

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## *Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática*

### Tese de Mestrado

de

Soraia Vanessa Vieira de Andrade

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Savinor UTS



Orientador na FEUP: Doutora Teresa Mata

Doutora Nídia Caetano

Doutor António Martins

Orientador na Savinor UTS: Doutora Elisabete Matos



Departamento de Engenharia Química

Julho de 2016



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores: Doutora Teresa Mata, Doutora Nídia Caetano e Doutor António Martins por todos os conhecimentos transmitidos e apoio prestado durante a realização deste projeto. Obrigada por toda a disponibilidade, dedicação e simpatia.

À Doutora Elisabete Matos, da *Savinor UTS*, pela disponibilidade e simpatia com que nos recebeu nas instalações da empresa.

À engenheira Magda, à Engenheira Marília, ao Engenheiro Tomás e à Dona Lurdes por toda a ajuda prestada e pela simpatia com que nos receberam diariamente no Laboratório de Tecnologia Química.

À minha amiga Daniela Correia, pela paciência, boa disposição e por toda a ajuda prestada. Obrigada por todos os momentos divertidos e pelo apoio constante.

À minha amiga, Mariana Pinto, pelas conversas animadas ao fim de mais um dia de trabalho, pelo interesse, disponibilidade, por toda a paciência e amizade.

À minha família por todo o carinho, paciência, incentivo e pelo apoio incondicional que constantemente me oferecem.

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta dissertação.

Este trabalho foi financiado pelo Projeto PP-IJUP2014-SOJA DE PORTUGAL financiado pela empresa Soja de Portugal SGPS e pelo Projeto POCI-01-0145-FEDER-006939 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.





## Resumo

As gorduras de animais são utilizadas nas indústrias de rações devido ao seu elevado conteúdo energético. No entanto, para estas serem utilizadas, existem critérios de qualidade que devem ser cumpridos. Um dos critérios mais importantes é o teor em ácidos gordos livres (AGL) ou índice de acidez. Devido a um processamento industrial inadequado da matéria-prima, a gordura pode sofrer processos químicos, de oxidação, hidrólise, hidrogenação ou fermentação que levam à libertação de ácidos gordos livres. Estes são responsáveis pela deterioração do produto, uma vez que provocam alterações indesejáveis de cor, sabor, aroma e consistência. Deste modo, é essencial encontrar métodos que permitam obter a qualidade mínima pretendida para as gorduras e ser possível a sua utilização na indústria.

As amostras de gordura usadas neste trabalho foram recolhidas na empresa *Savinor UTS* e caracterizadas de acordo com vários parâmetros. Obteve-se um índice de acidez de 4,43 mg KOH/g amostra, índice de iodo de 94,5 g/100 g amostra, massa volúmica de 0,920 g/cm<sup>3</sup>, viscosidade cinemática de 49,8 mm<sup>2</sup>/s e teor de humidade de 0,15 %. Foram testados vários catalisadores biológicos, nomeadamente, *Novozym 435*, *Lipozyme CALB L*, *Lipozyme TL 100 L* e *Lecitase Ultra*, sendo o álcool o etanol (EtOH). Foi selecionada a enzima que permitiu uma redução superior do índice de acidez, sendo esta a *Lipozyme CALB L*. Os parâmetros que influenciam significativamente a reação de esterificação são: a temperatura, razão mássica EtOH:AGL, razão mássica enzima:gordura e tempo de reação. Deste modo, foram realizadas várias experiências ao longo do tempo para temperaturas de 32,5 °C, 35 °C, 40 °C, 42,5 °C, 45 °C e 47,5 °C, razões mássicas EtOH:AGL de 2,44, 3,25, 4,06, 4,88 e 6,50 m/m e razões mássicas enzima:gordura de 0,0030, 0,0048, 0,0060, 0,0090 e 0,0120 m/m. As condições ótimas correspondem a uma temperatura de 45 °C, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m e estas permitiram uma redução do índice de acidez inicial de 67 %.

Por fim, concluiu-se que a redução de acidez de gorduras de mamíferos pelo processo de esterificação enzimática é um método apropriado que apresenta diversas vantagens, nomeadamente a reduzida formação de subprodutos e um menor consumo energético, uma vez que há formação do produto a temperaturas mais próximas da temperatura ambiente.

**Palavras-chave:** Gordura, ácidos gordos livres, esterificação enzimática.



## Abstract

Animal fats are used in the feed industry due to its high energy content. However, there are quality criteria that must be respected. One of the most important parameter is the content of free fatty acids - acid value. Due to inadequate industrial processing of the raw material, the fat can suffer chemical processes of oxidation, hydrolysis, hydrogenation or fermentation which leads to the release of free fatty acids (FFA). These are responsible for the deterioration of the product and they cause undesirable changes of color, taste, flavor and consistency. Thus, it is essential to find methods to achieve the desired minimum quality for fats and their possible use in industry.

The samples of mammal fat were collected in the company *Savinor UTS* and characterized according to various parameters. It was obtained an acid value of 4.43 mg<sub>KOH</sub> / g<sub>sample</sub>, iodine value of 94.5 g / 100 g sample, density of 0,920 g/cm<sup>3</sup>, kinematic viscosity of 49.8 mm<sup>2</sup>/s and 0.15 % of water content. Several biological catalysts were tested, namely *Novozym 435*, *Lipozyme CALB L*, *Lipozyme TL100 L* and *Lecitase Ultra* and the alcohol used was ethanol (EtOH). It was selected the enzyme that allowed a higher reduction of the acid value, which was *Lipozyme CALB L*. The parameters that significantly influence the esterification reaction are: temperature, EtOH: FFA mass ratio, enzyme: fat mass ratio and reaction time. So, several experiments were performed over time at temperatures of 32.5 °C, 35 °C, 40 °C, 42.5 °C, 45 °C and 47.5 °C, EtOH: FFA mass ratio of 2.44, 3.25, 4.06, 4.88 and 6.50 wt/wt, enzyme: fat mass ratio of 0.0030, 0.0048, 0.0060, 0.0090 and 0.0120 wt/wt. The optimum conditions correspond to a temperature of 45 °C, a mass ratio EtOH: FFA of 3.25 wt/wt and a mass ratio enzyme: fat of 0.0060 m/m. These conditions allowed a reduction of 67 % of the initial acid value.

Finally, it was concluded that the reduction of acidity of mammal fats by enzymatic esterification is a suitable method that has several advantages, including the reduced formation of by-products and a lower energy consumption, since the products are formed on temperatures near to ambient temperature.

**Key-Words:** Fat, free fatty acid, enzymatic esterification



## Declaração

Soraia Vanessa Vieira de Andrade declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

---

(Soraia Vanessa Vieira de Andrade)



# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto.....	1
1.2	Contributos do Trabalho.....	1
1.3	Apresentação da Empresa.....	2
1.4	Organização da Tese.....	3
<b>2</b>	<b>Estado da Arte.....</b>	<b>5</b>
2.1	Gorduras e Óleos.....	5
2.1.1	Gorduras Animais.....	6
2.2	Rações.....	7
2.3	Degradação de gorduras.....	8
2.4	Esterificação enzimática.....	10
2.4.1	Enzimas - Lipases.....	10
2.4.2	Parâmetros que influenciam o processo de esterificação.....	10
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>13</b>
3.1	Caracterização da amostra.....	13
3.1.1	Índice de acidez.....	13
3.1.2	Índice de iodo.....	15
3.1.3	Massa volúmica.....	16
3.1.4	Viscosidade Cinemática.....	17
3.1.5	Teor de Humidade.....	18
3.2	Esterificação Enzimática.....	19
3.2.1	Procedimento experimental.....	19
3.2.2	Condições de referência.....	21
3.2.3	Seleção do catalisador enzimático.....	22
3.2.4	Otimização das condições de reação.....	23
3.3	Cinética da Reação.....	24

3.3.1	Cinética de Michaelis-Menten .....	25
3.3.2	Cinética de Primeira Ordem.....	26
3.3.3	Cinética de Segunda Ordem .....	26
3.3.4	Energia de Ativação .....	27
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
4.1	Caracterização da amostra .....	29
4.2	Perfil de Glicerídeos e Composição em Ácidos Gordos .....	29
4.3	Escolha do catalisador enzimático.....	31
4.4	Ensaio nas condições de referência.....	32
4.5	Efeito da temperatura.....	33
4.6	Efeito da Razão Mássica EtOH:AGL .....	35
4.7	Efeito da Razão Mássica Enzima:gordura .....	36
4.8	Utilização de Etanol a 90 % .....	37
4.9	Condições ótimas.....	38
4.10	Cinética da Reação.....	39
4.11	Determinação da energia de ativação.....	42
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Referências .....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>.....</b>	<b>59</b>
<b>Anexo 4</b>	<b>.....</b>	<b>81</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Fluxograma do processo de produção de farinha e gordura de mamíferos. ....	3
<b>Figura 2.1.</b> Reação de síntese do triacilglicerol. ....	5
<b>Figura 2.2.</b> Triacilglicerol saturado. ....	6
<b>Figura 2.3.</b> Triacilglicerol insaturado. ....	6
<b>Figura 2.4.</b> Reação de hidrólise responsável pela rancidez hidrolítica ....	8
<b>Figura 2.5.</b> Mecanismo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados.....	9
<b>Figura 3.1.</b> Mistura antes da titulação - a) e no ponto de equivalência - b). ....	14
<b>Figura 3.2.</b> Mistura antes e após a titulação para determinação do índice de iodo. ....	16
<b>Figura 3.3.</b> Procedimento para determinação da massa volúmica. ....	17
<b>Figura 3.4.</b> Exemplo de um viscosímetro de Cannon-Fenske.....	18
<b>Figura 3.5.</b> Amostra utilizada para esterificação enzimática. ....	19
<b>Figura 3.6.</b> Montagem experimental relativa à fase reacional. ....	20
<b>Figura 3.7.</b> Montagem experimental relativa à separação por decantação. ....	20
<b>Figura 3.8.</b> Montagem experimental relativa à medição do índice de acidez. ....	21
<b>Figura 4.1.</b> Variação do índice de acidez ao longo do tempo para as condições de referência: 40 °C, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	33
<b>Figura 4.2.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para as diferentes temperaturas, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e a razão enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	34
<b>Figura 4.3.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para diferentes razões mássicas EtOH:AGL, a 45 °C e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	35
<b>Figura 4.4.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para diferentes razões mássicas enzima:gordura, a 45 °C e razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m. ....	36
<b>Figura 4.5.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para uma razão EtOH:AGL de 2,93 m/m, 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	37
<b>Figura 4.6.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para uma razão EtOH:AGL de 3,58 m/m, a 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	38

<b>Figura 4.7.</b> Redução do índice de acidez em função do tempo para as condições ótimas de reação: 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	39
<b>Figura 4.8.</b> Ajuste dos resultados a uma cinética de primeira ordem. ....	39
<b>Figura 4.9.</b> Ajuste dos resultados a uma cinética de segunda ordem em ácido oleico. ....	40
<b>Figura 4.10.</b> Ajuste dos resultados a uma cinética de Michaelis-Menten. ....	40
<b>Figura 4.11.</b> Ajuste dos resultados a uma cinética de segunda ordem global (primeira ordem em relação a cada um dos reagentes, ácido oleico e etanol). ....	41
<b>Figura 4.12.</b> Representação do $\ln(k_{app})$ em função $1/T$ . ....	43
<b>Figura A2.1.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 32,5 °C. ....	53
<b>Figura A2.2.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 35 °C. ....	53
<b>Figura A2.3.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 42,5 °C. ....	54
<b>Figura A2.4</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 47,5 °C. ....	54
<b>Figura A2.5</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 2,44 m/m. ....	55
<b>Figura A2.6.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 4,06 m/m. ....	55
<b>Figura A2.7.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 4,88 m/m. ....	56
<b>Figura A2.8.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 6,50 m/m. ....	56
<b>Figura A2.9.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0030 m/m. ....	57
<b>Figura A2.10.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0090 m/m. ....	57
<b>Figura A2.11.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0120 m/m. ....	58

<b>Figura A2.12.</b> Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0048 m/m. ....	58
<b>Figura A3.1.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 32,5 °C. ....	59
<b>Figura A3.2.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 32,5 °C. ....	59
<b>Figura A3.3.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 32,5 °C. ....	60
<b>Figura A3.4.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 32,5 °C. ....	60
<b>Figura A3.5.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 35 °C... ..	60
<b>Figura A3.6.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 35 °C. ... ..	61
<b>Figura A3.7.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 35 °C. ....	61
<b>Figura A3.8</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 35 °C.....	61
<b>Figura A3.9.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 40 °C... ..	62
<b>Figura A3.10.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 40 °C. ....	62
<b>Figura A3.11.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 40 °C. ....	62
<b>Figura A3.12.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 40 °C.....	63
<b>Figura A3.13.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 42,5 °C. ....	63
<b>Figura A3.14.</b> Ajuste ao modelo cinético segunda ordem para a temperatura de 42,5 °C... ..	63
<b>Figura A3.15.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 42,5 °C. ....	64
<b>Figura A3.16.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 42,5 °C. ....	64
<b>Figura A3.17.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 47,5 °C. ....	64
<b>Figura A3.18.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 47,5 °C. ....	65

<b>Figura A3.19.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 47,5 °C. .....	65
<b>Figura A3.20.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 47,5 °C. ....	65
<b>Figura A3.21.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.....	66
<b>Figura A3.22.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.....	66
<b>Figura A3.23.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m. ....	67
<b>Figura A3.24.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m. ....	67
<b>Figura A3.25.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m. ....	67
<b>Figura A3.26.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.....	68
<b>Figura A3.27.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.....	68
<b>Figura A3.28.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m. ....	68
<b>Figura A3.29.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.....	69
<b>Figura A3.30.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.....	69
<b>Figura A3.31.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m. ....	69
<b>Figura A3.32.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m. ....	70
<b>Figura A3.33.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m. ....	70
<b>Figura A3.34.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m.....	70

<b>Figura A3.35.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m. ....	71
<b>Figura A3.36.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m. ....	71
<b>Figura A3.37.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m. ....	72
<b>Figura A3.38.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m. ....	72
<b>Figura A3.39.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m. ....	72
<b>Figura A3.40.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m. ....	73
<b>Figura A3.41.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m. ....	73
<b>Figura A3.42.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m. ....	74
<b>Figura A3.43.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m. ....	74
<b>Figura A3.44.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m. ....	74
<b>Figura A3.45.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m. ....	75
<b>Figura A3.46.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m. ....	75
<b>Figura A3.47.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m. ....	75
<b>Figura A3.48.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m. ....	76
<b>Figura A3.49.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m. ....	76
<b>Figura A3.50.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m. ....	76

<b>Figura A3.51.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m. ....	77
<b>Figura A3.52.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m. ....	77
<b>Figura A3.53.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.....	78
<b>Figura A3.54.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.....	78
<b>Figura A3.55.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.....	78
<b>Figura A3.56.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m. ....	79
<b>Figura A3.57.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.....	79
<b>Figura A3.58.</b> Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.....	79
<b>Figura A3.59.</b> Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.....	80
<b>Figura A3.60.</b> Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m. ....	80
<b>Figura A4.1.</b> Análise Estatística para a cinética de segunda ordem em relação ao ácido oleico. ....	81
<b>Figura A4.2.</b> Análise Estatística para a cinética de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes, ácido oleico e etanol.....	82

# Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Produtos resultantes do tratamento de subprodutos pela Savinor UTS. ....	2
Tabela 2.1. Composição de ácidos gordos no tecido adiposo e músculo de diferentes animais. .....	7
Tabela 3.1. Amostras disponibilizadas pela Savinor UTS. ....	13
Tabela 3.2. Reagentes utilizados e o modo de preparação e/ou caracterização dos mesmos. .....	15
Tabela 3.3. Condições de referência. ....	21
Tabela 3.4. Características dos diferentes catalisadores enzimáticos disponíveis.....	22
Tabela 3.5. Ensaio realizado para determinação do catalisador enzimático. ....	22
Tabela 3.6. Condições experimentais utilizadas na variação da temperatura. ....	23
Tabela 3.7. Condições experimentais utilizadas na variação do parâmetro razão EtOH:AGL.	24
Tabela 3.8. Condições experimentais utilizadas na variação dos parâmetros razão enzima:gordura.....	24
Tabela 3.9. Condições experimentais utilizadas com etanol a 90%. ....	24
Tabela 4.1. Resultados dos vários parâmetros de caracterização da amostra. ....	29
Tabela 4.2. Insaponificável, perfil de glicerídeos e composição em ácidos gordos para gorduras de mamíferos, aves e peixes. ....	30
Tabela 4.3. Resultados obtidos para seleção do catalisador enzimático.....	31
Tabela 4.4. Resultados obtidos para o ensaio de referência: 40 °C, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	33
Tabela 4.5. Redução do índice de acidez na gordura das experiências realizadas a diferentes temperaturas. ....	34
Tabela 4.6. Redução do índice de acidez da gordura nas experiências realizadas a diferentes razões mássicas EtOH:AGL, a 45 °C e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	35
Tabela 4.7. Redução do índice de acidez da gordura nas experiências realizadas a diferentes razões mássicas enzima:gordura, a 45 °C e razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m. ....	37
Tabela 4.8. Redução do índice de acidez da gordura nas experiências realizadas com etanol a 90 %, a 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. ....	38

