



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO FARELO DE ARROZ VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

JOSÉ EVANDRO SARAIVA PEREIRA

QUÍMICO INDUSTRIAL E LICENCIADO EM QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA
E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2013



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO FARELO DE ARROZ *VIA* CATÁLISE ENZIMÁTICA

JOSÉ EVANDRO SARAIVA PEREIRA

QUÍMICO INDUSTRIAL E LICENCIADO EM QUÍMICA

ORIENTADORA: PROF. Dra. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE

COORIENTADORA: PROF. Dra. JEANE ESTELA DE LIMA DULLIUS

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre

Agosto, 2013



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO FARELO DE ARROZ VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

CANDIDATO: JOSÉ EVANDRO SARAIVA PEREIRA

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

DRA. JEANE ESTELA DE LIMA DULLIUS - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

DR. LUIZ ANTONIO MAZZINI FONTOURA - DO CURSO DE QUÍMICA - ULBRA

DR. TIZIANO DALLA ROSA - DA FACULDADE DE QUÍMICA - PUCRS

DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materials@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

“Você só poderá crescer de verdade se estiver fora da sua zona de conforto. Para avançar até o máximo de seu potencial, é necessário que você viva o limite das suas possibilidades”.

(T. Harv Eker)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais, Galvão e Marli, aos meus irmãos Elesandro, Ezequiel, Rodrigo e Claudione, ao meu amigo e irmão Jorge e sua esposa Zélia Passos e aos meus tios Silvio e Luzia pelo incentivo e apoio que tive em todos os momentos da minha vida. Também, aos meus queridos amigos da Comunidade Sócio-Educativa/FASERS e PUCRS.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as minhas conquistas, minha família, amigos, trabalho e por não deixar-me nunca esmorecer diante das adversidades nesta caminhada.

Aos meus pais, Galvão e Marli, por terem me dado a vida, amor e carinho. Ensinado princípios e valores, assim como me mostrarem que a vida nos possibilita vários caminhos, e quem escolhe qual seguir, somos nós.

Agradeço à orientação da professora Rosane Ligabue e coorientação da professora Jeane Dullius, pelo incentivo, oportunidade de aprendizado pessoal e profissional, desde a graduação, passando pela iniciação científica e neste mestrado. A vocês, minha eterna gratidão e meu muito obrigado!

Agradeço, aos professores Tiziano Dalla Rosa, André Arigony, Luiz Ernani, Marcus Seferin e Carlos Carone, pela ajuda e ensinamentos no laboratório ou em sala de aula. Muito obrigado!

A todos os funcionários da Faculdade de Química (Almoxarifado: Luciane, Roberto, Marcos, Paulo e Fernando, Vidreiro: Nelson e Secretaria: Nilza, Neiva e Luciana) pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu grande amigo e colega Leonardo Moreira dos Santos, pela troca de conhecimentos.

Ao professor Rogério Lourega, Lia, Andressa e Flávio do Centro de Excelência em Pesquisa e Inovação em Petróleo, Recursos Minerais e Armazenamento de Carbono (CEPAC) da PUCRS.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) (Leonardo, Carlos, Emamuelli, Renata, Manoela, Marisol, Rafael Soares, Wesley, Claudia, Gustavo e Guilherme), pela amizade, apoio e auxílio.

Ao professor Carlos Alexandre, aos técnicos Sérgio Alegre e Mozart Macagnan do Laboratório de Metalurgia e Tratamento Térmico (LAMETT) da PUCRS.

Ao pessoal do Laboratório de Processos Ambientais (LAPA) da PUCRS, a doutoranda Aline e ao Prof. Eduardo Cassel.

Ao Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS e a professora Vanusca Dalosto da Universidade Feevale.

Ao professor Dr. João Feliz Duarte de Moraes de Bioestatística da Faculdade de Matemática da PUCRS.

A todos meus amigos e colegas do CSE - Ala "A". Quero agradecer a estas pessoas que sempre me ajudaram e acreditaram em meu trabalho. Tatiane Pinheiro, Jair Cordeiro, João Fabian, Everson Costa, João Agnaldo, Rosane Bento e Thomas Marmett.

Aos funcionários do PGETEMA (Secretaria: Cláudia e Viviane), FAQUI pela estrutura oferecida e a CAPES pela bolsa concedida.

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SÍMBOLOS.....	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1. Aminoácidos.....	22
3.2. Enzimas.....	23
3.2.1. Sítio ativo das lipases	25
3.2.2. Especificidade das lipases ao substrato	27
3.3. Biotransformação.....	27
3.3.1. Biorefinaria.....	28
3.3.2. Produção de arroz	28
3.3.3. Farelo de Arroz	30
3.4. Reações catalisadas por lipases	32
3.4.1. Reação de hidrólise	32
3.4.2. Reação de transesterificação	32
3.4.3. Reação de esterificação	33
3.4.4. Mecanismo da reação de transesterificação na produção de biodiesel ...	34
3.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática	35
3.5. Escolha da lipase	37
3.6. Substratos.....	37
3.6.1. Lipídios.....	37

3.6.2. Álcool	38
3.7. Sistemas de solvente	41
3.7.1. Solvente orgânico	41
3.7.2. Co-solvente	43
3.7.3. Sistema isento de solvente	44
3.8. Relação entre solvente e álcool	45
3.9. Temperatura.....	46
3.10. Influência da água	47
3.11. pH	48
3.12. Transferência de massa	49
3.13. Concentração do glicerol	50
3.14. Cinética enzimática	51
3.15. Aditivos	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. Amostra.....	53
4.1.1. Análise da constituição do grão de arroz	53
4.1.2. Análise granulométrica	53
4.1.3. Teor de umidade.....	54
4.1.3.1. Análise gravimétrica.....	54
4.1.3.2. Análise termogravimétrica.....	55
4.1.4. Teor de óleo no farelo de arroz.....	55
4.2. Caracterização microestrutural e química	55
4.2.1. Microscopia eletrônica de varredura e ótica	55
4.2.2. Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado...56	
4.2.3. Avaliação da atividade enzimática em função da hidrólise dos triglicerídeos	57
4.2.3.1. Cinética da reação de formação dos AGL via catálise enzimática ..58	
4.2.3.2. Análise estatística	58
4.2.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	58
4.3. Catálise enzimática no farelo de arroz	59
4.3.1. Efeito da relação solvente e álcool na catálise enzimática	59
4.3.2. Influência do pH na catálise enzimática.....	59

4.3.3. Influência do pH na síntese do biodiesel a partir do óleo bruto extraído do farelo de arroz	60
4.3.4. Etapa de purificação dos ésteres metílicos	60
4.4. Caracterização por cromatografia gasosa.....	61
4.4.1. Fator de resposta relativo	61
4.4.2. Quantificação do biodiesel.....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
5.1. Constituição do grão de arroz.....	64
5.2. Análises granulométrica, gravimétrica e termogravimétrica	65
5.3. Análise termogravimétrica	66
5.4. Teor de óleo	68
5.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	69
5.6. Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado....	70
5.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	72
5.8. Atividade enzimática da lipase no farelo de arroz.....	75
5.9. Cinética da reação de formação de AGL e análise estatística	77
5.10. Determinação do fator de resposta relativo	78
5.11. Efeito do solvente <i>versus</i> álcool na conversão do óleo presente no farelo de arroz em ésteres.....	80
5.12. Efeito do metóxido de potássio na síntese do biodiesel do óleo presente no farelo de arroz em ésteres	82
5.13. Efeito do metóxido de potássio na síntese do biodiesel do óleo bruto extraído do farelo de arroz em ésteres	84
6. CONCLUSÕES	87
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS	109

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Sequência de quatro resíduos de aminoácidos Met, Asp, Leu e Tyr formando uma cadeia polipeptídica.23
- Figura 3.2. Estrutura cristalográfica da enzima *lipase Candida antarctica B*.24
- Figura 3.3. Representação esquemática de uma sequência de aminoácidos (Ser, Arg, Gly, Glu, Thr e Ser) formando o sítio ativo de uma enzima, que estabelece ligações de hidrogênio e iônicas com a molécula de monofosfato cíclico de adenosina.25
- Figura 3.4. Produção global de arroz com casca (*colunas verdes*) e área ocupada (*linha vermelha*).....29
- Figura 3.5. Representação esquemática da constituição do grão de arroz.30
- Figura 3.6. Percentual de AGL *versus* tempo de armazenamento do farelo de arroz nas temperaturas de 5, 30, 50 e 70°C. Percentual de AGL inicial 6,6% e teor de umidade de 10,3% em peso.31
- Figura 3.7. Representação esquemática da reação de hidrólise catalisada através da *lipase*.32
- Figura 3.8. Representação esquemática de duas das reações catalisadas pelas *lipases*: (a) transesterificação e (b) esterificação.33
- Figura 3.9. Mecanismo da reação de transesterificação de triglicerídeos *via* catálise enzimática.35
- Figura 3.10. Fluxograma dos parâmetros reacionais que influenciam a atividade enzimática na síntese do biodiesel.36
- Figura 3.11. Influência da razão molar (metanol:óleo) na conversão dos triglicerídeos em biodiesel.40
- Figura 3.12. Influência da razão molar álcool:óleo na transesterificação do óleo de soja. Novozym 435 (-■- *metanol*), Lipozyme TL-IM (-o- *etanol*) e Lipozyme RM-IM (-▲- *butanol*), 30°C, 15% de enzima, 4% de água e 6 h de reação.40
- Figura 3.13. Influência do comprimento da cadeia dos álcoois na esterificação em sistemas de solvente hexano (*branco*) e isento de solvente (*preto*).41

- Figura 3.14. Influência do solvente orgânico na conversão do óleo de girassol por transesterificação via rota metílica usando *lipases* imobilizadas (*RM* - *Rhizomucor miehei*; *TL* - *Thermomyces lanuginosa*; *AK* - *Pseudomonas fluorescens*).....42
- Figura 3.15. Comparação do percentual de conversão para as diferentes matérias-primas através do uso de solvente orgânico puro e co-solvente.44
- Figura 3.16. Reação de transesterificação mostrando os resultados dos sistemas: isento de solvente e com o solvente *t*-butanol.45
- Figura 3.17. Representação esquemática: (a) sistema isento de solvente e (b) com solvente orgânico.46
- Figura 3.18. Influência da temperatura na metanólise do óleo de colza.47
- Figura 3.19. Influência do percentual de água na metanólise do óleo de farelo de arroz.48
- Figura 3.20. Efeito do pH na atividade enzimática da *lipase* do farelo de arroz.49
- Figura 3.21. Influência da velocidade de agitação do sistema reacional na conversão dos ésteres metílicos. Condições de reação: razão molar de 4:1 de metanol para o óleo, 4% de Novozyme 435, 40°C, 12 h de reação.50
- Figura 3.22. Visualização do glicerol na etanólise de óleo de colza, catalisada por diferentes *lipases* imobilizadas: (a) *Lipozyme TL-IM*, (b) *Novozyme 435* e (c) *Lipozyme TL-HC*.51
- Figura 5.1. Resultado das imagens do grão de arroz (*Oryza sativa*) mostrando suas principais constituições: (a) fotografia do grão de arroz com casca e sem casca em escala de 0,5 mm e (b) micrografia da seção longitudinal do grão de arroz com casca.....64
- Figura 5.2. Curvas TG das faixas granulométricas 20-32, 32-35, 35-60, 60-100 mesh e do farelo de arroz bruto.....67
- Figura 5.3. Resultados da extração do óleo em base seca para as granulometrias de 20-32, 32-35, 35-60 e 60-100 mesh.....68
- Figura 5.4. Resultados da extração do óleo do farelo bruto e para as granulometrias de 20-100, 32-100, 20-32, 32-35, 35-60 e 60-100 mesh em base úmida (10,5%).....69
- Figura 5.5. (a) micrografia e (b) espectro da análise por EDS do germe e/ou embrião contido na baixa granulométrica 20-32 mesh.69

- Figura 5.6. Espectros de FTIR sobrepostos do (a) óleo do farelo de arroz refinado e (b) do óleo extraído do farelo de arroz bruto na região de número de onda de 1816-1658 cm^{-1}73
- Figura 5.7. Espectros de FTIR sobrepostos do óleo extraído das faixas granulométricas e farelo de arroz bruto obtidos após o polimento do grão de arroz na região de número de onda de 1823-1622 cm^{-1}73
- Figura 5.8. Espectros de FTIR sobrepostos do óleo extraído das faixas granulométricas e farelo de arroz bruto obtidos após dez semanas de estocagem na região de número de onda de 1812-1611 cm^{-1}74
- Figura 5.9. Percentual de AGL nas diversas granulometrias e farelo de arroz bruto em função do tempo de armazenamento na temperatura de 35°C.76
- Figura 5.10. Curva $\ln[AGL]/[AGL]_0$ versus *tempo* (dia) da hidrólise dos triglicerídeos do óleo extraído do farelo de arroz através da atividade enzimática nas diversas granulometrias e farelo de arroz bruto de 35°C.77
- Figura 5.11. Perfil cromatográfico da mistura dos substratos (C16:0, C18:1 e C18:2) e do PI utilizados na obtenção do FRR, na faixa de (t_r) de 6 a 15 min, do total de 22,75 min de análise.79
- Figura 5.12. Determinação experimental do FRR de cada um dos substratos (C16:0, C18:1 e C18:2) em comparação com do PI.79
- Figura 5.14. Influência do MeOK: (a) pH do meio reacional medido antes e 0, 12 e 24 h e (b) conversão do substrato (óleo) presente no farelo de arroz em biodiesel. Razão molar 8:1 metanol:óleo, 12:1 hexano:metanol, KOH (1, 1,5 e 2% m/m). Temperatura de 35°C, tempo de reação de 24 h, agitação mecânica de 180 rpm e as respectivas soluções de MeOK foram adicionadas em duas etapas (0 e 12 h) conforme o item 4.3.2. ...83
- Figura 5.15. Efeito do percentual do MeOK na catálise enzimativa no óleo bruto do farelo de arroz: (●) razão molar 3:1 metanol:óleo, 3:1, hexano:metanol, KOH (0, 1, 1,5 e 2% m/m). (▲) razão molar 8:1 metanol:óleo, 12:1 hexano:metanol, KOH (0 e 1% m/m). Para ambos as sínteses a *lipase Porcine pancreas* 5% (m/m), 35°C, 24 h e 180 rpm. As respectivas soluções de MeOK foram adicionadas em duas etapas conforme item 4.3.2.85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição de aminoácidos e massa molecular da <i>lipase</i> do farelo de arroz.	26
Tabela 3.2. Valores médios dos percentuais e produtividade de óleo de oleaginosas.	38
Tabela 4.1. Parâmetros de operação para as análises por ICP-OES.....	56
Tabela 5.1. Constituição do grão de arroz (<i>Oryza sativa</i>) obtido experimentalmente (base seca).	65
Tabela 5.2. Resultados das análises granulométrica, gravimétrica e termogravimétrica na caracterização do farelo de arroz.	66
Tabela 5.3. Resultados da quantificação dos elementos metálicos presentes no farelo de arroz.	70
Tabela 5.5. Constante k (dia^{-1}) da hidrólise dos triglicerídeos determinada através da $\ln[\text{AGL}]/[\text{AGL}]_0$ versus tempo (dia) na temperatura de 35°C.....	78

LISTA DE SÍMBOLOS

Abreviações

AGL	Ácido graxo livre
[AGL]	Concentração de ácido graxo livre
ANOVA	Análise de Variância
ATR	Refletância total atenuada, do inglês - <i>Attenuated Total Reflectance</i>
B5	% de Biodiesel misturado ao diesel de petróleo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DTG	Térmogravimétrica Derivada, do inglês – <i>Differential Thermogravimetric</i>
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X, do inglês - <i>Energy Dispersive X-Ray Spectrometer</i>
FID	Detector por Ionização de Chama, do inglês – <i>Flame Ionization Detector</i>
FRR	Fator de resposta relativo
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês – <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GC	Cromatografia em fase gasosa, do inglês – <i>Gas Chromatography</i>
IA	Índice de acidez
IC	Intervalo de confiança
ICP-OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês – <i>Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry</i>
k	Constante cinética
KOH	Hidróxido de potássio
MeOK	Metóxido de potássio
Mesh	Tamanho; mesh (número de abertura por polegada linear em uma tela)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura, do inglês - <i>Scanning Electron Microscopy</i>
MO	Microscopia Ótica
n	Número de repetições (replicatas)
P	Significância estatística

PPL	<i>Lipase, Porcine pancreas</i>
S_i	Substratos
sn	Número específico, do inglês – <i>specific number</i>
TGA	Análise Termogravimétrica, do inglês – <i>Thermogravimetric Analysis</i>

Unidades

°C	Graus Celsius
g	Grama
h	Hora
kg	Quilograma
L	Litro
m/m	Razão massa/massa
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mol	Quantidade de matéria
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
t_r	Tempo de retenção
μm	Micrometro
μmol	Micromol

RESUMO

PEREIRA, José Evandro Saraiva. **Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática**. Porto Alegre. 2013. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Avanços tecnológicos que possibilitem reduzir os custos do processo de produção de biodiesel praticados hoje em dia são necessários, para torná-lo mais competitivo frente aos combustíveis fósseis. Neste contexto, o presente trabalho estudou a síntese de biodiesel *via* catálise enzimática utilizando o farelo de arroz e o óleo bruto extraído deste através da biotransformação do óleo no farelo de arroz e utilizando a *lipase* presente nesta matéria-prima como biocatalisador. Ao se usar as razões molares de 8:1 de metanol:óleo e 12:1 de hexano:metanol, 35°C, 180 rpm, 10,5% de umidade, 25 g de farelo de arroz, durante 24 h de reação com adição de metanol em duas etapas foi alcançado 5,7% de conversão em ésteres metílicos. Este resultado demonstrou que o solvente orgânico hidrofóbico com $\log P > 3$ auxiliou a catálise enzimática quando comparado com um solvente polar (acetronitrila/*t*-butanol/metanol). O ajuste de pH do meio com a adição de metóxido de potássio (1% m/m KOH/óleo), nas mesmas condições reacionais, aumentou em 2,2 vezes a conversão em ésteres metílicos (12,9%). A adição de maiores concentrações de metóxido de potássio (1,5 e 2% m/m) manteve o pH ≈ 7 , mas não teve efeito na conversão em ésteres metílicos, ao contrário promoveu uma redução para 10,7% e 7,1%, respectivamente. A catálise enzimática realizada sobre o óleo bruto extraído do farelo de arroz nas razões molares de 3:1 de metanol:óleo e 3:1 de hexano:metanol utilizando a *lipase Porcine pancreas*, mantendo-se constante os outros parâmetros reacionais, levou a uma conversão de 72,1% em ésteres metílicos. Este trabalho mostrou que, em condições adequadas, a enzima *lipase* está mais protegida da toxicidade do metanol, ao mesmo tempo em que melhora a solubilidade deste álcool no óleo promovendo assim a síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz.

Palavras-Chaves: farelo de arroz, *lipase*, catálise enzimática, biotransformação, biodiesel.

ABSTRACT

PEREIRA, José Evandro Saraiva. **Synthesis of biodiesel from rice bran via enzymatic catalysis**. Porto Alegre. 2013. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Technological advances that allow reducing the biodiesel production process costs practiced today, are needed to make it more competitive against fossil fuels costs. In this context, the present work studied two methods for the synthesis of biodiesel *via* enzymatic catalysis using rice bran and the crude oil extracted from it, through the biotransformation of oil in the rice bran and using the *lipase* found in raw material as biocatalyst. When it was used the molar ratios of methanol:oil 8:1 and hexane:methanol 12:1, 35°C, 180 rpm, 10.5% moisture, 25 g of rice bran for 24 h the reaction with the addition of methanol in two steps has been reached 5.7% conversion to methyl esters. This result demonstrated that the hydrophobic organic solvent with $\log P > 3$ assisted enzymatic catalysis when compared polar solvent (acetonitrile/*t*-butanol/methanol). The pH adjustment of the medium with the addition of potassium methoxide (1% w/w KOH/oil) under the same reaction conditions increased in 2.2 times conversion to methyl esters (12.9%). The addition of higher concentrations of potassium methoxide (1.5 and 2% w/w) kept the pH ≈ 7 , but had no effect on the conversion to methyl esters, unlike promoted a decrease to 10.7% and 7.1%, respectively. The enzymatic catalysis performed on the crude oil extracted from rice bran with molar ratios of methanol:oil 3:1 and hexane:methanol 3:1 using *Porcine pancreatic lipase* keeping constant the other reaction parameters, led to a 72.1% of conversion to methyl esters. This work showed that, under suitable conditions, the enzyme *lipase* is more protected from methanol toxicity, while it improves the solubility of the alcohol in the oil thereby promoting the synthesis of biodiesel from rice bran.

Key-words: rice bran, *lipase*, enzymatic catalysis, biotransformation, biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

Quatro décadas atrás uma frase bastante irônica, mas muito intrigante e de certo modo utópica, foi proferida pelo Sheikh Zaki Yamani, na época ministro do petróleo da Arábia Saudita durante o primeiro (1973) e o segundo (1979) choques do petróleo de que “*a idade da pedra não acabou por falta de pedra, assim como a era do petróleo não irá acabar por falta de petróleo*” (TFE, 2012). Fazendo alusão da necessidade de obter novas fontes de energia renováveis (mais eficiente, segura e menos prejudicial ao meio ambiente) incorporando-as à matriz energética, e assim, tornando-nos menos dependentes dos combustíveis fósseis (Pires, 2012).

Assim, o interesse por novas fontes de energia, em especial a produção de biocombustíveis líquidos, tem aumentado em todo o mundo como parte de políticas governamentais para enfrentar a crescente escassez de petróleo, assim como, desenvolver novas tecnologias para a obtenção de energia de fontes renováveis para suprir a demanda e auxiliar na mitigação das mudanças climáticas (Solomon, 2010). Segundo consta no boletim mensal dos combustíveis renováveis do Ministério de Minas e Energia, o Brasil encerrou o ano de 2012 com produção de 2,7 bilhões de litros de biodiesel (MME, 2013). Devido à crescente demanda do mercado interno de combustíveis, a previsão é de 2,8 bilhões de litros até 2013, garantindo assim, a mistura de 5% (B5) ao diesel de petróleo (Goes *et al.*, 2013).

Para que a demanda crescente por biodiesel continue sendo garantida, novas fontes de matéria-prima (óleos e gorduras) devem ser disponibilizadas e novas tecnologias desenvolvidas, priorizando o baixo custo de produção do biodiesel além de um processo de baixo impacto ambiental (Vichi e Mansor, 2009). Nesse sentido, à biotecnologia através da biotransformação de óleos e gorduras, possibilita

modificações nas estruturas químicas destes por intermédio de biocatalisadores (enzimas) (Castro *et al.*, 2004).

Uma fonte de óleo (triglicerídeos) de baixo custo é o farelo de arroz, subproduto do beneficiamento do arroz. No farelo de arroz também, encontra-se a enzima *lipase*, um biocatalisador capaz de transformar o óleo, com a adição de álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), favorecendo a catálise enzimática, obtendo assim biodiesel (Paucar-Menacho *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2005; Ju e Vali, 2005; Lin *et al.*, 2008).

A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) informou em seu oitavo levantamento-maio/2013, que a produção de arroz da safra 2011/12 foi de 11,6 milhões de toneladas. A região Sul do país produziu 8,9 milhões de toneladas, representando 77,5% da produção nacional de arroz. Somente o Rio Grande do Sul (RS) contribuiu com 86,1% (7,7 milhões de toneladas) (CONAB, 2013). Nesse ano o RS obteve 650,1 mil toneladas de farelo de arroz, com a capacidade de fornecer 160,5 mil toneladas de óleo. Se, este óleo fosse transformado em biodiesel, equivaleria aproximadamente a 6,4% da demanda de biodiesel de 2012.

As vantagens da catálise enzimática sobre os catalisadores tradicionais é que as enzimas são reutilizáveis e potencialmente mais compatíveis com as variações na qualidade da matéria-prima. São capazes de produzir biodiesel em menos etapas de processo usando menos energia e com uma drástica redução na quantidade de águas residuais para o processo de purificação. Também, é capaz de melhorar a separação do produto (biodiesel) para se obter uma melhor qualidade de glicerol. E, a principal vantagem é que a *lipase* esta disponível nesta matéria-prima (farelo de arroz) com custo praticamente zero, o que se torna atrativo para a atividade industrial (Fjerbaek *et al.*, 2009; Paucar-Menacho *et al.*, 2007).

Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar a síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz (matéria-prima regional) *via* catálise enzimática.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi à síntese de biodiesel *via* catálise enzimática a partir do farelo de arroz oriundo dos engenhos de beneficiamento do arroz.

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar a matéria-prima (farelo de arroz) segundo o seu percentual na constituição do grão de arroz, sua distribuição granulométrica, o teor óleo e umidade e concentração de metais;
- Avaliar a atividade enzimática da *lipase* em função da hidrólise dos triglicerídeos através da quantificação dos ácidos graxos livres no óleo presente no farelo de arroz em função do tempo;
- Avaliar os parâmetros: razões molares óleo:álcool e solvente:álcool e pH nas sínteses de biodiesel a partir de farelo de arroz e do óleo bruto extraído do farelo de arroz;
- Determinar o percentual de ésteres metílicos da síntese do biodiesel.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aminoácidos

As proteínas são polímeros ou macromoléculas de aminoácidos contendo de centenas a vários milhares de aminoácidos em sequência. Isto ocorre devido à reação de condensação, resultando em ligações covalentes simples que são formadas entre dois aminoácidos através das extremidades do grupo amino (grupo *N-terminal*) e do grupo carboxílico (grupo *C-terminal*) de cada aminoácido, tendo como subproduto a formação de água. Esta ligação covalente simples recebe o nome de ligação peptídica (Manahan, 2012). E a cadeia formada por várias ligações peptídicas é denominada de cadeia polipeptídica ou esqueleto polipeptídico. A Figura 3.1 apresenta uma pequena sequência de uma proteína estabelecida por quatro resíduos de aminoácidos como a metionina (Met), ácido aspártico (Asp), leucina (Leu) e tirosina (Tyr), formando uma cadeia polipeptídica.

Aproximadamente vinte aminoácidos são os constituintes mais comuns das proteínas que se unem para formarem as cadeias polipeptídicas. A ampla variedade de aminoácidos está relacionada com os diferentes grupos químicos das cadeias laterais de cada aminoácido. Estas cadeias laterais, com suas propriedades químicas diferenciadas, possibilitam o enovelamento da longa cadeia polipeptídica formando estruturas tridimensionais específicas (Matthews, 2001; Manahan, 2012; Karshikoff, 2012).

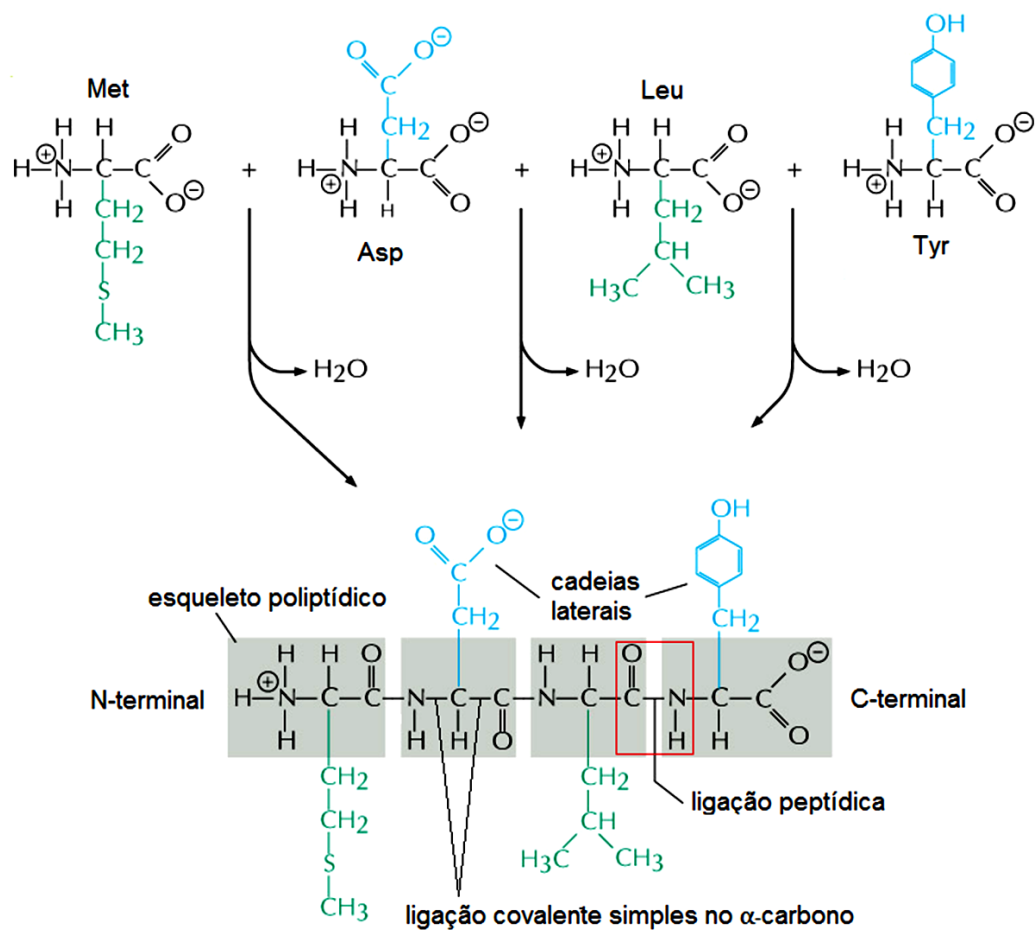


Figura 3.1. Sequência de quatro resíduos de aminoácidos Met, Asp, Leu e Tyr formando uma cadeia polipeptídica.

Fonte: Adaptação de Alberts *et al.*, 1999.

3.2. Enzimas

Quase todas as enzimas são proteínas globulares que variam em tamanho, forma e complexidade. Proteínas globulares são relativamente esféricas, como o nome implica (Matthews, 2001; Manahan, 2012; Karshikoff, 2012).

A Figura 3.2 representa a estrutura cristalográfica da enzima *lipase Candida antarctica B* encontrada na literatura como biocatalisador na produção de biodiesel (Monhemi *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011).

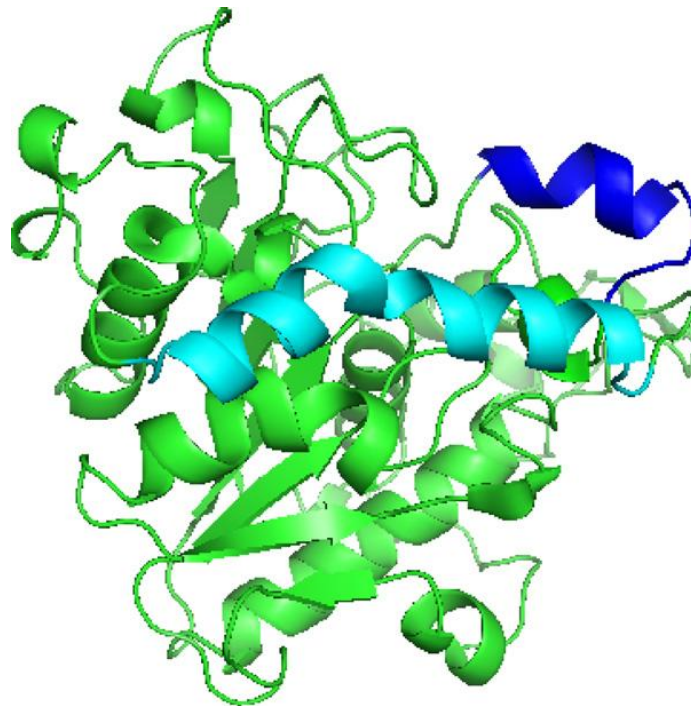


Figura 3.2. Estrutura cristalográfica da enzima *lipase Candida antarctica B*.

Fonte: Adaptação de Monhemi *et al.*, 2012.

A catálise de uma reação enzimática não ocorre em um local aleatório qualquer sobre a superfície da enzima, mas sim em uma região muito específica (fenda ou cavidade) denominada de sítio ativo. Todos os sítios ativos apresentam propriedades em comum. Por exemplo, aminoácidos com cadeias laterais importantes que formam interações não covalentes específicas com o substrato e serve como pontos de ancoragem para manter o substrato ligado ao sítio ativo, o que possibilita novas reações químicas (novas ligações covalentes). As interações não covalentes como ligações iônicas e de hidrogênio são estabelecidas no momento que o substrato é ancorado ao sítio ativo da enzima. Entretanto, estas interações apresentam elevada especificidade, conseqüentemente apenas uma ou um conjunto de moléculas específicas podem ser considerados substratos (Alberts *et al.*, 1999; Aehle *et al.*, 2008).

As enzimas podem assumir conformações diferentes temporariamente, em sua estrutura na região de ancoragem do substrato, devido às interações não covalentes com o substrato. A Figura 3.3. mostra uma representação esquemática de uma sequência de aminoácidos *serina (Ser) arginina (Arg), glicina (Gly), ácido glutâmico (Glu) e treonina (Thr)* formando um sítio ativo de uma enzima, que

estabelece ligações de hidrogênio e iônicas com a molécula de monofosfato cíclico de adenosina (Alberts *et al.*, 1999; Aehle *et al.*, 2008).

