	40	1	0,1013	10130	2573,13827	25,40117
47	10	10	27	1	0,1232	12320	4251,71087	34,51064
48	30	10	27	1	0,1034	10340	5655,61119	54,69643
49	30	10	27	-1	0,107	10700	3576,57879	33,42597
50	30	10	27	-1	0,1036	10360	4377,43282	42,25321
51	30	10	27	1	0,1127	11270	6528,98553	57,93244

Fonte: Autor (2017)

Anexo 3: Curvas padrão para o estudo da otimização e cinética



Fonte: Autor (2016)