<b>Tabela 4.9.</b> Parâmetros Cinéticos para os diferentes modelos testados. ....	41
<b>Tabela 4.10.</b> Resultados estatísticos. ....	42
<b>Tabela 4.11.</b> Constantes cinéticas obtidas para as várias temperaturas. ....	43
<b>Tabela 4.12.</b> Valores de energia de ativação e fator pré exponencial, obtidos experimentalmente. ....	44

# Notação e Glossário

$C_A$	Concentração de ácido oleico
$C_{A0}$	Concentração de ácido oleico inicial
$C_B$	Concentração de etanol
$C_{B0}$	Concentração de etanol inicial
$C_{KOH}$	Concentração da solução de hidróxido de potássio
$E$	Energia de ativação
$K$	Constante do viscosímetro
$k$	Constante cinética
$k_0$	Fator pré-exponencial
$k_{app}$	Constante de velocidade aparente
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$m$	Massa da amostra
$m_0$	Massa de ácido benzoico
$R$	Constante dos gases perfeitos
$r$	Velocidade de reação
$t$	Tempo
$V$	Volume total da solução
$V_0$	Volume da solução de hidróxido de potássio
$V_{max}$	Velocidade máxima da reação enzimática

## *Lista de unidades*

g	Gramma
l	Litro
m/m	Fração ou percentagem mássica
ml	Mililitro
min	Minuto
mm	Milímetro
K	Kelvin
kg	Quilograma
kJ	Quilojoule
s	Segundo
°C	Grau Celsius
€	Euro
µl	Microlitro

## *Letras gregas*

$\rho_{20}$	Densidade a 20 °C
$\nu$	Viscosidade cinemática

### ***Lista de Siglas***

AGL	Ácidos Gordos Livres
EtOH	Etanol
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
IA	Índice de Acidez
ISO	International Organization of Standardization
I/Cl	Razão iodo cloro
KOH	Hidróxido de Potássio
LU	Unidade de Lipase
NP EN	Versão Portuguesa da Norma Europeia
PLU	Unidade de Laurato Propílico
WI	Índice de iodo

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

As gorduras provenientes do abate e desmanche de animais são utilizadas nas indústrias de produção de sabão, rações e biodiesel, devido ao seu baixo custo e disponibilidade de matéria-prima. A utilização destes subprodutos na indústria contribui para a redução do impacto ambiental, uma vez que, se estes subprodutos não fossem utilizados pela indústria seriam transformados em resíduos urbanos.

Uma vez que as gorduras apresentam um determinado grau de deterioração, existem certos requisitos que devem ser cumpridos para ser possível a sua utilização na indústria. Um dos parâmetros mais importantes no controlo da qualidade das mesmas é o índice de acidez. Este critério permite avaliar o estado de conservação da gordura e existem limites impostos que devem ser respeitados.

Deste modo, o trabalho realizado, inserido no projeto IJUP PP-IJUP2014-SOJA DE PORTUGAL, tem como objetivo o estudo do processo de redução do índice de acidez de gorduras de origem animal, assim como a otimização do método utilizado, para posterior valorização comercial e utilização nas mais diversas áreas de aplicação.

## 1.2 Contributos do Trabalho

Através da realização deste trabalho pretendeu-se contribuir com os seguintes aspetos:


- Caracterização das amostras obtidas de acordo com vários parâmetros tais como, índice de acidez, índice de iodo, massa volúmica, viscosidade cinemática e teor de humidade;
- Avaliação do potencial de redução de acidez de gorduras de mamífero através do processo de esterificação enzimática;
- Teste de diversos catalisadores biológicos e seleção daquele com melhor resultado na redução do índice de acidez;
- Otimização do processo de esterificação através do estudo de diversas condições operatórias, sendo estas a temperatura, razão mássica etanol/AGL e razão mássica enzima/gordura;
- Estudo da cinética da reação e determinação dos respetivos parâmetros cinéticos.

### 1.3 Apresentação da Empresa

A *Savinor UTS* (Unidade de Tratamento de Subprodutos) integra o Grupo Soja de Portugal e desde 1984 é responsável pela recolha e tratamento de subprodutos de origem animal. Estes subprodutos de origem animal são recolhidos em matadouros, talhos, salas de desmanche e hipermercados. Também são recolhidos os subprodutos de peixe resultantes das indústrias conserveiras de Portugal e da Galiza.

Deste modo, os subprodutos deixam de constituir um perigo para a saúde pública e são devidamente tratados e reutilizados. Na Tabela 1.1 encontram-se os produtos resultantes do tratamento realizado pela *Savinor UTS*.

*Tabela 1.1. Produtos resultantes do tratamento de subprodutos pela Savinor UTS.*

	Farinha de carne para alimentação de cães e gatos Farinha de peixe para alimentação animal e aquacultura Farinhas de subprodutos para adubagem e compostagem Gorduras animais para alimentação animal Gorduras animais para combustível Óleo de peixe para alimentos compostos para aquacultura
--	--

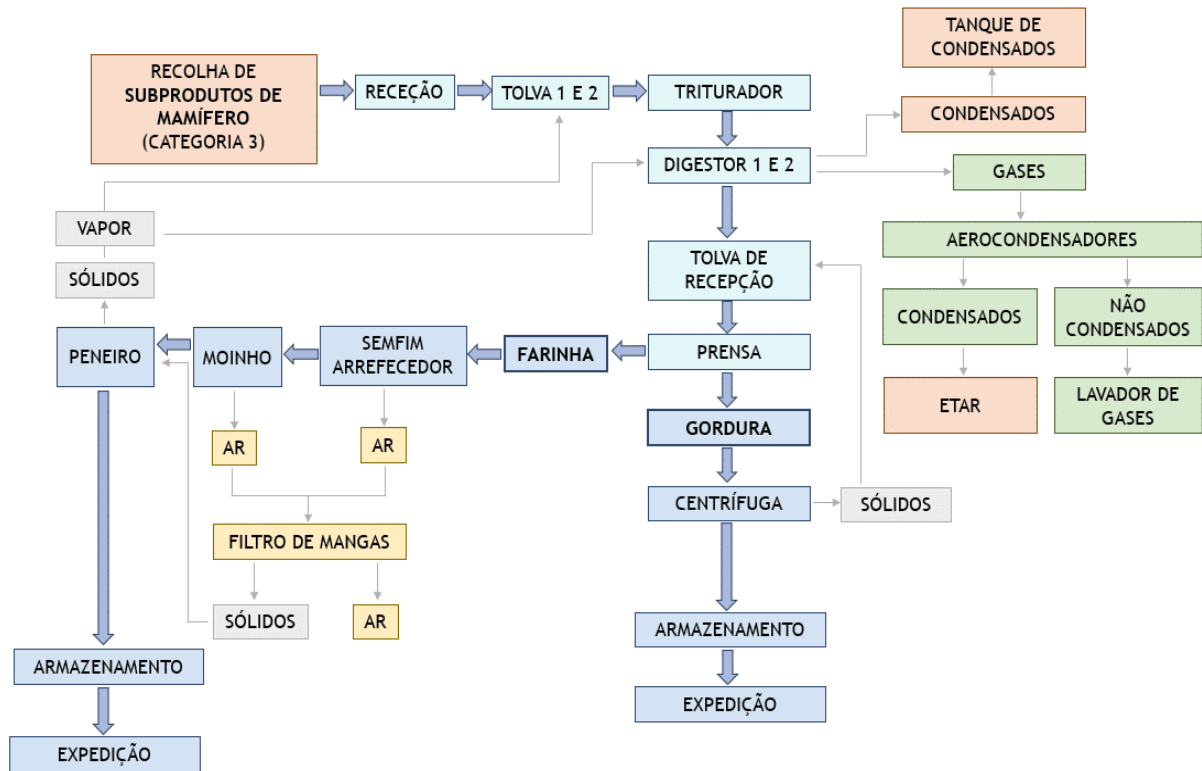
Os subprodutos são divididos em três categorias:

- Categoria 1: subprodutos perigosos para a saúde pública;
- Categoria 2: subprodutos impróprios para consumo, mas sem perigosidade para a saúde pública;
- Categoria 3: subprodutos próprios para consumo.

A *Savinor UTS* recebe apenas subprodutos das categorias 2 e 3, sendo os de categoria 3 destinados à produção de farinhas e gorduras animais. Desta categoria existem quatro linhas de produção sendo estas responsáveis pela:

- Produção de farinha e gordura de mamíferos;
- Produção de farinha e gordura de aves;
- Produção de farinha de penas;
- Produção de farinha e óleo de peixe.

Na Figura 1.1 está representado o fluxograma do processo de produção de farinha e gordura de mamíferos.



*Figura 1.1 Fluxograma do processo de produção de farinha e gordura de mamíferos (Adaptado de Savinor UTS, 2016).*

## 1.4 Organização da Tese

O presente documento está organizado em cinco capítulos principais. No primeiro capítulo são apresentados os objetivos e contributos do trabalho e é feita uma breve apresentação da empresa e a sua área de intervenção.

No segundo capítulo encontra-se exposta uma vasta gama de conteúdos teóricos essenciais para compreensão do estudo realizado.

O terceiro capítulo contempla as várias metodologias implementadas, assim como a descrição detalhada de todos os procedimentos experimentais realizados.

No quarto capítulo estão apresentados os resultados obtidos, assim como a discussão dos mesmos.

Por fim, no quinto capítulo encontram-se evidenciadas todas as conclusões obtidas ao longo do trabalho.



## 2 Estado da Arte

### 2.1 Gorduras e Óleos

As gorduras e óleos são substâncias orgânicas de origem animal ou vegetal, constituídas essencialmente por triacilgliceróis. Devido à sua estrutura molecular - cadeia longa de átomos de carbono, estes compostos são insolúveis em água. A diferença entre as gorduras e os óleos está relacionada com o estado físico ao qual se encontram a temperaturas inferiores a 20 °C. Deste modo, as gorduras encontram-se no estado sólido e os óleos no estado líquido (Klonoff, 2007; O'Brien, 2004).

Os triacilgliceróis são sintetizados a partir da união de uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos gordos, como se pode observar na Figura 2.1.

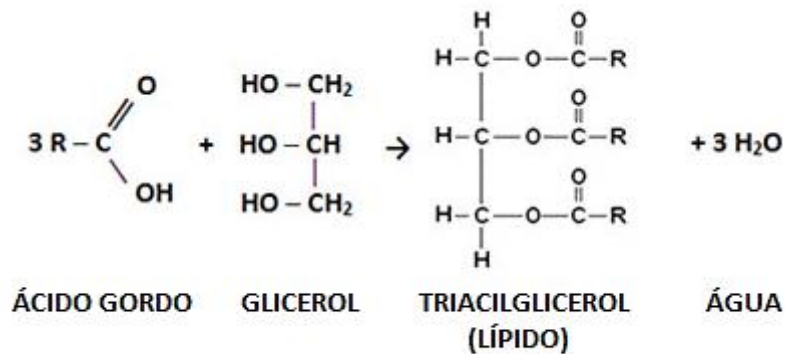
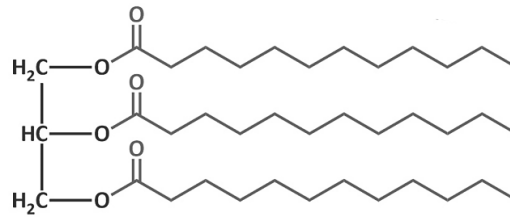


Figura 2.1. Reação de síntese do triacilglicerol.

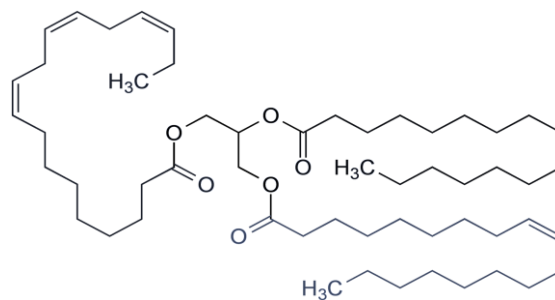
As propriedades dos triacilgliceróis dependem das moléculas de ácidos gordos que os constituem. Assim, o comprimento da cadeia de átomos de carbono, o número, posição e configuração das ligações duplas dos ácidos gordos transmitem características físico-químicas diferentes aos óleos e gorduras.

Uma característica importante é o grau de saturação destas moléculas. Os ácidos gordos saturados não apresentam ligações duplas na sua cadeia de carbonos, sendo mais comuns em gorduras de origem animal. Os ácidos gordos insaturados apresentam uma ou várias ligações duplas ao longo da sua cadeia de carbonos. Estes são mais comuns em gorduras de origem vegetal e animais marinhos. A presença destas ligações duplas determina o estado físico dos triacilgliceróis, uma vez que afeta a sua temperatura de fusão (Klonoff, 2007; Melo, 2010; Reda and Carneiro, 2007;).

Na Figura 2.2 e Figura 2.3 encontram-se representadas as estruturas de um triacilglicerol saturado e insaturado, respetivamente.



*Figura 2.2. Triacilglicerol saturado.*



*Figura 2.3. Triacilglicerol insaturado.*

Uma vez que a cadeia de átomos de carbono dos ácidos gordos saturados é linear, existe um maior número de interações entre as moléculas. Deste modo, a temperatura de fusão destes compostos é elevada, uma vez que é necessário fornecer mais energia para quebrar as ligações. Assim, os triacilgliceróis saturados encontram-se maioritariamente no estado sólido.

No caso dos ácidos gordos insaturados, estes apresentam uma temperatura de fusão baixa devido à presença de ligações duplas que dificulta a interação entre as moléculas. Desta forma, triacilgliceróis insaturados encontram-se no estado líquido. Concluindo, quanto maior for a cadeia de átomos de carbono e menor for o número de ligações duplas maior a temperatura de fusão do triacilglicerol (Reda and Carneiro, 2007).

### 2.1.1 Gorduras Animais

As gorduras de origem animal são constituídas maioritariamente por moléculas de ácidos gordos saturados. Tendo em conta a sua composição encontram-se sólidas ou semissólidas à temperatura ambiente.

A composição de ácidos gordos nas gorduras animais depende de vários fatores, tais como a raça, sexo, idade, alimentação e localização anatômica do corte. Na Tabela 2.2 está representada a composição de ácidos gordos (g/100 g de AGL) de diferentes animais (Wood et al., 2008).

*Tabela 2.2. Composição de ácidos gordos no tecido adiposo e músculo de diferentes animais (% m/m).*

Ácido Gordo	Tecido Adiposo			Músculo		
	Suíno	Ovino	Bovino	Suíno	Ovino	Bovino
Ácido Mirístico (14:0)	1,6	4,1	3,7	1,3	3,3	2,7
Ácido Palmítico (16:0)	23,9	21,9	26,1	23,2	22,2	25,0
Ácido Palmítoleico (16:1 cis)	2,4	2,4	6,2	2,7	2,2	4,5
Ácido Esteárico (18:0)	12,8	22,6	12,2	12,2	18,1	13,4
Ácido Oleico (18:1 cis-9)	35,8	28,7	35,3	32,8	32,5	36,1
Ácido Linolelaídico (18:2n-6)	14,3	1,3	1,1	14,2	2,7	2,4
Ácido Alfa-linolénico (18:3n-3)	1,4	1,0	0,5	0,95	1,37	0,70
Ácido Araquidónico (20:4n-6)	0,2	-	-	2,21	0,64	0,63
Ácido Eicosapentaenóico (20:5n-3)	-	-	-	0,31	0,45	0,28

## 2.2 Rações

Na indústria de produção de rações é necessário garantir o conteúdo de proteína das mesmas, assim como os valores energéticos. Deste modo, as gorduras animais são ingredientes indispensáveis nas fórmulas de ração, uma vez que devido ao seu elevado conteúdo energético, garantem um aumento do rendimento nutritivo da ração.