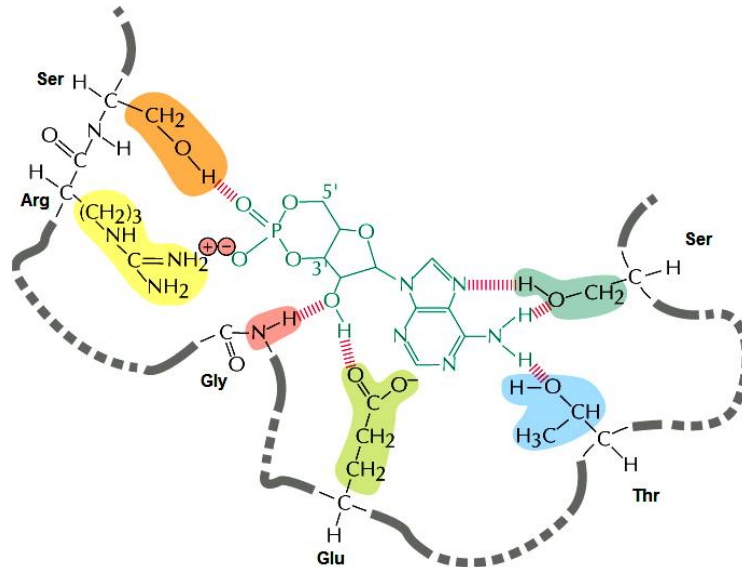


Figura 3.3. Representação esquemática de uma sequência de aminoácidos (Ser, Arg, Gly, Glu, Thr e Ser) formando o sítio ativo de uma enzima, que estabelece ligações de hidrogênio e iônicas com a molécula de monofosfato cíclico de adenosina.

Fonte: Adaptação de Alberts *et al.*, 1999.

3.2.1. Sítio ativo das lipases

As *lipases* são enzimas que têm a capacidade de realizar o rompimento (hidrólise) das ligações éster, tais como os triglicerídeos e ésteres de ácidos graxos. Todos os membros da família das *lipases* conservam o resíduo de aminoácido (Ser) no sítio ativo, que é nucleófilo essencial para a catálise. Estas enzimas são denominadas proteases serina (Al-Zuhair *et al.* 2007; Schmid e Verger, 1998). A tríade do sítio ativo das *lipases* consiste dos resíduos de aminoácido serina (Ser), *histidina* (His) e *ácido aspártico* (Asp) ou *ácido glutâmico* (Glu). O arranjo espacial da citada tríade é muito semelhante à tríade clássica da *lipase* esterase (Raghavendra *et al.*, 2008; Bhardwaj *et al.*, 2001).

Aizono *et al.*, em estudo realizado na década de 70, purificaram e caracterizaram a *lipase* existente no farelo de arroz determinando sua composição e massa molar, obtendo informações sobre a composição (Tabela 3.1), estabelecendo

quais os resíduos de aminoácidos fazem parte da estrutura tridimensional, quantidade de aminoácidos e peso molecular da *lipase*. Este estudo possibilitou confirmar a presença da tríade de aminoácidos (*Serina, Histidina e os Ácidos aspártico ou glutâmico*) que fazem parte do sítio ativo desta *lipase*.

Tabela 3.1. Composição de aminoácidos e massa molecular da *lipase* do farelo de arroz.

Aminoácidos	Aminoácidos ($\mu\text{g}/1,362\text{mg}$ de proteína)	Massa molecular mínimo	Número de resíduos		Massa molecular calculado
			Calculado	Integral	
Lisina (Lys)	39,735	4393,6	8,8	9	39541
Histidina (His)*	19,325	9665,9	4,0	4	38664
Arginina (Arg)	59,614	3568,6	10,8	11	39255
Ácido aspártico (Asp)*	135,925	1153,2	33,5	34	39209
Ácido glutâmico (Glu)*	102,607	1714,0	22,6	23	39422
Glicina (Gly)	87,635	886,7	43,6	44	39015
Alanina (Ala)	86,482	1119,5	34,5	35	39118
Valina (Val)	54,425	2415,2	16,0	16	38643
Leucina (Leu)	47,377	3253,2	11,8	12	39038
Isoleucina (Ile)	28,064	5492,0	7,0	7	38444
Prolina (Pro)	61,962	2134,8	18,1	18	38426
Serina (Ser)*	89,693	1322,3	29,3	29	38347
Treonina (Thr)	60,867	2262,7	17,1	17	38466
Cistina (-S-S-) ^(a)	55,648	5440,7	7,1	7	38085
Metionina (Met)	19,155	9328,9	4,1	4	37316
Tirosina (Tyr)	95,786	2320,3	16,7	17	39445
Fenilalanina (Phe)	82,432	2431,8	15,9	16	38909
Triptofano (Trp)	61,079	4152,5	9,3	9	37370
			Total: 312	Média: 38706	

(a) Molécula resultante das ligações de dissulfeto entre os resíduos de cisteína;

(*) Tríade do sítio ativo da *lipase*.

Fonte: Adaptação de Aizono *et al.*, 1971.

Assim, este estudo estabeleceu o marco da real potencialidade que esta enzima apresenta quanto à extraordinária capacidade de realizar transformações químicas, fazendo e desfazendo ligações covalentes, devido à presença do sítio ativo de elevada especificidade, atuando como catalisador enzimático.

3.2.2. Especificidade das lipases ao substrato

Lipases de diferentes origens apresentam diferentes especificidades quanto aos substratos, pois tem a capacidade de distinguir características estruturais do grupo acil, tais como o número de carbonos da cadeia, posição ou configuração das ligações, presença de ramificações, bem como, a fonte do carbono da carbonila (ácidos graxos livres, ésteres graxos e acilgliceróis) (Antczak *et al.*, 2009).

Estas enzimas podem diferir consideravelmente quanto ao número específico (do inglês, *specific number - sn*) da posição do grupo acil no acilglicerol. E em termos de substrato-enzima, a atividade das *lipases* pode ser caracterizada em: tiposeletividade (capacidade de hidrolisar um tipo particular de éster de ácidos graxos); regioseletividade (capacidade para hidrolisar os grupos de éster *sn-1* e *sn-3* posições em relação a posição *sn-2* do triglicerídeo) e estereosseletividade (capacidade para diferenciar entre dois enantiômeros em um substrato racêmico) (Muralidhar *et al.*, 2002; Zarevucka *et al.*, 2005; Pilarek e Szewczyk, 2007).

Lipases são classificadas em três grupos, pois tem a capacidade de realizar a reação de hidrólise nas ligações éster dos triglicerídeos nas posições: *sn-1,3*-específicos (posições R1 ou R3), *sn-2*-específico (posição R2) e aleatória, que atuam em todas as três posições (Tongboriboon *et al.*, 2010; Stransky *et al.*, 2007; Schmid e Verger, 1998).

3.3. Biotransformação

A biotecnologia cobre um amplo espectro de campos da biotransformação com aplicações em diversas áreas como a indústria química, farmacêutica e alimentícia, devido principalmente às vantagens dessa tecnologia no que diz respeito ao rendimento do processo, produção de produtos biodegradáveis, redução no consumo de energia e na quantidade de resíduos. Estes aspectos traduzem um dos enfoques biotecnológicos, que possibilitam também, a transformação de óleos e gorduras através da biotransformação (Castro *et al.*, 2004).

3.3.1. Biorefinaria

A biotransformação de óleos e gorduras é um exemplo de biorefinaria que tem como definição: "Biorefinaria é o processamento sustentável de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis (alimentos, materiais e produtos químicos) e de energia (combustíveis, energia e calor)". A biorrefinaria pode consistir em uma única unidade ou ser formada por um conjunto de instalações simples que processam os subprodutos ou resíduos de instalações vizinhas (Jong e Ree, 2012; IEA, 2012).

Potencialmente, as biorrefinarias podem fazer uso de uma ampla variedade de fontes de biomassa. As biorrefinarias contribuem para o uso sustentável e eficiente dos recursos da biomassa, fornecendo uma variedade de produtos para diferentes mercados e setores. Elas também têm o potencial de reduzir os conflitos de terra e competição pela matéria-prima (IEA, 2012).

Neste contexto, em particular a cultura do arroz propicia que além da obtenção do produto principal (arroz integral, branco e/ou parabolizado) possa também, obter através de processos biotecnológicos outros produtos comercializáveis, tendo como matéria-prima os subprodutos do beneficiamento do arroz, como a casca e o farelo de arroz.

3.3.2. Produção de arroz

O arroz tem sido historicamente um dos cereais mais importantes na dieta alimentar da humanidade. Ainda hoje, este cereal sustenta aproximadamente 2/3 da população mundial, aproximadamente 4,8 bilhões de pessoas. Duas espécies diferentes de arroz são cultivadas: a *Oryza sativa* e a *Oryza glaberrima* e, há cerca de 22 espécies selvagens. A *Oryza sativa* é originária no trópico úmido da Ásia, mas hoje em dia é cultivada em todo o mundo, enquanto a *Oryza glaberrima* tem sido cultivada na África Ocidental nos últimos 3500 anos (Rosell e Marco, 2012). O arroz é o cereal mais cultivado em todo o planeta, em destaque na Ásia e América Latina, as quais têm no arroz a base da sua alimentação (Pires, 2000).

Em 2012, a área do planeta ocupada para o seu cultivo foi de aproximadamente de 162,5 milhões de hectares tendo uma produtividade mundial de 724,5 milhões de toneladas de arroz com casca. As perspectivas para a safra de 2013 são de 746,7 milhões de toneladas, o que representa 2,9 por cento acima da produção de 2012 (Figura 3.4) (FAO, 2013).

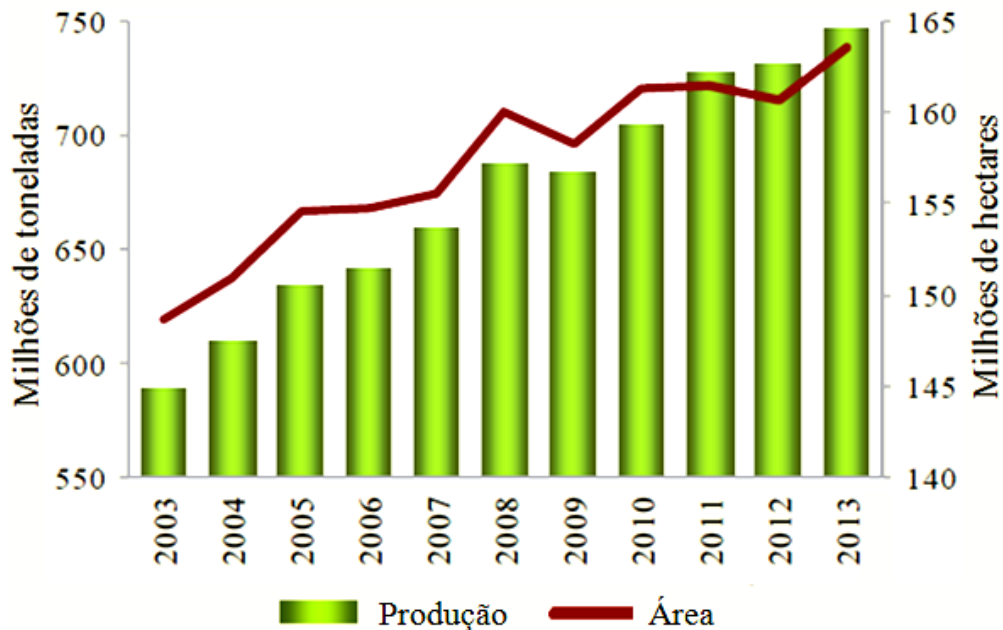


Figura 3.4. Produção global de arroz com casca (*colunas verdes*) e área ocupada (*linha vermelha*).

Fonte: Adaptação de FAO, 2013.

No Brasil, a CONAB, ao realizar o oitavo levantamento de grãos em maio de 2013, estimou que a safra de arroz deverá ser de 11,9 milhões toneladas, 3% maior que a safra 2011/12 (11,6 milhões de toneladas). A região Sul foi responsável por 77,5% (8,9 milhões de toneladas) da produção nacional de arroz, e o RS representou 86,1% (7,7 milhões de toneladas), seguido de Santa Catarina com aproximadamente 12% e Paraná com 1,8% (SOSBAI, 2010; CONAB, 2013).

No mundo, o consumo anual médio de arroz é de 60kg/pessoa. Na Ásia, continente onde são produzidos 90% desse cereal, o consumo anual médio é de 100 a 150 kg/pessoa. Na América Latina esta média reduz para 30 kg/pessoa. O Brasil destaca-se, pois o consumo anual é, em média, de 45 kg/pessoa (SOSBAI, 2010).

3.3.3. Farelo de Arroz

O farelo de arroz é um dos subprodutos obtido do beneficiamento do arroz, resultado das etapas de descasque e polimento do grão (Sawant *et al.*, 1999; Amissah *et al.*, 2003), durante este processo, varias partes do grão são removidas. A Figura 3.5 mostra uma representação esquemática da constituição do grão de arroz, o qual é constituído (base seca) de aproximadamente 20% de casca, 7 a 8,5% de farelo, 70 a 72% de endosperma e 2 a 3% de embrião ou germe (Ju e Vali, 2005; Zhou *et al.*, 2002).

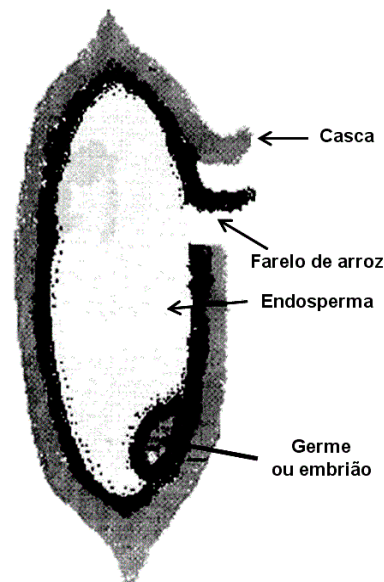


Figura 3.5. Representação esquemática da constituição do grão de arroz.

Fonte: Adaptação de Ju e Vali, 2005; Zhou *et al.*, 2002.

O farelo contém de 15 a 23% de óleo e é direcionado para a indústria de ração animal. Devido a sistemas enzimáticos presentes no farelo que rapidamente hidrolisa os triglicérides em ácidos graxos livres (AGL), aumentando o teor de acidez (Pauca-Menacho *et al.*, 2007; Ju e Vali, 2005). Segundo a ANVISA (2012) determina que o percentual de AGL nos diversos óleos vegetais utilizados na alimentação humana é de no máximo 0,3g/100g.

Um exemplo da capacidade da *lipase* em hidrolisar os triglicérides contidos no óleo do farelo de arroz, foi publicado por Zullaikah *et al.* (2005), apresentado na Figura 3.6. Este grupo estudou um método eficiente na produção de biodiesel

através do óleo dessa matéria-prima. Para isto, investigaram o efeito da umidade, temperatura e tempo de armazenamento do farelo de arroz em função do teor de AGL.

Na Figura 3.6, observa-se que no tempo zero de armazenamento o percentual de AGL encontra-se acima do pré-estabelecido pela ANVISA (2012). Também, duas informações importantes podem ser obtidas no que se refere ao percentual de umidade (10,3%) e temperatura na faixa de 30 a 50°C, propiciando um ambiente adequado para que a *lipase* alcance sua máxima atividade enzimática de hidrólise, produzindo o máximo de 76% e 82% de AGL em respectivamente 24 semanas. A definição de atividade enzimática que envolve a velocidade de reação é: “uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que transforma um μmol de substrato ou a formação de um μmol do produto por minuto”, sob condições de teste, como temperatura, pH e concentração de substrato (Uttatre *et al.*, 2010).

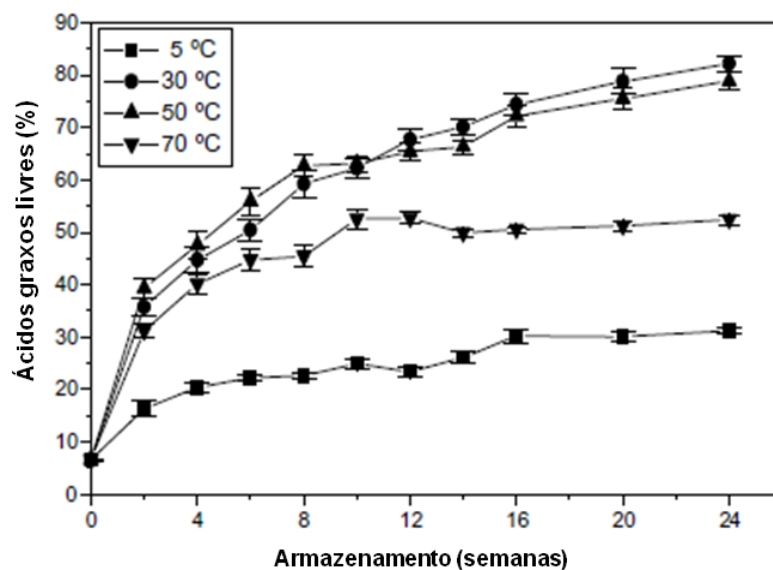


Figura 3.6. Percentual de AGL *versus* tempo de armazenamento do farelo de arroz nas temperaturas de 5, 30, 50 e 70°C. Percentual de AGL inicial 6,6% e teor de umidade de 10,3% em peso.

Fonte: adaptação de Zullaikah *et al.*, 2005.

O trabalho de Zullaikah *et al.* (2005) mostra que um dos subprodutos do beneficiamento do arroz tem grande potencial de tornar-se matéria-prima de baixo custo para a produção de biodiesel, enquadrando-se nos princípios da Química

Verde (Química Sustentável) com importância fundamental na transição para uma matriz energética renovável e de baixo impacto ambiental (Vichi e Mansor, 2009).

3.4. Reações catalisadas por lipases

As enzimas não só apenas têm a capacidade de realizar a reação de hidrólise, mas também, podem catalisar as reações “reversas” através das reações de transesterificação e esterificação com elevada seletividade, proporcionando um processo eficiente e limpo (Schuchardt *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2009).

3.4.1. Reação de hidrólise

A hidrólise (Figura 3.7) ocorre nos grupos acil dos triglicerídeos e ésteres através do consumo de água, produzindo AGL, acilgliceróis parciais e 1,2,3-propanotriol (glicerol). As *lipases* têm a capacidade de realizar esta mudança da estrutura dos triglicerídeos e ésteres, na interface óleo/água, tendo como substratos óleos e gorduras (Schuchardt *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2008; Wu e Tsai, 2004).

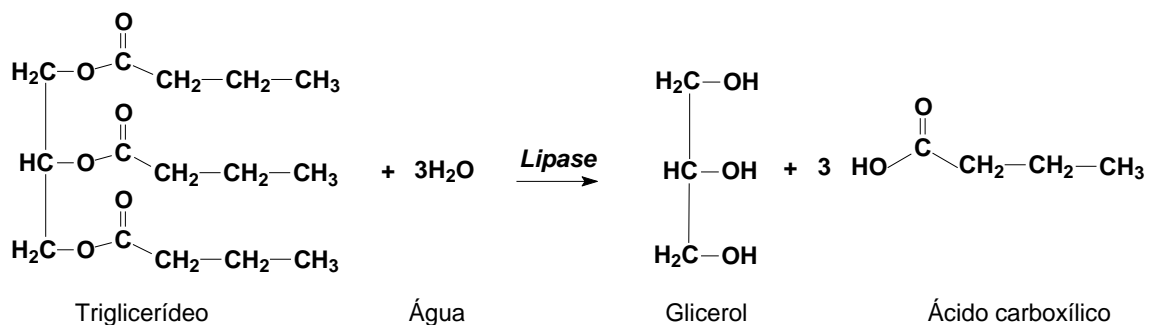


Figura 3.7. Representação esquemática da reação de hidrólise catalisada através da *lipase*.

Fonte: Adaptação de Wu e Tsai, 2004.

3.4.2. Reação de transesterificação

A reação de transesterificação consiste na adição de um álcool na estrutura do triglicerídeo e eliminação de outro. A Figura 3.8 (a) apresenta de forma esquemática a reação de transesterificação catalisada por um biocatalisador (*lipase*), onde os reagentes de partida são estabelecidos pela estequiometria de um mol de triglicerídeo que reage com três mols de um álcool de cadeia curta (HO-R).

Os produtos formados são três mols de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e um mol do subproduto glicerol. Esta reação é reversível e ocorre em três etapas diferentes, obtendo o diglicerídeo e o monoglicerídeo, como intermediários (Schuchardt *et al.*, 1998; Suarez *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009).

3.4.3. Reação de esterificação

Nesta reação, ocorre a condensação do ácido carboxílico com um álcool formando éster. Também de forma esquemática, a Figura 3.8 (b) mostra a reação de esterificação catalisada pela *lipase*, em que a estequiometria entre os reagentes é na razão molar de 1:1. Esta reação é reversível e ocorre em apenas uma etapa, onde um mol do ácido carboxílico irá reagir com um álcool formando um mol de biodiesel e um mol do subproduto água (Schuchardt *et al.*, 1998 Oliveira, 2006; Jaeger e Reetz, 1998).

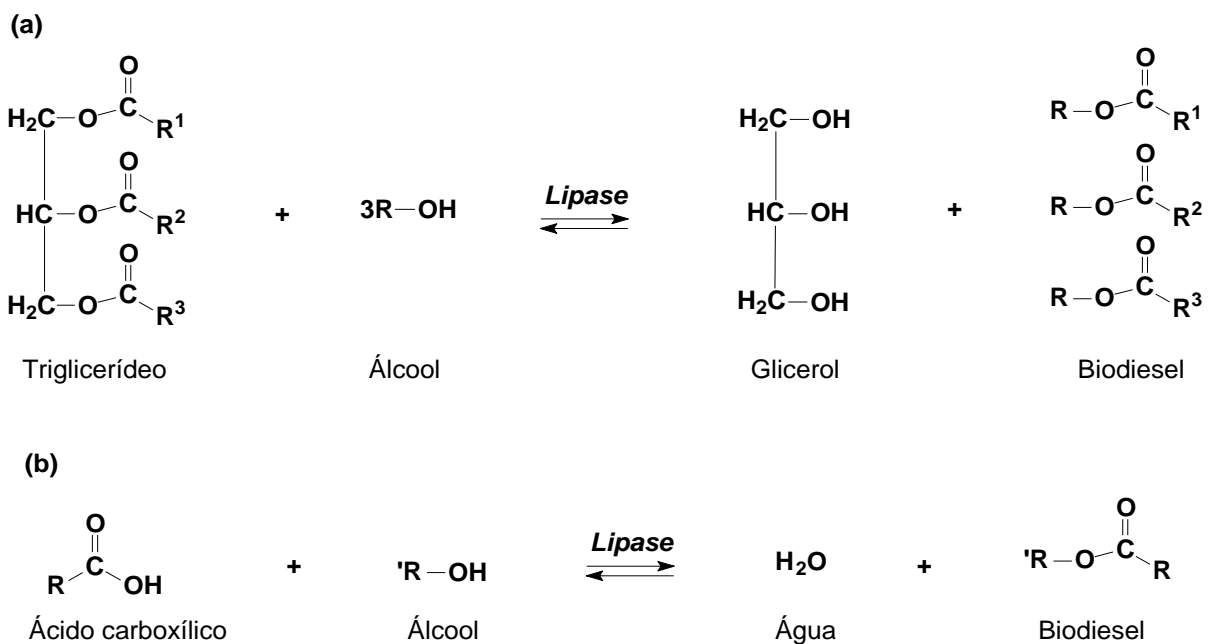


Figura 3.8. Representação esquemática de duas das reações catalisadas pelas *lipases*: (a) transesterificação e (b) esterificação.

Fonte: Adaptação de Li *et al.*, 2012.

3.4.4. Mecanismo da reação de transesterificação na produção de biodiesel

Estudos propostos por Raghavendra *et al.* (2008), Bhardwaj *et al.* (2001) e Aizono *et al.* (1971), confirmaram a presença de grupos funcionais ácidos ou básicos, localizados nos sítios ativos das enzimas *lipases*, possibilitando catalisarem as reações através da doação ou recepção de prótons durante o transcorrer da reação, devido aos ácidos conjugados das aminas que são doadores de prótons, ao passo que as próprias aminas e íons carboxilatos são receptores de prótons (Schuchardt *et al.*, 1998; Mendes *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2011).

O mecanismo proposto para a transesterificação de triglicerídeos com mono-álcoois consiste na sequência dos seguintes passos, como mostrado na Figura 3.9: (a) a amina presente no resíduo de aminoácido histidina do sítio ativo da enzima, desprotona a hidroxila do resíduo de aminoácido serina possibilitando o ataque nucleofílico do íon hidroxila ao carbono carbonílico de um dos grupos acila do triglicerídeo formando um intermediário tetraédrico, o complexo enzima-substrato (E-S); (b) ocorre o rearranjo de elétrons do intermediário tetraédrico do complexo E-S, seguido da desprotonação do ácido conjugado da amina, formando o diglicerídeo e o complexo enzima-acilada (E-Ac); (c) a amina desprotona a hidroxila do álcool (HO-R₁) o que possibilitado por parte deste um ataque nucleofílico ao carbono carbonila do complexo E-Ac, formando um intermediário tetraédrico denominado de complexo enzima-acilada-álcool (E-Ac-A). Finalmente a última etapa (d), onde através do rearranjo de elétrons do intermediário tetraédrico E-Ac-A e da desprotonação do ácido conjugado da amina, ocorre à regeneração do sítio ativo da enzima e a formação do éster de ácidos graxo, isto é, o biodiesel. Em processos similares, reações semelhantes ocorrerão com os diglicerídeos, produzindo monoglicerídeos, os quais formarão, finalmente, a glicerina (Al-Zuhair *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2013; Suarez *et al.*, 2007; Jaeger e Reetz, 1998; Reis *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2012 Schuchardt *et al.*, 1998).

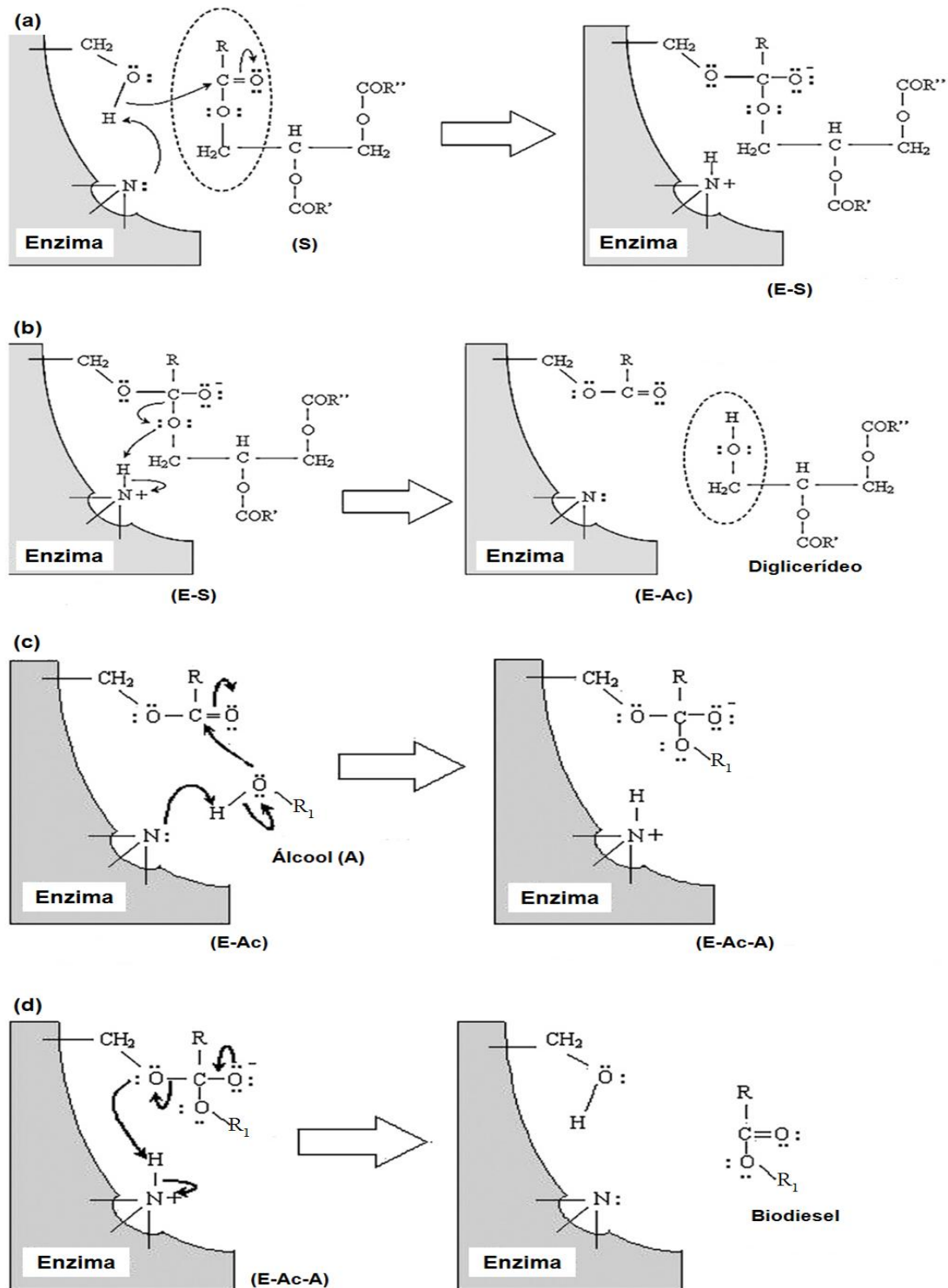


Figura 3.9. Mecanismo da reação de transesterificação de triglicerídeos *via* catálise enzimática.

Fonte: Adaptação de Al-Zuhair *et al.*, 2007.

3.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática

A viabilidade econômica da aplicação enzimática em um processo industrial, depende da otimização dos parâmetros reacionais na catálise enzimática que são

de extrema relevância, determinando, principalmente a estabilidade da enzima. Além disso, enzimas estáveis durante o processo catalítico permitem obter elevadas taxas de reação (Eijsink *et al.*, 2004).

A estabilidade da enzima está relacionada a fatores que influenciam na conversão do substrato em biodiesel. Para alcançar a viabilidade econômica, é imprescindível que o meio reacional possibilite um ambiente favorável ao desempenho da enzima como biocatalisador. Para isso, é necessário ter com clareza dois aspectos fundamentais: os parâmetros básicos, como escolha da lipase, substratos (reagentes), sistemas de solvente, razão molar óleo:álcool e temperatura, este último influencia diretamente os subparâmetros (quantidade de água, pH do meio, transferência de massa, aditivos e concentração do glicerol) (Figura 3.10). Não ocasionando assim, a desnaturação da enzima o que possibilitará que a mesma possa alcançar sua máxima atividade enzimática, que em última análise se reflete nas taxas de reação (Antczak *et al.*, 2009).

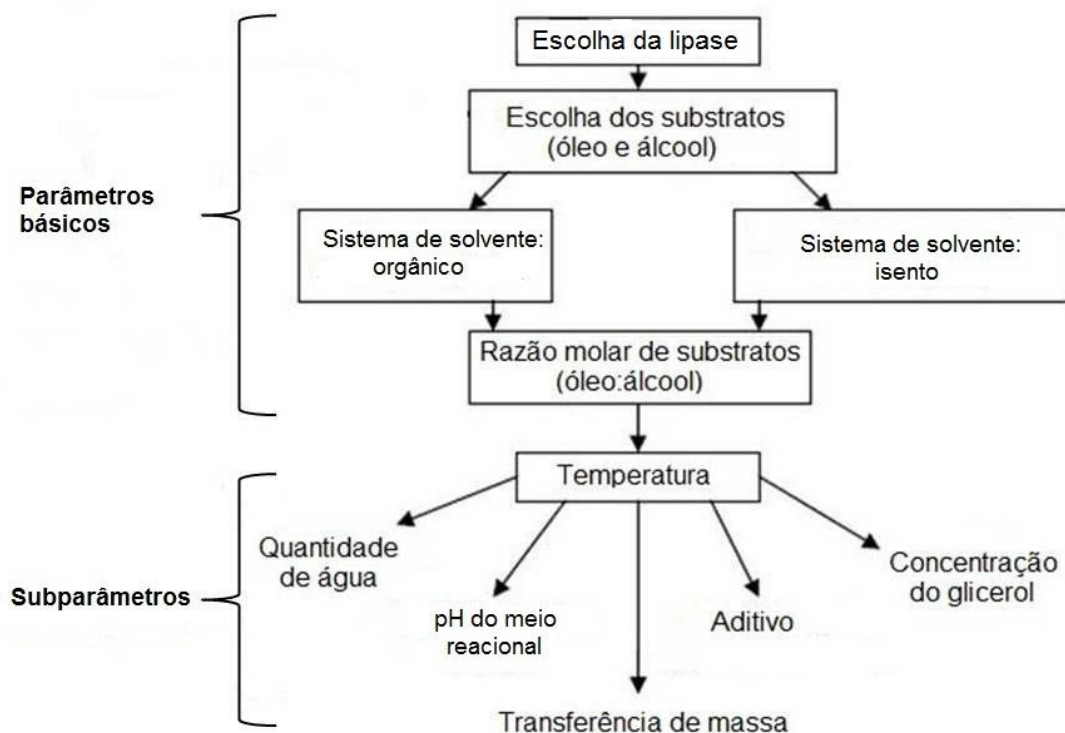


Figura 3.10. Fluxograma dos parâmetros reacionais que influenciam a atividade enzimática na síntese do biodiesel.