Para além do elevado teor energético, existem outras vantagens para a utilização de gorduras animais, nomeadamente a redução dos custos de produção, a eliminação da pulverulência e a redução do consumo elétrico e desgaste das máquinas.

É necessário garantir a qualidade dos subprodutos utilizados na produção de rações, uma vez que ingredientes de má qualidade geram rações de qualidade inferior que provocam perda de produtividade dos animais. Assim, é necessário realizar uma avaliação detalhada da composição química e microbiológica dos subprodutos (Jardine and Barros; Maciel, 2008; Senegalhe et al., 2014).

## 2.3 Degradação de gorduras

Como já foi dito anteriormente, os ácidos gordos são os constituintes principais das gorduras. Devido a um processamento industrial inadequado da matéria-prima (transporte, armazenamento, etc.), esta pode sofrer processos químicos, de oxidação, hidrólise, hidrogenação ou fermentação, que são responsáveis pela deterioração do produto, uma vez que provocam alterações indesejáveis de cor, sabor, aroma e consistência do mesmo - rancidez. Existem dois tipos de rancidez: hidrolítica e oxidativa (Bellaver and Zanotto, 2004).

Na **rancidez hidrolítica** existe quebra das ligações éster devido à ação de enzima ou agentes químicos. Deste modo, há libertação dos seus constituintes principais - ácidos gordos livres (AGL), que são responsáveis pelo carácter ácido das gorduras. Uma elevada quantidade de ácidos gordos livres, indica que o produto se encontra em deterioração, tornando-se assim, mais ácido. Na Figura 2.4 está representada a reação de hidrólise que leva à formação de ácidos gordos livres (Aditivos e Ingredientes, 2010; FiB, 2014; Senegalhe et al., 2014).

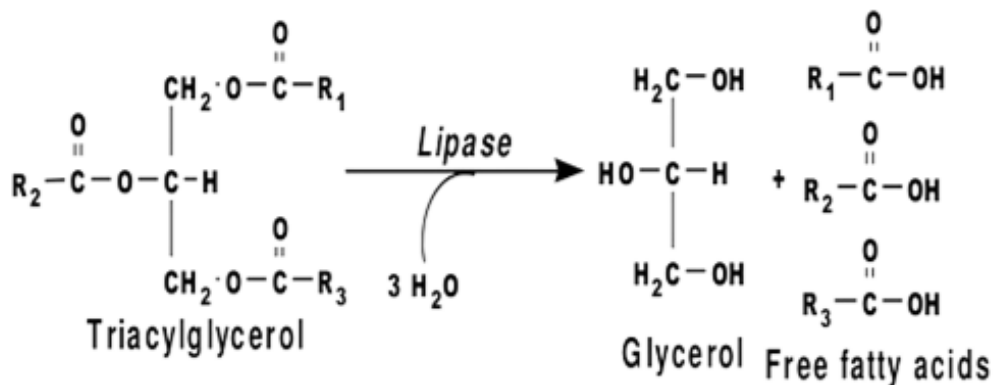
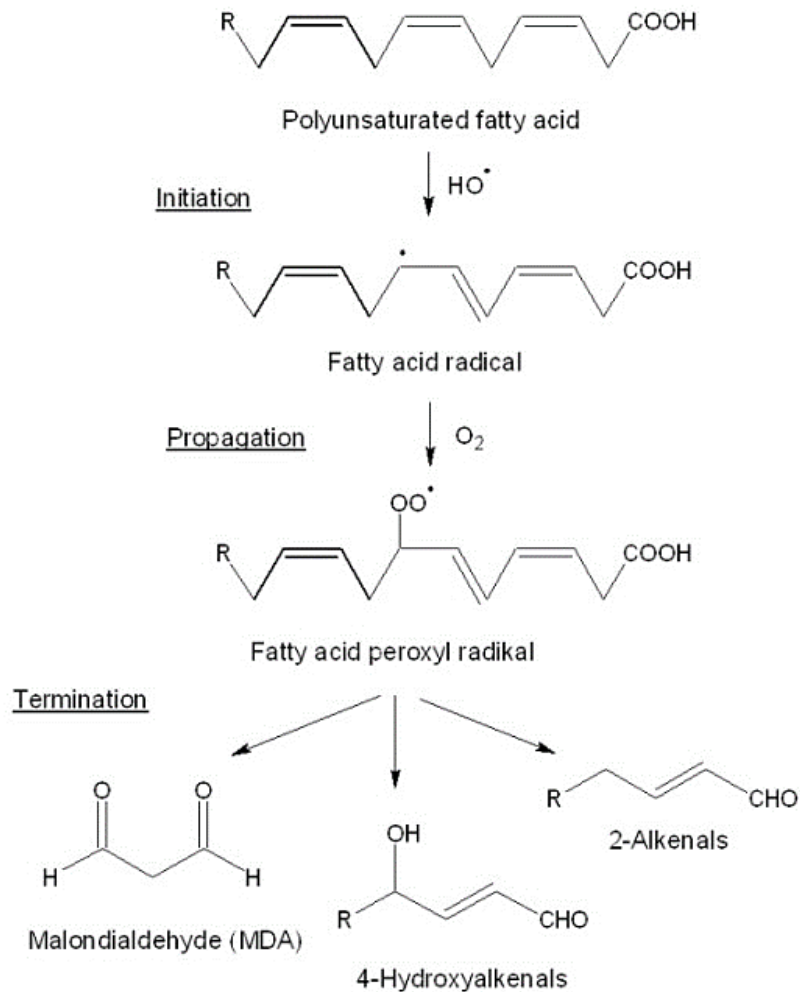


Figura 2.4. Reação de hidrólise responsável pela rancidez hidrolítica (Mehta, 2013).

A **rancidez oxidativa** ocorre em lípidos que apresentam ácidos gordos insaturados ou ácidos gordos insaturados livres. Deste modo, as ligações duplas podem formar radicais livres que reagem com o oxigénio atmosférico levando à formação de outros compostos tais como aldeídos, peróxidos, álcoois, ácidos e cetonas. As reações que provocam este tipo de rancidez são as reações de auto-oxidação e foto-oxidação. Na Figura 2.5 encontra-se representado o mecanismo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados (Aditivos e Ingredientes, 2010; FiB, 2014).

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática



**Figura 2.5.** Mecanismo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados (Schwager, 2015).

Existem diversos fatores que influenciam a decomposição das gorduras tais como a exposição à luz, uma vez que esta acelera as reações de oxidação; a temperatura de armazenamento pois quanto maior a temperatura maior a velocidade de reação; a presença de água, a quantidade de oxigênio presente e a composição da gordura, isto é, o tipo de ácido gordo insaturado e o grau de insaturação têm influência na oxidação. De forma a impedir a deterioração dos produtos devido à oxidação dos mesmos, é usual a adição de antioxidantes, uma vez que são substâncias capazes de adiar, retardar ou até mesmo impedir a degradação das gorduras (Aditivos & Ingredientes, 2010; Silva, 2008).

## **2.4 Esterificação enzimática**

Para aumentar a qualidade das gorduras é necessário encontrar uma forma de estabilizar os ácidos gordos livres presentes nas gorduras. Um dos métodos consiste na transformação dos ácidos gordos livres em compostos mais estáveis, como os ésteres.

A reação de esterificação, tal como o nome indica, é um dos mecanismos de síntese de ésteres, no qual há reação entre um ácido carboxílico e um álcool, com eliminação de água durante o processo.

Na esterificação enzimática são utilizados catalisadores biológicos - enzimas. A síntese enzimática de ésteres apresenta vantagens relativamente ao método convencional - esterificação química, nomeadamente, a reduzida formação de subprodutos e um menor consumo energético, uma vez que há formação do produto a temperaturas mais próximas da temperatura ambiente (Leão, 2009).

### **2.4.1 Enzimas - Lipases**

As enzimas são proteínas, altamente específicas com um elevado poder catalítico. As lipases são enzimas classificadas como hidrolases, uma vez que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis para formar ácidos gordos livres e glicerol. Por outro lado, em meio não aquoso, as lipases catalisam a reação inversa, permitindo assim a obtenção de ésteres. Durante esta reação, há formação de água, sendo que, este parâmetro deve ser controlado de modo a evitar a desativação da enzima e evitar que ocorra a reação de hidrólise (João and Zanella, 2000).

As lipases são muito utilizadas em meio orgânico devido à sua versatilidade catalítica, por não necessitarem de cofatores e por atuarem numa elevada gama de temperatura e pH. Estas enzimas são isoladas de uma variedade de tecidos de plantas e animais. São também produzidas através de fermentação, utilizando várias espécies de fungos e bactérias (Leão, 2009; Richetti, 2009; Tsukamoto, 2006).

### **2.4.2 Parâmetros que influenciam o processo de esterificação**

Existem vários parâmetros que influenciam o processo nomeadamente a temperatura, tipo de álcool e razão mássica álcool:AGL, tipo e quantidade de catalisador, tempo de reação e a agitação reacional.

### **Temperatura**

De um modo geral, quanto maior a temperatura, maior a velocidade de reação, ou seja, maior a quantidade de produto formado em menos tempo. No entanto, é importante ter em atenção a temperatura de ebulição do álcool utilizado na reação de esterificação. Deste modo, a temperatura deve ser inferior à temperatura de ebulição do álcool para evitar a evaporação do mesmo (Marques, 2014).

Deve-se ter em conta também a gama de operação da enzima, uma vez que para temperaturas próximas dos limites de operação da mesma, pode ocorrer a desativação do catalisador que influencia negativamente a produção de ésteres.

### **Tipo de álcool e reação mássica Álcool:AGL**

Os álcoois de cadeia curta, tais como o etanol e o metanol, são os mais utilizados nas reações de esterificação uma vez que permitem obter maiores rendimentos. Devido à toxicidade do metanol, o etanol é o mais adequado para a reação de esterificação de gorduras animais para posterior aplicação em rações animais.

A razão mássica álcool:AGL encontra-se associada ao tipo de catalisador e depende do estado inicial da matéria-prima. Desta forma, razões mássicas muito baixas requerem tempos de reação elevados. No entanto, razões mássicas elevadas torna o processo de separação e recuperação dos produtos mais difícil, diminuindo assim o rendimento da reação e aumentando o custo associado ao processo (Marques, 2014).

### **Tipo e quantidade de catalisador**

O catalisador não interfere no equilíbrio da reação, apenas influencia a velocidade da mesma. O rendimento da reação varia de acordo com o tipo e quantidade de enzima utilizada. No entanto, como os catalisadores biológicos são sensíveis às condições do meio: temperatura, tipo e quantidade de álcool, estes fatores podem levar à inativação do catalisador e à consequente perda de rendimento da reação (Marques, 2014).

### **Tempo de reação**

Tempos de reação elevados levam à diminuição da formação de ésteres, devido à ocorrência da reação inversa - hidrólise.

### **Agitação Reacional**

A agitação influencia a produção de ésteres uma vez que depende diretamente dela o contacto eficiente entre os reagentes e o catalisador. Deste modo, deve-se garantir uma agitação constante ao longo do processo (Marques, 2014).

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Caracterização da amostra

A caracterização da amostra permite obter informações cruciais acerca do estado inicial da gordura e do seu grau de deterioração. Deste modo, a amostra foi analisada de acordo com vários parâmetros físico-químicos tais como, o índice de acidez, índice de iodo, massa volúmica, viscosidade cinemática e teor de humidade.

As amostras disponibilizadas pela *Savinor UTS* encontram-se mencionadas na Tabela 3.1.

*Tabela 3.1. Amostras disponibilizadas pela Savinor UTS.*

Amostra (1 kg)	Data de amostragem/processamento
1	24 de julho de 2015
2	30 de julho de 2015
3	14 de agosto de 2015
4	4 de setembro de 2015
5	23 de setembro de 2015

Todas as amostras apresentavam uma composição 100 % suíno. No entanto, como estas foram recolhidas em datas diferentes, o que tem influência em alguns dos parâmetros acima referidos, procedeu-se à homogeneização das mesmas. Deste modo, garantiu-se a utilização de uma amostra mais uniforme ao longo de todo o trabalho.

#### 3.1.1 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez permite avaliar o estado de conservação da gordura, uma vez que, com o passar do tempo esta pode sofrer processos de oxidação que leva à libertação de ácidos gordos livres (Brasilino, 2010).

Assim, o índice de acidez corresponde à quantidade de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos gordos livres presentes na amostra. Expressa-se em miligramas de hidróxido de potássio por grama de amostra. O índice de acidez foi determinado de acordo com a norma NP EN 14104:2011.

Utilizou-se como titulante uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) que foi preparada dissolvendo 7 g de KOH em 1000 ml de etanol. Para determinar a concentração da

mesma, pesou-se cerca de 0,15 g de ácido benzoico (pureza mínima de 99,9 % (m/m)) e dissolveu-se em cerca de 50 ml de 4-metilpentan-2-ona. Por fim, titulou-se com a solução de KOH e determinou-se a sua concentração através da Equação 1.

$$C_{KOH} = \frac{1000 \times m_0}{122,1 \times V_0} \quad (1)$$

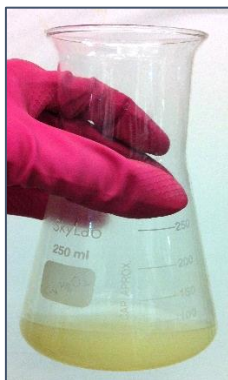
Em que,  $m_0$  corresponde à massa, em gramas de ácido benzoico e  $V_0$  ao volume, em mililitros, da solução de hidróxido de potássio.

Para a determinação do índice de acidez pesou-se para um matraz cerca de 5 g de gordura e adicionou-se aproximadamente 25 ml de uma mistura equimolar de éter dietílico e etanol a 96 % previamente neutralizada com a solução de KOH. De seguida, adicionou-se algumas gotas de fenolftaleína e titulou-se, agitando, com a solução de KOH.

Para determinar o índice de acidez utilizou-se a expressão 2. Na Figura 3.1a) e na Figura 3.1b) encontra-se representada a mistura antes e após a titulação, respetivamente.

$$IA = \frac{56,1 \times V \times c}{m} \quad (2)$$

Em que  $V$  corresponde ao volume, em mililitros, da solução de KOH;  $c$  à concentração, em moles por litro, da solução de KOH e  $m$  à massa, em gramas, da amostra.



a)



b)

**Figura 3.1.** Mistura antes da titulação - a) e no ponto de equivalência - b).

### 3.1.2 Índice de iodo

O índice de iodo é utilizado como uma estimativa do grau de insaturação das gorduras, uma vez que cada ligação dupla existente nos ácidos gordos insaturados, pode reagir com dois átomos de um elemento da família dos halogéneos, neste caso o iodo (Knothe, 2002).

Desta forma, define-se como a massa de halogénio, expressa como iodo, absorvida pela toma de amostra, dividida pela massa da toma de amostra. É expresso em gramas de iodo absorvido por 100 g de amostra de gordura. O índice de iodo foi determinado de acordo com a norma NP EN 14111:2009.

Os reagentes utilizados e o modo de preparação e/ou caracterização dos mesmos encontram-se descritos na Tabela 3.2.

*Tabela 3.2. Reagentes utilizados e o modo de preparação e/ou caracterização dos mesmos.*

Reagente	Modo de preparação
Iodeto de potássio	Solução aquosa a 100 g/l.
Solução de amido	Misturou-se cerca de 5 g de amido solúvel em 30 ml de água e adicionou-se 1000 ml de água a ferver. Levou-se à ebulição durante 3 min.
Tiosulfato de sódio	Solução volumétrica padrão aquosa $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ .
Solvente	Mistura de volumes iguais de ciclohexano e ácido acético glacial.
Reagente de Wijs	Contendo monocloreto de iodo em ácido acético. A razão I/Cl deve encontrar-se dentro dos limites $1,10 \pm 0,1$ .

De modo a determinar o índice de iodo, pesou-se cerca de 0,20 g de gordura para um frasco de vidro escuro de 500 ml. Adicionou-se 20 ml de solvente e 25 ml de reagente de Wijs, agitou-se e deixou-se repousar no escuro cerca de 1 hora. No final da reação, adicionou-se 20 ml de iodeto de potássio e 150 ml água e titulou-se a mistura com a solução padrão de tiosulfato de sódio até ao desaparecimento da cor amarela devido ao iodo. De seguida, adicionou-se algumas gotas de solução de amido e continuou-se a titulação até a cor azul desaparecer após agitação. Paralelamente, preparou-se um branco com o reagente e solvente e repetiu-se o procedimento anteriormente descrito.

Na Figura 3.2a) e Figura 3.2b) encontra-se representado, a mistura antes e após a titulação, respetivamente.



*Figura 3.2. Mistura antes e após a titulação para determinação do índice de iodo.*

Determinou-se o índice de iodo através da Equação 3.

$$WI = \frac{12,69 \times c \times (V_1 - V_2)}{m} \quad (3)$$

Em que  $c$  corresponde à concentração, em moles por litro, da solução de tiosulfato de sódio (titulante);  $V_1$  ao volume, em mililitros, de titulante utilizado no ensaio em branco;  $V_2$  ao volume, em mililitros, de titulante utilizado no ensaio com a amostra e  $m$  à massa, em gramas, de amostra.

### 3.1.3 Massa volúmica

Corresponde à massa, em gramas, no volume de um centímetro cúbico de gordura ou óleo à temperatura de referência. A massa volúmica foi determinada de acordo com a norma NP 938:1988.

Para determinar a massa volúmica da gordura a uma temperatura de referência de 20 °C, realizaram-se quatro pesagens. Inicialmente pesou-se o picnómetro de 50 cm<sup>3</sup> de capacidade vazio, depois o picnómetro cheio com água destilada. Posteriormente, introduziu-se a gordura fundida até ocupar cerca de um terço da capacidade do picnómetro, deixou-se solidificar e pesou-se. Por fim, preencheu-se o picnómetro com água destilada e tornou-se a pesar.

Na Figura 3.3 a), b), c) e d) encontram-se representadas imagens relativas ao procedimento anteriormente descrito.

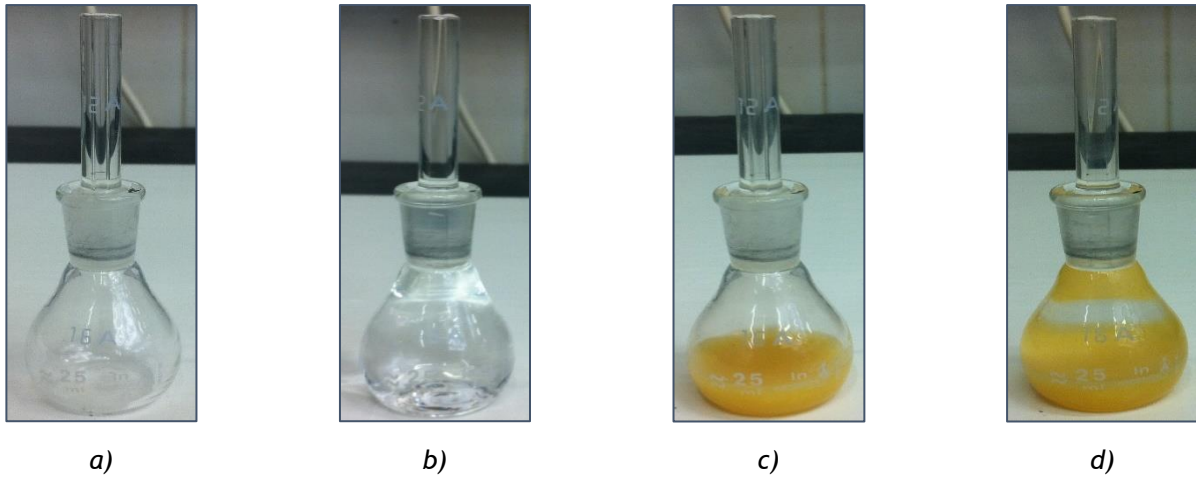


Figura 3.3. Procedimento para determinação da massa volúmica.

A massa volúmica da gordura foi determinada através das equações 4, 5 e 6.

$$A = 0,0012[(m_2 - m_1) - (m_4 - m_3)] \quad (4)$$

$$V_{20} = \frac{(m_2 - m_1) - (m_4 - m_3) + A}{0,99820} \quad (5)$$

$$\rho_{20} = \frac{m_3 - m_1 + A}{V_{20}} \quad (6)$$

Onde  $m_1$  corresponde à massa, em gramas, do picnómetro;  $m_2$  à massa, em gramas, do picnómetro com água destilada;  $m_3$  à massa, em gramas, do picnómetro com a gordura fundida e  $m_4$  à massa, em gramas, do picnómetro com a gordura fundida e água destilada.

#### 3.1.4 Viscosidade Cinemática

A viscosidade cinemática, expressa em  $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , foi determinada de acordo com a norma ISO 3104:1999. Para tal utilizou-se um viscosímetro capilar Cannon-Fenske de 400 mm.

Pipetou-se cerca de 10 ml de gordura fundida para o viscosímetro, mergulhado num banho a 40 °C. Esperou-se cerca de 10 minutos até se atingir o equilíbrio. De seguida, aspirou-se a

gordura até que esta transpusesse a marca 1 referida na Figura 3.4. Por fim, com o auxílio de um cronómetro mediu-se o tempo de escoamento entre os dois traços de referência. Repetiu-se este procedimento três vezes e calculou-se a viscosidade cinemática através da Equação 7.

$$\nu = K(t - G) \quad (7)$$

Em que,  $K$  é a constante do viscosímetro,  $t$  é o tempo de escoamento em segundos e  $G$  é um fator de correlação que tem valor nulo para tempos de escoamento superiores a 280 segundos.

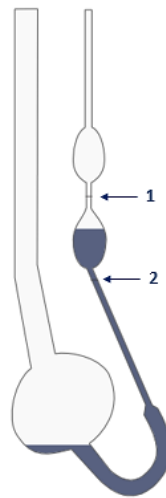


Figura 3.4. Exemplo de um viscosímetro de Cannon-Fenske.

### 3.1.5 Teor de Humidade

O teor de água na gordura é um parâmetro importante a ser controlado, uma vez que, com o excesso de água, pode ocorrer reações de hidrólise, que leva ao aumento dos ácidos gordos livres. O teor de água foi determinado por titulação Karl-Fisher de acordo com a norma ISO 8534:1996.

Adicionou-se o solvente anidro ao equipamento de Karl-Fisher até o eletrodo se encontrar imerso. De seguida, com agitação, juntou-se o reagente de Karl-Fisher até o equipamento indicar o final da titulação. Posteriormente, adicionou-se entre 5 a 10 gramas de amostra ao vaso de reação do equipamento e titulou-se com o reagente de Karl Fisher até se verificar o final da titulação. Determinou-se o teor de água, em percentagem mássica, pela Equação 8.

$$w = \frac{V \times \rho}{m} \times 100 \quad (8)$$

Em que  $V$  corresponde ao volume, em mililitros, do reagente de Karl Fisher,  $\rho$  aos equivalentes de água do reagente de Karl Fisher, expresso em gramas por mililitro e  $m$  à massa, em gramas, de amostra utilizada.

## 3.2 Esterificação Enzimática

### 3.2.1 Procedimento experimental

Inicialmente, pesou-se 10 g de gordura para cada um dos oito frascos, adicionou-se quantidades de enzima e álcool (etanol a 96 %) previamente calculada e a barra magnética. Um exemplo dos cálculos efetuados encontra-se no Anexo 1. Na Figura 3.5 encontra-se representado uma das amostras utilizadas.



Figura 3.5. Amostra utilizada para esterificação enzimática.

De seguida, cobriu-se os frascos com película aderente, rolhou-se e colocaram-se os mesmos no banho termostático com agitação à temperatura de referência. Posteriormente, retiraram-se os frascos a tempos de reação diferentes: 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Na Figura 3.6 encontra-se representada a montagem experimental relativa à fase de reação.



*Figura 3.6. Montagem experimental relativa à fase reacional.*

De seguida, procedeu-se à lavagem e separação por decantação. Assim, colocou-se o conteúdo de cada frasco num funil de decantação, adicionou-se água destilada a cerca de 80 °C, agitou-se e por fim, separou-se a gordura esterificada da fase líquida (água, álcool e enzima). Este procedimento foi repetido três vezes para garantir uma separação adequada dos produtos de reação. A montagem experimental relativa à separação por decantação encontra-se representada na Figura 3.7.



*Figura 3.7. Montagem experimental relativa à separação por decantação.*

Por fim, pesou-se para dois matrizes, uma certa quantidade de gordura esterificada, registou-se os seus valores e mediu-se o seu índice de acidez de acordo com o procedimento descrito no subcapítulo 3.1.1. A montagem experimental relativa à medição do índice de acidez está representada na Figura 3.8.



*Figura 3.8. Montagem experimental relativa à medição do índice de acidez.*

### 3.2.2 Condições de referência

Tendo em conta outros estudos realizados para redução de acidez de gorduras, utilizaram-se as condições ótimas dos mesmos como ponto de partida. No Anexo 1 encontra-se representado um exemplo de cálculo de ambas as razões mássicas. Deste modo, na Tabela 3.3 estão apresentadas as condições de referência utilizadas.

*Tabela 3.3. Condições de referência.*

Condições iniciais	
Temperatura ( °C)	40
Razão EtOH:AGL (m/m)	3,25
Razão enzima:gordura (m/m)	0,0060

### 3.2.3 Seleção do catalisador enzimático

De entre os catalisadores biológicos disponíveis no laboratório, fez-se uma seleção daqueles que seriam adequados para a reação de esterificação. Também se teve em conta na escolha o preço dos mesmos. Uma vez que a enzima imobilizada *Novozym 435* foi a que originou melhores resultados nos estudos realizados anteriormente, foi usada a mesma como referência.

Na Tabela 3.4 encontram-se listados os catalisadores testados, assim como algumas características dos mesmos.

*Tabela 3.4. Características dos diferentes catalisadores enzimáticos disponíveis (Novozymes).*

Enzima	Atividade	Gama de temperatura	Preço
Lecitase Ultra	10 000 LU/g	35-60 °C	17 €/kg
Lipozyme CALB L	5 000 LU/g	30-60 °C	52 €/kg
Lipozyme TL 100 L	100 000 LU/g	20-50 °C	15 €/kg
Novozym 435	10 000 PLU/g	30-60 °C	876 €/kg

Procedeu-se maioritariamente de acordo com o procedimento experimental descrito no subcapítulo 3.2.1, com a diferença que os frascos não foram retirados ao longo dos tempos de reação acima referidos. Assim, para cada enzima testada, fizeram-se quatro experiências, variando o tempo de reação e a quantidade de enzima utilizada. A temperatura e a razão EtOH:AGL usadas foram as de referência descritas na Tabela 3.3. As condições utilizadas para seleção do catalisador enzimático estão representadas na Tabela 3.5.

*Tabela 3.5. Ensaio realizados para determinação do catalisador enzimático.*

Enzima	Tempo de reação	Quantidade de enzima
Lecitase Ultra	120 min	10 µL
		100 µL
	180 min	10 µL
		100 µL
Lipozyme CALB L	120 min	200 µL
		100 µL
	180 min	200 µL
		100 µL

*Tabela 3.5. Ensaios realizados para determinação do catalisador enzimático (continuação).*

Enzima	Tempo de reação	Quantidade de enzima
Lipozyme TL 100 L	120 min	50 µL
		100 µL
	180 min	50 µL
		100 µL
Novozym 435	120 min	0,01 g
	180 min	

### 3.2.4 Otimização das condições de reação

Após a escolha da enzima, realizou-se um ensaio nas condições de referência e partindo destas, variou-se os diferentes parâmetros, um de cada vez, com o objetivo de descobrir as condições ótimas de reação. O primeiro parâmetro a ser variado foi a temperatura. Deste modo, realizou-se vários ensaios a temperaturas diferentes tendo em conta a gama de operação da enzima e a temperatura máxima suportada pelo termostato (50 °C). Estes encontram-se descritos na Tabela 3.6.

*Tabela 3.6. Condições experimentais utilizadas na variação da temperatura.*

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão EtOH:AGL (m/m)	Razão enzima:gordura (m/m)
1	32,5	3,25	0,0060
2	35,0		
3	42,5		
4	45,0		
5	47,5		

Após encontrar a temperatura ótima, utilizou-se esta como nova temperatura de referência e variou-se o parâmetro razão EtOH:AGL. As experiências realizadas encontram-se descritas na Tabela 3.7.

*Tabela 3.7. Condições experimentais utilizadas na variação do parâmetro razão EtOH:AGL.*

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão EtOH:AGL (m/m)	Razão enzima:gordura (m/m)
1	Temperatura ótima	2,44	0,0060
2		4,06	
3		4,88	
4		6,50	

Após encontrar a razão EtOH:AGL, utilizou-se esta como referência e variou-se a razão enzima:gordura. As condições experimentais utilizadas encontram-se na Tabela 3.8.

*Tabela 3.8. Condições experimentais utilizadas na variação dos parâmetros razão enzima:gordura.*

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão EtOH:AGL (m/m)	Razão enzima:gordura (m/m)
1	Temperatura ótima	Razão EtOH:AGL ótima	0,0030
2			0,0048
3			0,0090
4			0,0120

Uma vez que a adição de uma certa quantidade de água ajuda as enzimas a manter a sua conformação o que contribui para a sua funcionalidade, realizaram-se novos ensaios com etanol a 90 % nos quais se variou a Razão EtOH:AGL. Na Tabela 3.9 estão apresentadas as condições utilizadas.

*Tabela 3.9. Condições experimentais utilizadas com etanol a 90%.*

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão EtOH:AGL (m/m)	Razão Enzima:gordura (m/m)
1	Temperatura ótima	2,93	Razão ótima
2		3,58	

### 3.3 Cinética da Reação

Para as experiências realizadas testou-se várias cinéticas sendo estas, de Michaelis-Menten, cinética de primeira ordem e cinética de segunda ordem.

Inicialmente foi necessário converter o índice de acidez para concentração de ácido oleico. Uma vez que o índice de acidez corresponde à percentagem de ácido oleico a multiplicar por um fator de 1,99 utilizou-se a expressão 9 para determinar a concentração de ácido oleico em mol·l<sup>-1</sup>.

$$C_{\text{Ácido Oleico}} = \frac{\frac{IA}{1,99} \times \frac{m}{100}}{M_{\text{Ácido Oleico}} V} \quad (9)$$

Em que,  $IA$  corresponde ao índice de acidez, expresso em mg KOH/g amostra;  $m$  corresponde à massa de amostra, em gramas;  $M_{\text{Ácido Oleico}}$  à massa molar, em g·mol<sup>-1</sup>, do ácido oleico e  $V$  ao volume total da solução (amostra e álcool) em litros.

### 3.3.1 Cinética de Michaelis-Menten

A cinética de Michaelis-Menten é um dos modelos mais conhecidos e adequados para catálise enzimática. O modelo relaciona a velocidade da reação com a concentração de substrato, de acordo com a Equação 10, designada de equação de Michaelis-Menten (Levenspiel et al., 1964).

$$r = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

Em que,  $r$  corresponde à velocidade da reação,  $V_{max}$  à velocidade máxima de reação,  $[S]$  à concentração de substrato e  $K_M$  à concentração para qual a velocidade de reação enzimática é metade da velocidade máxima.

Para o ajuste dos resultados obtidos foi utilizada a Equação 11 que resulta da integração e manipulação da Equação 10 (Levenspiel et al., 1964).

$$\frac{C_{A0} - C_A}{\ln\left(\frac{C_{A0}}{C_A}\right)} = -K_M + V_{max} \frac{t}{\ln\left(\frac{C_{A0}}{C_A}\right)} \quad (11)$$

Em que  $C_A$  corresponde à concentração, em mol·l<sup>-1</sup>, de ácido oleico e  $C_{A0}$  à concentração inicial de ácido oleico, em mol·l<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Cinética de Primeira Ordem

Para uma reação unimolecular irreversível de primeira ordem a velocidade de reação relaciona-se com a concentração através da expressão 12 (Levenspiel et al., 1964):

$$r = kC_A \quad (12)$$

Pela sua integração obtém-se a Equação 13 (Levenspiel et al., 1964):

$$-\ln\left(\frac{C_A}{C_{A0}}\right) = kt \quad (13)$$

Em que  $C_A$  corresponde à concentração, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , de ácido oleico e  $C_{A0}$  à concentração inicial de ácido oleico, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $k$  à constante de velocidade em  $\text{min}^{-1}$  e  $t$  ao tempo em min.