Fonte: Adaptação de Antczak *et al.*, 2009.

3.5. Escolha da lipase

As *lipases* são classificadas como hidrolases e atuam sobre as ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. Estas podem ser divididas em dois grupos principais: (i) carboxilesterases (EC 3.1.1.1) e (ii) as *lipases* (EC 3.1.1.3), que diferem em várias características bioquímicas. As *lipases* podem atuar na hidrólise de triglicerídeos e na síntese de ésteres (Messaoudi *et al.*, 2010; Arpigny e Jaeger, 1999; Sivaramakrishnan e Muthukumar, 2012). As lipases catalisam reações de substratos insolúveis em água, enquanto que as esterases em substratos solúveis em água (Alvarez-Macarie *et al.*, 1999).

3.6. Substratos

3.6.1. Lipídios

Óleos e gorduras, substâncias hidrofóbicas do reino vegetal e animal que são formados por um mol de glicerol e três mols de ácidos graxos, sendo geralmente referidos como triglicerídeos e ácidos graxos livres (Alberts *et al.*, 1999; Yang, 2007). Estes são à base da matéria-prima para a produção de biodiesel.

A produção mundial de biodiesel tem se concentrado em combustível derivado de oleaginosas que fornecem o óleo, onde se encontram os lipídios. A Tabela 3.2 apresenta as principais fontes de oleaginosas que fornecem as matérias-primas fáceis de processar e de alta qualidade para produção de biodiesel.

O biodiesel produzido no Brasil está baseado em óleo de soja, o que corresponde a 81% da produção total de biodiesel no país (ANP, 2013). Entretanto, alguns aspectos relacionados à viabilidade da matéria-prima devem ser observados, no intuito do processo ser viável economicamente como o percentual de óleo por grão, balanço energético (produção do óleo *versus* biodiesel produzido), vocação da região para a produção da matéria-prima e variações sazonais (Quintella *et al.*, 2009; Suarez *et al.*, 2009).

Tabela 3.2. Valores médios dos percentuais e produtividade de óleo de oleaginosas.

Oleaginosa	Teor de Óleo (% m)	Produtividade (kg/ha ano)	Produção de Óleo (kg/ha ano)
Mamona	38 a 48	1500	720
Girassol	35 42	1600	672
Amendoim	39	1800	702
Gergelim	39	1000	390
Canola	38	1800	684
Dendê	20	20000	4000
Soja	18	2200	396
Algodão	15	1800	270
Babaçu	6	12000	720
Pinhão Manso	35-45	1000 - 6000	500 a 2000
Microalga	20	nd	90.000

Fonte: Adaptação de Quintella *et al.*, 2009.

3.6.2. Álcool

Na produção tradicional de biodiesel, o excesso de álcool sobre os triglicerídeos é necessário para aumentar a taxa de conversão da reação na obtenção do produto. No processo enzimático, o excesso de álcool pode ocasionar a inibição das enzimas, reduzindo sua atividade enzimática, tornando o processo ineficiente. Este cuidado não é exagerado, pois, a otimização deste parâmetro de reação irá assegurar uma boa difusão do álcool no substrato, evitando a elevação da polaridade do meio reacional, além de manter o glicerol que é extremamente hidrofílico em solução, impossibilitando a desativação da *lipase* (Noureddini *et al.*, 2005; Hernandez-Martin e Otero, 2008). Sendo assim, alguns aspectos quanto ao tipo de álcool, comprimento da cadeia, razão molar, polaridade e solubilidade deste frente ao substrato terão que ser observados para que não ocorra inibição da enzima.

Shimada *et al.* (1999) ao realizarem a reação de transesterificação em processo contínuo para a produção de biodiesel utilizando a *lipase Candida antarctica* imobilizada, na temperatura de 30°C, solvente na razão molar de 3:1 hexano/metanol durante 24 h Nelson *et al.* (1996) constataram que, quando a razão

molar metanol/óleo foi superior a 1,5:1 ocorreu inativação da *lipase*, conforme Figura 3.11. Neste exemplo, verifica-se que esta *lipase* é suscetível a um álcool primário, polar e de apenas um carbono.

Outro aspecto que pode ser constatado (Figura 3.12) é a resposta de cada enzima, frente ao tipo, comprimento da cadeia do álcool e razão molar álcool:substrato na catálise enzimática. Constata-se que para o metanol (*Novozym 435*), etanol (*Lipozyme TL-IM*) e butanol (*Lipozyme RM-IM*) as razões molares ótimas foram 5:1; 7:1 e 9:1, respectivamente. Acima destes valores, a atividade enzimática foi prejudicada como constatado (Rodrigues *et al.*, 2008).

O comprimento da cadeia alifática do álcool também influencia nas taxas de conversão na esterificação. Ghamgui *et al.* (2004) realizaram a esterificação do ácido oléico (C18:1) na presença da *lipase Rhizopus oryzae* imobilizada utilizando álcoois primários de diferentes comprimento de cadeia como etanol (C2), propanol (C3), butanol (C4), pentanol (C5) e hexanol (C6). Estas reações foram em sistema isento de solvente e em sistema com solvente orgânico, o hexano. A razão molar de ácido oléico:álcool foi de 1:1, a 37°C e agitação (200 rpm).

A Figura 3.13 mostra a preferência da *lipase* pelo álcool primário mais polar e de apenas dois carbonos na cadeia, independentemente dos sistemas de solventes adotados. Entretanto, o maior percentual de conversão (83%) foi alcançado para o sistema de reação com o solvente hexano. Para o sistema isento de solvente o percentual de conversão foi apenas 75%, ambos com o mesmo álcool. Os menores percentuais de conversão foram para os sistemas em que o comprimento do álcool foi maior (pentanol e hexanol), com 20,56% e 29,03% de conversão, respectivamente independente do sistema de solvente. Estes resultados podem ser explicados pela baixa difusão do álcool de cadeia longa no meio reacional.

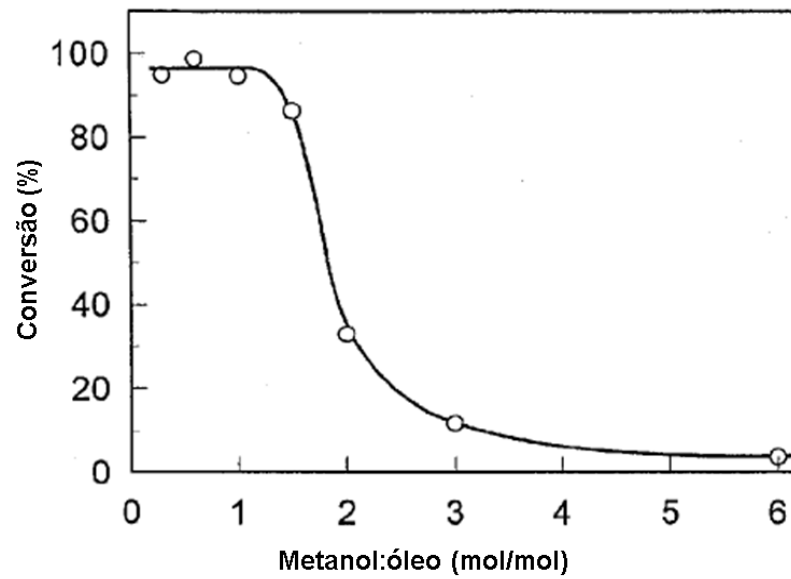


Figura 3.11. Influência da razão molar (metanol:óleo) na conversão dos triglicéridos em biodiesel.

Fonte: Adaptação de Shimada *et al.*, 1999.

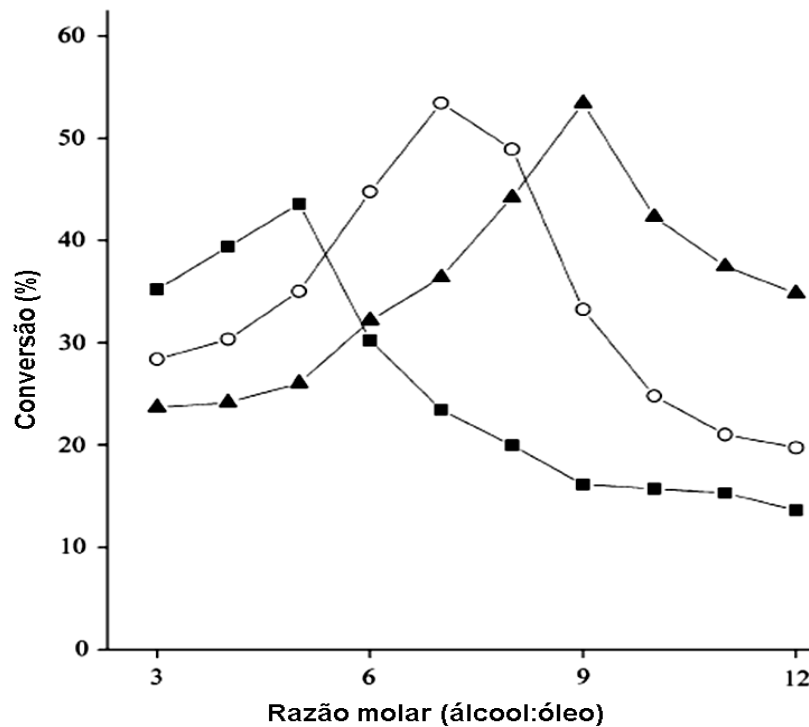


Figura 3.12. Influência da razão molar álcool:óleo na transesterificação do óleo de soja. Novozym 435 (-■- *metanol*), Lipozyme TL-IM (-○- *etanol*) e Lipozyme RM-IM (-▲- *butanol*), 30°C, 15% de enzima, 4% de água e 6 h de reação.

Fonte: Adaptação de Rodrigues *et al.*, 2008.

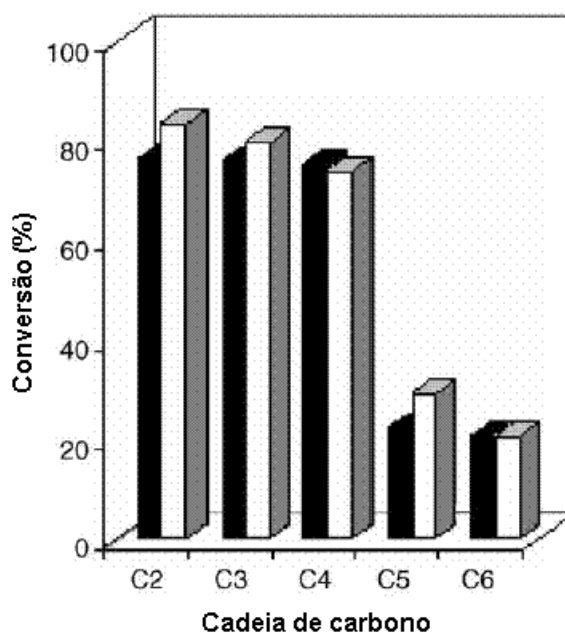


Figura 3.13. Influência do comprimento da cadeia dos álcoois na esterificação em sistemas de solvente hexano (*branco*) e isento de solvente (*preto*).

Fonte: Adaptação de Ghamgui *et al.*, 2004.

3.7. Sistemas de solvente

3.7.1. Solvente orgânico

A escolha adequada do solvente em síntese enzimática é um dos parâmetros mais importantes em biocatálise. De modo geral, as características do solvente orgânico influenciam, não somente, na transferência de massa (solubilidade) no sistema de reação, mas também têm grande efeito sobre a estrutura da enzima, influenciando na quantidade de água ideal para que a enzima possa manter sua máxima atividade (Zheng *et al.*, 2010).

Laane *et al.* (1987) realizaram, provavelmente, um dos mais significativos trabalhos em biocatálise utilizando *lipase*, relacionando atividade enzimática e propriedades físico-químicas do solvente orgânico. De posse de dados básicos de termodinâmica, estes registraram o $\log P$ (logarítmo do coeficiente de partição em octanol-água em um sistema de duas fases) para 107 solventes orgânicos. Os autores quantificaram a correlação positiva entre os valores de atividade enzimática e $\log P$, estabelecendo que os solventes hidrofóbicos são incapazes de retirar água

associada a enzima para $\log P > 3$, mantendo a hidratação necessária para a máxima atividade enzimática. O mesmo não acontece quando a biocatálise é realizada com solventes hidrofílicos, cujo $\log P < 2$. Estes têm a capacidade de retirar água associada à enzima, influenciando na sua estrutura e flexibilidade frente ao substrato, ocasionando perda de atividade enzimática (Villeneuve, 2007; Li *et al.*, 2006).

Recentes trabalhos em síntese de biodiesel foram realizados utilizando diferentes solventes orgânicos, demonstrando que a conversão do biodiesel, também é influenciado pelo tipo de *lipase* utilizada (Antczak *et al.*, 2009). Soumanou e Bornscheuer (2003) constataram que utilizando diferentes solventes orgânicos como hexano ($\log P = 3,5$), ciclohexano ($\log P = 3,1$), heptano ($\log P = 4,0$), *iso*-octano ($\log P = 4,7$), acetona ($\log P = -0,24$) e o éter de petróleo ($\log P = 3,2$), na produção de biodiesel de óleo de girassol por transesterificação via rota metílica com *lipases* (RM - *Rhizomucor miehei*; TL - *Thermomyces lanuginosa*; AK - *Pseudomonas fluorescens*) imobilizadas, houve uma menor diferença entre as máximas conversões quando o solvente era apolar. Também, foi possível constatar que, quando o solvente é polar, a conversão é extremamente prejudicada como mostrado na Figura 3.14.

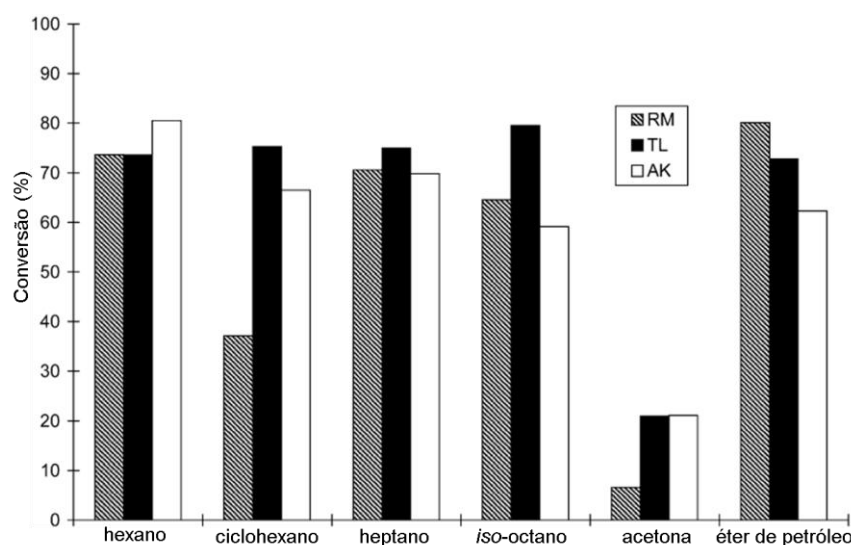


Figura 3.14. Influência do solvente orgânico na conversão do óleo de girassol por transesterificação via rota metílica usando *lipases* imobilizadas (RM - *Rhizomucor miehei*; TL - *Thermomyces lanuginosa*; AK - *Pseudomonas fluorescens*).

Fonte: Adaptação de Soumanou e Bornscheuer, 2003.

3.7.2. Co-solvente

Teoricamente, o solvente orgânico polar poderia extrair a água de hidratação da *lipase* desativando o biocatalisador, impossibilitando de realizar seu papel. Uma alternativa é fazer uso de um co-solvente, que neste estudo foi a mistura de um solvente orgânico hidrofóbico forte e um solvente orgânico hidrofóbico fraco. Li *et al.* (2010) ao realizar a síntese enzimática para a produção de biodiesel, determinou o co-solvente adequado para misturas de dois solventes orgânicos para a máxima atividade enzimática, baseando-se nos trabalhos de Hilhorst *et al.* (1984) e de Laane *et al.* (1987), que estabeleceram a Equação 3.1.

$$\log P_c = x_1 \cdot \log P_1 + x_2 \cdot \log P_2 \quad (3.1)$$

onde,

$\log P_c$ = o $\log P$ do co-solvente;

x_1 e x_2 = frações molares dos solventes misturados;

$\log P_1$ e $\log P_2$ = valores dos solventes puro.

A Figura 3.15 apresenta os percentuais de conversão em biodiesel para diferentes tipos de matérias-primas, quando estas foram transesterificadas com metanol utilizando as *lipases* *Novozym 435* e *Lipozyme TL IM* imobilizadas, tendo o co-solvente (40% acetronitrila + 60% *t*-butanol) no meio reacional. As conversões superaram 90% quando comparadas com o solvente puro, exceto para os óleos de semente de chá, resíduo de fritura e salada. Com o uso somente de álcool *t*-butanol, as conversões foram inferiores ao do co-solvente (Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006).

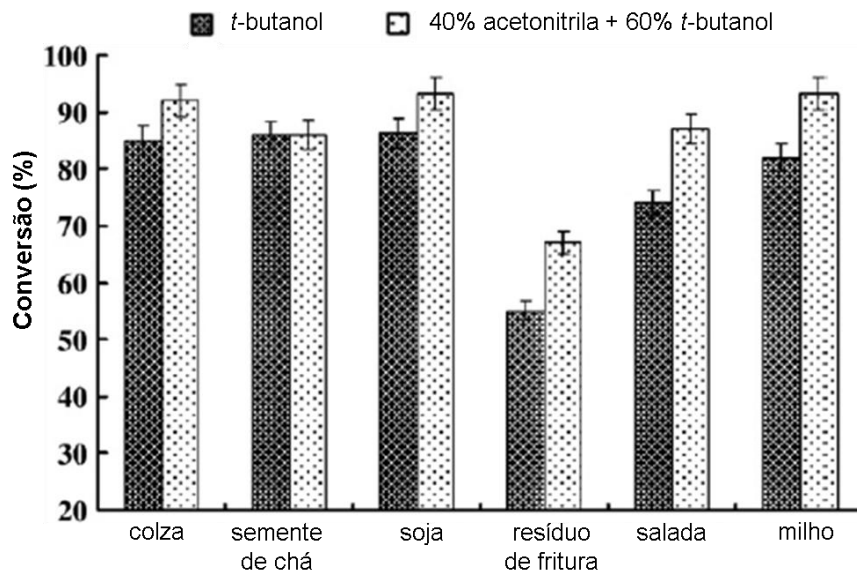


Figura 3.15. Comparação do percentual de conversão para as diferentes matérias-primas através do uso de solvente orgânico puro e co-solvente.

Fonte: Adaptação de Li *et al.*, 2010.

3.7.3. Sistema isento de solvente

Outra maneira de realizar a catálise enzimática é não utilizar solvente no meio reacional. Entretanto, um estudo detalhado dos parâmetros reacionais como quantidade de *lipase*, tempo de reação, temperatura, agitação e razão molar álcool:óleo deverão ser realizados, possibilitando assim, que a *lipase* obtenha sua máxima atividade enzimática.

Liu *et al.* (2009) estudaram a catálise enzimática para a obtenção do biodiesel a partir do óleo de *Stillingia* da árvore *Sapium sebiferum*, nativa da China e Japão, por transesterificação *via* metanólise em sistema isento de solvente (Figura 3.16), onde foi utilizado as *lipases* *Novozym 435* (5%), *Lipozyme TLIM* (12%) e *Lipozyme RMIM* (14%), razão molar óleo:metanol de 1:4, temperatura de reação de 40°C durante 10h. Neste estudo o percentual de conversão do óleo em biodiesel ficou prejudicado, com valores entre 18 a 34%. Ainda na Figura 3.16 é possível observar os resultados do processo em solvente orgânico, *t*-butanol 40% v/v (álcool/óleo), e mantendo os demais parâmetros reacionais, apresentaram um percentual de conversão que alcançou 64 a 83%, indicando a importância do solvente adequado no sistema reacional.

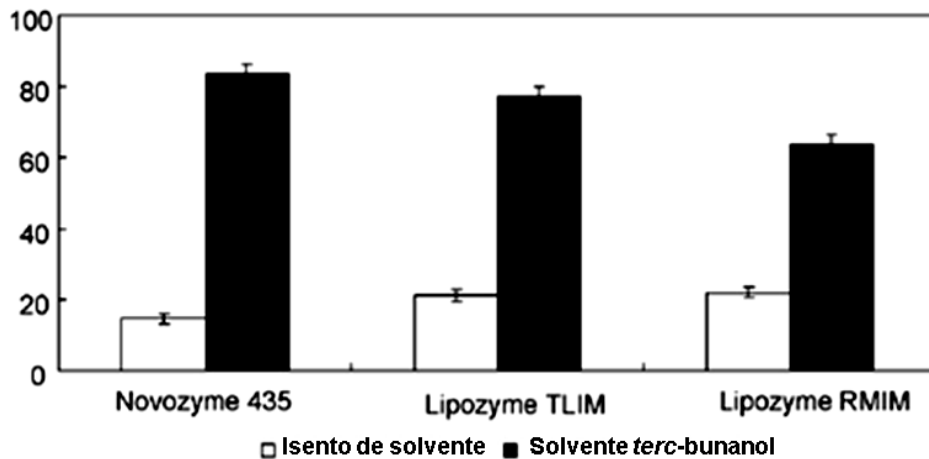


Figura 3.16. Reação de transesterificação mostrando os resultados dos sistemas: isento de solvente e com o solvente *t*-butanol.

Fonte: Adaptação de Liu *et al.*, 2009.

Os resultados mostram que o *t*-butanol eliminou os efeitos negativos causados pelo metanol e o glicerol nas *lipases*, mantendo estes solubilizados no substrato, possibilitando que as *lipases* alcancem suas máximas atividades enzimáticas (Liu *et al.*, 2009).

3.8. Relação entre solvente e álcool

A necessidade do adequado balanço da relação solvente *versus* álcool fica evidenciando quando a *lipase* é suscetível à toxicidade do álcool empregado como agente transesterificador e/ou esterificador, na catálise enzimática (Nelson *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1999; Gagnon e Vasudevan, 2011). O álcool influencia negativamente e diretamente sobre a superfície da *lipase* reduzindo sua atividade catalítica. Este fato ocorre devido à imiscibilidade dos triglicerídeos hidrofóbicos e o metanol hidrofílico levando a formação de uma interface que conduz a resistência à transferência de massa. A forte polaridade do metanol tende a retirar água de solvatação e hidratação, moléculas circundantes a estrutura globular e do sítio ativo da enzima, através da formação de ligações de hidrogênio, levando a mesma a sua desativação ou até a desnaturação, como mostrado na representação esquemática da Figura 3.17 (a), reduzindo e/ou paralisando a formação do produto em síntese (Fu *et al.*, 2009; Villeneuve, 2007).

Entretanto, as enzimas requerem muito menos álcool para realizar a reação como demonstrado no item 3.6.2, Figura 3.11 (Shimada *et al.*, 1999). A adição de um solvente orgânico com adequado coeficiente de partição ($\log P$), influencia no meio reacional, pois possibilita o aumento da solubilidade do metanol em triglicerídeos, ao mesmo tempo que reduz a concentração de metanol em torno da enzima, evitando a retirada de água de solvatação e hidratação, como demonstrado na representação esquemática da Figura 3.17 (b) (Fu e Vasudevan 2009; Gagnon e Vasudevan, 2011; Villeneuve, 2007).

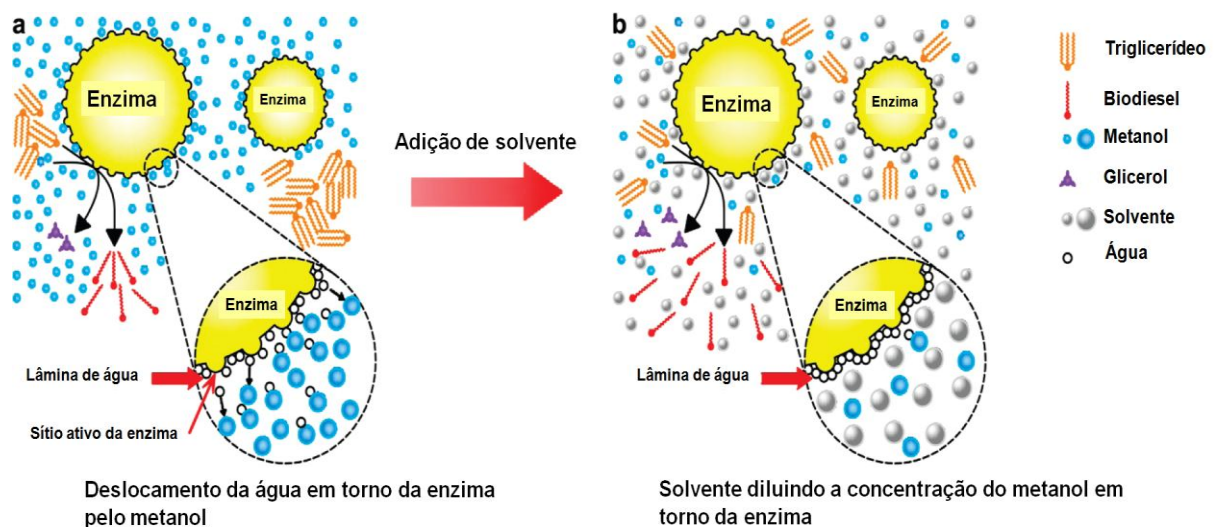


Figura 3.17. Representação esquemática: (a) sistema isento de solvente e (b) com solvente orgânico.

Fonte: Adaptação de Fu e Vasudevan, 2009.

3.9. Temperatura

O efeito da temperatura na produção de biodiesel em catálise enzimática é um parâmetro reacional que merece toda atenção, devido a sua influência na atividade enzimática. Jeong e Park (2008) ao realizarem a transesterificação do óleo de colza com metanol e utilizando a *lipase Novozym 435* em solvente orgânico (*t*-butanol) com 2 h de reação, verificaram que diferentemente da catálise tradicional a temperatura de reação necessariamente deve ser inferior da temperatura de ebulição do álcool, evitando assim, perda de atividade enzimática (Figura 3.18). Pois neste tipo de catálise a temperatura ótima ou ideal, é a temperatura que proporciona a máxima atividade enzimática sem desnaturar a enzima. Também, constataram

que na faixa de 25 a 55°C, a conversão em ésteres metílicos diminui após a temperatura ultrapassar 40°C, devido à perda de atividade enzimática da *lipase*.

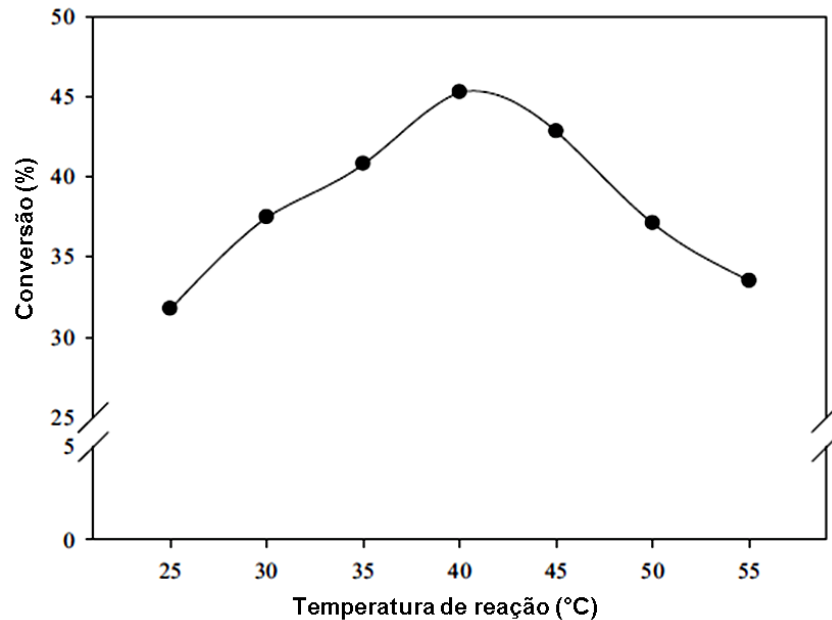


Figura 3.18. Influência da temperatura na metanólise do óleo de colza.

Fonte: Adaptação de Jeong e Park, 2008.

3.10. Influência da água

Outro parâmetro de reação importante em biocatálise é a presença de água no meio reacional, principalmente em meio orgânico, pois é essencial para a atividade enzimática. A característica de sua ação é justamente na interface (óleo/água) gerada entre a fase orgânica e inorgânica do meio reacional (Zheng *et al.*, 2010). A água deve estar dissolvida no solvente e também ligada à enzima, o que não significa ser somente de hidratação da enzima, mas sim, reflete na quantidade de água de solvatação que circula a enzima contribuindo para a sua estabilização (geometria espacial) através das forças de interações do tipo: ligações de hidrogênio, van der Waals e pontes salinas. Esta estabilização da enzima reflete na sua menor ou maior flexibilidade frente às interações do complexo enzima-substrato (Villeneuve, 2007; Fu *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostraram que o mais conveniente é expressar os resultados das sínteses enzimáticas de biodiesel em função do percentual da

quantidade de água em relação ao óleo, pois a água é adicionada ao sistema reacional para aumentar a eficiência catalítica (Antczak *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010). O trabalho de Zheng *et al.* (2010) ao realizar a síntese de biodiesel por transesterificação através da metanólise do óleo do farelo de arroz e utilizando a *lipase Candida sp. 99-125* imobilizada indicou que de 20% até 40% de água foram as quantidades ideais para obter os melhores resultados de conversão. Entretanto, acima de 40% de água, os resultados em conversão reduziram conforme os resultados apresentados na Figura 3.19.

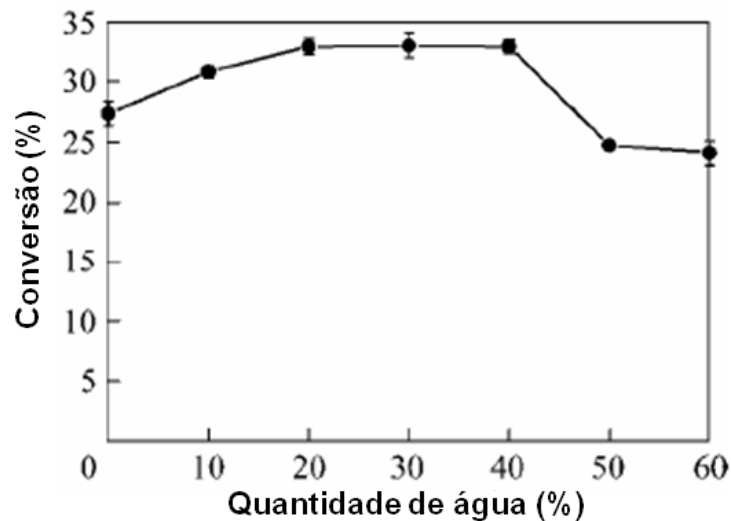


Figura 3.19. Influência do percentual de água na metanólise do óleo de farelo de arroz.

Fonte: Adaptação de Zheng *et al.*, 2010.

3.11. pH

O pH tem uma forte influência sobre a estabilidade da enzima e deve ser ajustado a um intervalo adequado para enzima (Kirk *et al.*, 2012). O pH é determinante para a estrutura tridimensional da enzima em função da camada de água circundante na enzima, pois influencia na sua atividade enzimática. As cargas eletrostáticas dos grupos polares contidos nas moléculas da enzima dependem do pH do seu microambiente em meios não aquosos.

Aizono *et al.* (1973) ao estudarem a *lipase* do farelo de arroz constataram que o pH influenciava na atividade enzimática da *lipase*. Neste estudo, os pesquisadores utilizaram como substrato a tributirina (triglicérido) e ajustaram o pH da mistura

reacional com 0,5N NaOH ou 0,5N HCl, constataram que a máxima atividade relativa percentual da *lipase* foi quando o pH permaneceu entre 7,5 e 8 (Figura 3.20).

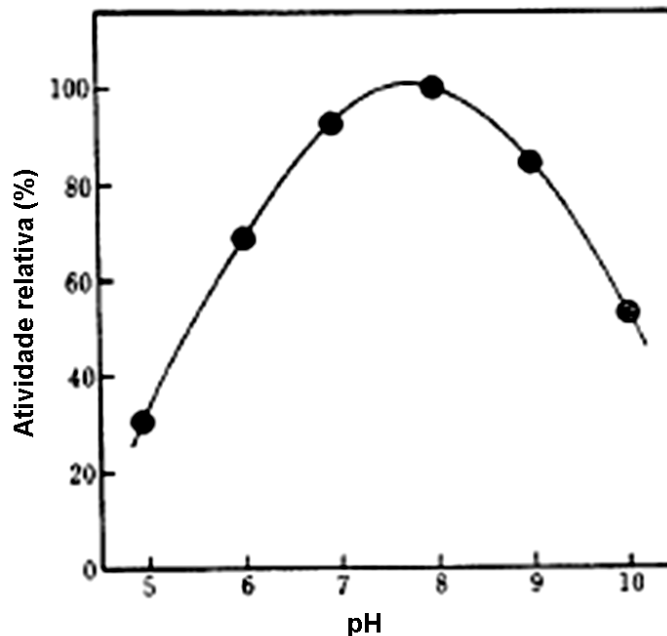


Figura 3.20. Efeito do pH na atividade enzimática da *lipase* do farelo de arroz.