Representou-se graficamente o logaritmo da concentração normalizada em função do tempo e retirou-se o parâmetro cinético.

### 3.3.3 Cinética de Segunda Ordem

Para a cinética de segunda ordem efetuaram-se dois ajustes. Um deles, assumindo uma cinética de segunda ordem apenas em relação ao ácido oleico. No outro ajuste assumiu-se que se tratava de uma cinética de segunda ordem global, no entanto de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes (ácido oleico e etanol).

Para o primeiro caso a velocidade de reação relaciona-se com a concentração através da Equação 14 (Levenspiel et al., 1964).

$$r = kC_A^2 \quad (14)$$

Pela sua integração e manipulação, resulta a expressão 15 (Levenspiel et al., 1964):

$$\frac{1}{C_A} = kt + \frac{1}{C_{A0}} \quad (15)$$

Em que  $C_A$  corresponde à concentração, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , de ácido oleico e  $C_{A0}$  à concentração inicial de ácido oleico, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $k$  à constante de velocidade em  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $t$  ao tempo em min.

Para a cinética de primeira ordem em relação ao ácido oleico e ao etanol foi necessário determinar a concentração de álcool. Uma vez que a reação de esterificação apresenta uma estequiometria de 1:1, as quantidades de álcool e ácido oleico consumidas para um determinado tempo são iguais. Desta forma, uma vez que o volume reacional permanece constante, calculou-se a concentração de álcool a partir da Equação 16.

$$C_B = C_{B0} - (C_{A0} - C_A) \quad (16)$$

Em que  $C_{B0}$  e  $C_B$  corresponde, respetivamente, à concentração, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , de etanol inicial e ao longo do tempo e  $C_{A0}$  e  $C_A$  corresponde, respetivamente, à concentração, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , de ácido oleico inicial e para um determinado tempo de reação.

A velocidade da reação relaciona-se com as concentrações de ambos através da Equação 17 (Levenspiel et al., 1964):

$$r = kC_A C_B \quad (17)$$

Através da integração e manipulação obtém-se a expressão 18 (Levenspiel et al., 1964):

$$\ln\left(\frac{C_B}{C_A}\right) = (C_{B0} - C_{A0})kt + \ln\left(\frac{C_{B0}}{C_{A0}}\right) \quad (18)$$

Em que  $C_A$  e  $C_B$  correspondem à concentração, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , de ácido oleico e etanol, respetivamente;  $C_{A0}$  e  $C_{B0}$  à concentração inicial de ácido oleico e etanol, respetivamente, em  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $k$  à constante de velocidade em  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $t$  ao tempo em min.

### 3.3.4 Energia de Ativação

A energia de ativação é determinada a partir da equação de Arrhenius (Equação 19) (Levenspiel et al., 1964):

$$k = k_0 e^{-E/RT} \quad (19)$$

Linearizando a Equação 19 obtém-se a Equação 20:

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E}{RT} \quad (20)$$

Em que  $k$ , corresponde à constante cinética e  $k_0$  ao fator pré-exponencial, ambos com unidades de  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $E$  corresponde à energia de ativação em  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $R$  à constante dos gases perfeitos ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e  $T$  à temperatura em  $\text{K}^{-1}$ .

Após a determinação da cinética que melhor ajustava os resultados experimentais, determinou-se os valores das constantes cinéticas a várias temperaturas. Representou-se graficamente o logaritmo das mesmas em função do inverso da temperatura e determinaram-se os respectivos parâmetros de Arrhenius.

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterização da amostra

A amostra foi caracterizada de acordo com vários parâmetros, tais como índice de acidez, índice de iodo, massa volúmica, viscosidade cinemática e teor de humidade. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.1

*Tabela 4.1. Resultados dos vários parâmetros de caracterização da amostra.*

Caracterização da amostra	
Índice de acidez (mg KOH/g amostra)	4,43
Índice de iodo (g/100 g amostra)	94,5
Massa volúmica a 20 °C (g/cm <sup>3</sup> )	0,920
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm <sup>2</sup> /s)	49,8
Teor de humidade (%)	0,15

O índice de acidez obtido é relativamente baixo, cerca de 4,43 mg KOH/g amostra, valor este que se encontra dentro dos limites impostos pela *Savinor UTS* para venda.

O índice de iodo é uma medida do grau de insaturação das gorduras. Segundo O'Brien o índice de iodo da gordura de suíno varia entre 45-70 g/100 g amostra. O valor obtido é superior, resultado este que evidencia alguma degradação da gordura.

Os valores obtidos para a massa volúmica e a viscosidade cinemática encontram-se dentro do esperado uma vez que estas propriedades dependem essencialmente da composição da gordura.

O teor de humidade é baixo, como expectável, uma vez que as gorduras são compostos hidrofóbicos, e também pelo facto de a água ter sido removida durante o processo de obtenção da gordura.

### 4.2 Perfil de Glicerídeos e Composição em Ácidos Gordos

Com a cooperação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, foi feita uma caracterização adicional ao nível do teor de matéria insaponificável, perfil de glicerídeos e composição em ácidos gordos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** *Insaponificável, perfil de glicerídeos e composição em ácidos gordos para gorduras de mamíferos, aves e peixes.*

	Mamíferos		Aves		Peixes	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
<b>Insaponificável ISO 3596</b> (g/100 g)	1,3	0,1	2,2	0,2	1,8	0,1
<b>Perfil de Glicerídeos ISO 18695</b> (% relativa)						
Triglicerídeos	93,0	0,7	91,6	0,9	88,9	0,4
Monoglicerídeos	3,8	0,2	3,7	0,6	3,8	0,1
Ácidos Gordos Livres	3,2	0,5	4,6	0,3	7,4	0,5
<b>Composição em Ácidos Gordos ISO 12966</b> (g ácidos gordos / 100g de ácidos gordos)						
<b>C14:0</b>	1,6	0,1	0,5	0,0	4,1	0,1
<b>C16:0</b>	23,0	0,9	20,7	0,2	18,6	0,3
<b>C18:0</b>	14,2	0,2	5,9	0,1	4,9	0,0
<b>C20:0</b>	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
<b>Total saturados</b>	<b>39,8</b>	<b>0,9</b>	<b>27,6</b>	<b>0,2</b>	<b>30,4</b>	<b>0,5</b>
<b>C16:1</b>	2,9	0,1	4,9	0,1	5,3	0,1
<b>C18:1</b>	36,7	0,5	34,7	0,2	13,3	0,1
<b>C20:1</b>	0,7	0,0	0,3	0,0	1,9	0,0
<b>Total monoinsaturados</b>	<b>43,9</b>	<b>0,6</b>	<b>41,8</b>	<b>0,1</b>	<b>26,9</b>	<b>0,1</b>
<b>C18:2</b>	11,9	0,2	26,3	0,1	2,1	0,0
<b>C18:3</b>	0,7	0,0	2,3	0,0	0,8	0,0
<b>C20:2</b>	0,5	0,0	0,2	0,0	0,4	0,0
<b>C20:4</b>	0,6	0,0	0,6	0,0	1,8	0,0
<b>C20:5</b>	-		-		9,6	0,1
<b>C22:5n3</b>	0,1	0,0	0,1	0,0	1,7	0,0
<b>C22:6n3</b>	0,1	0,0	0,1	0,0	20,5	0,4
<b>Total polinsaturados</b>	<b>14,2</b>	<b>0,3</b>	<b>29,8</b>	<b>0,1</b>	<b>40,0</b>	<b>0,3</b>
<b>Total trans</b>	<b>1,7</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,2</b>

A gordura de mamíferos apresenta um maior teor em ácidos gordos saturados e monoinsaturados, característica esta das gorduras de origem animal. No caso, do óleo de peixe, seria de esperar uma composição em ácidos gordos polinsaturados elevada, o que se verifica. A gordura de aves apresenta uma composição intermédia entre a gordura de mamíferos e o óleo de peixe nos diferentes ácidos gordos que a constituem.

### 4.3 Escolha do catalisador enzimático

Para seleção do catalisador mais adequado, foram realizadas experiências com diversas enzimas, para dois tempos de reação diferentes: 3 horas e 2 horas. Inicialmente fez-se os ensaios para um tempo de reação superior para verificar que enzima permitia obter uma redução do índice de acidez superior. No entanto, como para tempos longos de reação por vezes pode ocorrer a reação de hidrólise, fez-se posteriormente um ensaio a um tempo de reação inferior.

As enzimas testadas foram a *Novozym 435*, *Lecitase Ultra*, *Lipozyme CALB L* e *Lipozyme TL 100 L*. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.3.

*Tabela 4.3. Resultados obtidos para seleção do catalisador enzimático*

	Tempo de Reação de 3 horas		Tempo de Reação de 2 horas	
	IA Inicial (mg <sub>KOH</sub> /g <sub>amostra</sub> )	4,4	IA Inicial (mg <sub>KOH</sub> /g <sub>amostra</sub> )	4,5
	IA Final (mg <sub>KOH</sub> /g <sub>amostra</sub> )	Redução IA (%)	IA Final (mg <sub>KOH</sub> /g <sub>amostra</sub> )	Redução IA
<b>Novozym 435</b>				
0,01 g	3,2	27 %	3,4	24 %
<b>Lecitase Ultra</b>				
100 µL	4,0	10 %	4,1	9 %
10 µL	4,3	2 %	4,0	10 %
<b>Lipozyme CALB L</b>				
100 µL	1,6	64 %	1,5	68 %
200 µL	1,2	72 %	1,5	67 %
<b>Lipozyme TL 100 L</b>				
100 µL	10,9	-146 %	10,5	-133 %
50 µL	6,9	-55 %	8,5	-90 %

A enzima *Novozym 435* originou uma redução de 24 % do IA para um tempo de 2 horas. Para um tempo de reação de 3 horas a redução do índice de acidez aumenta ligeiramente, atingindo o valor de 27 %.

A *Lecitase Ultra* obteve, para um volume de 10 µL, uma redução de 10 % do índice de acidez inicial para um tempo de reação de 2 horas. No entanto, prolongando o tempo de reação até 3 horas, verificou-se que a redução do índice de acidez diminuiu para 2 % o que indica que a enzima começou a catalisar a reação inversa levando à formação de ácidos gordos livres. Para um volume de 100 µL, verificou-se uma redução do índice de acidez de 9 % e 10 % para tempos

de reação de 2 horas e 3 horas respetivamente. Este pequeno aumento da redução do índice de acidez pode indicar a ocorrência de ambas as reações, direta e inversa, em simultâneo.

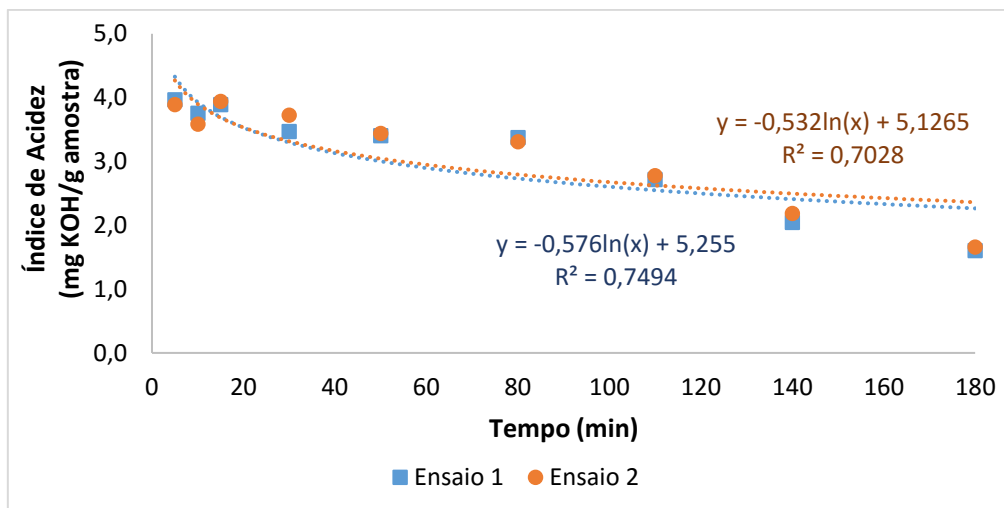
A *Lipozyme CALB L* alcançou os melhores resultados, permitindo obter reduções de acidez na gama dos 60-70 %. No entanto, para a experiência realizada com um volume de enzima de 100 µL, verificou-se um aumento do índice de acidez ao longo do tempo.

Por fim, a *Lipozyme TL 100 L* catalisou a reação de hidrólise, aumentando assim o seu índice de acidez inicial. Para um volume de enzima de 100 µL, pelos resultados obtidos, verificou-se que a enzima catalisou sempre a reação inversa. No entanto, para um volume de enzima de 50 µL, verificou-se que, em algum momento da reação, a enzima voltou a catalisar a reação direta - esterificação, obtendo-se assim um índice de acidez inferior ao obtido para as duas horas de reação. Apesar de catalisar novamente a reação direta o índice final obtido é o dobro do índice de acidez inicial, pelo que a enzima não é apropriada para a reação.

Para finalizar, apesar de as enzimas em estudo serem todas adequadas para a esterificação de ácidos gordos, nem todas permitiram obter os resultados desejados. Isto deve-se ao facto de as enzimas serem muito seletivas e sensíveis em relação às condições do meio no qual estão inseridas. Assim, a enzima que se adaptou melhor ao meio e que permitiu obter melhores resultados foi a *Lipozyme CALB L*, sendo esta o catalisador selecionado para a reação de esterificação no restante estudo.

#### **4.4 Ensaio nas condições de referência**

Inicialmente testou-se a redução do índice de acidez para as condições de referência: temperatura de 40 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.1 e na Tabela 4.4.



**Figura 4.1.** Variação do índice de acidez ao longo do tempo para as condições de referência: 40 °C, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m.

**Tabela 4.4.** Resultados obtidos para o ensaio de referência: 40 °C, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m.

Ensaio nas condições de referência	
Índice de acidez inicial (mg KOH/ g amostra)	4,3
Índice de acidez final (mg KOH/ g amostra)	1,6
Redução do IA (%)	62

Pela análise da Figura 4.1 verificou-se que os resultados obtidos para os dois ensaios são concordantes. As condições de referência utilizadas permitiram reduzir 62 % do índice de acidez inicial, resultados estes bastante satisfatórios tendo em conta que este é apenas o ensaio inicial.

## 4.5 Efeito da temperatura

Foram testadas diversas temperaturas para o estudo da redução do índice de acidez, nomeadamente 32,5 °C, 35,0 °C, 42,5 °C, 45,0 °C e 47,5 °C, mantendo constante a razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.2 e na Tabela 4.5.

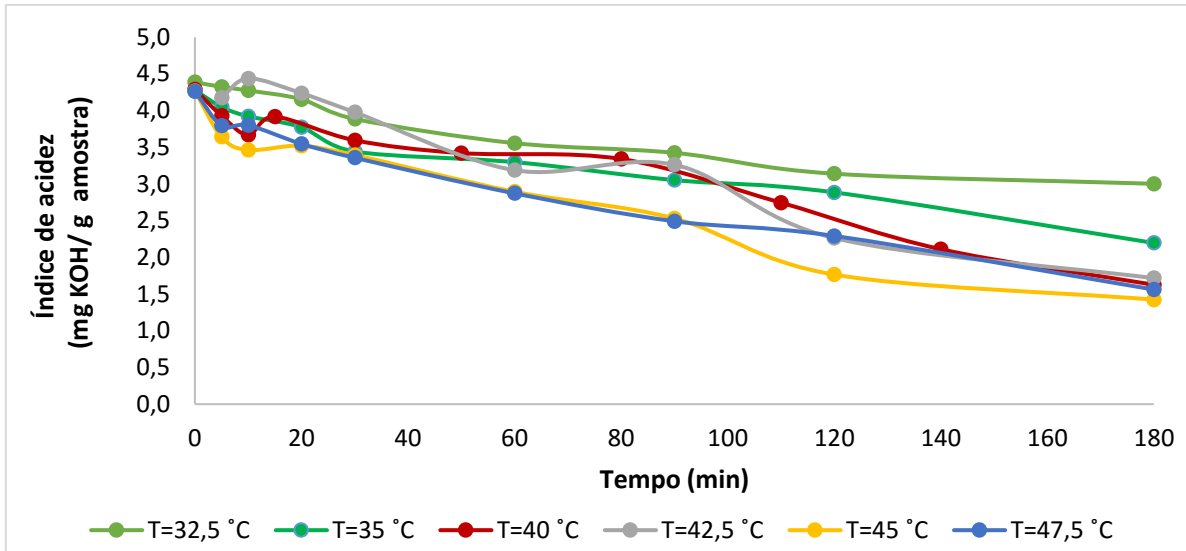


Figura 4.2. Variação do índice de acidez em função do tempo para as diferentes temperaturas, razão EtOH:AGL de 3,25 m/m e a razão enzima:gordura de 0,0060 m/m.

Tabela 4.5. Redução do índice de acidez na gordura das experiências realizadas a diferentes temperaturas.

Temperatura	Redução do Índice de Acidez
32,5 °C	32 %
35,0 °C	49 %
40,0 °C	62 %
42,5 °C	62 %
45,0 °C	67 %
47,5 °C	63 %

Seria de esperar que a redução do índice de acidez aumentasse com a temperatura, uma vez que a velocidade de reação aumenta. No entanto, pela análise da Tabela 4.5 verificou-se que para a temperatura mais elevada (47,5 °C) não se obteve a redução do índice de acidez mais elevada. Isto significa que, possivelmente, para esta temperatura a enzima desnaturou, ou seja, perdeu parte da sua atividade enzimática. No entanto, obteve-se uma redução superior à obtida no ensaio de referência, nomeadamente uma redução de 63 %.

Para a temperatura mais baixa em estudo (32,5 °C) a redução do índice de acidez foi de apenas 32 %. Esta pequena redução pode também dever-se ao facto de a temperatura se encontrar próximo dos limites de operação da enzima (30 °C), o que pode levar à perda da sua atividade.

Para a experiência realizada à temperatura de 42,5 °C obteve-se a mesma redução do índice de acidez que no ensaio de referência, sendo este de 62 %.

Por fim obteve-se a maior redução do índice de acidez para a experiência realizada a 45 °C, cerca de 67 %. Deste modo, passou a ser utilizada a temperatura ótima como nova temperatura de referência para as experiências seguintes, nomeadamente, variação da razão mássica EtOH:AGL, razão mássica Enzima:gordura e nos ensaios realizados com etanol a 90 %.

#### 4.6 Efeito da Razão Mássica EtOH:AGL

Testaram-se várias razões mássicas EtOH:AGL para o estudo da redução do índice de acidez, nomeadamente 2,44, 4,06, 4,88 e 6,50 m/m mantendo constante a temperatura de 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.3 e na Tabela 4.6.

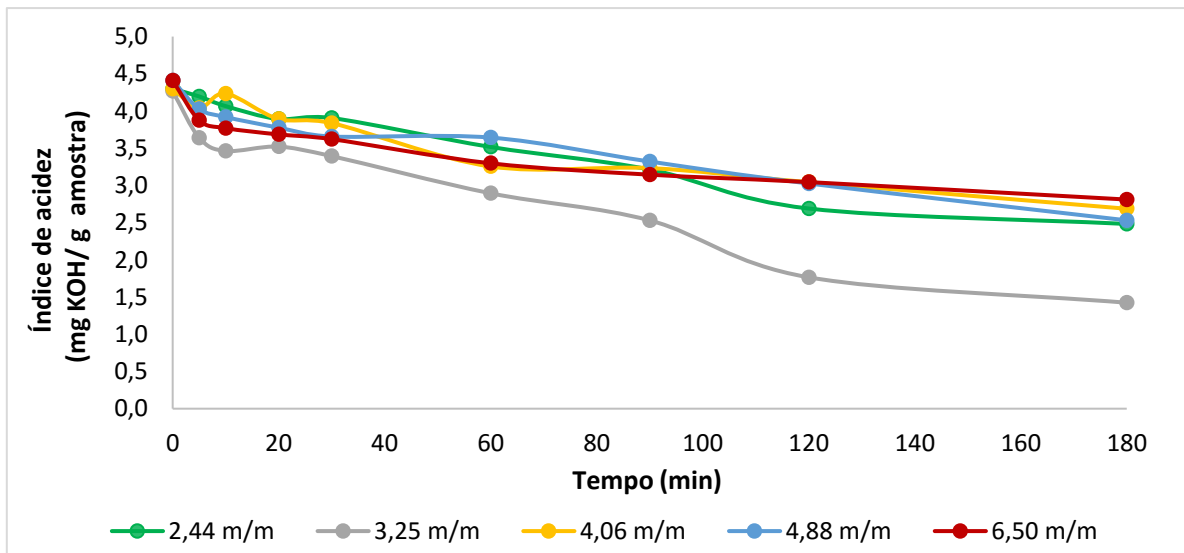


Figura 4.3. Variação do índice de acidez em função do tempo para diferentes razões mássicas EtOH:AGL, a 45 °C e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m.

Tabela 4.6. Redução do índice de acidez da gordura nas experiências realizadas a diferentes razões mássicas EtOH:AGL, a 45 °C e razão enzima:gordura de 0,0060 m/m.

Razão mássica EtOH:AGL	Redução do Índice de Acidez
2,44 m/m	42 %
3,25 m/m	67 %
4,06 m/m	38 %
4,88 m/m	43 %
6,50 m/m	36 %

Pela análise da Figura 4.3 e da Tabela 4.6 verificou-se que a razão ótima é a razão mássica de referência (3,25 m/m), razão esta que corresponde à utilização da quantidade de álcool estequiométrica.

Para uma razão mássica de 2,44 m/m, obteve-se uma redução do índice de acidez de 42 %. Esta razão corresponde a menos 25 % da quantidade de álcool relativamente à quantidade estequiométrica. Deste modo, a quantidade de álcool fornecida para a reação não foi suficiente. Analisando os resultados obtidos para a razão 2,44 m/m na Figura 4.3, é possível observar que a partir dos 120 minutos se obteve praticamente um patamar o que possivelmente indica que o álcool foi consumido na totalidade.

Para as razões de 4,06, 4,88 e 6,50 m/m, obtiveram-se reduções de 38 %, 43 % e 36 %, respetivamente, o que indica que a reação se torna mais lenta para quantidades de álcool elevadas. Uma vez que o etanol é utilizado para precipitar enzimas, e as razões acima referidas correspondem todas a condições em excesso de álcool, as reduções baixas de índice de acidez obtidas possivelmente devem-se ao fenómeno de precipitação de enzimas.

#### 4.7 Efeito da Razão Mássica Enzima:gordura

Foram realizadas experiências para diferentes razões mássicas enzima:gordura de 0,0030, 0,0048, 0,0090 e 0,0120 m/m mantendo constante a temperatura de 45 °C e a razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.4 e na Tabela 4.7.

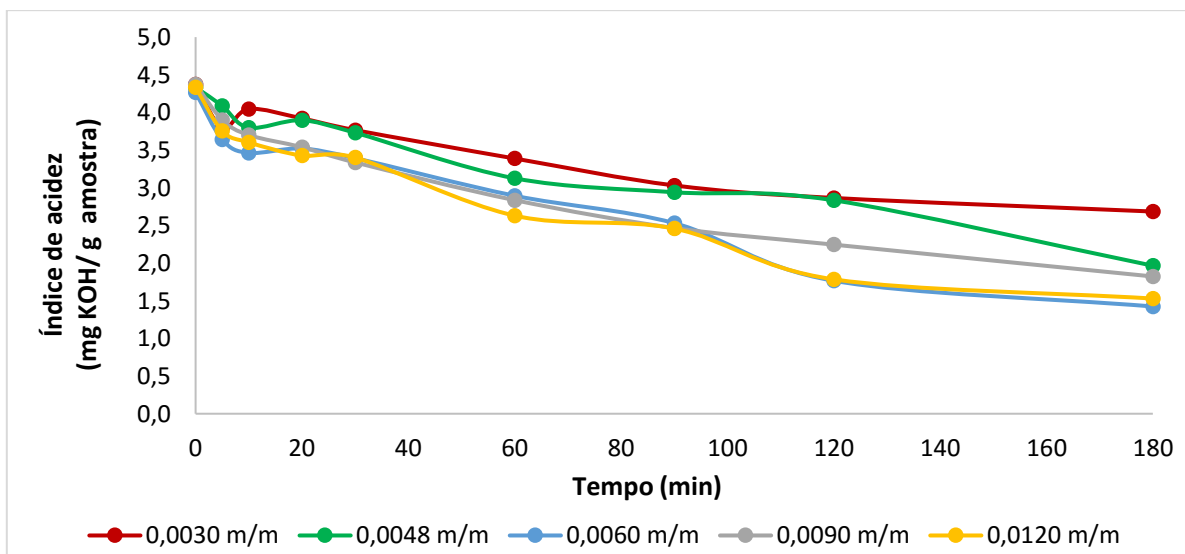


Figura 4.4. Variação do índice de acidez em função do tempo para diferentes razões mássicas enzima:gordura, a 45 °C e razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m.

**Tabela 4.7.** Redução do índice de acidez da gordura nas experiências realizadas a diferentes razões mássicas enzima:gordura, a 45 °C e razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m.

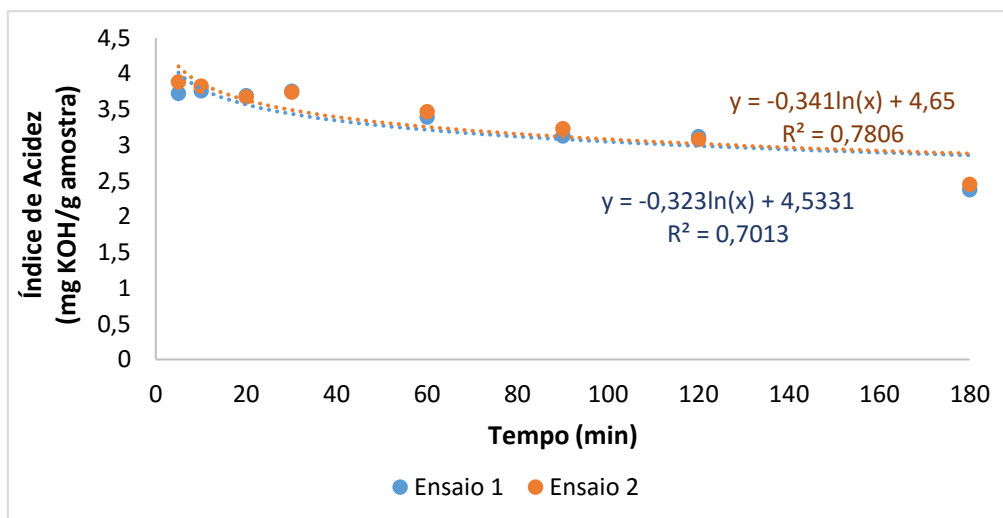
Razão mássica enzima:gordura	Redução do Índice de Acidez
0,0030 m/m	39 %
0,0048 m/m	55 %
0,0060 m/m	67 %
0,0090 m/m	58 %
0,0120 m/m	65 %

Pela análise dos resultados obtidos a razão mássica enzima:gordura que permitiu uma maior redução do índice de acidez foi a razão de referência 0,0060 m/m.

Seria de esperar que para quantidades superiores de enzima se obtivesse uma redução do índice de acidez superior. No entanto, para razões mássicas enzima:gordura de 0,0090 m/m e 0,0120 m/m obtiveram-se reduções de IA de 58 % e 65 % respetivamente. Estes valores podem indicar que, apesar de existir excesso de enzima, consumiu-se o substrato na totalidade.

#### 4.8 Utilização de Etanol a 90 %

Por fim, foram realizadas duas experiências na qual se utilizou etanol a 90 % para duas razões mássicas EtOH:AGL, 2,93 e 3,58 m/m, mantendo constante a temperatura de 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.5, Figura 4.6 e Tabela 4.8.



**Figura 4.5.** Variação do índice de acidez em função do tempo para uma razão EtOH:AGL de 2,93 m/m, 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m.

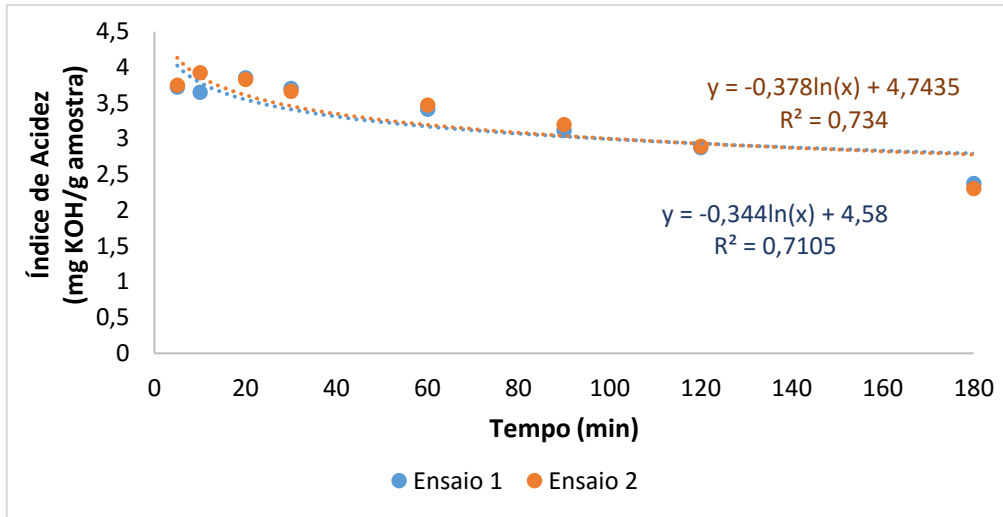


Figura 4.6. Variação do índice de acidez em função do tempo para uma razão EtOH:AGL de 3,58 m/m, a 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m.

Tabela 4.8. Redução do índice de acidez da gordura nas experiências realizadas com etanol a 90 %, a 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m.

Razão mássica EtOH:AGL	Redução do Índice de Acidez
2,93 m/m	44 %
3,58 m/m	46 %

Ao utilizar o etanol a 90 %, aumenta-se a quantidade de água no sistema. A adição de água ao processo por vezes contribui para o aumento do rendimento da reação, uma vez que a enzima necessita de uma certa quantidade de água para manter uma conformação cataliticamente ativa. No entanto pela análise dos resultados obtidos verificou-se que para ambas as razões mássicas EtOH:AGL, 2,93 e 3,58 m/m, obteve-se uma redução do índice de acidez de 44 % e 46 % respetivamente. Como o catalisador enzimático é sensível a variações do meio, a adição de água ao sistema reacional pode levar à ocorrência de reações secundárias de hidrólise.

## 4.9 Condições ótimas

Após a realização de todas estas experiências, verificou-se que se obtém uma maior redução do índice de acidez, nomeadamente 67 %, para as seguintes condições: temperatura de 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de enzima:gordura de 0,0060 m/m. Na Figura 4.7 encontra-se representada a variação do índice de acidez ao longo do tempo para as condições ótimas.

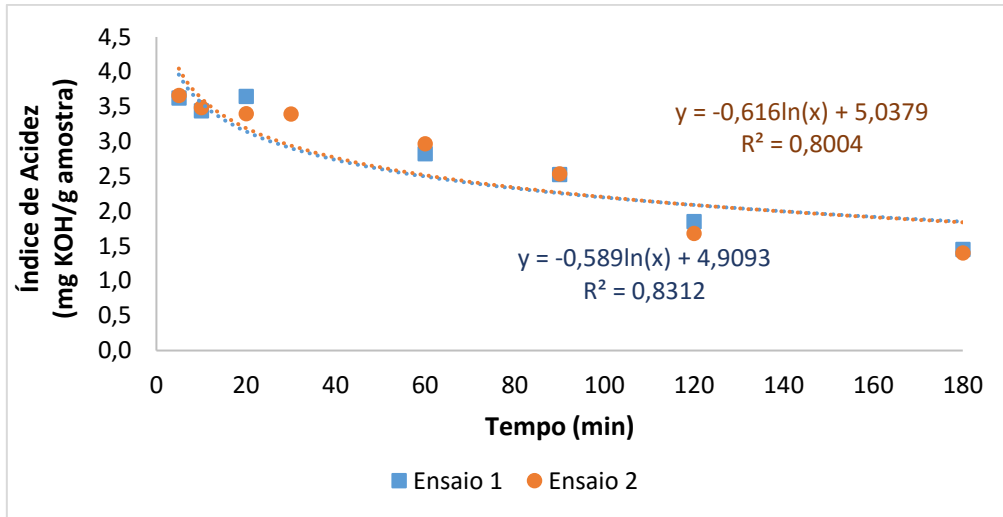


Figura 4.7. Redução do índice de acidez em função do tempo para as condições ótimas de reação: 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de Enzima:gordura de 0,0060 m/m.