Fonte: Adaptação de Aizono *et al.*, 1973.

3.12. Transferência de massa

A transferência de massa é outro fator chave na síntese enzimática, pois a reação ocorre na interfase óleo/água. Halim e Kamaruddin (2008) estudaram o efeito da transferência de massa ao realizarem a transesterificação do resíduo de fritura do óleo de palma, utilizando como solvente o *t*-butanol. Eles verificaram que, quando a agitação foi de 220 rpm, a máxima percentagem de conversão em biodiesel foi de 88%. Entretanto, quando a velocidade de agitação foi inferior a 200 rpm, o percentual de conversão reduziu. Isto devido à baixa difusão do álcool no substrato como mostrado na Figura 3.21. Para a agitação superior ao ideal, ocorreu a redução na conversão em função da desnaturação da enzima por força mecânica.

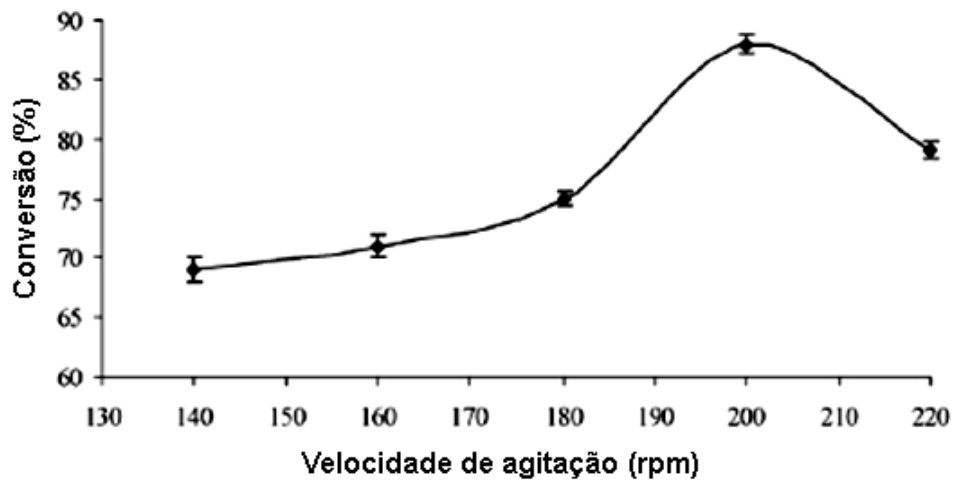


Figura 3.21. Influência da velocidade de agitação do sistema reacional na conversão dos ésteres metílicos. Condições de reação: razão molar de 4:1 de metanol para o óleo, 4% de Novozyme 435, 40°C, 12 h de reação.

Fonte: Adaptação de Halim e Kamaruddin, 2008.

3.13. Concentração do glicerol

O glicerol é o subproduto obtido da transesterificação do triglicerídeo em biodiesel e possui elevada densidade e polaridade. Estudos sobre o efeito do glicerol na catálise enzimática indicam que o glicerol reduz a eficiência da enzima, devido à inativação da *lipase* quando imobilizada, pois o glicerol é adsorvido na superfície do suporte, formando um revestimento hidrofílico, bloqueando o sítio ativo da enzima e impossibilitando assim, o acesso ao substrato hidrofóbico (Dossat *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2005). Também, por ser uma molécula altamente hidrofílica, quando não atua diretamente na superfície da enzima, impede que o álcool se solubilize no substrato reduzindo a atividade enzimática (Xu *et al.*, 2011).

Xu *et al.* (2011) através de um método de tingimento *in situ* do glicerol utilizando um corante vermelho, demonstraram o efeito negativo do glicerol na etanólise por transesterificação do óleo de colza utilizando três tipos de *lipases* imobilizadas, etanol anidro, temperatura de reação de 35°C durante 24 h sem qualquer agitação. As imagens mostradas na Figura 3.22 (a, b e c) mostram a aglutinação do glicerol durante o processo. Como pode ser constatado o glicerol formou uma camada de patículas sobre a superfície onde se encontra suportada a

enzima. Observa-se também, uma fase líquida límpida sem glicerol livre, sugerindo que o glicerol formado foi completamente adsorvido sobre o suporte.

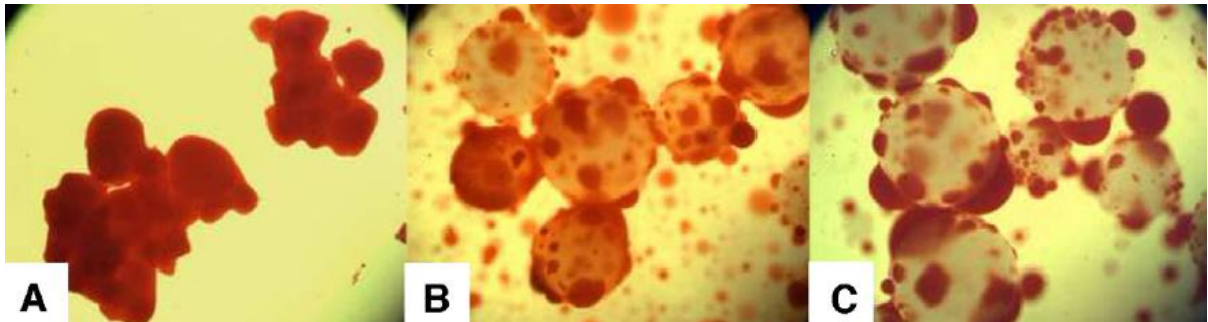


Figura 3.22. Visualização do glicerol na etanólise de óleo de colza, catalisada por diferentes *lipases* imobilizadas: (a) *Lipozyme TL-IM*, (b) *Novozyme 435* e (c) *Lipozyme TL-HC*.

Fonte: Adaptação de Xu *et al.*, 2011.

Na tentativa de neutralizar a influência negativa do glicerol no meio reacional, Li *et al.* (2006) realizaram a síntese de biodiesel do óleo de colza com metanol em solvente orgânico hidrofílico (*t*-butanol) utilizando *lipases* imobilizadas (*Lipozyme TL-IM* e *Novozyme 435*). Neste estudo foi possível verificar que o glicerol permaneceu solúvel no meio reacional, sem formar filme sobre a *lipase* suportada. Constataram que o solvente não só impossibilitou a deposição do glicerol sobre a *lipase* como também, manteve o metanol solúvel no substrato (Watanabe *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010).

3.14. Cinética enzimática

A lei cinética para uma reação de primeira ordem em função do consumo de um reagente limitante (triglicerídeos) WBC (2013) é dada pela Equação (3.1), onde a $[AGL]$ é em função da concentração do reagente limitante e k é a constante cinética da reação (Ouachab e Tsoutsos, 2012). A Equação (3.1) pode ser reescrita como na Equação (3.2), esta por sua vez ao ser integrada (Equação (3.3)), resulta na Equação (3.4 ou 3.5), onde k é independente do tempo, sendo em $t = 0$, a $[AGL]$ é $[AGL]_0$, e em um instante de tempo qualquer é $[AGL]$.

$$\frac{d[AGL]}{dt} = k[AGL] \quad (3.1)$$

$$\frac{d[AGL]}{[AGL]} = kdt \quad (3.2)$$

$$\int_{[AGL]_0}^{[AGL]} \frac{d[AGL]}{[AGL]} = k \int_0^t dt \quad (3.3)$$

$$\ln\left(\frac{[AGL]}{[AGL]_0}\right) = kt \quad (3.4)$$

OU

$$[AGL] = [AGL]_0 \cdot e^{kt} \quad (3.5)$$

3.15. Aditivos

As enzimas são estabilizadas por uma combinação de ligações de hidrogênio, iônica, interações de van der Waals e hidrofóbicas e, em alguns casos, ligações de dissulfeto. A adição de aditivos no meio reacional pode afetar o solvente que envolve a enzima, induzindo a efeitos importantes sobre a estabilidade da enzima (Triantafyllou *et al.*, 1997). Enzimas podem ser eficientemente estabilizadas com uma grande variedade de aditivos químicos, como tensoativos aniônicos, catiônicos, não iônicos e sais (ex. fosfatos e cloretos) influenciando diretamente a atividade enzimática (Yasuda *et al.*, 2000; Fernandez-Lafuente, 2009; Chi *et al.*, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

O farelo de arroz utilizado neste estudo, assim como o arroz (*Oryza sativa*) com casca foram doados pelo engenho de beneficiamento de arroz Dom Carlito, localizado na cidade de Viamão-RS. O farelo de arroz foi imediatamente coletado após o processo de descasque e polimento do grão de arroz e foi armazenado em embalagem plástica e a baixa temperatura (-10°C), para posteriores análises de caracterização física, microestrutural e química.

4.1.1. Análise da constituição do grão de arroz

A determinação da constituição do grão de arroz foi dada em percentuais a partir da pesagem (base seca) em balança analítica (Gibertini E154) da casca, endosperma mais o farelo e, por último o germe ou embrião, estes em relação ao grão inteiro. Para este experimento foram realizadas replicatas (n=6) no Laboratório de Organometálicos e Resinas na Faculdade de Química da PUCRS.

4.1.2. Análise granulométrica

O farelo de arroz foi submetido à análise granulométrica utilizando o método descrito por Chong *at al.* (2007), para determinar a fração mássica em função da granulometria. A análise foi feita com amostras de aproximadamente 150 g em um peneirador vibratório (Berfeu), equipado com um o conjunto de peneiras de 20, 32, 35, 60 e 100 mesh. A norma utilizada como referência para este procedimento foi a ASTM D 422-63 (2007). Este experimento foi realizado em triplicatas no Centro de Excelência em Pesquisa e Inovação em Petróleo, Recursos Minerais e

Armazenamento de Carbono (CEPAC) na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande de Sul (PUCRS).

4.1.3. Teor de umidade

O teor de umidade do farelo de arroz foi obtido através das análises gravimétrica e termogravimétrica, do inglês – *Thermogravimetric Analysis (TGA)*, para o farelo de arroz bruto e demais granulometrias estudadas (Zullaikah *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2010; Al-Zuhair *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009).

4.1.3.1. Análise gravimétrica

O percentual de umidade determinado pela análise gravimétrica, baseou-se nas normas Bc 2-49 da AOCS (1997) e IAL (2008). A massa de amostra de farelo de arroz foi de aproximadamente 2 g. Esta permaneceu na estufa em cadinho de porcelana por 1 h na temperatura de $130 \pm 2^\circ\text{C}$ até peso constante. Sendo que, passado o tempo de permanência na estufa a amostra permaneceu por 45 min em dessecador de sílicagel e, posteriormente, foi feito a pesagem em balança analítica. O teor de umidade (w) foi determinado segundo a Equação (4.1). Para este experimento foram realizadas replicatas ($n=15$) na FAQUI.

$$w = \frac{M_{cws} - M_{cs}}{M_{cs} - M_c} \cdot 100 \quad (4.1)$$

onde,

w = teor de água, %;

M_{cws} = massa do cadinho e amostra úmida, g ;

M_{cs} = massa do cadinho e amostra seca, g ;

M_c = massa do cadinho, g .

4.1.3.2. Análise termogravimétrica

Análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento SDT, modelo Q600 da TA Instruments, em atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de 5°C/min, na faixa de 25°C a 600°C, utilizando-se porta-amostra de alumina (Oliveira, 2002). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais da Faculdade de Química da PUCRS.

4.1.4. Teor de óleo no farelo de arroz

O teor de óleo do farelo de arroz foi expresso em percentual em relação à massa do farelo. Cada extração foi realizada com aproximadamente 12 g de farelo utilizando-se um sistema com extrator Soxhlet e balão de fundo redondo de 250 mL em temperatura de refluxo do hexano (Neon, 95%). O tempo ideal de extração foi determinado através de estudo prévio e com base na literatura (Amarasinghe e Gangodavilage, 2004; Pourali *et al.*, 2009). Após o término de cada extração, o solvente foi recuperado em rota evaporador e, em seguida o óleo foi seco em estufa a 90°C por 30 min. Após foi realizada a pesagem (diferença de massa) do balão com o óleo extraído em balança analítica Gehaka AG 200. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Organometálicos e Resinas na Faculdade de Química da PUCRS.

4.2. Caracterização microestrutural e química

4.2.1. Microscopia eletrônica de varredura e ótica

Para a realização da caracterização microestrutural do grão de arroz através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, do inglês – *Scanning Electron Microscopy (MEV)* foi necessário o preparo da amostra através do procedimento de preparação de superfícies polidas em dispositivos adequados (embutimento) seguido de lixamento e polimento conforme descrito na literatura (Dedavid *et al.*, 2007; Holink *et al.*, 1979; Bartosiewicz e Mencik, 1974).

A análise microestrutural por MEV do grão de arroz e do farelo de arroz foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura *Philips*, modelo *XL 30* com auxílio da Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X, do inglês - *Energy Dispersive X-Ray Spectrometer (EDS)* no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS. Também, se utilizou o microscópio ótico Olympus, modelo PMG3 do Laboratório de Metalurgia e Tratamento Térmico (LAMETT) da Faculdade de Engenharia Mecânica da PUCRS.

4.2.2. Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

A técnica analítica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês - *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)* foi utilizada para determinar os elementos metálicos presentes no farelo de arroz. Esta análise foi realizada no CEPAC-PUCRS com o equipamento Perkin Elmer Optima 7000-DV. Os parâmetros utilizados para as análises estão na Tabela 4.1. As análises foram realizadas em base seca. O procedimento de digestão das amostras foi feito com uma mistura de ácido nítrico (HNO_3) e ácido perclórico (HClO_4), segundo descrito na literatura (Melo e Silva, 2008). As amostras do farelo de arroz analisadas foram aquelas separadas granulometricamente nas faixas de 20-32, 32-35 e 35-60 mesh.

Tabela 4.1. Parâmetros de operação para as análises por ICP-OES.

Parâmetros	Descrição
Potência do plasma	1300W
Vazão do gás do plasma	20L/min
Vazão do gás auxiliar	1L/min
Vazão do gás de nebulização	0,5L/min
Câmara de nebulização	Concêntrico Meinhard
Vazão da amostra	1,5mL/min
Replicatas	3

Elemento	Comprimento de onda (nm)	R²
Fe	238,204	0,999840
Ca	317,933	0,999253
Mg	285,213	0,999880
Cu	327,393	0,999328
Cd	228,802	0,999854
Zn	213,857	0,999813
Na	588,995	0,992625
K	766,490	0,997583
Co	228,616	0,999847
Mn	257,610	0,999846

4.2.3. Avaliação da atividade enzimática em função da hidrólise dos triglicerídeos

A atividade enzimática da *lipase* foi avaliada em função da hidrólise dos triglicerídeos presentes no óleo, resultando em AGL durante um período de dez semanas a 35°C e umidade própria do farelo ($\approx 10\%$) baseado no método por Zullaikah *et al.* (2005). Os experimentos foram realizados em replicatas ($n=2$) para o farelo e nas faixas granulométricas estudadas, exceto para a faixa de 60-100 mesh que foi realizada uma para cada ponto. A acidez foi medida através da determinação do índice de acidez (IA) que nos possibilitou quantificar o percentual de AGL. Para tanto, o método adotado foi com base na norma Cd 3d-63 da AOCS (1995).

O IA é definido como a quantidade de hidróxido de potássio (em mg) que é necessária para neutralizar os AGL contidos em um grama do óleo. A Equação (4.2) apresenta o cálculo do IA (AOCS, 1995; Silva, 2005; IAL, 2008). Utilizou-se 50 mL de uma mistura de solventes: tolueno (Vetec, 99,5%) e 2-propanol (Synth 99,5%) na proporção de 1:1 (v/v) para solubilizar a massa de 1 g de óleo. Para neutralizar os AGL, titulou-se a alíquota com uma solução padrão de NaOH 0,1 mol/L.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \cdot [\overline{M}] \cdot 56,1}{m_{(\text{óleo})}} \quad (4.2)$$

onde,

IA = índice de acidez, $mgKOH/g$;

v = volume do NaOH usado na titulação dos AGL, mL ;

$[\overline{M}]$ = concentração molar do titulante, mol/L ;

$m_{(\text{óleo})}$ = massa da amostra de óleo, g .

O teor de AGL no óleo do farelo de arroz foi expresso em relação ao ácido oléico, devido à composição deste óleo ser prioritariamente de ácido palmítico (16%), ácido oléico (41%) e o ácido linoléico (38%) (Lin *et al.*, 2008). Este cálculo é

realizado conforme Equação (4.3), onde se divide o índice de acidez por 1,99 (AOCS, 1995; IAL, 2008; Silva, 2005; Rukunudin *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2011).

$$\% AGL = 0,503 \cdot IA \quad (4.3)$$

4.2.3.1. Cinética da reação de formação dos AGL via catálise enzimática

Para avaliar a velocidade de reação de hidrólise do óleo extraído do farelo de arroz, determinou-se a constante cinética (k) da reação de formação de AGL utilizando o método titulométrico descrito no item 4.2.3. Os resultados da Tabela 5.4, foram aplicados na Equação (3.4).

4.2.3.2. Análise estatística

Para avaliar a significância dos resultados obtidos da hidrólise dos triglicerídeos em AGL através da atividade enzimática da *lipase* presente no farelo de arroz, foi utilizada a análise estatística ANOVA RM (análise de variância com medidas repetidas) dos resultados obtidos do item 4.2.3. Para o processamento desta análise foi empregado o *software Statistical Package for the Social Science (SPSS®)* para o Windows®. Para os resultados serem considerados estatisticamente significativos, o nível de significância máximo foi de 5% ($p \leq 0,05$) e intervalo de confiança de 95%.

4.2.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* é uma técnica de análise rápida e não destrutiva. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer Instruments Spectrum One, equipado com célula de refletância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, no intervalo de 4000 à 650 cm^{-1} . O volume de óleo analisado de cada amostra foi de 100 μL e todos os espectros foram

normalizados. O método usado para análise do óleo em FTIR foi baseado em dados da literatura (Castilho *et al.*, 2012; Bendini *et al.*, 2009; Mirghani *et al.*, 2011).

4.3. Catálise enzimática no farelo de arroz

4.3.1. Efeito da relação solvente e álcool na catálise enzimática

As catálises enzimáticas para a síntese de biodiesel foram realizadas tendo como matéria-prima o farelo de arroz bruto (25 g). Neste, encontravam-se o substrato (óleo 25%), a *lipase* (biocatalisador) e umidade ($\approx 10,5\%$). As reações foram realizadas utilizando um sistema constituído de um balão de 250 mL de fundo redondo de três bocas, haste e hélice de vidro posicionada por dentro do condensador. Os parâmetros reacionais como tempo de reação (24 h), temperatura (35°C), agitação mecânica de 180rpm e adição de metanol em duas etapas (0 e 12h), foram aplicados com base em trabalhos da literatura (Aizono *et al.*, 1973; Nelson *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1999; Ebrahimi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Outros dois importantes parâmetros reacionais estudados neste trabalho foram as relações molares, metanol:óleo nas razões molares de 4:1, 8:1, 12:1 e 25:1. Para as relações solvente/metanol, se estudou a influência do co-solvente acetonitrila (40%)/*t*-butanol(60%) (Merck 99,7% e Vetec 99,0%), respectivamente com metanol nas razões molares de 6:1, 14:1, 21:1 e 43:1. O segundo solvente testado foi o hexano (Neon 95%), nas razões molares de 4:1, 8:1, 12:1 e 25:1 hexano:metanol, respectivamente.

4.3.2. Influência do pH na catálise enzimática

Neste estudo, foi verificada a influência do metóxido de potássio (MeOK) na catálise enzimática quando aplicado no meio reacional (farelo de arroz bruto). Estas reações foram realizadas com os mesmos parâmetros anteriormente aplicados no item 4.3.1, utilizando a razão molar de metanol:óleo de 8:1 e a razão molar hexano:metanol de 12:1. As soluções de MeOK foram preparadas com a quantidade de 1, 1,5 e 2% (m/m) KOH/óleo (Vetec 85%). Tendo em vista que o álcool foi colocado em duas etapas, no tempo zero, a solução de MeOK foi adicionada,

estando nesta primeira etapa o volume a correspondente quantidade de catalisador, mais a primeira fração do álcool. Após 12 h de reação foi adicionado o restante do volume de metanol, sem o KOH. Para determinar o pH do meio reacional foi utilizado o pHmetro LabQuest calibrado, sendo as medidas realizadas antes, após a adição do MeOK (0h), em 12 h e ao término (24 h) da reação.

4.3.3. Influência do pH na síntese do biodiesel a partir do óleo bruto extraído do farelo de arroz

Foram extraídos 5 g de óleo bruto do farelo de arroz (item 4.1.4), sendo este a matéria-prima para a síntese. Estas reações ocorreram nas melhores condições descritas no item 4.3.1. Entretanto, as relações molares foram hexano:metanol de 3:1 (Nelson *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1999) e de metanol:óleo de 3:1, mais a *lipase Porcine pancreas 5% (m/m) lipase/óleo* como descrito por Ebrahimi *et al.* (2012). As soluções de MeOK de 0, 1, 1,5 e 2% e o metanol foram adicionados conforme já descrito no item 4.3.2.

As mesmas razões molares de metanol:óleo 8:1 e hexano:metanol 12:1 no óleo bruto extraído do farelo de arroz foram confrontadas, verificando a influência na extensão de ésteres formados. As demais condições reacionais foram as mesmas deste item. Com exceção para as quantidades de MeOK que foram de (0 e 1% m/m KOH/óleo) adicionadas da mesma forma que a descrita no item 4.3.2.

4.3.4. Etapa de purificação dos ésteres metílicos

Os produtos obtidos nas sínteses dos itens 4.3.1 e 4.3.2 foram purificados primeiramente, por decantação, onde o material sólido separou-se do sobrenadante em uma proveta (100 mL) por 10 min. O sobrenadante, onde se encontrava os ésteres metílicos e demais subprodutos e/ou acilglicerois, AGL, sais de ácidos graxos, fosfolipídios e o solvente foi separado e colocado em uma pêra de separação e lavado três vezes com água destilada, a temperatura de 60°C na proporção de 1:1 (v/v) sobrenadante/água. A fase inferior da pera de decantação foi guardada para tratamento e reaproveitamento do metanol e da água.

Posteriormente, a fase superior da pera de decantação foi submetida a purificação em batelada baseado em método descrito na literatura por (Faccini, 2008), através da filtragem a vácuo em coluna de sílica 3,5% (m/v), granulometria de 5-40 μm em um filtro de vidro sinterizado ($D = 4,5 \text{ cm}$ e $h = 7 \text{ cm}$). A sílica antes de ser utilizada permaneceu por 30 min em estufa a 100°C para retirada de umidade. Finalmente o solvente hexano foi recuperado em rota evaporador e o produto encaminhado para a análise por cromatografia em fase gasosa.

Entretanto, ao término das sínteses do item 4.3.3, o meio reacional primeiramente foi depositado em um tubo de ensaio (30 mL) e submetido a 10 min de centrifugação a 4000 rpm (HT Centribio TDL80-23). A fase superior seguiu o mesmo procedimento de purificação posterior à etapa de lavagem, descrito no parágrafo anterior. A fase inferior onde se encontrava a *lipase* foi acondicionada em frascos.

4.4. Caracterização por cromatografia gasosa

4.4.1. Fator de resposta relativo

Para a análise quantitativa de um composto em cromatografia em fase gasosa, do inglês – *Gas Chromatography (GC)*, é necessário determinar o fator de resposta relativo (FRR). A relação matemática utilizada para a determinação do FRR foi através da Equação (4.4). Com base na literatura Prados *et al.* (2012), a determinação empírica do FRR foi obtido usando como PI o heptadecanoato de metila (C17:0) em relação aos padrões designados como *substratos* (S_i): palmitato de metila (C16:0), oleato de metila (C18:1) e linoleato de metila (C18:2), todos padrões da marca Sigma – Aldrich com pureza $\geq 99\%$. Estes três S_i foram utilizados na identificação dos ésteres majoritários da mistura de ésteres obtidos na síntese de biodiesel do óleo do farelo de arroz.

$$\frac{m_{S(i)}}{m_{PI}} = k_{s(i)} \cdot \frac{A_{S(i)}}{A_{PI}} \quad (4.4)$$

onde,

$m_{S(i)}$ = massa do *substrato*_(i);

m_{PI} = massa do padrão interno;

$k_{S(i)}$ = fator de resposta relativo do *substrato*_(i);

$A_{S(i)}$ = área do pico do *substrato*_(i);

A_{PI} = área do pico do padrão interno.

Para determinar o FRR, foram preparadas soluções estoque de (PI $\approx 10\text{mg.mL}^{-1}$) e (substratos $\approx 9,0\text{mg.mL}^{-1}$) em heptano (Vetec 99,5%), segundo as normas EN 14103 (2003) e ASTM D 6584, possibilitando assim, construir uma reta através de cinco pontos (cinco misturas) de diferentes concentrações de S_i , adicionando a cada um destes pontos a mesma quantidade de PI. Para cada ponto, foram realizadas três injeções de $1\mu\text{L}$ no GC. Este procedimento foi realizado com base na literatura (EN 14103, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Visentainer, 2012; Aguiar *et al.*, 2011; Prados *et al.*, 2012). Os parâmetros de análise no GC para a determinação do FRR estão descritos no item 4.4.2.

4.4.2. Quantificação do biodiesel

O biodiesel obtido das sínteses enzimáticas foi quantificado por GC baseado no método EN 14103 (2003). Pesou-se em balão volumétrico a massa de amostra que variou entre 70 a 80mg. A cada amostra era adicionado $1000\mu\text{L}$ da solução de PI de 10mg/mL e avolumado com 5mL de heptano. O volume injetado de cada análise foi de $1\mu\text{L}$. Estas análises foram realizadas nas mesmas condições, nas quais foram obtidos os FRR. Para a correta quantificação dos ésteres metílicos obtidos, a integração das áreas dos picos foi executada a partir do éster miristato de metila (C14:0) até o pico do éster nervonato de metila (C24:1), tendo todos os picos em consideração, incluindo os menores.

As condições operacionais do equipamento de GC utilizado para a determinação do FRR e quantificação do biodiesel por GC são descritas a seguir: o equipamento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu modelo GC-14B, equipado com detector de ionização de chama, do inglês – *Flame Ionization Detector (FID)*,

coluna capilar HP-INNOWAX (polietileno glicol) com 30m de comprimento; 0,250mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária. O gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 1,0mL/min. Para todas as análises realizadas, o programa de temperatura da coluna foi: temperatura inicial do forno de 160°C, 1ª rampa de aquecimento na taxa de 40°C/min até 190°C (1,0min), 2ª rampa de aquecimento na taxa de 3°C/min até 250°C (1,0min). A temperatura do injetor e do detetor foram mantidas a 250°C. O volume das amostras injetadas foi de 1 μ L no modo “split” na razão de 1:30. O tempo total de cada análise foi de 22,75min. Todos os gases utilizados nestas análises (hidrogênio, nitrogênio e ar sintético) eram de alta pureza (99,999%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Constituição do grão de arroz

A Figura 5.1 apresenta a fotografia do grão de arroz (*Oryza sativa*) (a) com casca e sem casca e a micrografia da secção longitudinal do grão de arroz com casca (b). Estas imagens mostram basicamente as partes que constituem o grão de arroz: (a/a') casca, (b/b') embrião e/ou germe, (c/c') farelo e (d/d') endosperma, as quais estão de acordo com a descrição da literatura (Guimarães *et al.*, 2002; Orthofer, 2013). A casca é a camada mais externa, tendo a função de proteger o grão, sendo removida quando o grão é moído durante o processo de beneficiamento. Sob a casca, está o farelo de cor acastanhada que é removido durante o processo de polimento, assim como o embrião e/ou germe, restando o endosperma. O endosperma é a porção localizada no interior do grão de arroz, que é branca, e contém uma grande quantidade de amido (Zhou *et al.*, 2002).

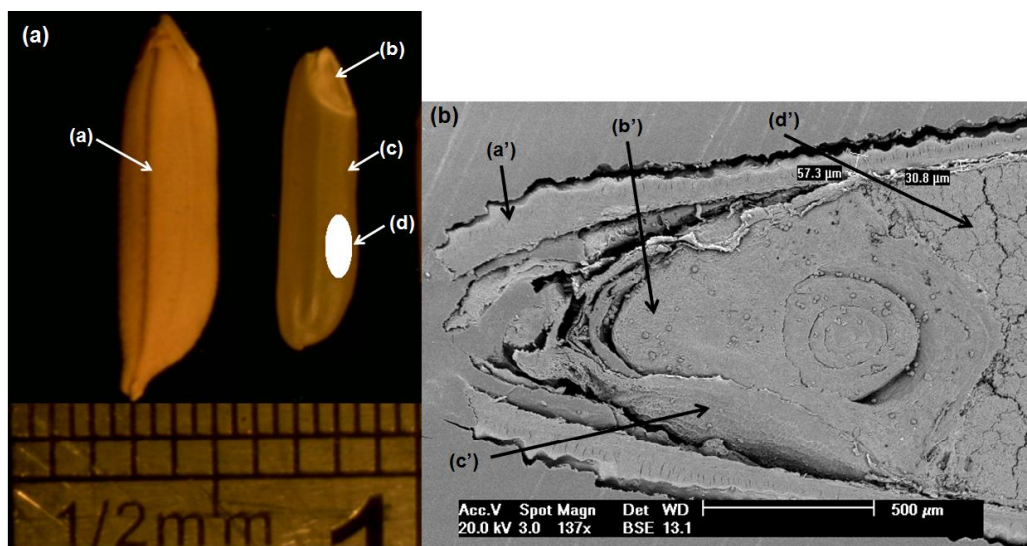


Figura 5.1. Resultado das imagens do grão de arroz (*Oryza sativa*) mostrando suas principais constituições: (a) fotografia do grão de arroz com casca e sem casca em escala de 0,5 mm e (b) micrografia da secção longitudinal do grão de arroz com casca.

As dimensões e a constituição do grão de arroz estão sujeito, principalmente, ao manejo na lavoura, variações ambientais, qualidade da espécie (diferenças varietais) e qualidade de processamento (polimento) assim como o armazenamento do grão após a colheita (Zhou *et al.*, 2002).

A Tabela 5.1 apresenta a análise da constituição do grão de arroz (base seca), este que foi coletado no mesmo engenho do farelo de arroz. Os resultados demonstram que o grão é constituído de 20,9% de casca e 2,8% de germe. Nessa análise, o percentual de endosperma e farelo é resultado da diferença da soma dos constituintes anteriores tendo como base o grão inteiro.

Tabela 5.1. Constituição do grão de arroz (*Oryza sativa*) obtido experimentalmente (base seca).

Constituição do grão de arroz		
Casca (%)	Endosperma e Farelo (%)	Embrião (%)
20,9 ± 0,9	76,3 ± 0,9	2,8 ± 0,2
Casca (%) ^(a)	Endosperma (%) ^(a)	Farelo e embrião (%) ^(a)
20	70	10

Fonte: ^(a)Paucar-Menacho *et al.*, 2007.

Os resultados deste estudo quando comparados com a literatura (Paucar-Menacho *et al.*, 2007) diferem apenas quanto ao percentual da constituição de endosperma e o farelo. Isto em decorrência da metodologia adotada na obtenção dos constituintes. Pois, ao se comparar os valores experimentais (entre *endosperma*, *farelo* e *embrião*) dos valores da literatura (*endosperma*^(a); *farelo* e *embrião*^(a)), percebe-se que a diferença é de aproximadamente 7%, o que corresponde ao percentual de farelo de arroz descrito na literatura (Zhou *et al.*, 2002, Ju e Vali, 2005; Orthofer, 2013).

5.2. Análises granulométrica, gravimétrica e termogravimétrica

A composição do farelo de arroz depende do processo a que ele é submetido, variedade de arroz, tratamento dos grãos antes do polimento, tipo de sistema de polimento, grau de polimento e fracionamento que ocorre durante o polimento (Orthofer, 2013). Os resultados que constam na Tabela 5.2 foram

obtidos para fornecer informações referentes ao percentual mássico e umidade das faixas granulométricas e do farelo de arroz bruto, com o propósito de entender a influência destes em relação à atividade enzimática da *lipase*, principalmente sobre o triglicerídeo (substrato - óleo) contido no farelo. Os resultados obtidos na análise granulométrica possibilitaram constatar que o maior percentual mássico está entre os 20-32 e 35-60 mesh, pois o farelo é composto de partículas de diferentes tamanhos e o percentual mássico varia em função das dimensões desses grãos, estando estes resultados similares ao descrito por Imsanguan *et al.* (2008) e Chong *et al.* (2007). A umidade encontrada no farelo de arroz bruto e nas frações granulométricas estudadas através da análise gravimétrica foi em média de 10,5%. Este resultado é muito próximo a 10,68% encontrado por Montanher *et al.* (2005) e 10,8% encontrado por Zullaikah *et al.* (2005).

Tabela 5.2. Resultados das análises granulométrica, gravimétrica e termogravimétrica na caracterização do farelo de arroz.

Peneira (mesh)	Granulométrica Massa (%)	Gravimétrica Umidade (%)	Termogravimétrica		
			T _i (°C)	T _f (°C)	Umidade (%)
> 20 ^(a)	4,9 ± 0,3	nd	nd	nd	nd
20 – 32 ^(b)	16,3 ± 0,5	10,1 ± 0,2	23,5	149,9	8,5
32 – 35	23,6 ± 1,9	10,7 ± 0,3	26,7	126,7	10,3
35 – 60	45,9 ± 1,2	11,0 ± 0,2	33,4	138,1	10,7
60 – 100	8,7 ± 1,8	10,6 ± 0,2	30,5	129,0	9,8
< 100	0,2 ± 0,2	nd	nd	nd	nd
Farelo bruto	nd ^(c)	10,5 ± 0,3	25,9	136,9	10,1
20 – 100	nd	10,1 ± 0,1	nd	nd	nd
32 – 100	nd	10,5 ± 0,2	nd	nd	nd

^(a) fragmentos do grão de arroz e da casca, ^(b) somente o germe e/ou embrião e ^(c) nd - não determinado.

5.3. Análise termogravimétrica

Esta é uma técnica, onde se pode acompanhar a perda de massa de uma amostra durante seu aquecimento. A Figura 5.2 mostra o comportamento de cinco curvas termogravimétricas das faixas granulométricas de 20-32, 32-35, 35-60, 60-100mesh e do farelo de arroz bruto. Este comportamento de degradação é semelhante ao encontrado por Araújo e Fernandes (2013), no estudo da

degradação térmica da farinha de trigo. As curvas DTG das faixas granulométricas e do farelo bruto foram usadas para avaliar as diferentes etapas de degradação e são apresentadas no ANEXO A.

As curvas TG (Figura 5.2) mostram que a decomposição térmica ocorre em 4 estágios (E_n) para a maioria das faixas granulométricas e no farelo de arroz. Entretanto, a faixa granulométrica 20-32 mesh difere das demais, principalmente a partir do E_2 até E_4 . Este aspecto pode ser resultado do maior percentual de óleo encontrado nesta faixa granulométrica como demonstrado através dos resultados do item 5.4 (descrito a seguir).

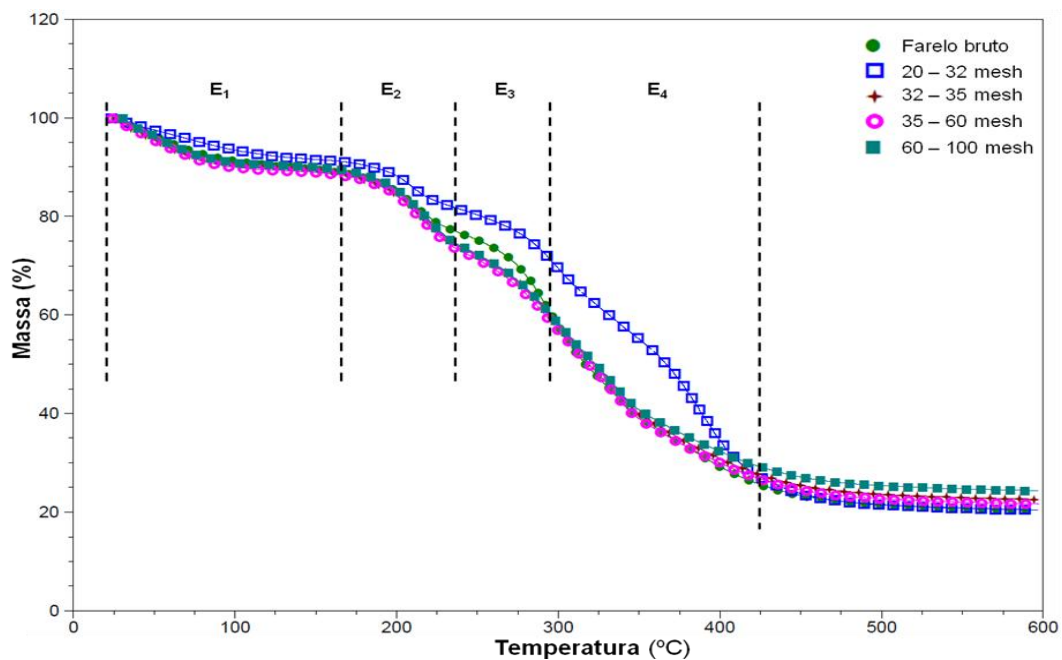


Figura 5.2. Curvas TG das faixas granulométricas 20-32, 32-35, 35-60, 60-100 mesh e do farelo de arroz bruto.

Na Tabela 5.2, encontram-se as temperaturas iniciais e finais do E_1 que variaram em média entre 23 a 30°C e 126 a 149°C, respectivamente. Estas estão relacionadas à desidratação do farelo de arroz, com perda de umidade que foi em média 9,9%. Este resultado é corroborado pela análise gravimétrica (10,5%) e muito próximo a 10,68% encontrado por Montanher *et al.* (2005) e 10,8% encontrado por Zullaikah *et al.* (2005). As demais etapas referem-se à decomposição do material orgânico que faz parte do farelo de arroz. Após a E_4 tem-se o resíduo, que foi em média de 22,1% na temperatura de 600°C, para as cinco análises realizadas.

5.4. Teor de óleo

A Figura 5.3 mostra os resultados do estudo onde foi determinado o melhor tempo de extração do óleo do farelo de arroz para as faixas granulométricas de 20-32, 32-35, 35-60 e 60-100 mesh em base seca. Após 9 h de extração obteve-se 43,6, 28,2, 25,8 e 24,8% de óleo, respectivamente para as faixas granulométricas citadas acima. Após este tempo não houve aumento significativo nos percentuais de óleo extraído. Outra informação relevante nesse estudo é que, somente na faixa granulométrica de 20-32 mesh o percentual de óleo extraído foi superior a 40%, nas demais faixas a quantidade média de óleo extraído foi de cerca de 50% menor (26,2% de óleo) para o mesmo tempo de extração.

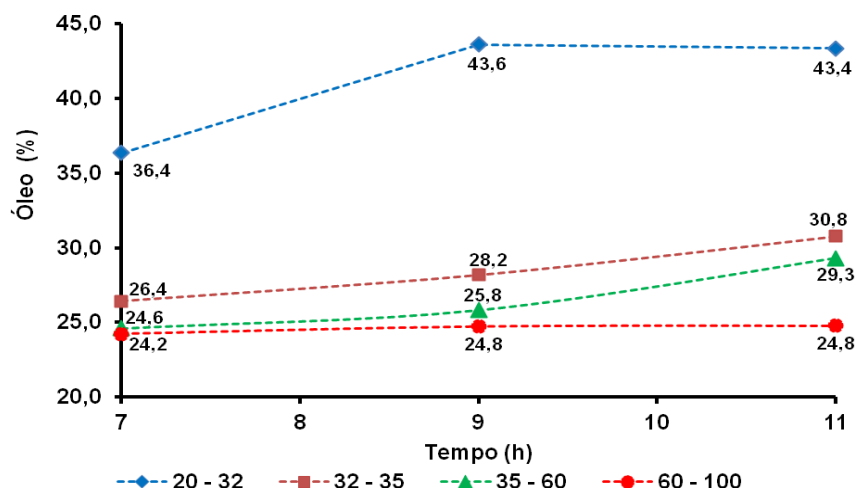


Figura 5.3. Resultados da extração do óleo em base seca para as granulometrias de 20-32, 32-35, 35-60 e 60-100 mesh.

Os resultados obtidos da extração do óleo do farelo de arroz bruto e demais granulometrias em base úmida (10,5%) são apresentados na Figura 5.4 e mostram que o percentual de óleo extraído foi similar para as granulometrias e no farelo de arroz bruto, com exceção para a granulometria de 20-32 mesh, alcançando o maior percentual de óleo extraído (28,4%). Os resultados da extração do óleo do farelo de arroz em base úmida demonstraram que a umidade exerceu uma forma de obstáculo dificultando que o hexano (solvente extrator) percolasse o material extraíndo o óleo, diferentemente (Figura 5.3), onde a extração foi em base seca. Isto indica que existe um percentual maior de óleo no germe do grão de arroz que nas demais faixas granulométricas, o que corrobora com a literatura Orthoefer (2013)

apud Saunders (1990) Randall *et al.* (1985) Zhou *et al.* (2002). Também, fica claro que os percentuais de óleo extraídos das demais granulometrias estão próximos do farelo de arroz sem qualquer tratamento prévio (farelo bruto) e de acordo os com resultados encontrados na literatura (15 a 23% de óleo) Ju e Vali (2005).

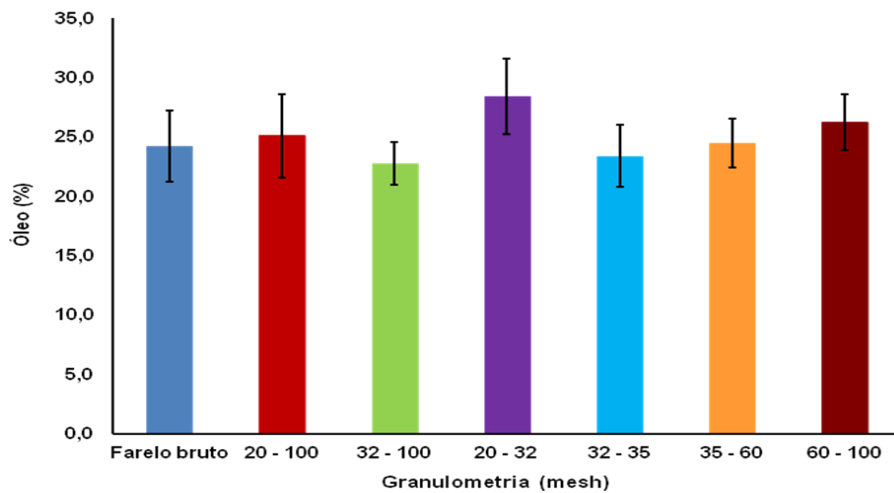


Figura 5.4. Resultados da extração do óleo do farelo bruto e para as granulometrias de 20-100, 32-100, 20-32, 32-35, 35-60 e 60-100 mesh em base úmida (10,5%).

5.5. Microscopia eletrônica de varredura

Através da técnica de MEV foi possível obter a imagem da morfologia do germe e/ou embrião (Figura 5.5 a), este que é encontrado na faixa granulométrica de 20-32mesh. Suas dimensões (primeiro plano) são aproximadamente de 1,74mm de comprimento e 994 μ m de largura.

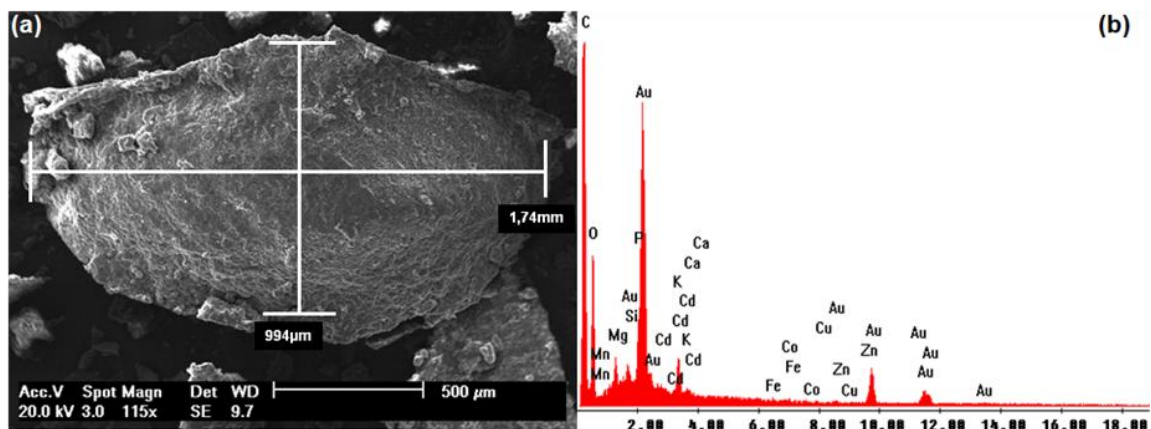


Figura 5.5. (a) micrografia e (b) espectro da análise por EDS do germe e/ou embrião contido na baixa granulométrica 20-32 mesh.

Observa-se pelo espectro da análise por EDS (Figura 5.5 b) realizado no germe (Figura 5.5 a) do farelo de arroz a presença dos elementos (C, O, Si, P, Cd, Co, Cu, Mn, Zn, Fe, Ca, K, Mg). Também, deve estar presente no germe como em todo o farelo o elemento sódio (Na), que através do EDS não foi possível detectar em decorrência de o seu número atômico ser 11, pois elementos que apresentam o número atômico inferior e/ou igual a 11 não é detectado por EDS. Mas foi quantificado pela técnica de ICP-OES, como consta no item 5.6 (descrito a seguir). Em algumas regiões do espectro, verifica-se o sinal referente à presença do elemento Au, ocasionado pelo processo de metalização da amostra.

5.6. Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

Para quantificar os elementos metálicos encontrados no item 5.5, foi realizada a análise quantitativa por ICP-OES destes elementos (Cd, Co, Cu, Mn, Zn, Fe, Na, Ca, K, Mg) presentes no germe e/ou embrião do farelo de arroz. Entretanto, para uma análise mais representativa do farelo de arroz, foram analisadas as seguintes faixas granulométricas: 20-32; 32-35; 35-60 e 60-100 mesh. Os resultados são apresentados na Tabela 5.3 e revelaram que estes elementos estão presentes no farelo como elementos-traço.

Tabela 5.3. Resultados da quantificação dos elementos metálicos presentes no farelo de arroz.

Farelo de Arroz						
Peneira (mesh)		20 - 32	32 - 35	35 - 60	60 - 100	
Elemento	Faixa	*[ppm] ± DPR				Total
Cd	(a)	0,13 ± 9,95	0,11 ± 3,59	0,04 ± 3,47	0,03 ± 1,90	0,31
Co		0,21 ± 2,56	0,14 ± 4,96	0,18 ± 9,12	0,12 ± 9,92	0,65
Cu	(b)	4,80 ± 1,14	1,50 ± 1,74	1,50 ± 0,12	3,00 ± 0,36	10,80
Mn		16,62 ± 0,87	23,21 ± 0,23	24,47 ± 1,38	24,78 ± 0,66	89,08
Zn		57,84 ± 0,71	9,13 ± 0,81	9,55 ± 0,17	12,94 ± 0,40	89,46
Fe		21,57 ± 1,64	18,66 ± 0,78	24,93 ± 0,19	32,31 ± 0,44	86,47
Na	(c)	217,62 ± 1,19	61,44 ± 8,72	106,32 ± 3,70	81,09 ± 2,39	446,47
Ca		579,15 ± 1,41	273,42 ± 1,74	7,94 ± 0,12	24,08 ± 0,36	884,59
K		1086,00 ± 0,67	1179,60 ± 0,72	1531,50 ± 0,33	1044,30 ± 1,09	4841,40
Mg		886,0 ± 7,50	881,10 ± 0,37	1975,50 ± 0,22	2031,00 ± 0,36	5773,50

*[ppm]: concentração em partes por milhão (mg/kg) ± DPR: desvio-padrão relativo.

Como consta na Tabela 5.3, as concentrações encontradas dos elementos-traço são muito variáveis nas diferentes granulometrias analisadas. Entretanto, afim de melhor compará-las, estas foram divididas em três grupos de faixas de concentração: (a) 0-0,22, (b) 0-60 e (c) 0-2100 ppm, permitindo uma melhor interpretação dos resultados. A concentração de Cd variou de 0,03-0,13 ppm, superiores a este, as concentrações de Co variaram de 0,12-0,21 ppm, nas faixas granulométrica submetidas à análise.

As concentrações dos elementos-traço Cu, Mn, Zn e Fe variaram de 0-60,0 ppm. Nesta faixa, os elementos-traço têm pouca variação na concentração entre as faixas granulométricas, com exceção para o Zn que, no mínimo, quadruplicou sua concentração na faixa de 20-32 mesh.

Os resultados de concentração dos quatro últimos elementos metálicos (Na, Ca, K e Mg) analisados nas mesmas faixas granulométricas do farelo de arroz para a faixa de concentração (0-2100,0 ppm), demonstram que o elemento metálico Mg é o que está presente em maior concentração nas faixas granulométricas estudadas, seguido do elemento metálicos K. Os demais elementos desta faixa de concentração apresentaram resultados inferiores a estes nas mesmas faixas de granulométricas.

Os resultados encontrados permitem entender um dos aspectos pelo qual, a atividade enzimática da *lipase* do farelo de arroz é prejudicada, isto é, devido à presença de determinados elementos metálicos. Um estudo feito por Mumhi *et al.* (1993) com o objetivo de inibir a atividade enzimática da *lipase* do farelo de arroz, evitando assim, que esta hidrolisasse os triglicerídeos presentes no óleo do farelo, constatou que ao pulverizarem o farelo de arroz com soluções de 25, 50, 100 e 200ppm dos íons Zn, Cu, Fe e Ni em metanol, ocorrendo a inibição da enzima e, esta inibição foi mais eficaz com as soluções de 100 e 200 ppm dos elementos na sequência: Fe > Ni > Zn > Cu.

É importante destacar que não somente os elementos metálicos citados no estudo de Mumhi *et al.* (1993), tem a capacidade de interagir no sítio ativo da *lipase*, ocasionando inibição, reduzindo sua atividade enzimática. Mas também, os

elementos metálicos como Co, Mn, Mg, Na, K e Ca. Devido as suas concentrações no meio reacional, estes podem interferir na atividade enzimática como demonstraram os estudos realizados por Mendes *et al.* (2012); Ma *et al.* (2006); Ghori *et al.* (2011); Zhou *et al.* (2012); Uttatree *et al.* (2010); Zheng *et al.* (2011).

5.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

As faixas de vibração de estiramento do grupo funcional carbonila (C=O) de éster do triglicerídeo e do grupo funcional C=O de ácido carboxílico ocorrem nas regiões de 1750-1735 cm^{-1} e 1720-1706 cm^{-1} , respectivamente (Silverstein *et al.*, 2007; Rohman e Man, 2010). Desta forma, é possível acompanhar a hidrólise dos triglicerídeos em AGL pela ação da enzima *lipase*. Os espectros de FTIR característicos do óleo refinado de arroz, do óleo bruto extraído do farelo de arroz após o polimento do grão de arroz e do óleo bruto extraído do farelo de arroz após dez semanas de armazenamento, são apresentados no ANEXO B.

A Figura 5.6 apresenta os espectros sobrepostos do (a) óleo do farelo de arroz refinado e (b) do óleo extraído do farelo de arroz bruto na região de número de onda de 1816-1658 cm^{-1} . No espectro (a) observa-se uma banda intensa em 1743 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo funcional C=O de éster do triglicerídeo, conforme descrito por Furlan *et al.* (2010). O espectro (b), do óleo do farelo de arroz bruto imediatamente ao polimento do grão de arroz, observa-se uma banda semelhante (mesma intensidade e mesmo número de onda) e um ombro que após deconvolução (espectro b') atribuiu-se ao estiramento do grupo funcional C=O de ácido carboxílico (1712 cm^{-1}), de acordo com o descrito por Bendini *et al.* (2007) e Silverstein *et al.* (2007), onde os AGL podem estar na forma de dímeros no estado líquido em concentração inferior a 0,01M. Este fato é explicado pela formação de ligação de hidrogênio, que acarreta o enfraquecimento da ligação C=O do ácido carboxílico, resultando na absorção em número de ondas menores que o da ligação C=O de éster (Silverstein *et al.* 2007). Estas informações corroboram com os resultados encontrados em outros estudos Lerma-García *et al.* (2010); Ozgul-Yucel e Proctor (2004). Com isso foi possível confirmar a presença de AGL no farelo de

arroz bruto, mesmo durante o processo de polimento do grão de arroz em seu beneficiamento na indústria do arroz.

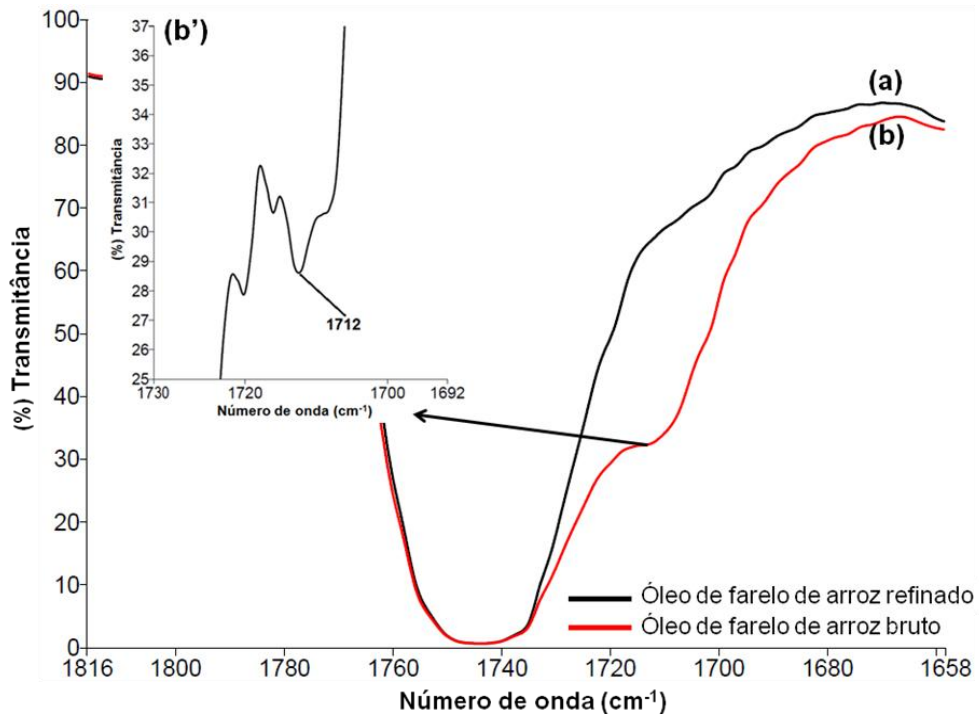


Figura 5.6. Espectros de FTIR sobrepostos do (a) óleo do farelo de arroz refinado e (b) do óleo extraído do farelo de arroz bruto na região de número de onda de 1816-1658 cm^{-1} .

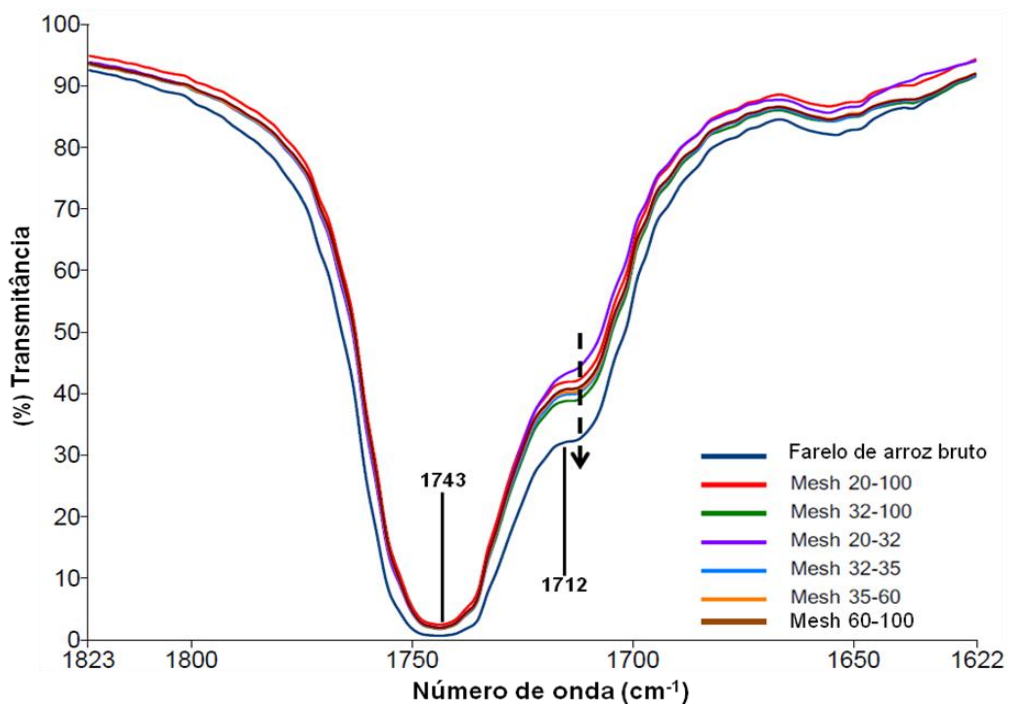


Figura 5.7. Espectros de FTIR sobrepostos do óleo extraído das faixas granulométricas e farelo de arroz bruto obtidos após o polimento do grão de arroz na região de número de onda de 1823-1622 cm^{-1} .

Na Figura 5.7 estão sobrepostos os sete espectros obtidos do óleo extraído do farelo de arroz bruto e demais faixas granulométricas estudadas na região de número de onda de 1823-1622 cm^{-1} . Pode-se perceber claramente que ocorrer um aumento relativo na intensidade das bandas atribuídas ao estiramento do grupo funcional C=O de ácido carboxílico, com número de onda (1712 cm^{-1}) do óleo extraído das faixas granulométrica estudadas em questão (20-32 < 20-100 < 35-60 < 32-35 < 32-100 < farelo de arroz bruto), este último mais intenso que as demais. Este fato evidencia uma maior concentração de AGL no óleo do farelo bruto. Assim, fica demonstrado através desta técnica que a *lipase* presente no farelo de arroz, independente da faixa granulométrica estudada, exerce atividade enzimática hidrolisando as ligações ésteres dos triglicerídeos, transformando-os em AGL mesmo durante o processo de polimento do grão de arroz.

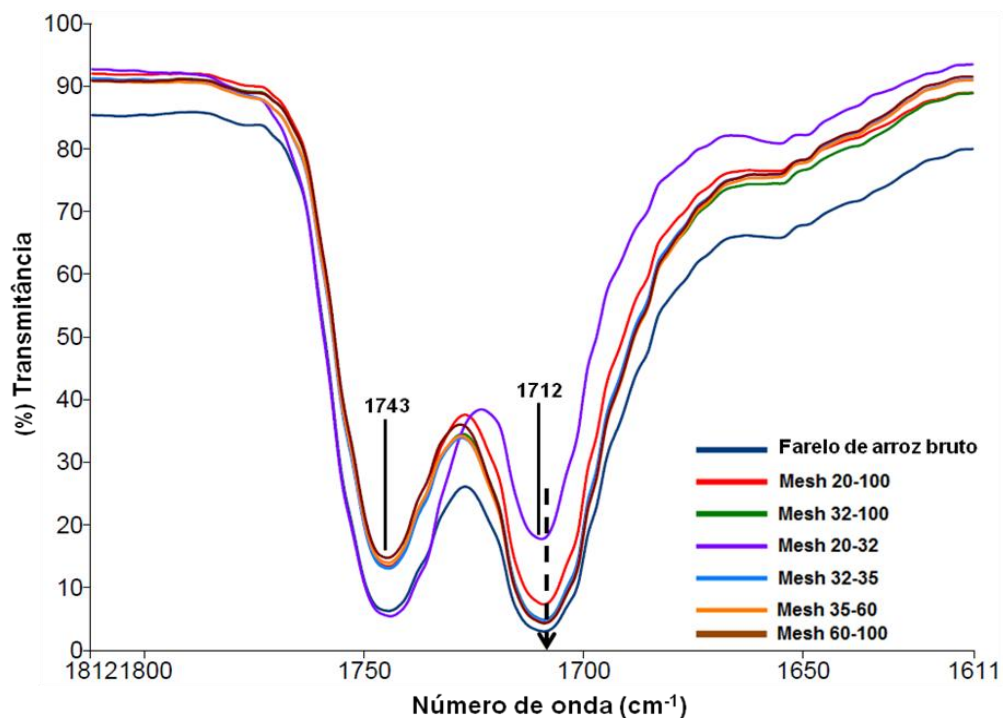


Figura 5.8. Espectros de FTIR sobrepostos do óleo extraído das faixas granulométricas e farelo de arroz bruto obtidos após dez semanas de estocagem na região de número de onda de 1812-1611 cm^{-1} .

A Figura 5.8 também apresenta sobrepostos os sete espectros do óleo extraído das faixas granulométricas e farelo de arroz bruto estudadas na região de número de onda de 1812-1611 cm^{-1} . Estes espectros foram obtidos após dez semanas de estocagem. Novamente, pode-se observar as mesmas bandas de

vibração de estiramento das ligações dos grupos funcional C=O de ésteres dos triglicerídeos e ácidos carboxílicos com número de onda de 1743 e 1712 cm^{-1} , respectivamente de acordo com Furlan *et al.* (2010) e Bendini *et al.* (2007). Percebe-se, claramente, que ocorreu aumento relativo na intensidade das bandas de vibração de estiramento das ligações dos grupos funcional C=O de ácidos carboxílicos, demonstrando que, após passarem dez semanas de estocagem a concentração dos AGL aumentou no óleo. Entretanto, observa-se que a concentração de AGL no óleo da faixa granulométrica 20-32 mesh, foi relativamente a menor quando comparadas com as demais faixas. O inverso é observado quanto a intensidade das bandas de vibração de estiramento das ligações dos grupos funcional C=O de ésteres, que ao final das dez semanas houve uma redução da concentração dos triacilglicerídeos no óleo. Este fenômeno demonstra que, após passarem 70 dias, onde foram mantidas as condições de estocagem do farelo, a *lipase* permaneceu ativa hidrolisando as ligações ésteres dos triglicerídeos.

5.8. Atividade enzimática da lipase no farelo de arroz

Como foi constatado na análise qualitativa realizada no item 5.7, a *lipase* promove a hidrólise dos triglicerídeos do óleo do farelo de arroz em AGL. Na Tabela 5.4 (Anexo C) estão demonstrados os percentuais de AGL obtidos da atividade enzimática da *lipase* durante a hidrólise dos triglicerídeos em função do tempo de armazenamento. Entre os resultados, destacam-se os percentuais iniciais de AGL (tempo= 0), mesmo durante o polimento do grão de arroz, houve variação em função de cada granulometria e do farelo bruto, na faixa de 6,1-7,6% (média de 6,8%). Estes resultados estão muito próximos ao valor de 6,6% encontrado por Zullaikah *et al.* (2005).

A atividade enzimática da *lipase* é melhor observada na Figura 5.9 que apresenta o percentual de AGL (%AGL) em função do tempo. O aumento do teor de AGL em função da hidrólise do óleo durante as dez semanas de armazenamento nas diversas granulometrias e no farelo bruto mostra que a atividade enzimática da *lipase* é contínua. Para as amostras estudadas, a tendência à estabilização da atividade é observada somente a partir da sexta semana, com exceção para o farelo

de arroz bruto que crescentes. Estes resultados são semelhantes ao estudo de Zullaikah *et al.* (2005). Ao final de dez semanas de armazenamento do farelo a média de AGL foi de aproximadamente 47%. Entretanto, a exceção foi para a faixa granulométrica de 20-32 mesh, onde a atividade enzimática foi de aproximadamente a metade da média das demais.

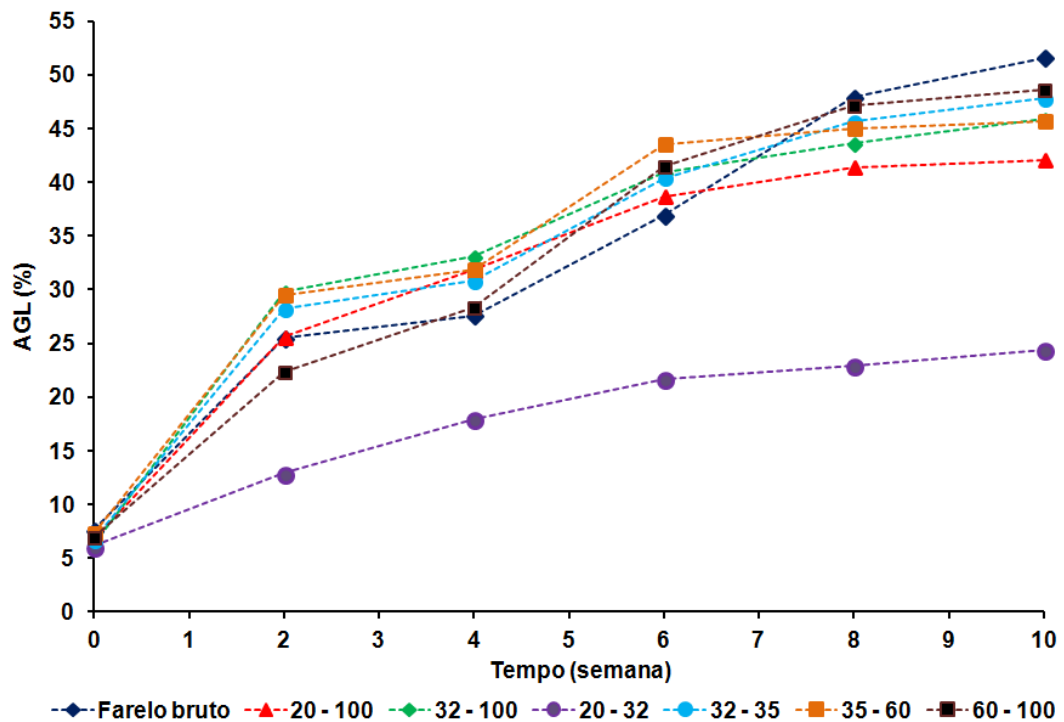


Figura 5.9. Percentual de AGL nas diversas granulométricas e farelo de arroz bruto em função do tempo de armazenamento na temperatura de 35°C.