#### 4.10 Cinética da Reação

Para as experiências realizadas, ajustaram-se os resultados obtidos a várias cinéticas com o objetivo de determinar qual seria a mais adequada. Testou-se cinética de primeira ordem, segunda ordem global e Michaelis-Menten. No Anexo 3 estão representados os ajustes cinéticos para o ensaio 1 das diversas experiências realizadas. Na Figura 4.8 encontra-se representado o ajuste dos resultados a uma cinética de primeira ordem para o ensaio 1 realizado nas condições ótimas de operação: temperatura de 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de enzima:gordura de 0,0060 m/m.

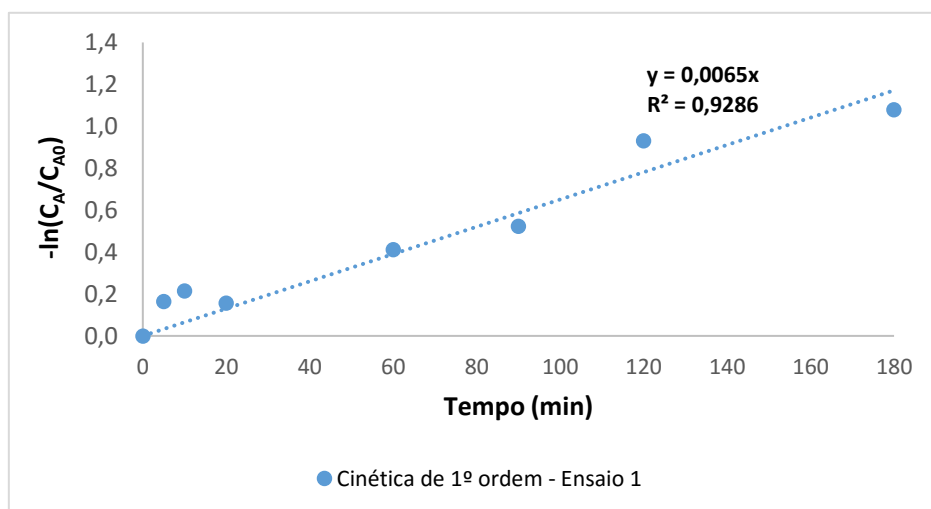


Figura 4.8. Ajuste dos resultados a uma cinética de primeira ordem.

Na Figura 4.9 encontra-se representado o ajuste dos resultados a uma cinética de segunda ordem em relação ao ácido oleico para o ensaio 1 realizado nas condições ótimas de operação: temperatura de 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de enzima:gordura de 0,0060 m/m.

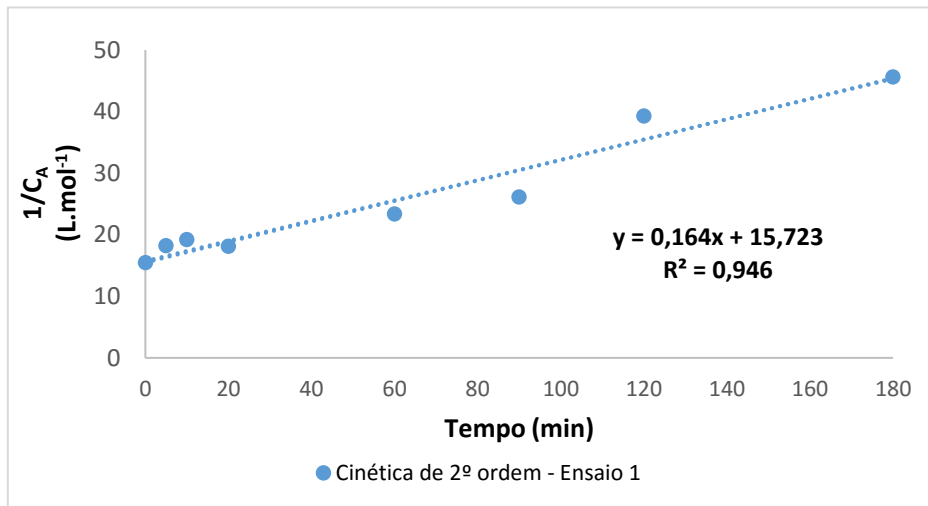


Figura 4.9. Ajuste dos resultados a uma cinética de segunda ordem em ácido oleico.

Na Figura 4.10 encontra-se representado o ajuste dos resultados a uma cinética de Michaelis-Menten para o ensaio 1 realizado nas condições ótimas de operação: temperatura de 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de enzima:gordura de 0,0060 m/m.

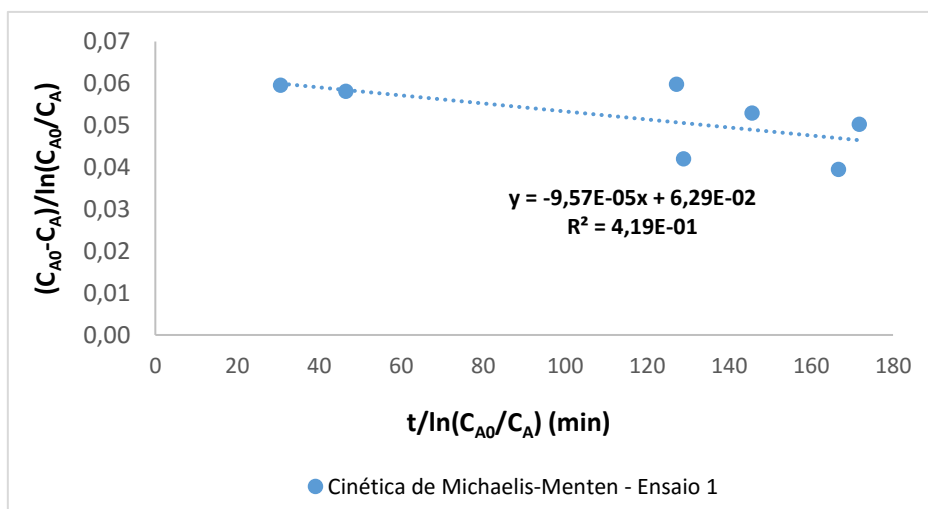


Figura 4.10. Ajuste dos resultados a uma cinética de Michaelis-Menten.

Na Figura 4.11 encontra-se representado o ajuste dos resultados a uma cinética de segunda ordem global, mas de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes (ácido oleico e etanol) para o ensaio 1 realizado nas condições ótimas de operação: temperatura de 45 °C, razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e razão mássica de enzima:gordura de 0,0060 m/m.

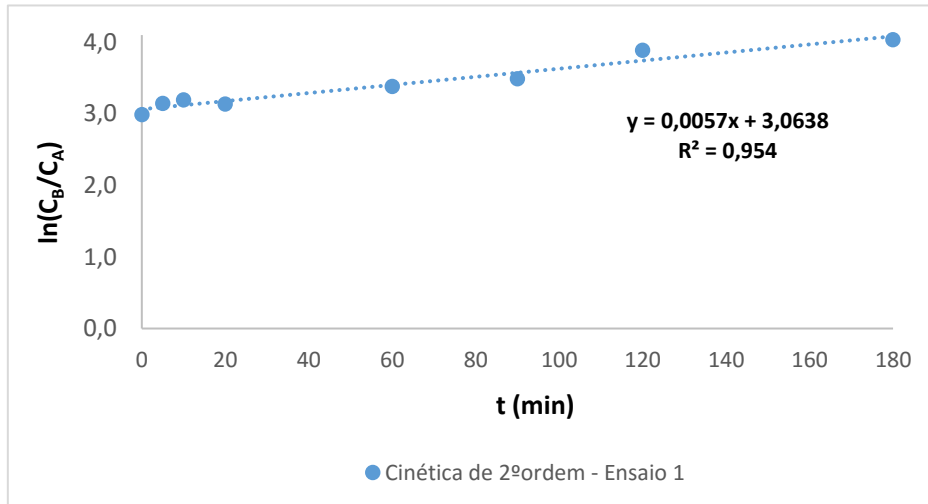


Figura 4.11. Ajuste dos resultados a uma cinética de segunda ordem global (primeira ordem em relação a cada um dos reagentes, ácido oleico e etanol).

Através do declive e da ordenada na origem das equações dos ajustes realizados para os diferentes modelos cinéticos é possível obter os parâmetros cinéticos característicos de cada modelo. Na Tabela 4.9 encontram-se representados os parâmetros obtidos para os diferentes modelos cinéticos.

Tabela 4.9. Parâmetros Cinéticos para os diferentes modelos testados.

	Parâmetro Cinético	
	<b>Cinética de Michaelis-Menten</b>	$K_M$ (mol·l <sup>-1</sup> )
	$V_{MAX}$ (mol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	-9,57×10 <sup>-5</sup>
<b>Cinética de primeira ordem</b>	$k_{app}$ (min <sup>-1</sup> )	0,065
<b>Cinética de segunda ordem global</b>		
$r = kC_A^2$	$k_{app}$ (l·mol <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	0,164
$r = kC_A C_B$	$k_{app}$ (l·mol <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	0,0047

Apesar da cinética de Michaelis-Menten ser o modelo característico da catálise enzimática, pela análise da Figura 4.10 verificou-se que este modelo não ajusta adequadamente os resultados experimentais obtidos.

Pela análise da Figura 4.8 verificou-se que a cinética de primeira ordem, não é apropriada, uma vez que não ajusta adequadamente os pontos iniciais.

Através da análise da Figura 4.9 e da Figura 4.11, apesar de ambos os modelos cinéticos de segunda ordem apresentarem um valor de  $R^2$  elevado, verificou-se que o modelo de segunda ordem global, mas de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes é o que ajusta melhor os resultados experimentais. No entanto, fez-se uma análise estatística dos dados a ambos os modelos de segunda ordem para confirmar qual ajustava melhor os resultados experimentais. No Anexo 4 estão representados os resultados estatísticos completos para os dois modelos em estudo. Na Tabela 4.10 estão representados os valores de F de significância e Valor P obtidos para ambos os modelos.

*Tabela 4.10. Resultados estatísticos.*

Cinética de segunda ordem global	Resultados Estatísticos	
	F de significância	Valor P
$r = kC_A^2$	$5,1 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$
$r = kC_A C_B$	$3,1 \times 10^{-5}$	$5,6 \times 10^{-10}$

Quanto menores os valores de F de significância e Valor P melhor o ajuste dos valores experimentais ao modelo cinético. Deste modo, confirma-se que o modelo mais adequado para representar os resultados obtidos é o modelo cinético de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes (segunda ordem global).

#### 4.11 Determinação da energia de ativação

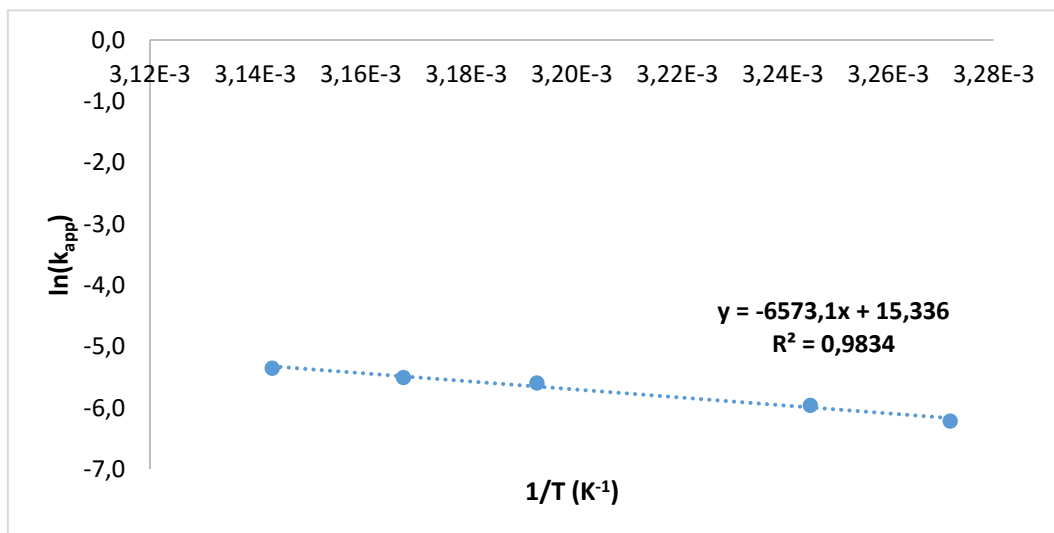
Após definir o modelo cinético mais apropriado procedeu-se à determinação da energia de ativação para a reação. Para tal, foi necessário determinar os valores das constantes de velocidade a diversas temperaturas. Na Tabela 4.11 encontram-se evidenciados os valores das constantes cinéticas obtidas para as diferentes temperaturas.

**Tabela 4.11.** Constantes cinéticas obtidas para as várias temperaturas.

Temperatura (°C)	$k_{app}$ (l·mol <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )
32,5	0,0017
35,0	0,0026
40,0	0,0037
42,5	0,0041
45,0	0,0047
47,5	0,0041

Quanto maior a temperatura, maior o valor da constante cinética. No entanto, para a temperatura de 47,5 °C verificou-se que o valor da constante cinética diminuiu. Como já foi explicado anteriormente, tal deve-se provavelmente ao facto de a enzima perder a sua atividade a esta temperatura. Deste modo, este valor não foi utilizado para determinação da energia de ativação.

Representou-se o logaritmo das constantes cinéticas em função do inverso da temperatura, como se pode observar na Figura 4.12.



**Figura 4.12.** Representação do  $\ln(k_{app})$  em função  $1/T$ .

Pelo declive da reta determinou-se a energia de ativação e pelo valor da ordenada na origem o valor do fator pré-exponencial. Na Tabela 4.12 encontram-se representados os valores dos parâmetros de Arrhenius obtidos.

**Tabela 4.12.** Valores de energia de ativação e fator pré exponencial, obtidos experimentalmente.

Parâmetros de Arrhenius	
$E_a$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	54,7
$k_0$ (l·mol <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	4,6×10 <sup>6</sup>

Num estudo cinético de esterificação do ácido oleico utilizando lipases como catalisador obteve-se uma energia de ativação de 22,4 kJ·mol<sup>-1</sup> (Mahmud et al., 2009). No entanto, a reação obedecia a uma cinética de Michaelis-Menten.

Para a reação de esterificação a partir do ácido oleico e álcool oleílico, utilizando como catalisador uma lipase imobilizada (*Candida Antartica*), obteve-se uma energia de ativação de 91,1 kJ·mol<sup>-1</sup>, para um mecanismo reversível de segunda ordem (Radzi et al., 2010).

O valor de energia de ativação obtido - 55,7 kJ·mol<sup>-1</sup> é ligeiramente diferente dos valores referidos anteriormente. No entanto, o mecanismo de reação corresponde a uma cinética de segunda ordem global, de primeira ordem em relação ao ácido oleico e ao etanol. As condições do meio reacional e a natureza do catalisador também afetam os parâmetros cinéticos obtidos.

## 5 Conclusões

As amostras de gordura de suíno foram caracterizadas de acordo com vários parâmetros. A gordura de suíno apresentou um índice de acidez de 4,43 mg<sub>KOH</sub>/g<sub>amostra</sub>, um índice de iodo de 94,5 g/100 g amostra, uma massa volúmica de 0,920 g/cm<sup>3</sup>, uma viscosidade cinemática de 49,8 mm<sup>2</sup>/s e um teor de humidade de 0,15 %.

Pelo valor obtido para o índice de acidez, verificou-se que a gordura de suíno é mais estável e conserva as suas propriedades por mais tempo, comparativamente com outras gorduras animais, nomeadamente, a gordura de aves e o óleo de peixe.

Para seleção do catalisador enzimático foram testadas quatro enzimas diferentes, a *Novozym 435*, *Lipozyme CALB L*, *Lipozyme TL 100 L* e *Lecitase Ultra*. A enzima que permitiu obter uma redução do índice de acidez maior foi a *Lipozyme CALB L*, sendo este o catalisador escolhido para as reações de esterificação.

Testaram-se vários parâmetros para otimização das reação de esterificação, nomeadamente a temperatura, a razão mássica EtOH:AGL e a razão mássica enzima:gordura. As condições ótimas de reação correspondem a uma temperatura de 45 °C, uma razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e uma razão enzima:gordura de 0,0060 m/m. Estas condições permitiram uma redução do índice de acidez de 67 %.