Para explicar este fenômeno há uma hipótese que é descrita por Suzuki (2011) *apud* Takomo (1993) em que os triglicerídeos estão situados em bolsões no farelo de arroz protegidos por membranas contínuas de fosfatidilcolina. Estas membranas são degradadas por uma enzima chamada de *Fosfolipase D*, liberando os ácidos fosfatídicos juntamente com os triglicerídeos, passando os triglicerídeos a serem hidrolisados pela enzima *lipase*. Entretanto, o ácido fosfatídico consiste num esqueleto de glicerol, em geral, ligado a este um ácido graxo saturado em a *sn-1*, um ácido graxo insaturado ligado ao *sn-2* e um grupo fosfato ligado a carbono *sn-3*. Este grupo fosfato é extremamente polar, o que favorece uma possível inibição da atividade enzimática da *lipase*, o que corrobora com os resultados apresentados por Lai *et al.* (2005) e Watanabe *et al.* (2002).

5.9. Cinética da reação de formação de AGL e análise estatística

A velocidade da reação de formação de AGL foi determinada após a conversão (hidrólise) dos triglicerídeos do óleo presente nas diversas granulometrias e farelo bruto em AGL, através da atividade enzimática exercida pela *lipase* contida no farelo. A linearização dos resultados obtidos do estudo da atividade enzimática da *lipase* sobre os triglicerídeos do farelo seguiu o proposto por Ouachab e Tsoutsos (2012). Ao plotar o gráfico $\ln[AGL]/[AGL]_0$ versus tempo (Figura 5.10) com base na Equação (3.4), percebe-se que a interpolação foi linear, obtendo uma equação linear ($y = ak + b$), pois no período de dez semanas, os triglicerídeos são consumidos e os sítios ativos das enzimas não encontram-se mais saturados, nesse momento, a concentração dos triglicerídeos se torna limitante da velocidade, passando a uma reação de pseudo-primeira ordem como referido por WBC (2013). A partir das equações lineares obteve-se o coeficiente angular de cada reta (k), o que significa a constante cinética e seus respectivos valores estão apresentados na Tabela 5.5.

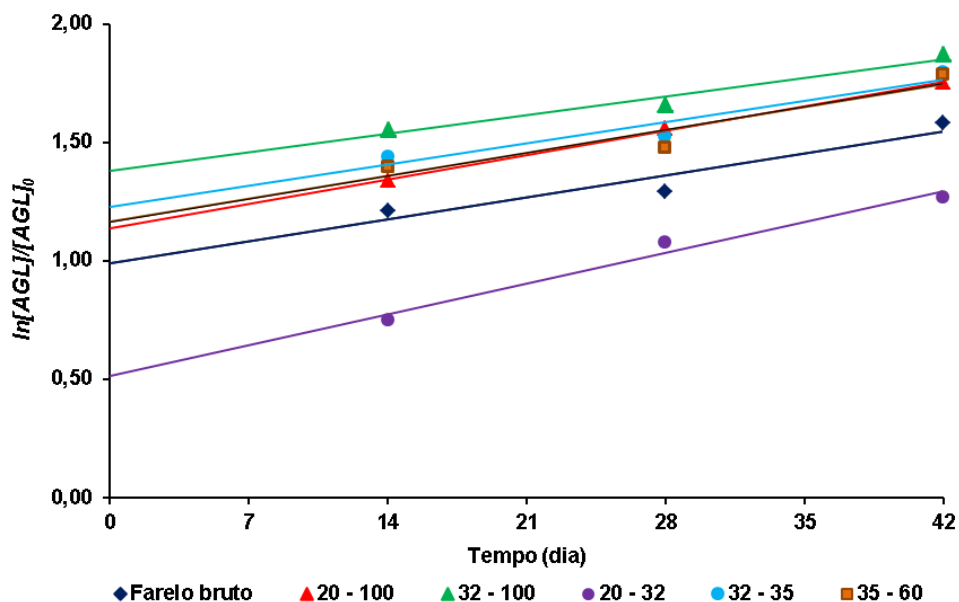


Figura 5.10. Curva $\ln[AGL]/[AGL]_0$ versus tempo (dia) da hidrólise dos triglicerídeos do óleo extraído do farelo de arroz através da atividade enzimática nas diversas granulometrias e farelo de arroz bruto de 35°C.

As k foram em média $1,41 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e a taxa em que os AGL foram formados foi em média de $0,7\% \text{ AGL} \cdot \text{dia}^{-1}$, resultado este comparável com os resultados

obtidos por Zullaikah *et al.* (2005), quando trabalhou com farelo de arroz com umidade de 10,3% a 30°C ($\approx 1,2\%$ AGL.dia⁻¹).

Tabela 5.5. Constante k (dia⁻¹) da hidrólise dos triglicerídeos determinada através da $\ln[\text{AGL}]/[\text{AGL}]_0$ versus tempo (dia) na temperatura de 35°C.

Peneira (mesh)	k (10 ⁻² dia ⁻¹)
Farelo bruto	1,32
20 - 100	1,48
32 - 100	1,13
20 - 32	1,86
32 - 35	1,39
35 - 60	1,39

A análise estatística realizada com base nos resultados da Tabela 5.4, mostrou que para o intervalo de confiança de 95%, existe diferença entre os grupos analisados, com um nível de significância máximo foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5.10. Determinação do fator de resposta relativo

A Figura 5.11 demonstra o perfil cromatográfico de uma análise na faixa de tempo de retenção (t_r) de 6 a 15 min de um total de 22,75 min de cada análise. Este perfil cromatográfico deixa claro a excelente resolução entre os picos eluídos da mistura dos substratos (C16:0 - palmitato, C18:1 - oleato e C18:2 - linoleato de metila) e do C17:0 - PI, estando este perfil adequado ao demonstrado por Marques *et al.* (2010) e Lin *et al.* (2009), o que possibilitou a obtenção do FRR.

Os resultados experimentais quantitativos obtidos das cinco misturas injetadas, foram plotadas (Figura 5.12) em um gráfico $A_{S(i)}/A_{PI}$ versus $m_{S(i)}/m_{PI}$, que através da declividade da reta passando pelos pontos experimentais, e aplicado o método de regressão linear e/ou método dos mínimos quadrados, resultaram nos FRR de cada um dos substratos (C16:0, C18:2 e C18:1) em comparação com do PI heptadecanoato de metila. Os coeficientes angulares encontrados nas equações das retas forneceram os FRR dos substratos analisados sendo 1,018, 0,9368 e 0,9001, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com a literatura

Visentainer (2012) e Prados *et al.* (2012). Assim, pode-se afirmar que o equipamento nestas condições de análise está operando em condições otimizadas, garantindo confiabilidade aos resultados. Diante destes resultados e considerando o modo de integração segundo a norma EN 14103 (2003), o FFR aplicado nos cálculos para a determinação da conversão em ésteres metílicos (biodiesel) para os itens 5.11 a 5.13, foi de uma unidade. Os cromatogramas das referidas análises são apresentados no ANEXO D.

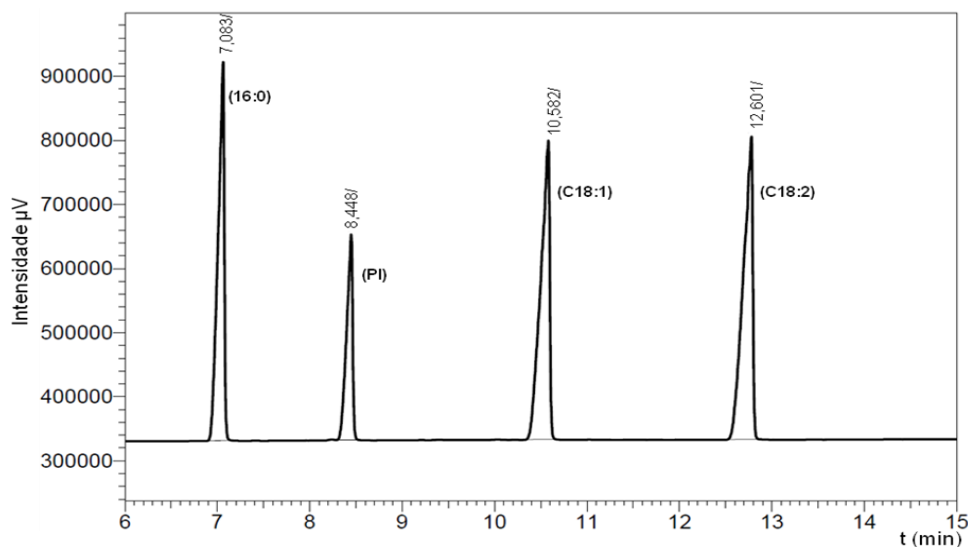


Figura 5.11. Perfil cromatográfico da mistura dos substratos (C16:0, C18:1 e C18:2) e do PI utilizados na obtenção do FRR, na faixa de (t_r) de 6 a 15 min, do total de 22,75 min de análise.

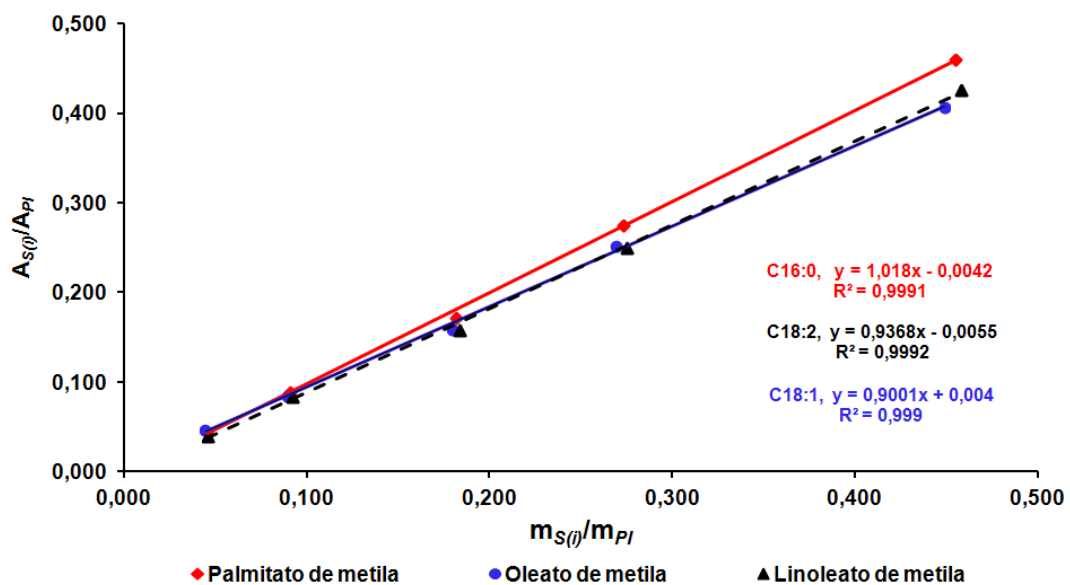


Figura 5.12. Determinação experimental do FRR de cada um dos substratos (C16:0, C18:1 e C18:2) em comparação com do PI.

5.11. Efeito do solvente *versus* álcool na conversão do óleo presente no farelo de arroz em ésteres

Neste trabalho, considerando que a matéria-prima (farelo de arroz) contém o substrato (acilglicerois e AGL \approx 25%), umidade (\approx 10%) e *lipase*, investigou-se o efeito do co-solvente (hexano e uma mistura de 40% de acetonitrila e 60% de *t*-butanol), almejando o balanço mais adequando destes com o agente de transesterificação e/ou esterificação, o álcool primário metanol, para obter o máximo de conversão em biodiesel através da catálise enzimática.

O co-solvente teve grande influência sobre a produção de biodiesel na transesterificação e/ou esterificação enzimática do óleo do farelo de arroz com metanol. Os resultados da Figura 5.13 (a) demonstram claramente que o efeito causado pelo co-solvente ocasionou a inibição da *lipase*, alcançando apenas 1,1% de conversão em ésteres metílicos, quando a reação se processou nas razões molares metanol:óleo de 25:1 e co-solvente acetronitrila/*t*-butanol:metanol de 6:1. O baixo percentual de conversão está claramente correlacionado com a composição do co-solvente (acetonitrila com $\log P = -0,33$ e *t*-butanol com $\log P = 0,86$) somada à presença do metanol ($\log P = 0,32$), os quais são hidrofílicos, todos com $\log P < 2$, o que resultou na extração de água de solvatação e de hidratação da superfície da *lipase*, mesmo adicionando o metanol em menores quantidades e em estágios diferentes de tempo de reação (0 e 12 h), da mesma forma como foi feito por Shimada *et al.* (1999) e Ebrahimi *et al.* (2012). Além disso, o excesso de solventes polares pode dificultar o acesso dos acilglicerois e dos AGL até o sítio ativo da *lipase*, prejudicando-a na sua atividade enzimática. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Fu e Vasudevan (2009); Gagnon e Vasudevan, (2011) quando estudaram a influência dos solventes na síntese enzimática.

O aumento nas conversões a biodiesel foi obtido quando foi usado hexano como co-solvente (Figura 5.13, b), mantendo-se as mesmas condições reacionais anteriores. Neste estudo se verificou que as melhores razões molares foram metanol:óleo 8:1 e hexano:metanol 12:1, onde se alcançou 5,7% de conversão em

ésteres metílicos. Este resultado foi 5 vezes maior ao resultado obtido com co-solvente acetonitrila/t-butanol (Figura 5.13, a).

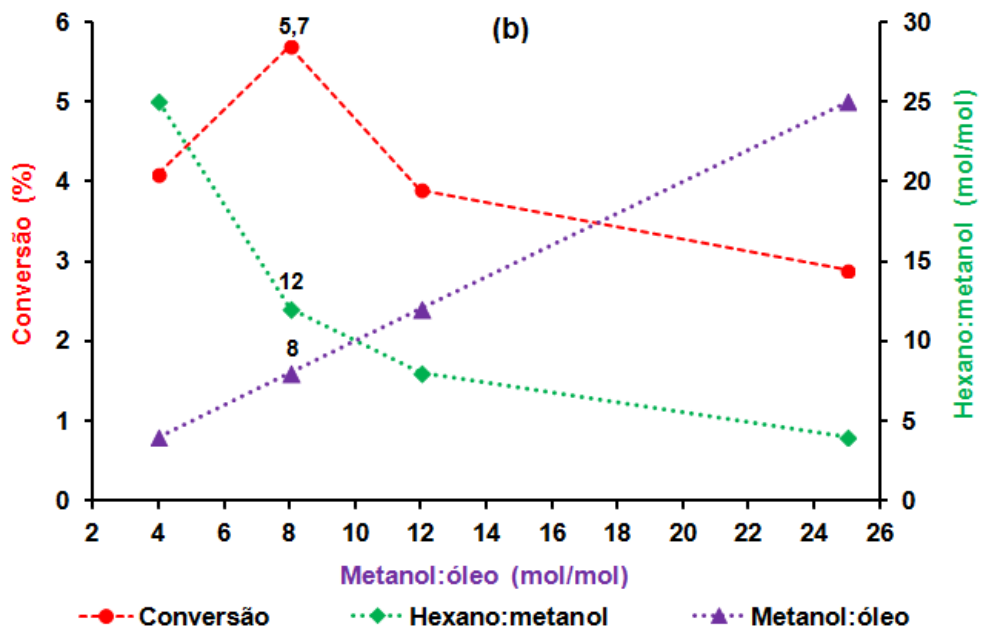
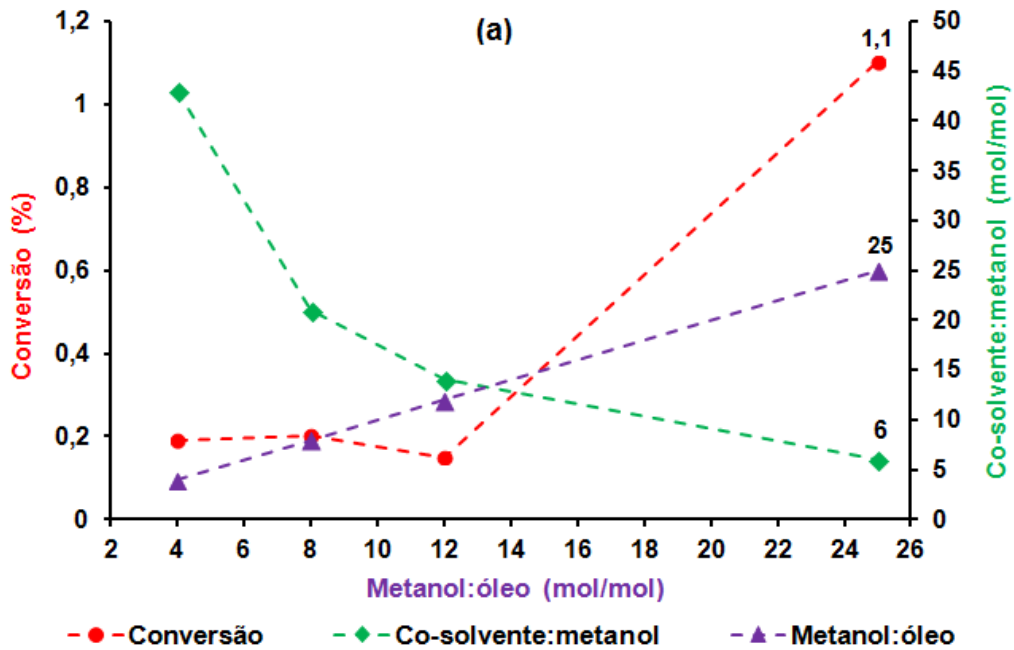


Figura 5.13. Efeito do sincronismo entre as razões molares: (a) metanol:óleo versus co-solvente acetonitrila/t-butanol: metanol e (b) metanol:óleo versus hexano:metanol na conversão do substrato (óleo) presente no farelo de arroz em biodiesel. Temperatura de 35°C, tempo de reação de 24 h, agitação mecânica de 180 rpm e o metanol adicionado em duas etapas (0 e 12 h).

Os resultados demonstrados na Figura 5.13 (b) estão em acordo com Laane *et al.* (1987), Fu e Vasudevan (2009) e Gagnon e Vasudevan, (2011) e Villeneuve (2007), os quais identificaram que os solventes orgânicos hidrofóbicos com $\log P > 3$, têm uma correlação positiva com a atividade enzimática. Estabelecendo assim, que estes solventes são incapazes de retirar água associada à enzima, mantendo-a com a hidratação necessária para a máxima atividade enzimática. O hexano com $\log P = 3,5$ é o mais adequado para este tipo de catálise pois o hexano, juntamente com o metanol, acilglicerois e AGL formam simultaneamente o meio reacional o que limita a concentração de metanol em torno da enzima, evitando a retirada de água de solvatação e hidratação da mesma, ao mesmo tempo que possibilita o aumento da solubilidade do metanol no óleo e proporcionando maior contato do substrato com o sítio ativo da *lipase*.

Outro aspecto a ser considerado neste estudo é a dificuldade na difusão do hexano, do metanol, dos acilglicerois e AGL até a superfície da *lipase* onde se encontra o sítio ativo, devido a presença de materiais sólidos e outras substâncias químicas presentes no farelo de arroz. Para a produção de biodiesel, os processos de refino de óleo tem um papel importante na conversão em ésteres. As impurezas no óleo, tais como, extremos na quantidade de água, fosfoglicerídeos, pigmentos, podem afetar a conversão dos acilglicerois e AGL em ésteres devido a emulsificação, das misturas de reações e as dificuldades na separação do biodiesel do subproduto, entre outros, assim como o próprio metanol de ser consumido por outras moléculas contidas neste meio, como mencionado por Ribeiro *et al.* (2011).

5.12. Efeito do metóxido de potássio na síntese do biodiesel do óleo presente no farelo de arroz em ésteres

Na catálise enzimática o efeito do pH exerce outro fator importante na otimização do processo. Aizono *et al.* (1973) constataram que a máxima atividade relativa percentual da *lipase* foi quando o pH permaneceu entre 7,5 e 8. Na tentativa de alcançar este pH adequado item 4.3.2, foram adicionados soluções de MeOK em metanol de 1, 1,5 e 2%. A Figura 5.14 (a) mostra o pH do meio reacional em função do tempos, antes e depois de adicionar o MeOK. O pH antes de ser adicionado o

MeOK era em média de 5,1. Ao ser adicionado o MeOK, o pH medido nos tempos 0, 12 e 24 foram em média 6,4, 7,0 e 7,7, respectivamente. Com exceção do meio reacional em que o pH passou a 6,4, os demais atingiram ao valor adequado dentro da faixa de pH citada por Aizono *et al.* (1973).

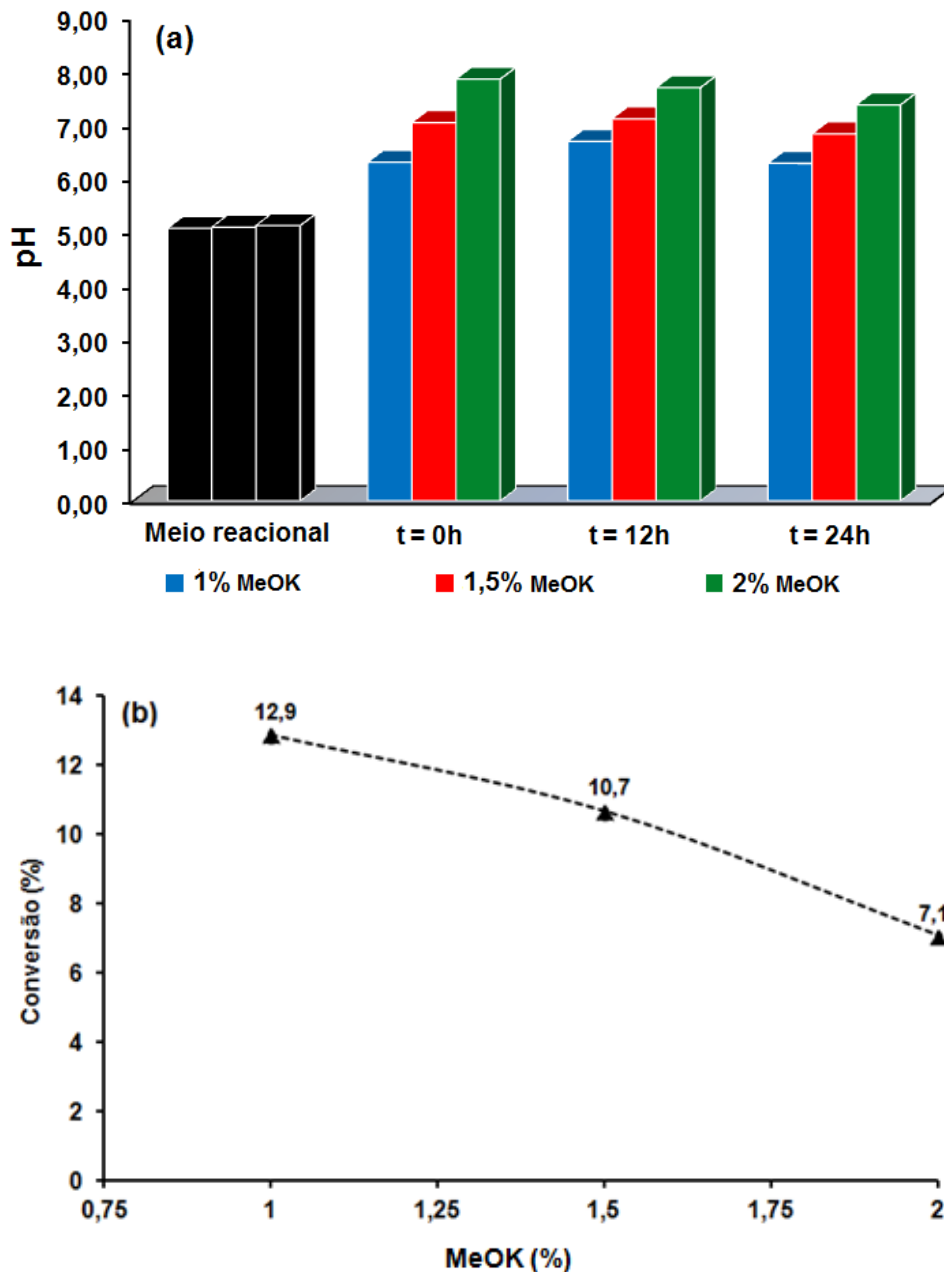


Figura 5.14. Influência do MeOK: (a) pH do meio reacional medido antes e 0, 12 e 24 h e (b) conversão do substrato (óleo) presente no farelo de arroz em biodiesel. Razão molar 8:1 metanol:óleo, 12:1 hexano:metanol, KOH (1, 1,5 e 2% m/m). Temperatura de 35°C, tempo de reação de 24 h, agitação mecânica de 180 rpm e as respectivas soluções de MeOK foram adicionadas em duas etapas (0 e 12 h) conforme o item 4.3.2.

No entanto, essa adequação no pH das soluções refletiu-se positivamente somente para a reação que recebeu 1% de MeOK, o que foi traduzido em um de 2,2 vezes mais ésteres metílicos, alcançando 12,9% de conversão em ésteres. Aumentando o MeOK adicionado ao meio reacional, houve uma redução nos percentuais de conversão para 10,7 e 7,1%, mas relevantes quando comparados com 5,7%, como demonstrado na Figura 5.14 (b). Este fato pode estar relacionado a presença de outros íons metálicos no farelo de arroz e também, por boa parte do KOH ter sido consumido pelos AGL gerando sabão conforme relatado por Sherbiny *et al.* (2010).

Íons metálicos desempenham importante papel na estrutura e função das *lipases* como descrito na literatura por Mendes *et al.* (2012), Ma *et al.* (2006), Ghori *et al.* (2011), Zhou *et al.* (2012), Uttatree *et al.* (2010), Zheng *et al.* (2011) e Mumhi *et al.* (1993). A explicação para o aumento ou redução (Figura 5.13 (b)) dos percentuais de conversão obtidos neste experimento, está baseado nos resultados obtidos no item 5.6, Tabela 5.3, onde foram mostrados os elementos metálicos que podem atuar na estrutura e/ou no sítio ativo da *lipase*, dependendo da concentração em que estão no meio reacional. A literatura citada acima revela que a atividade da *lipase*, em geral, é drasticamente inibida por metais pesados como o íons Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e ligeiramente inibida por íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ . Outro trabalho mostra que o íons Ca^{2+} e K^+ podem contribuir e/ou inibir a atividade enzimática, como publicado por Zhou *et al.* (2012) ao variar as concentrações do íon K^+ em catálise enzimática utilizando *lipase*.

5.13. Efeito do metóxido de potássio na síntese do biodiesel do óleo bruto extraído do farelo de arroz em ésteres

A síntese do biodiesel do óleo bruto extraído do farelo de arroz (Figura 5.15) torna o processo mais econômico devido a não necessidade de purificação desta matéria-prima. Assim como, por utilizar o próprio hexano, solvente de extração do óleo, posteriormente como solvente para a catálise enzimática. Os resultados foram obtidos nas seguintes condições reacionais: razão molar hexano:metanol de 3:1 (melhor condição descrita nos trabalhos de Nelson *et al.* (1996) e Shimada *et al.*

(1999), metanol:óleo de 3:1 e 5% (m/m) de *lipase Porcine pancreatic*, 180rpm de agitação mecânica e temperatura de 35°C (melhor condição descrita no trabalho de Ebrahimi *et al.* (2012)). Nessas condições os resultados mostraram que a síntese sem a adição de MeOK, levou a uma conversão de 72,1% em ésteres. Ao adicionar 1% de MeOK, a conversão passou para 73,8% indicando que o íon K^+ não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade enzimática. Aumentando a percentual de MeOK para 1,5 e 2%, houve uma redução na conversão em ésteres para 68,3%. O que pode ser traduzido como uma pequena influência negativa deste íon na atividade enzimática como relatado por Uttatree *et al.* (2010) e Zhou *et al.* (2012).

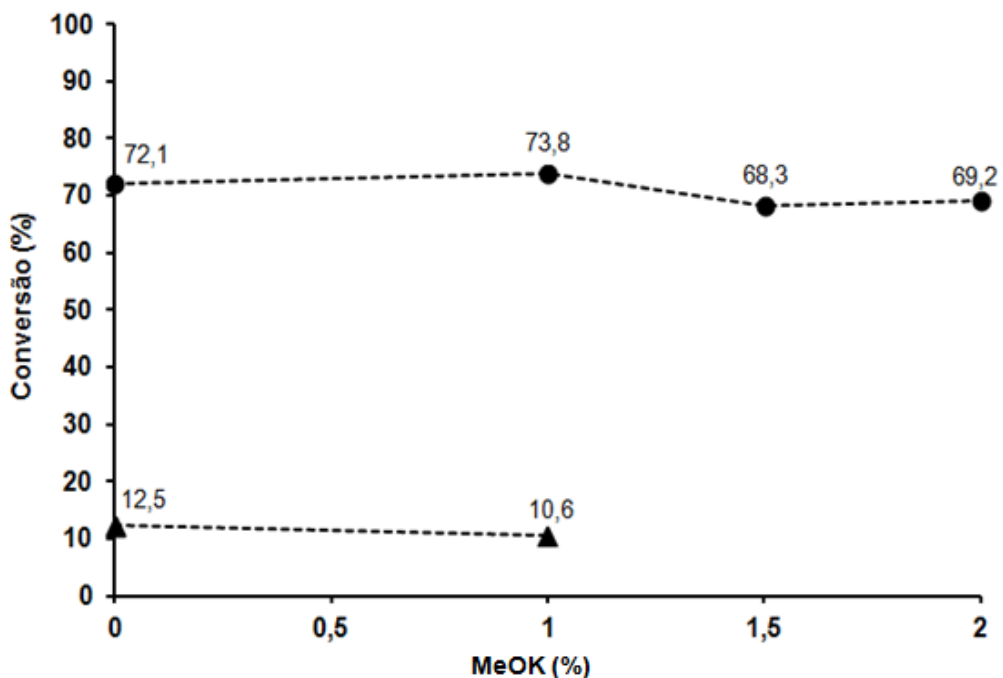


Figura 5.15. Efeito do percentual do MeOK na catálise enzimativa no óleo bruto do farelo de arroz: (●) razão molar 3:1 metanol:óleo, 3:1, hexano:metanol, KOH (0, 1, 1,5 e 2% m/m). (▲) razão molar 8:1 metanol:óleo, 12:1 hexano:metanol, KOH (0 e 1% m/m). Para ambas as sínteses a *lipase Porcine pancreas* 5% (m/m), 35°C, 24 h e 180 rpm. As respectivas soluções de MeOK foram adicionadas em duas etapas conforme item 4.3.2.

O balanço adequado dos parâmetros: razões molares álcool:óleo e solvente:álcool, tipo de solvente e pH é de fundamental importância na catálise enzimática como já relatado por Fu e Vasudevan (2009); Gagnon e Vasudevan, (2011); Villeneuve (2007); Ebrahimi *et al.* (2012), entretanto, estes pesquisadores partem de óleos refinados como matéria-prima e neste trabalho é avaliado o uso do

óleo bruto extraído do farelo de arroz. Ao compararmos os sistemas quando as razões molares foram de 8:1 para metanol:óleo e 12:1 para hexano:metanol, sem MeOK (12,5%) e com 1% (10,6%), constatou-se que houve uma redução drástica nas conversões de ésteres comparadas ao sistema anterior (\approx 84%), confirmando que a relação solvente, metanol e substrato não foi adequada, e que a presença do íon K^+ não influenciou sobre a catálise enzimática. O que reforça a idéia da relação de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade descrita por Araújo *et al.* (2010) entre o meio reacional e a superfície da enzima globular.

Outro aspecto a ser levado em consideração para explicar o fato de que os melhores resultados de conversão em ésteres metílicos obtidos até o momento ainda necessitam ser otimizados é que a presença dos ácidos fosfatídicos (fosfolipídios), em média de 5,5 a 6,7% (m/m) no farelo de arroz, assim como no óleo bruto extraído (Yoshida *et al.*, 2011; Suzuki (2011) *apud* Takomo, 1993). Segundo os resultados de Lai *et al.* (2005), ao ser adicionado 2% de fosfolipídios ao óleo de soja refinado, houve uma redução substancial na ordem de 10% na conversão dos ésteres metílicos sintetizados. Ao realizarem a catálise enzimática com o óleo de arroz bruto, Lai *et al.* (2005) obteve o máximo de conversão de 65%. Atribuindo a presença dos fosfolipídios e outros componentes desconhecidos presentes no óleo bruto do farelo de arroz, os quais foram responsáveis pela perda de atividade de *lipase* utilizada em questão. Ao compararmos este trabalho com o referido, houve um aumento de 12% na conversão em ésteres metílicos, demonstrando uma melhoria no método aplicado.

6. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho, cujo objetivo foi avaliar o uso do farelo de arroz bruto e/ou o óleo bruto extraído desta matéria-prima para a catálise enzimática na produção de biodiesel, foi imprescindível a caracterização qualitativa e quantitativa do farelo de arroz, onde se constatou que:

- O grão de arroz é constituído de casca (20,9%), endosperma e farelo de arroz (76,3%) e germe e/ou embrião de 2,8%. Somente o farelo de arroz corresponde a aproximadamente 7%, formado de fragmentos de endosperma, casca e majoritariamente de farelo e embrião.

- O farelo de arroz contém em média 10,5% de umidade e 25% de óleo, assim como, elementos-traço de metais como o Cd, Co (na faixa de 0,31 a 0,65 ppm), Cu, Mn, Zn, Fe (na faixa de 10,80 a 86,47 ppm), Na, Ca, K e Mg na faixa de 446,47 a 5773,5 ppm).

- A hidrólise dos triglicerídeos pela enzima *lipase*, gerando AGL mesmo durante o polimento do grão de arroz foi de 6,8%, chegando a 47% após dez semanas de armazenamento a temperatura de 35°C. A constante cinética foi, em média, de $1,41 \times 10^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e a taxa em que os AGL foram formados foi em média de 0,7% AGL.dia⁻¹.

Após a caracterização do farelo de arroz, as variáveis como o teor de óleo, o teor de umidade e elementos-traço de metais foram consideradas variáveis fixas, devido à natureza da matéria-prima, na transformação do óleo bruto (acilglicerois e AGL), através das reações de transesterificação e/ou esterificação, em ésteres metílicos através da catálise enzimática, concluiu-se que:

- Na catálise enzimática utilizando o farelo de arroz bruto, as melhores razões molares foram de 8:1 de metanol:óleo e 12:1 de hexano:metanol em 24 h de reação alcançando 5,7% em ésteres metílicos. Estas relações molares mostraram-se necessárias, pois os resultados confirmaram que a *lipase* presente no farelo é

suscetível a elevadas concentrações de metanol, sendo indispensável à utilização de um solvente orgânico hidrofóbico com $\log P > 3$. Nas mesmas condições reacionais com o co-solvente composto de 40% de acetonitrila e 60% de *t*-butanol, a máxima conversão alcançada foi de apenas 1,1% em ésteres metílicos.

- O MeOK (1%) adicionado ao meio reacional para o farelo de arroz bruto, proporcionou um aumento na conversão de 2,2 vezes (12,9%) em ésteres metílicos. As concentrações de 1,5 e 2% de MeOK ao meio reacional adequaram o pH, como referido por Aizono *et al.*, (1973), entretanto, isto não refletiu no aumento na conversão em ésteres metílicos, mas a redução 10,7% e 7,1%, respectivamente.

- A síntese do biodiesel a partir do óleo bruto extraído do farelo de arroz, nas razões molares de 3:1 de metanol:óleo e 3:1 de hexano:metanol e sem a adição de MeOK, levou a 72,1% de conversão em ésteres metílicos. Entretanto, não se constatou influência na catálise enzimática com a adição de 1, 1,5 e 2% de MeOK ao meio reacional, pois os resultados foram reduzidos em média para 70,4% em ésteres metílicos.

- A síntese do biodiesel a partir do óleo bruto extraído do farelo de arroz, com o mesmo sistema de reações com a *lipase Porcine pancreas* 5% m/m (*lipase*/óleo) nas razões molares de 8:1 de metanol:óleo e 12:1 de hexano:metanol, reduziram em média a conversão em ésteres metílicos para 11,5%, reduzindo drasticamente em 6,3 vezes a conversão em ésteres metílicos, quando comparados os resultados do sistema anterior com ou sem a adição de MeOK. Isto ratificou que mesmo utilizando o metanol e hexano, mas com inadequadas relações molares, ocasionaram inibição atividade enzimática da *lipase Porcine pancreas*.

Face aos resultados apresentados neste trabalho conclui-se que, o farelo de arroz pode ser utilizado como matéria-prima na produção de biodiesel e com a realização de mais estudos e o aperfeiçoamento dos métodos de produção de biodiesel será possível obter conversão em ésteres metílicos superiores aos demonstrados neste trabalho. Ademais, o farelo de arroz torna-se uma importante matéria-prima com enorme potencial para a produção de biodiesel, por conter um

biocatalisador, a enzima *lipase* e o óleo, ambos componentes necessários para a realização dessa síntese enzimática, o que irá reduzir os custos de produção, uma vez que somente o óleo é responsável por 70 a 88% do preço final na produção de biodiesel (Dabdoub *et al.*, 2009).

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando que o farelo de arroz tem potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel e através dos resultados apresentados neste trabalho e o conhecimento adquirido, torna-se necessário a realização de trabalhos futuros para investigar outros aspectos, dos quais se destacam:

- Extração e purificação da *lipase* do farelo de arroz;

- Realizar a catálise enzimática do farelo de arroz para estudar a influência de outros parâmetros reacionais como: temperatura, pH, umidade, tempo de reação, álcool e íons metálicos;

- Para a síntese do biodiesel do óleo bruto extraído do farelo de arroz, estudar a influência dos mesmos parâmetros reacionais, como também, a presença dos fosfolipídios no meio reacional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aehle, W.; Perham, R. N.; Michal, G.; Cadow, A. J.; Concoby, B. Enzymes, 1. General. ***Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry***, p. 573-611, 2008.

Aguiar, A. C.; Cottica, S. M.; Boroski, M.; Oliveira, C. C.; Bonafé, E. G.; França, P. B.; Souza, N. E. Visentainer, J. V. Quantification of Essential Fatty Acids in the Heads of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed with Linseed Oil. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, vol. 22, p. 643-647, 2011.

Aizono, Y.; Funatsu, M.; Sugano, M.; Hayashi, K.; Fujiki, Y. Enzymatic Properties of Rice Bran Lipase. ***Agricultural and Biological Chemistry***, v. 37, p. 2031-2036, 1973.

Aizono, Y.; Funatsu, M.; Sugano, M.; Hayashi, K.; Inamasu M.; Yamagu, M. Biochemical Studies on Rice Bran Lipase Part II. Chemical Properties. ***Agricultural and Biological Chemistry***, v. 37, p. 1973-1979, 1971.

Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, RS, Ed. Artmed, 1999.

Alvarez-Macarie, E.; Augier-Magro; Guzzo, J.; Baratti, J. Molecular characterization of gene encoding in esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. ***Biotechnology Letters***, v. 21, p. 313-319, 1999.

Al-Zuhair, S.; Ling, F. W.; Jun, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 951-960, 2007.

Amarasinghe, B. M. W. P. K.; Gangodavilage, N. C. Rice Bran Oil Extraction in Sri Lanka data for Process Equipment Design. *Food and Bioproducts Processing*, v. 82, p. 54-59, 2004.

Amissah, J. G. N.; Ellis, W. O.; Oduro, I.; Manful, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, v. 14, p. 21-24, 2003.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>> Acesso em agosto 2013.

Antczak, M. S.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, de 1999. Regulamento Técnico, nº196-E, **Brasília: Diário Oficial da União**. <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm> Acesso em agosto 2012.

AOCS - American Oil Chemists` Society, Official Methods and Recommended Practices of the, 5th ed., Moisture and Volatile Matter - Bc 2-49, edited by D. Firestone, AOCS Press, Champaign, IL, 1997.

AOCS, Official methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Cd 3d – 63, 5ª ed. Champaign, 1995.

Araújo, E. A.; Andrade, N. J.; Carvalho, A. F.; Ramos, A. M.; Silva, C. A. S.; Silva, L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Química Nova*, v. 33, p. 1940-1948, 2010.

Araújo, E. G.; Fernandes, N. S. Determinação da umidade em farinha de trigo utilizando o método clássico de análise e a termogravimetria. <http://annq.org/congresso2007/trabalhos_apresentados/T78.pdf> Acesso em maio 2013.

Arpigny, J. L.; Jaeger, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, v. 343, p. 177-183, 1999.

ASTM - American Society for Testing and Materials - Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils. Designation: D422-63, 2007.

ASTM - American Society for Testing and Materials Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides, Total Diglycerides, Total Triglycerides, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography. Designation: D6584-10a, 2011.

Augusto, F.; Valente, A. L. P.; Riedo, C. R. F. **Cromatografia a Gás: Curso em Diapositivos.** <www.chemkeys.com> Acesso em: abril de 2013.

Bartosiewicz, L e Mencik, Z. Etchinh technique to reveal supermolecular struture of crystalline polymers. *Journal of Polymer Science Polymer Physics Edition*, v. 12, p. 1163, 1974.

Bendini, A., Cerretani, L., Di virgilio, F., Belloni, P., Bonoli-Carbognin, M., Lercker, G. Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality*, v. 30, p. 424-437, 2007.

Bhardwaj, K.; Raju, A.; Rajasekharan, R. Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family1. *Plant Physiology*, v. 127, p. 1728-1738, 2001.

Castilho, A. E. W.; Santos, H. F.; Miranda, A. M.; Jorio, A.; Ferreira, E. H. M.; Achete, C. A.; Armond, R. A. S. Z.; Anconi, C. P. A.; Almeida, W. B. Estudo teórico e experimental de espectros infravermelho de ésteres de ácido graxo presentes na composição do biodiesel de soja. **Química Nova**, v, 35, p. 1752-1757, 2012.

Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

Cheng, C. W.; Abdulla, R.; Sridhar, R. R.; Ravindra, P. Determination of External Mass Transfer Model for Hydrolysis of Jatropha Oil Using Immobilized Lipase in Recirculated Packed-Bed Reactor. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 1, p. 289-298, 2011.

Chi, E. Y.; Krishnan, S. Randolph, T. W.; Carpenter, J. F. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1325-1335, 2003.

Chong, F. C.; Tey, B. T.; Dom, Z. M.; Cheong, K. H.; Satiawihardja, B.; Ibrahim, M. N.; Rahman, R. A.; Biak, D. R. A.; Ling, T. C. Rice Bran Lipase Catalysed Esterification of Palm Oil Fatty Acid Distillate and Glycerol in Organic Solvent. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 250-256, 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra brasileira: grãos, nono Levantamento**. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_09_11_56_07_boletim_2_mai_2013.pdf> Acesso em: maio de 2013.

Dabdoub, M. J.; Bronzel, J. L.; Rampin, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.

Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado. Microscopia eletrônica de varredura. Aplicações e preparação de amostras. Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. EDIPUCRS: 2007, <

<http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia/microscopia.pdf>> Acesso em: junho de 2013.

Dossat, V.; Combes, D.; Marty, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packet bed reactor: influence of the glycerol production. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 25, p. 194-200, 1999.

Ebrahimi, S.; Amini, G.; Younesi, H.; Najafpour, G. D. Production of biodiesel using soybean oil catalyzed by porcine pancreas lipase in a solvent free system. ***Middle-East Journal of Scientific Research***, v.11, p. 1323-1327, 2012.

Eijsink, V. G. H.; Bjork, A.; Gaseidnes, S.; Sirevag, R.; Synstad, B.; van den Burg, B.; Vriend, G. Rational engineering of enzyme stability. ***Journal of Biotechnology***, v. 30, p. 105-120, 2004.

EN 14103 - Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents, ***European Committee for Standardization***, 2001.

Faccini, S. C. Uso de adsorventes na purificação de biodiesel de óleo de soja. Porto Alegre: UFRGS, 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - ***Rice Market Monitor***, v. XVI - Issue No. 3 <<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>>. Acesso em agosto 2013.

Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 45, p. 405-418, 2009.

Fjerbaek, L.; Christensen, K. V.; Norddahl, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 102, p. 1298-1314, 2009.

Fu, B e Vasudevan, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 4105-4111, 2009.

Furlan, P. Y.; Wetzel, P.; Johnson, S.; Wedin, J.; Och, A. Investigating the Oxidation of Biodiesel From Used Vegetable Oil by FTIR Spectroscopy: Used Vegetable Oil Biodiesel Oxidation Study by FTIR. **Spectroscopy Letters**, v.43, p.580-585, 2010.

Gagnon, M. D. e Vasudevan, P. T. Effects of Solvent and Enzyme Source on Transesterification Activity. **Energy Fuels**, v. 25, p. 4669-4674, 2011.

Ghamgui, H.; Karra-Chaabouni, M.; Gargouri, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 355-363, 2004.

Ghori, M. I.; Iqbal, M. J.; Hameed, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. Brazilian **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 22-29, 2011.

Goes, T.; Araújo, M.; Marra, R. **Biodiesel e sua Sustentabilidade**. <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010/Trabalho_biodiesel_11_de_janeiro_de_2010-versao_final.pdf> Acesso em: junho de 2013.

Guarieiro, L. L. N.; Pinto, A. C.; Aguiar, P. F.; Ribeiro, N. M. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 31, p. 421-426, 2008.

Guimarães, C. M.; Fageria, N. K.; Filho, M. P. B. Como a planta de arroz se desenvolve.http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Encarte+99_000h320ycjw02wx7ha06keamm1n762mw.pdf> Acesso em: maio de 2013.

Halim, S. F. A e Kamaruddin, A. H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1436-1439, 2008.

Hernandez-Martin, E e Otero, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL-IM. *Bioresour Technol*, v. 99, p. 277-286, 2008.

Hilhorst, R.; Spruijt, R.; Laane, C.; Veeger, C. Rules for the regulation of enzyme activity in reserved micelles as illustrated by the conversion of apolar steroids by 20 B-hydroxysteroid dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, v. 144, p. 459-466, 1984.

Holink, A. S.; Kambour, R. P.; Fink, D. G.; Hobbs, .Y. *Microstructural science*, v. 7, 1979.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, edição IV, 1º Edição Digital, São Paulo, 2008.

IEA - Agência Internacional de Energia. **IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery** <www.biorefinery.nl/fileadmin/biorefinery/docs/Brochure_Totaal_definitief_HR_opt.pdf> Acesso em agosto 2012.

Jaeger, K. E e Reetz, M. T. Microbial lipases form versatile tools for Biotechnology. *TIBTECH*, v. 16, p 396-403, 1998.

Jeong, T.; Park, D. H. Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil for Biodiesel Production with tert-Butanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 148, p. 131-139, 2008.

Jong, E. e van Ree, R. **Biorefineries: adding value to the sustainable utilisation of biomass**. <www.ieabioenergy.com/LibIten.aspx?id=6420> Acesso em agosto 2012.

Ju, Y. H. e Vali, S. R. Rice bran oil as a potential resource for biodiesel: A review. ***Journal of Scientific & Industrial Research***, v. 64, p. 866-882, 2005.

Karshikoff, A. **Non-Covalent Interactions In Proteins**. <<http://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/p477>> Acesso em julho de 2012.

Kirk, O.; Damhus, T.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C.; Olsen, H. S.; Hansen, T. T.; Lund, H.; Schiff, H. E.; Nielsen, L. K. **Enzyme Applications, Industrial**.<<http://onlinelibrary.wiley.com/advanced/search/results>> Acesso em agosto 2012.

Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 30, p. 81-87, 1987.

Lai, C. C.; Zullaikah, S.; Vali, S. R.; Ju, Y. H. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, v. 80, p. 331-337, 2005.

Lerma-García, M. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M.; Simó-Alfonso, E. F. Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. ***Food Chemistry***, v. 118, p. 78-83, 2010.

Li, A.; Ngo, T. P. N.; Yan, J.; Tian, K.; Li, Z. Whole-cell based solvent-free system for one-pot production of biodiesel from waste grease. ***Bioresource Technology***, v. 114, p. 725-729, 2012.

Li, L.; Du, W.; Liu, D.; Wang, L.; Li, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction médium. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 43, p. 58-62, 2006.

Li, Q.; Zheng, J.; Yan, Y. Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent. ***Fuel Processing Technology***, v. 91, p. 1229-1234, 2010.

Lin, L.; Ying, D.; Chaitep, S.; Vittayapadung, S. Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. ***Applied Energy***, v. 86, p. 681-688, 2009.

Liu, Y.; Xin, H. L.; Yan, Y. J. Physicochemical properties of stillingia oil: Feasibility for biodiesel production by enzyme transesterification. ***Industrial Crops and Products***, v. 30, p. 431-436, 2009.

Liu, Z.; Chi, Z.; Jing Li, L. W. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 40, 445-451, 2008.

Lôbo, I. P.; Ferreira, S L F.; Cruz, R. S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. ***Química Nova***, v. 32, p. 1596-1608, 2009.

Ma, J.; Zhang, Z.; Wang, B.; Kong, X.; Wang, Y.; Cao, S.; Feng, Y. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. ***Protein Expression and Purification***, v. 45, p. 22-29, 2006.

Manahan, S. E. Toxicological Chemistry and Biochemistry. <
http://verum.pucrs.br/F/DR1JRKHE4J57VGJEX7LTSVB1INRL5MIB34IQTEFHAPU3KYJTYS-37660?func=full-set-set&set_number=003887&set_entry=000004&format=999> Acesso em julho 2012.

Matthews, B. W. Hydrophobic Interactions in Proteins. ***Encyclopedia of Life Sciences***, p. 1-6, 2001.

Marques, M. V.; Naciuk, F. F.; Mello, A. M. S.; Seibel, N. M.; Fontoura, L. A. M. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. ***Química Nova***, v. 33, p. 978-980, 2010.

Marques, M. V.; Silva, C. F. G.; Naciuk, F. F.; Fontoura, L. A. M. **A Química do Biodiesel** <<http://www.ulbra.br/extensao/curso.php?id=402> > Acesso em maio 2013.

Matthews, B. W. Hydrophobic Interactions in Proteins. ***Encyclopedia of Life Sciences***, p. 1-6, 2001.

Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 78, p. 119-134, 2012.

Messaoudi, A.; Belguith, H.; Gram, I.; Hamida, J. B. Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. ***African Journal of Biotechnology***, v. 9, p. 8243-8247, 2010.

Mirghani, M. A.; Kabbashi, N. A.; Alam, M. .; Qudsieh, I. Y.; Alkatib, M. F. R. Rapid Method for the Determination of Moisture Content in Biodiesel Using FTIR Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 88, p. 1897-1904, 2011.

MME - Ministério de Minas e Energia, **boletim mensal dos combustíveis renováveis**, n^o 63 abril/2013 <http://www.aprobio.com.br/boletim_dcr063_abril_2013.pdf> acesso em: junho de 2013.

Monhemi, H.; Housaindokht, M. R.; Bozorgmehr, M. R.; Googheri, M. S. S. Enzyme is stabilized by a protection layer of ionic liquids in supercritical CO₂: Insights from molecular dynamic simulation. ***Journal of Supercritical Fluids***, v. 69, p. 1-7, 2012.

Montanher, S. F.; Oliveira, E. A.; Rollemberg, M. C. Removal of metal ions from aqueous solutions by sorption onto rice bran. ***Journal of Hazardous Materials***, v. 117, p. 207-211, 2005.

Mumhi, S. K.; Bhatia, N.; Sekhod, B. S.; Sukhija, P. S. Inactivation of Rice Bran Lipase with Metal Ions. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, v. 57, p. 69-174, 1993.

Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; Ramachandran, V. N.; Ward, O. P.; Nigam, P. Understanding lipase stereoselectivity. ***World Journal of Microbiology & Biotechnology***, v. 18, p. 81-97, 2002.

Nelson, L. A.; Foglia, T. A.; Marmer, W. N. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel, ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 73, p. 1191-1195, 1996.

Noureddini, H.; Gao, X.; Philkana, R.S. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. ***Bioresour Technol***, v. 96, p. 769-777, 2005.

Oliveira, E. A. Dissertação de mestrado: Biomassas vegetais como materiais sorventes: utilização do farelo de arroz na remoção de íons metálicos em soluções aquosas. **Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá**, Maringá, Brasil, 2002.

Orthofer, F. T. Rice Bran Oil.
<http://uqu.edu.sa/files2/tiny_mce/plugins/filemanager/files/4281709/84607_25.pdf>.
Acesso em: janeiro de 2013.

Ouachab, N e Tsoutsos, T. Study of the acid pretreatment and biodiesel production from olive pomace oil. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***. DOI: 10.1002/jctb.3940.

Ozgul-Yucel, S. and Proctor, A. Rice bran FFA determination by diffuse reflectance IR Spectroscopy. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 81, p. 221-224, 2004.

Pace, C. K.; Fu, H.; Fryar, K. L.; Landua, J.; Trevino, S. R.; Shirley, B. A.; Hendricks, M. M.; Limura, S.; Gajiwala, K.; Scholtz, J. M.; Grimsley, G. R. Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability. ***Journal of Molecular Biology***, v. 408, p. 514-528, 2011.

Parida, K. M. e Mallick, S. Silicotungstic acid supported zirconia: An effective catalyst for esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 275, p. 77-83, 2007.

Paucar-Menacho, L. M.; Silva, L. H.; Santana, A. S.; Gonçalves, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanol. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, p. 45-53, 2007.

Pilarek, M. e Szewczyk, K. W. Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *Journal of Biotechnology*, v. 127, p. 736-744, 2007.

Pires, A. A energia além do petróleo. <<http://exame.abril.com.br/revista-exame/edicoes/0830/noticias/a-energia-alem-do-petroleo-m0050255>> Acesso em: agosto de 2012.

Pires, V. T.; Dissertação de Mestrado: Implantação Do Controle Estatístico De Processos Em Uma Empresa De Manufatura De Óleo De Arroz. **Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De Produção Da Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul**, Porto alegre, 2000.

Pourali, O.; Asghari, F. S.; Yoshida, H. Simultaneous rice bran oil stabilization and extraction using sub-critical water médium. *Journal of Food Engineering*, v. 95, p. 510-516, 2009.

Prados, C. P.; Rezende, D. R.; Batista, L. R.; Alves, M. I. R, Filho, N. R. A. Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. *Fuel*, v. 96, p. 476-481, 2012.

Quintella, C. M.; Teixeira, L. S. G.; Korn, M. G. A.; Neto, P. R. C.; Torres, E. A.; Castro, M. P.; Jesus, C. A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão

geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v. 32, p. 793-808, 2009.

Raghavendra, M. P.; Kumar, P. R.; Prakash, V. Inhibition of lipase from rice (*Oryza sativa*) by diethyl-p-nitrophenyl phosphate. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 277-285, 2008.

Randall, J. M.; Sayre, R. N.; Shultz, W. G.; Fong, R. Y.; Mossman, A. P. Rice bran stabilition by extrusion cooking for extraction of edible oil. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 361-365. 1985.

Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 237-250, 2009.

Ribani, M.; Carla Beatriz Grespan Bottoli, Carol H. Collins e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, Lúcio Flávio Costa Melo. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

Ribeiro, B. D.; Castro, A. M.; Coelho, M. A. Z.; Freire, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research**, p. 1-16, 2011.

Rodrigues, R., C.; Volpato, V.; Wada, K.; Ayub, M. A. Z. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 925-930, 2008.

Rohman, A. e Man, Y. B. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research international**, v. 43, p. 886-892, 2010.

Rosell, C. M. e Marco, C. Rice <<http://pt.scribd.com/doc/60603286/Rice>>. Acesso em julho 2012.

Rukunudin, I. H.; White, P. J.; Bern, C. J.; Bailey, T. B. A Modified Method for Determining Free Fatty Acids from Small Soybean Oil Sample Sizes. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, vol. 75, p. 563-568, 1998.

Sauders, R. M. The properties of rice bran as a foodstuff. ***Cereal Foods World***, v. 35, p. 632-636, 1990.

Sawant, S. B.; Prabhu, A. V.; Tambe, S. P.; Gandhi, N. N.; Joshi, J. B. Rice Bran Lipase: Extraction, Activity, and Stability. ***Biotechnology Progress***. v. 15, p. 1083-1089, 1999.

Schmid, R.; D. e Verger, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. ***Angewandte Chemie International Edition***, v. 37, p. 1608-1633, 1998.

Sherbiny, S. A. E; Refaat, A. A.; Sheltawy, S. T. E. Production of biodiesel using the microwave technique. ***Journal of Advanced Research***, v.1, p. 309-314, 2010.

Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Samukawa, T.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H.; Tominaga, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 76, p. 789-793, 1999.

Schuchardt, U.; Serchelia, S.; Vargas, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, v. 9, p. 199-210, 1998.

Silva, C. L. M.; Dissertação de Mestrado: Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol **Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Departamento de Química Inorgânica**. Campinas, Brasil, 2005.

Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 7 ed. Editora LTC, Rio de Janeiro, 2007.

Sivaramakrishnan, R.; Muthukumar, K. Isolation of Thermo-stable and Solvent-Tolerant *Bacillus* sp. Lipase for the Production of Biodiesel. ***Appl Biochem Biotechnol***, v. 166, p.1095-1111, 2012.

Solomon, B. D. Biofuels and sustainability. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, v. 1185, p. 119-134, 2010.

SOSBAI - Sociedade Sul-brasileira de Arroz Irrigado. **Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Bento Gonçalves: SOSBAI, p. 8, 2010.

Soumanou, M. M.; Bornscheuer, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 33, p. 97-103, 2003.

Sransky, K.; Zarevucka, M.; Kejik, Z.; Wimmera, Z.; Mackova, M.; Demnerova, K. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 34, p. 209–216, 2007.

Suarez, P. A. Z.; Meneghetti, S. M. P.; Meneghetti, M. R.; Wolf, C. R. Transformação de Triglicerídeos em Combustíveis, Materiais Poliméricos e Insumos Químicos: Algumas Aplicações da Catálise na Oleoquímica. ***Química Nova***, v. 30, p. 667-676, 2007.

Suarez, P. A. Z.; Santos, A. L. F.; Rodrigues, J. P.; Alves, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. ***Química Nova***, v. 32, p. 768-775, 2009.

Suzuki, Y. Isolation and Characterization of a Rice (*Oryza sativa* L.) Mutant Deficient in Seed Phospholipase D, an Enzyme Involved in the Degradation of Oil-Body Membranes. ***Crop Science***, v. 51, p. 567-573, 2011.

Takano, K. Advances in cereal chemistry and technology in Japan. ***Cereal Foods World***, v. 38, p. 695-698, 1993.

TFE - The future of energy, The end of the Oil Age.
<<http://www.economist.com/node/2155717>> Acesso em: julho de 2012.

Tongboriboon, K.; Cheirsilp, B.; H-Kittikun, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 67, p. 52-59, 2010.

Triantafyllou, A. O.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. How Do Additives Affect Enzyme Activity and Stability in Nonaqueous Media? ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 54, p. 67-76, 1997.

Uttatree, S.; Winayanuwattikun, P.; Charoenpanich, J. Isolation and Characterization of a Novel Thermophilic-Organic Solvent Stable Lipase From *Acinetobacter baylyi*. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 162, p. 1362-1376, 2010.

Vichi, F. M. e Mansor, M. T. C. Energia, meio ambiente e economia: o Brasil no contexto mundial. ***Química Nova***, v. 32, p. 757-767, 2009.

Villeneuve, P. Lipases in lipophilization reactions. ***Biotechnology Advances***, v. 25, p. 515-536, 2007.

Visentainer, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. ***Química Nova***, v. 35, p. 274-279, 2012.

Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H.; Tominaga, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida Antarctica* lipase. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 77, p. 355-360, 2000.

Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 17, p. 151-155, 2002.

WBC - Worthington Biochemical Corporation, **Introduction to Enzymes**<http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/Enzymes.pdf> >Acesso em junho 2013.

Wu, H. S. e Tsai, M. J. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 488-493, 2004.

Xu, Y.; Nordblad, M.; Nielsen, P.M.; Brask, J.; Woodley, J. M. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 213-219, 2011.

Yoshida, H.; Tanigawa, T.; Yoshida, N.; Kuriyama, I.; Tomiyama, Y.; Mizushima, Y. Lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in rice brans. **Food Chemistry**, v. 129, p. 479-484, 2011.

Yang, S. T. Chapter 1. Bioprocessing – from Biotechnology to Biorefinery. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, p.1-23, 2007.

Yasuda, M.; Kiguchi, T.; Kasahara, H.; Ogino, H.; Ishikawa, H. Effect of Additives on Transesterification Activity of *Rhizopus chinensis* Lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 681-683, 2000.

Zarevucka, M.; Kejik, Z.; Samana, D. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 481-486, 2005.

Zheng, L.; Li, D.; Jike, L.; Xiaolei, G.; Zixin, Y.; Tianwei, T. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Crude Rice Bran Oil with Immobilized *Candida* sp. 99-125. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 870-875, 2010.

Zheng, Y. Y.; Guo, X. H.; Song, N. N.; Li, D. C. Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.69, p. 127-132, 2011.

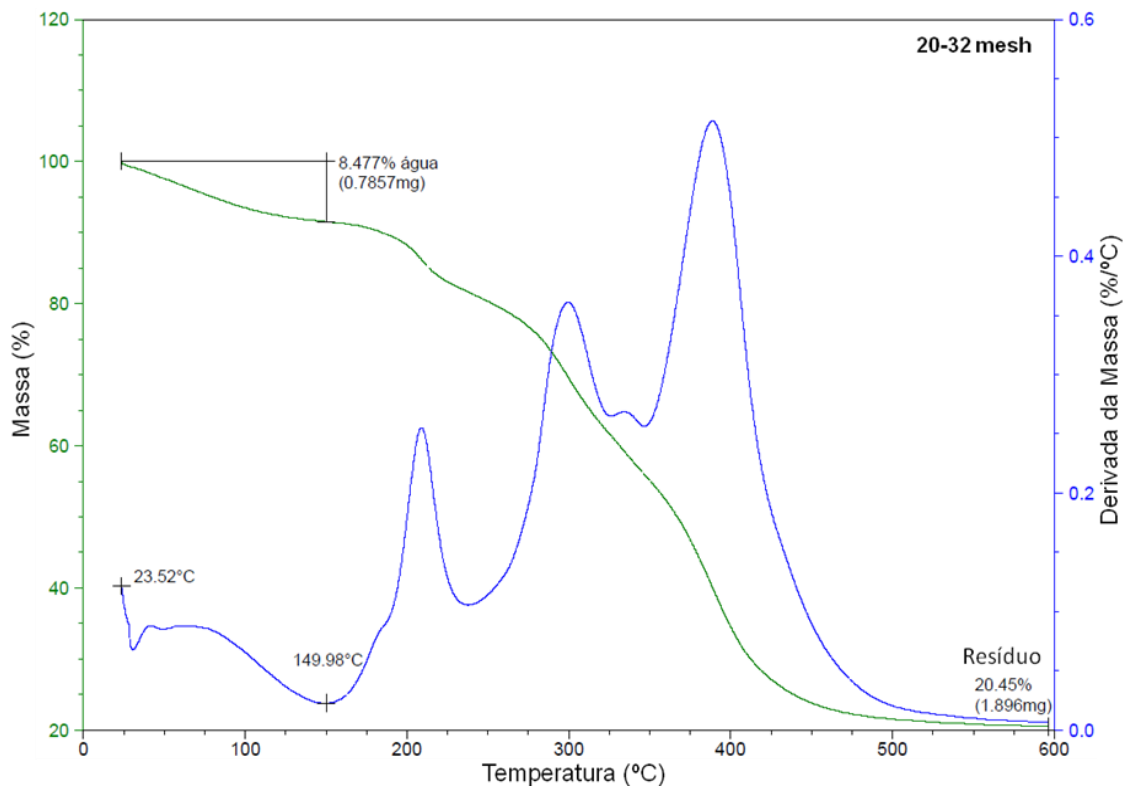
Zhou, J.; Chen, W. W.; Jia, Z. B.; Huang, G. R.; Hong, Y.; Tao, J. J.; Luo, X. B. Purification and Characterization of Lipase Produced by *Aspergillus oryzae* CJLU-31 Isolated from Waste Cooking Oily Soil. ***American Journal of Food Technology***, v. 7, p. 596-608, 2012.

Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S.; Blanchard, C. Composition and functional properties of rice. ***International Journal of Food Science and Technology***, v.37, p.849-868, 2002.

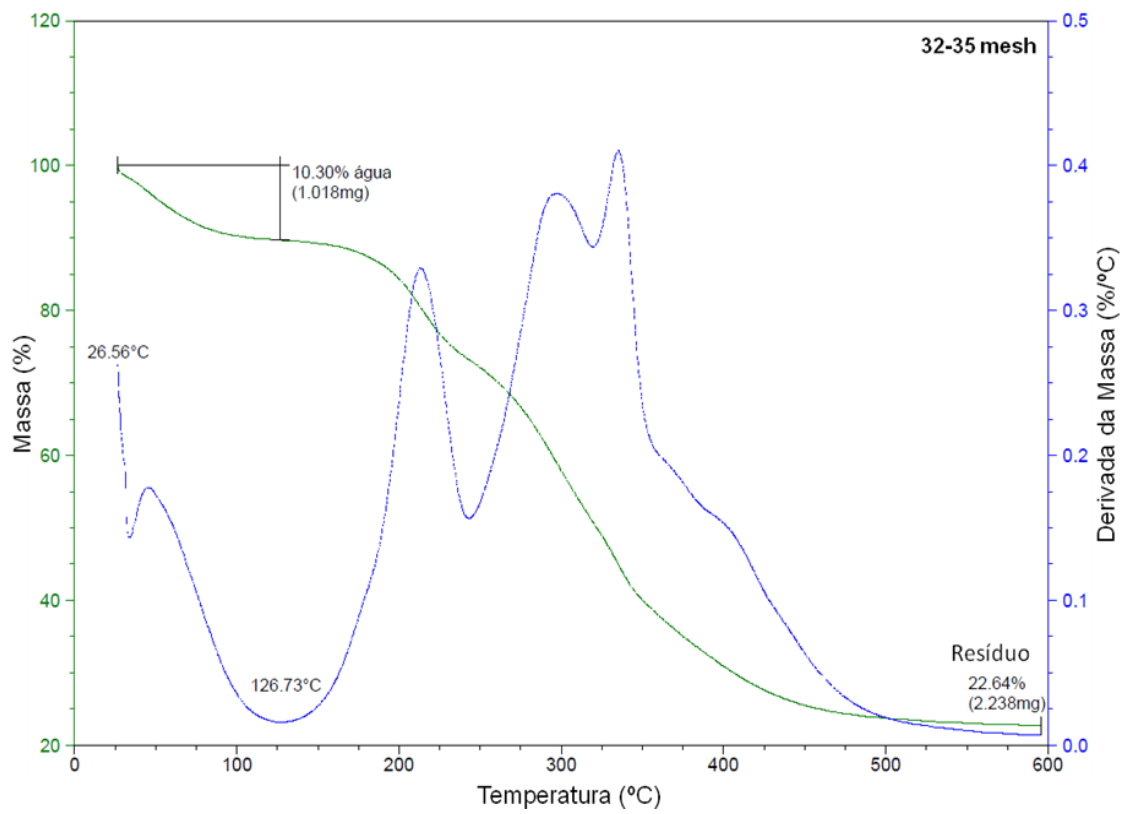
Zullaikah, S.; Chao-Chin, L.; Vali, S. R.; Yi-Hsu, J. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. ***Bioresource Technology***, v. 96, p. 1889-1896, 2005.

ANEXOS

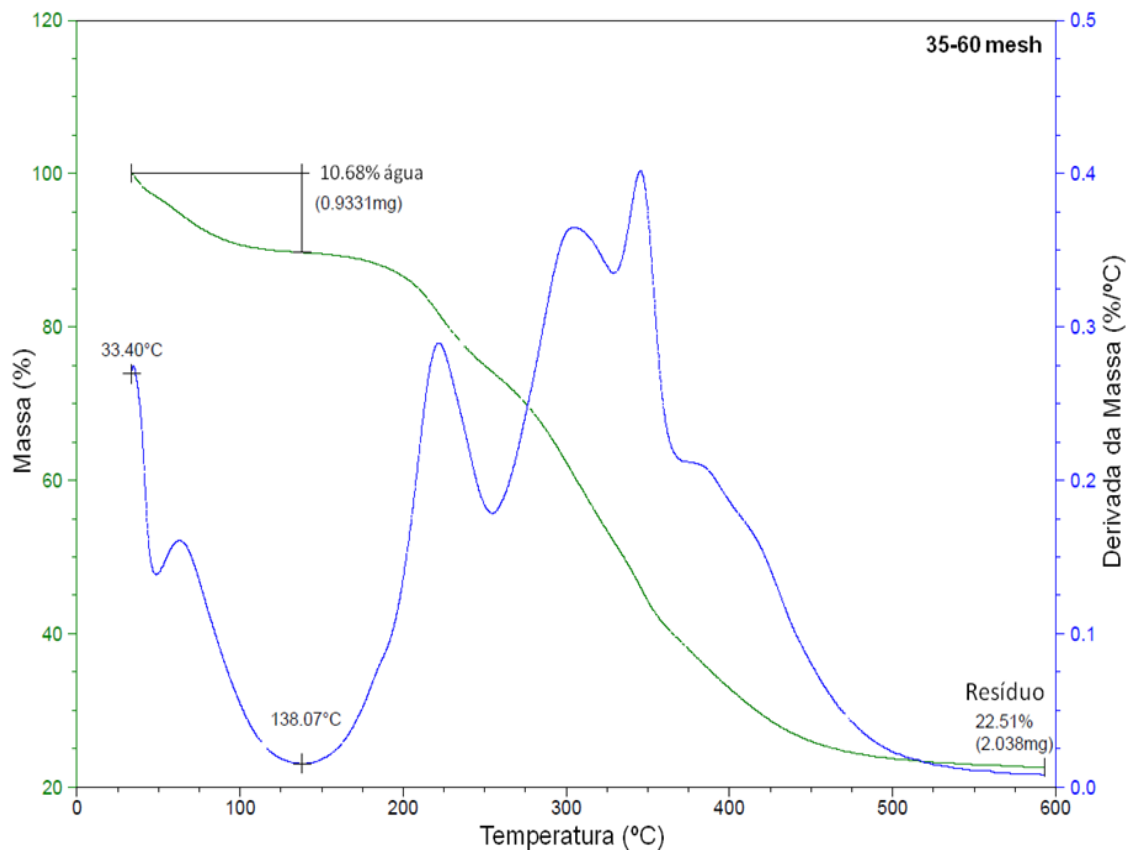
ANEXO A:



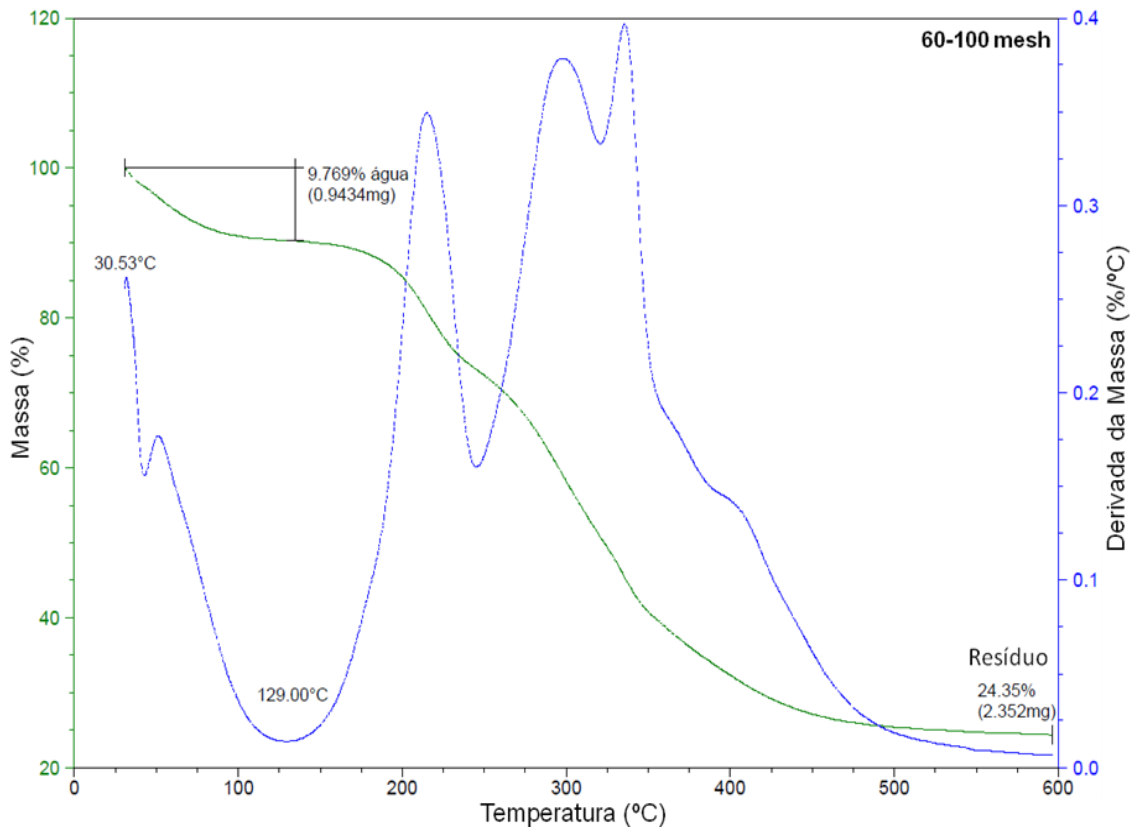
ANEXO A1: Curvas TG/DTG da faixa granulometria 20-32 mesh.



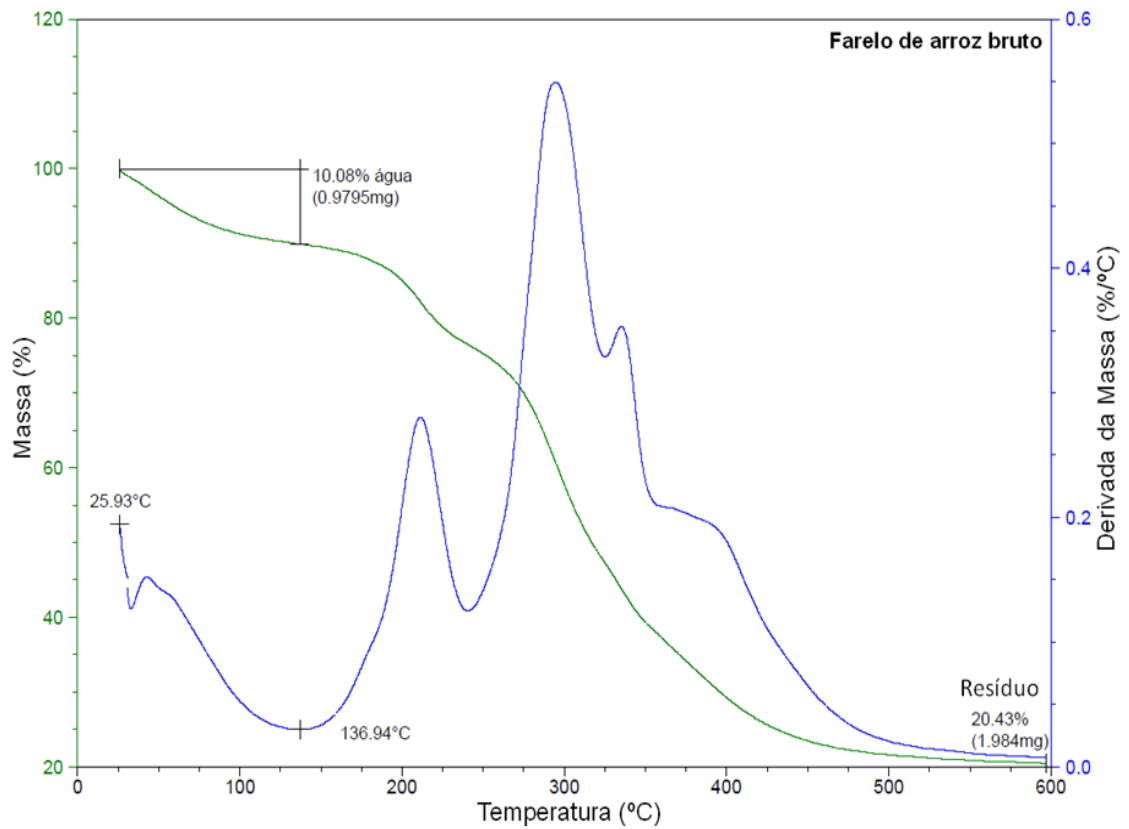
ANEXO A2: Curvas TG/DTG da faixa granulometria 32-35 mesh.



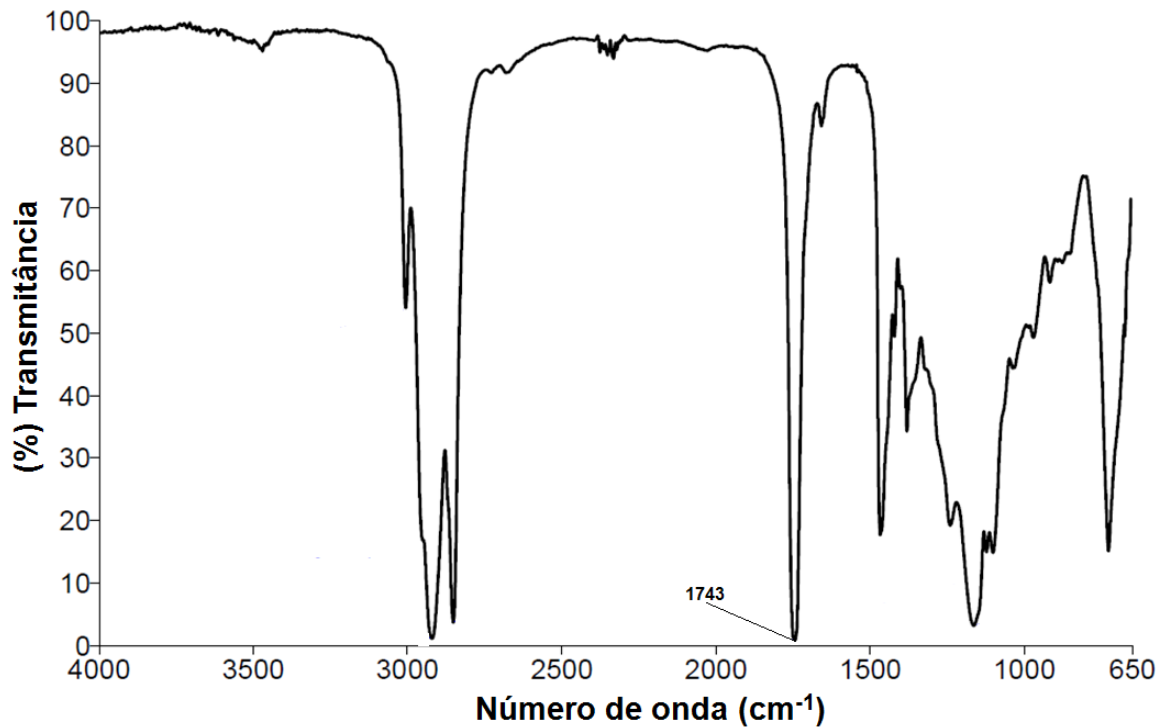
ANEXO A3: Curvas TG/DTG da faixa granulometria 35-60 mesh.



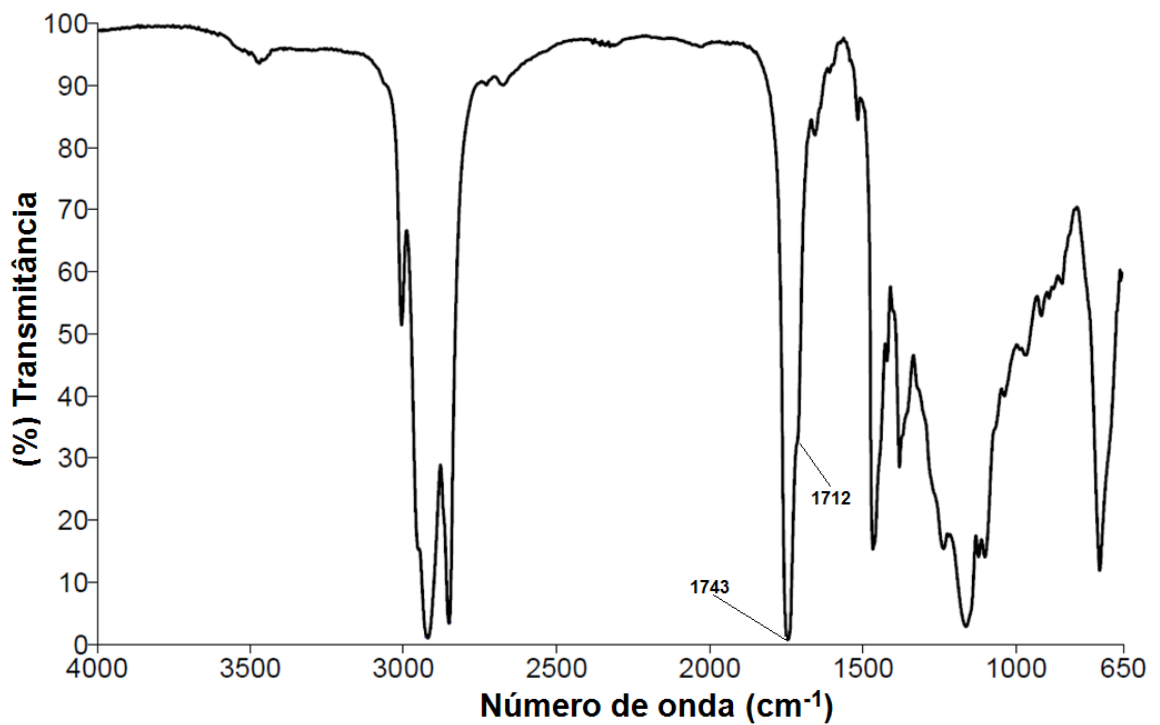
ANEXO A4: Curvas TG/DTG da faixa granulometria 60-100 mesh.



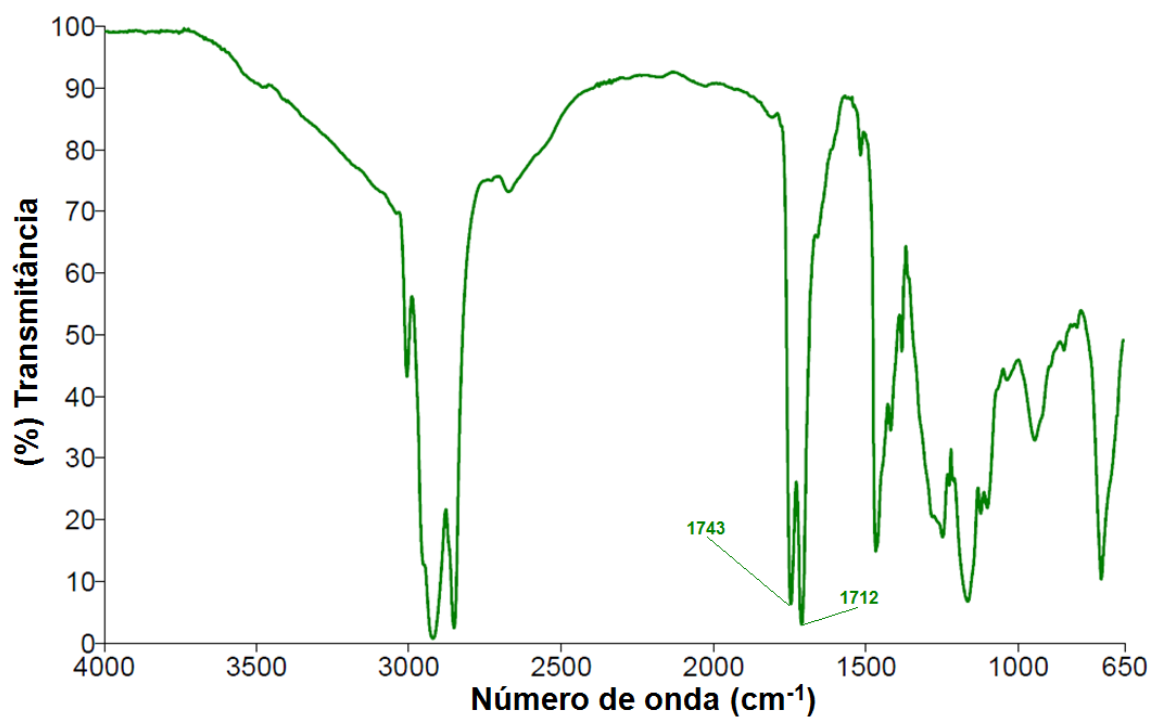
ANEXO A5: Curvas TG/DTG do farelo de arroz bruto.

ANEXO B:

ANEXO B1: Espectro de FTIR do óleo refinado do farelo de arroz na região de número de onda de 4000-650 cm⁻¹.



ANEXO B2: Espectro de FTIR do óleo bruto extraído do farelo de arroz durante o polimento do grão de arroz na região de número de onda de 4000-650 cm⁻¹.



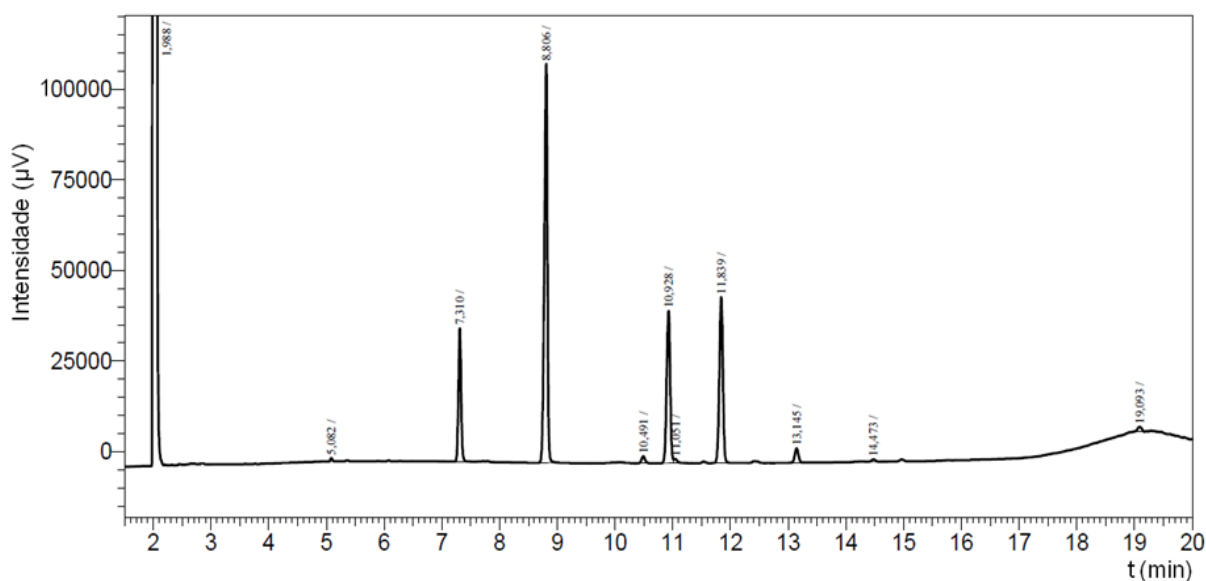
ANEXO B3: Espectro de FTIR do óleo bruto extraído após dez semanas de armazenamento do farelo de arroz na região de número de onda de 4000-650 cm^{-1} .

ANEXO C:

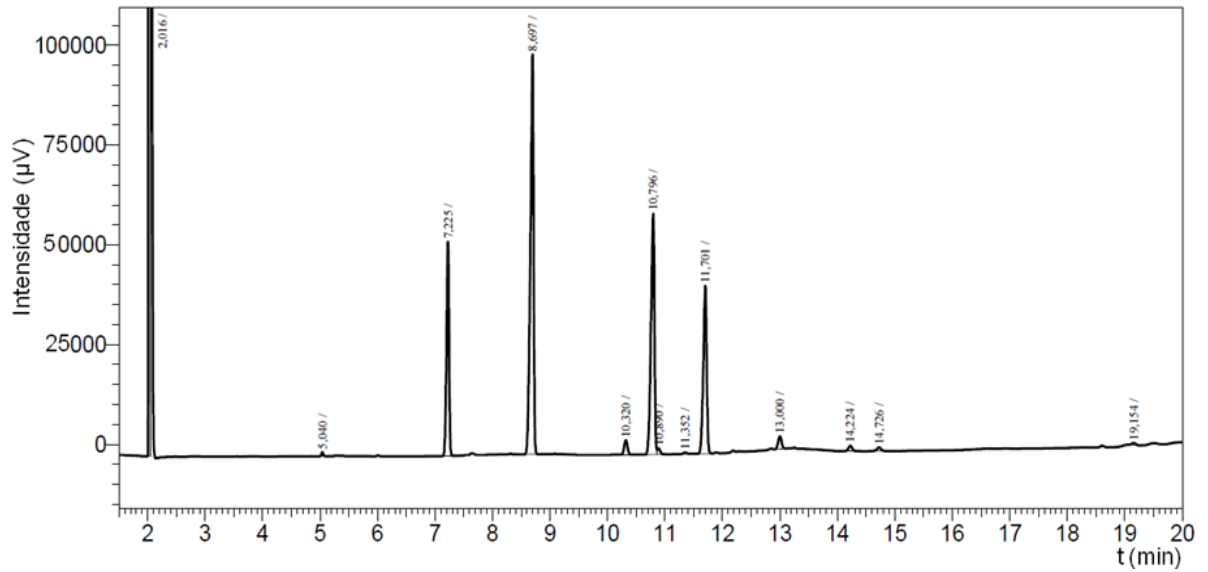
Anexo C1: Tabela 5.4. Resultados da atividade enzimática em função do tempo de armazenamento na temperatura de 35°C do farelo de arroz expresso em percentual de AGL.

Peneira (mesh)	Percentagem de AGL					
	Semana					
	Zero	Duas	Quatro	Seis	Oito	Dez
Farelo bruto	7,6 ± 1,3	25,5 ± 1,3	27,6 ± 2,3	36,9 ± 1,1	47,9 ± 1,4	51,6 ± 2,0
20 - 100	6,7 ± 0,6	25,6 ± 0,1	31,8 ± 0,5	38,7 ± 0,4	41,4 ± 0,8	42,1 ± 0,7
32 - 100	6,3 ± 0,9	29,8 ± 0,5	33,1 ± 1,6	40,9 ± 1,5	43,6 ± 0,4	45,9 ± 1,3
20 - 32	6,1 ± 0,3	12,9 ± 0,9	17,9 ± 1,9	21,7 ± 1,2	22,9 ± 1,5	24,4 ± 1,1
32 - 35	6,7 ± 1,1	28,2 ± 1,1	30,8 ± 0,8	40,4 ± 1,3	45,7 ± 1,0	47,8 ± 0,8
35 - 60	7,3 ± 0,7	29,5 ± 0,2	31,9 ± 0,4	43,5 ± 0,9	45,0 ± 1,3	45,7 ± 0,6
60 - 100	6,9	22,3	28,3	41,5	47,1	48,6

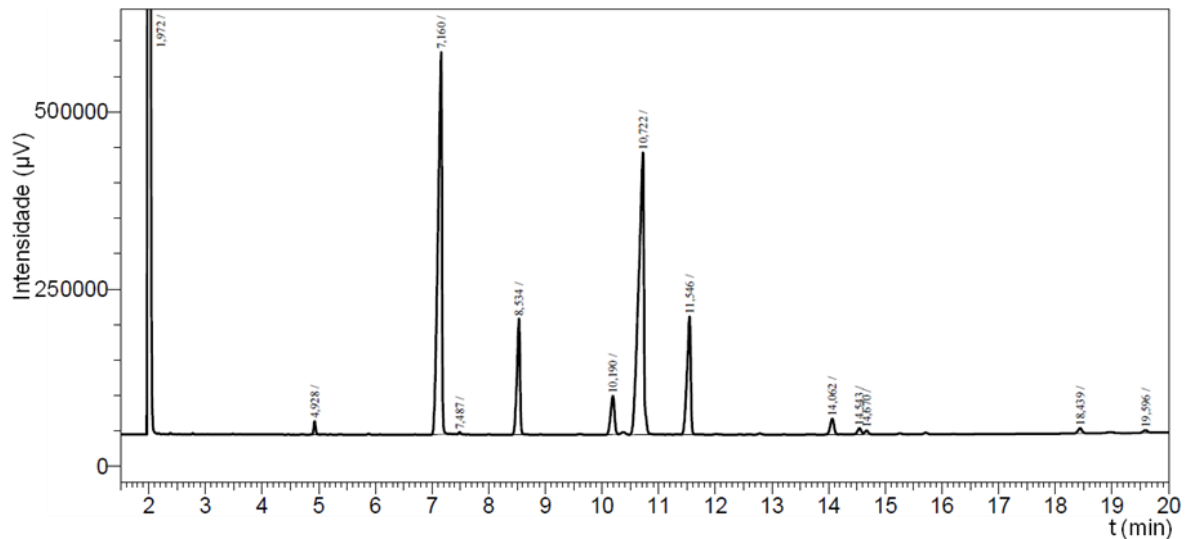
ANEXO D:



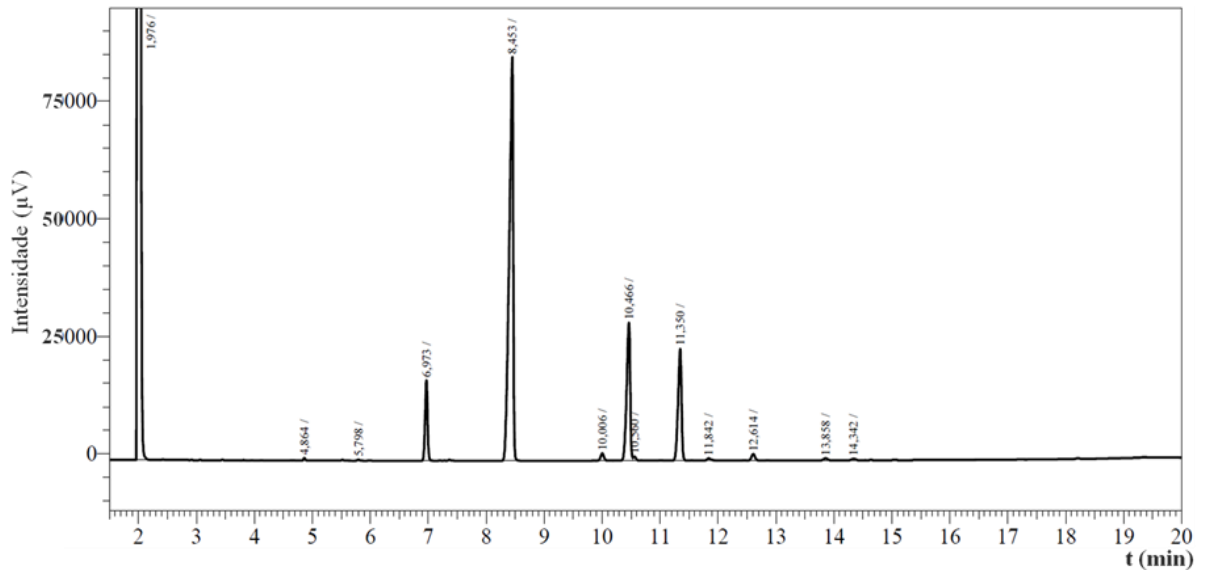
ANEXO D1: Perfil cromatográfico da mistura dos ésteres metílicos produzidos *via* catálise enzimática (*lipase*) do óleo no farelo de arroz bruto (5,7% de conversão) na faixa de $t_r=1,5$ a 20 min do total de 22,75 min.



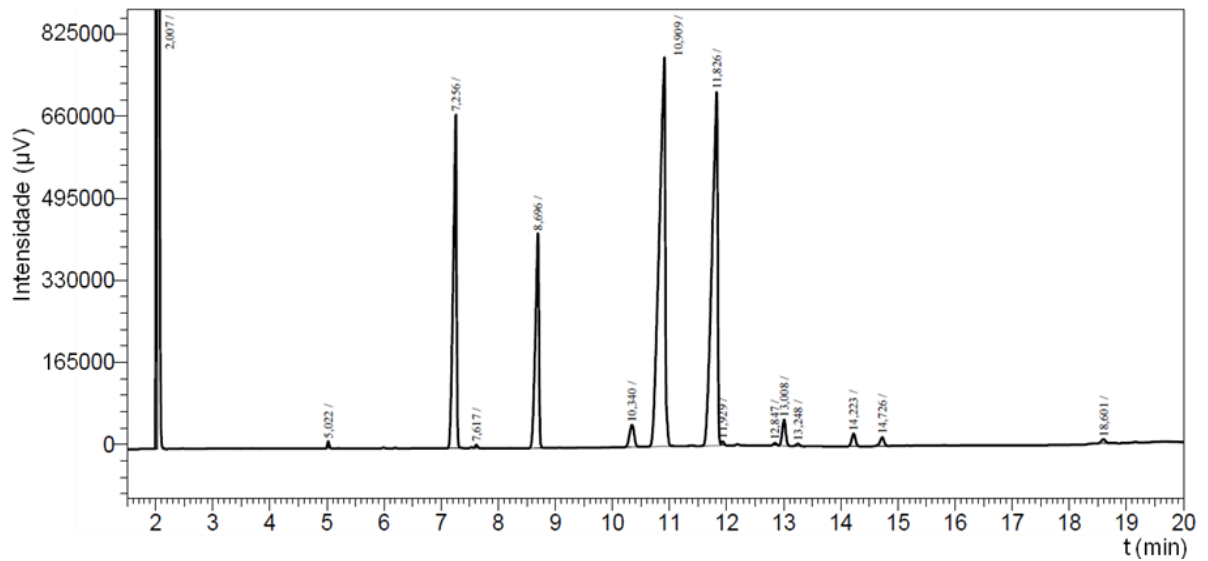
ANEXO D2: Perfil cromatográfico da mistura dos ésteres metílicos produzidos *via* catálise enzimática (*lipase*) do óleo no farelo de arroz bruto com adição de 1% de KOH (12,9% de conversão) na faixa de $t_r=1,5$ a 20 min do total de 22,75 min.



ANEXO D3: Perfil cromatográfico da mistura dos ésteres metílicos produzidos do óleo bruto extraído do farelo de arroz *via* catálise enzimática com a *lipase* PPL ($\approx 73,8\%$ de conversão) na faixa de $t_r=1,5$ a 20 min do total de 22,75 min.



ANEXO D4: Perfil cromatográfico da mistura dos ésteres metílicos produzidos do óleo bruto extraído do farelo de arroz *via* catálise enzimática com a *lipase PPL* ($\approx 10,6\%$ de conversão) na faixa de $t_r=1,5$ a 20 min do total de 22,75 min.



ANEXO D5: Perfil cromatográfico da mistura dos ésteres metílicos produzidos do óleo refinado do farelo de arroz por catálise alcalina 1% de KOH (m/m) ($\approx 98\%$ de conversão) na faixa de $t_r=1,5$ a 20 min do total de 22,75 min.