Fez-se o ajuste dos resultados obtidos a diferentes cinéticas, nomeadamente, cinética de Michaelis-Menten, cinética de primeira ordem e cinética de segunda ordem. Concluiu-se que o modelo cinético que mais se adequa aos resultados experimentais é a cinética de segunda ordem global, primeira em relação ao ácido oleico e primeira em relação ao etanol. Por fim, a energia de ativação obtida para a reação foi de 54,7 kJ·mol<sup>-1</sup>.

### Limitações e Trabalho Futuro

Para trabalhos futuros deveriam ser tomadas em conta as seguintes considerações:

- Realização de experiências com alteração de vários parâmetros em simultâneo, nomeadamente variação da razão EtOH:AGL e a razão enzima:gordura, uma vez que as condições do meio interferem ativamente no desempenho da enzima.
- Realização de experiências com excesso de álcool, ácidos gordos livres ou enzima. Uma vez que o mecanismo de reação é uma combinação entre o álcool e os ácidos gordos livres, a realização destas experiências permitiria retirar mais conclusões acerca do modelo cinético.

- Utilização de diferentes álcoois ou adição de um co solvente.
- Aplicação do desenho de experiências no estudo de redução de acidez de gorduras animais, uma vez que os parâmetros da reação são dependentes entre si.

### **Apreciação final**

A realização deste projeto permitiu ter uma pequena noção acerca da investigação científica. Foram adquiridos novos conhecimentos e competências, assim como foram também aplicados os conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Mestrado Integrado em Engenharia Química.

Foi uma experiência enriquecedora também ao nível pessoal, pois permitiu o contacto com pessoas novas, o trabalho em equipa e a partilha de opiniões, abrindo assim novos horizontes e perspectivas de futuro.

## 6 Referências

- Aditivos & Ingredientes. A Rancidez Oxidativa em Alimentos. Aditivos & Ingredientes, 72, 31-37, 2010.  
URL [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/209.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/209.pdf)
- Bellaver, C., Zanotto, D.L. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal. In: APINCO 2004. Santos SP. Brasil, 2004.
- Brasilino, M.G.A. Avaliação da estabilidade Oxidativa do Biodiesel de Pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*) e suas misturas ao diesel. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2010.
- FiB (Food Ingredients Brasil). Os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. Food Ingredients Brasil, 16(29), 38-45, 2014.
- Jardine, J.G., Barros, T.D. Gordura animal. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. URL <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1om7kf02wyiv802hvm3jholyoom.html> (Acedido em 3.15.16).
- João, J.J., Zanella, C.R., 2000. Utilização de Enzimas em Meio Orgânico. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento. 32(16), 32-36.
- Klonoff, David C. Replacements for Trans Fats—Will There Be an Oil Shortage? Journal of Diabetes Science and Technology, US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2007.
- Knothe, G. Structures Indices in FA chemistry. How Relevant is the Iodine Value? USDA, ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois 61604, 2002.
- Leão, L.S., 2009. Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico. Tese de Mestrado, Escola de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.
- Levenspiel, O. Chemical Reaction Engineering. 3ª Ed. John Wiley & Sons, Estados Unidos da América, 1999.
- Maciel, R. Uso de óleos e gorduras nas Rações, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 2008.

Mahmud, M.S., Safinski, T., Nelson, M. I., Sidhu, H. S., Adesina, A.A., Kinetic Analysis of Oleic Acid Esterification Using Lipase as Catalyst in a Microaqueous Environment, 2009.

Marques, C.D.A. Utilização de catalisadores heterogêneos na conversão de gorduras animais em biodiesel. Tese de Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente, Universidade de Lisboa, 2014.

Mehta, D.N., 2013. Fats URL <http://www.slideshare.net/daxamehta/fats-29486179> (Acedido em 5.7.16).

Melo, M.A.M.F. Avaliação das propriedades de óleos vegetais visando a produção de Biodiesel. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

Novozymes, Lipase enzymes, 2016.

URL <http://www.novozymes.com/en/solutions/pharmaceuticals/biocatalysis/lipase-enzymes> (Acedido em 3.17.16).

O'Brien, R.D. Fats and Oils-Formulating and Processing for Applications, second edition, Florida, 2004.

Radzi S.M., Mohamad R., Basri M., Salleh A.B., Ariff A., Rahman M.B., Rahman R.N., Kinetics of enzymatic synthesis of liquid wax ester from oleic acid and oleyl alcohol, 2010.

Reda, S.Y., Carneiro, P.I.B. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. Revista Analytica. 27, 60-67, 2007.

Richetti, A. Esterificação Enzimática de Palmitato de 2-Etilexila em Sistema Livre de Solvente. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

Savinor UTS, 2016

URL <http://www.savinor.pt/uts/pt/linhas-de-producao> (Acedido em 4.20.16).

Schwager, E., 2015. Mechanism of Irreversible Cell Injury, The art of Medicine. URL <https://theartofmed.wordpress.com/2015/06/11/mechanism-of-irreversible-cell-injury/> (Acedido em 6.16.16).

- Senegalhe, F.B.D., Burin, P.C., Fuzikawa, I.H.S., Penha, D.S., Leonardo, A.P., 2. Ácidos graxos na carne e gordura de ovinos. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 10(18), 81-101, 2014.
- Silva, L.M. Determinação da Estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2008.
- Tsukamoto, J. Esterificação enzimática direta de carboidratos com ácido acrílico em meio orgânico. Tese de doutoramento, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78, 343-358, 2007.



## Anexo 1

- **Determinação do volume estequiométrico de etanol**

Sabe-se que a percentagem de ácido gordo livre, expresso como ácido oleico existente numa amostra corresponde ao índice de acidez da mesma, a dividir por um fator de 1,99. Deste modo, para um índice de acidez de 4,43 mg  $\text{KOH/g}$  amostra determinou-se a massa de ácidos gordos livres da seguinte forma:

$$m_{AGL} = \frac{4,43}{1,99} \times \frac{10}{100} = 0,223 \frac{g_{AGL}}{10 g_{amostra}}$$

Sabe-se que por cada grama de ácidos gordos livres são necessários 2,25 g metanol logo:

$$m_{metanol} = 0,223 \frac{g_{AGL}}{10 g_{amostra}} \times 2,25 \frac{g_{metanol}}{g_{AGL}} = 0,502 \frac{g_{metanol}}{10 g_{amostra}}$$

A partir das massas molares do metanol e etanol determinou-se a massa de etanol necessário para cada 10 gramas de amostra:

$$m_{etanol} = 0,502 \frac{g_{metanol}}{10 g_{amostra}} \times \frac{46,07 g_{etanol} \cdot mol^{-1}}{32,04 g_{metanol} \cdot mol^{-1}} = 0,722 \frac{g_{etanol}}{10 g_{amostra}}$$

Por fim, dividiu-se pela massa volúmica de etanol e determinou-se o respetivo volume:

$$\begin{aligned} V_{etanol} &= 0,722 \frac{g_{etanol}}{10 g_{amostra}} \times \frac{1}{0,789 g_{etanol} \cdot cm^{-3}_{etanol}} \\ &= 0,915 \frac{cm^3_{etanol}}{10 g_{amostra}} \end{aligned}$$

- **Determinação da razão mássica EtOH:AGL**

A razão mássica EtOH:AGL corresponde:

$$\text{Razão mássica EtOH: AGL} = \frac{m_{\text{etanol}}}{m_{\text{AGL}}}$$

$$\text{Razão mássica EtOH: AGL} = \frac{m_{\text{etanol}}}{m_{\text{AGL}}} = \frac{0,722}{0,223} = \mathbf{3,24 \text{ m/m}}$$

Devido aos arredondamentos efetuados em cada etapa, obteve-se uma razão mássica de 3,24 m/m. No entanto, fazendo os arredondamentos apenas ao resultado final, obtém-se a razão mássica de referência, nomeadamente 3,25 m/m.

- **Determinação da razão mássica Enzima:gordura:**

Para as condições de referência utilizou-se um volume de enzima de 50 µL;

$$\text{Razão mássica Enzima: Gordura} = \frac{m_{\text{enzima}}}{m_{\text{gordura}}} = \frac{0,050 \text{ cm}^3 \times 1,2 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}}{10 \text{ g}} = \mathbf{0,0060 \text{ m/m}}$$

## Anexo 2

Na Figura A2.1, Figura A2.2, Figura A2.3 e Figura A2.4 encontra-se representado a variação do índice de acidez em função do tempo variando o parâmetro da temperatura. Manteve-se constante a razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m.

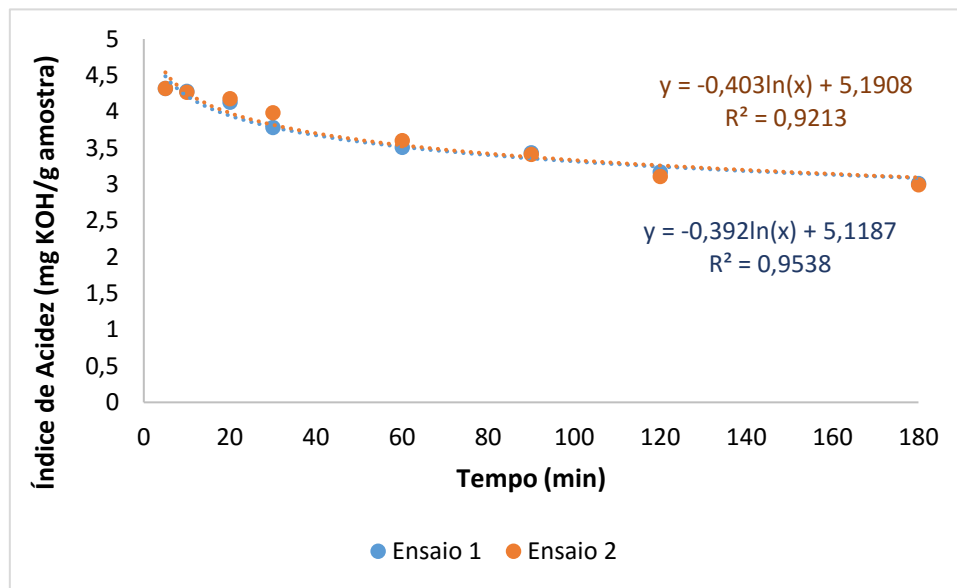


Figura A2.1. Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 32,5 °C.

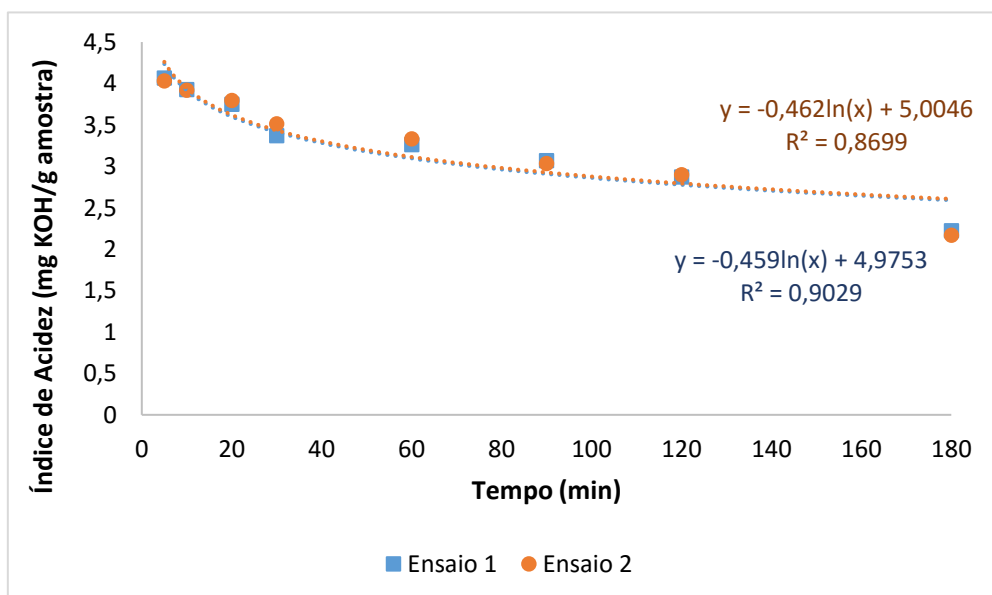


Figura A2.2. Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 35 °C.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

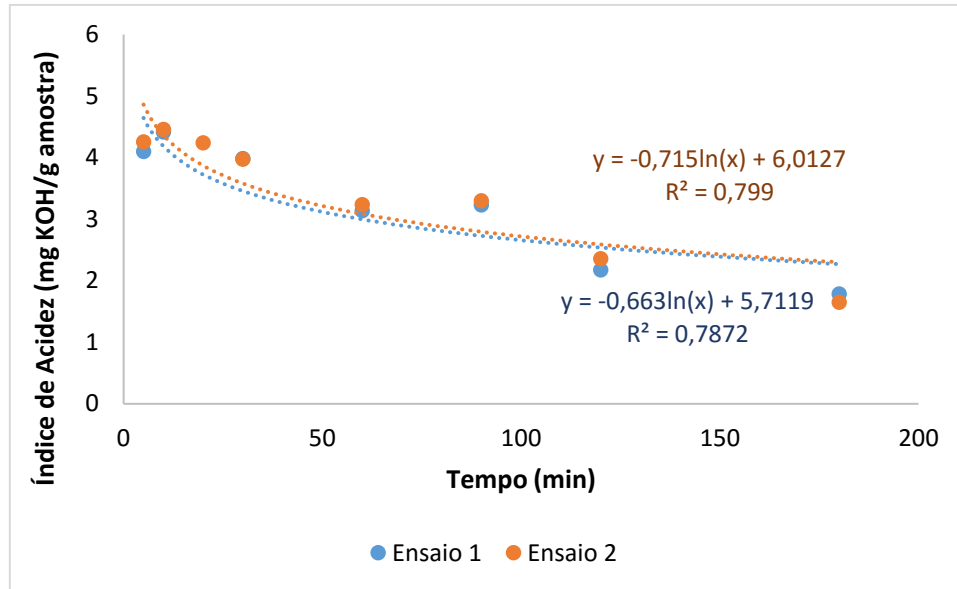


Figura A2.3. Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 42,5 °C.

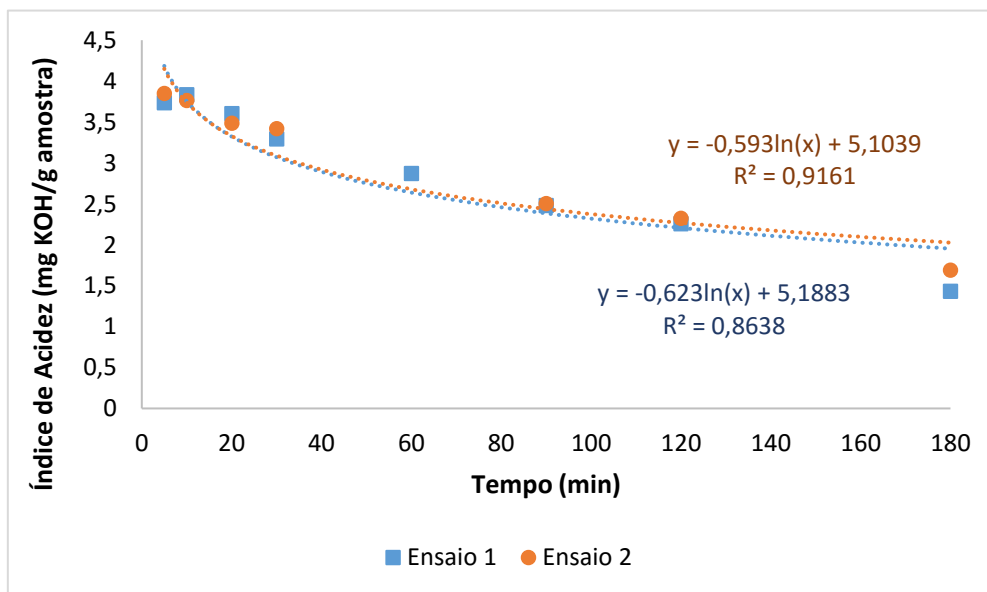


Figura A2.4 Variação do índice de acidez em função do tempo para a temperatura de 47,5 °C.

Na Figura A2.5, Figura A2.6, Figura A2.7 e Figura A2.8 encontra-se representada a variação do índice de acidez em função do tempo variando o parâmetro razão mássica EtOH:AGL. Mantive-se constante a temperatura de 45 °C e a razão mássica enzima:gordura de 0,0060 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

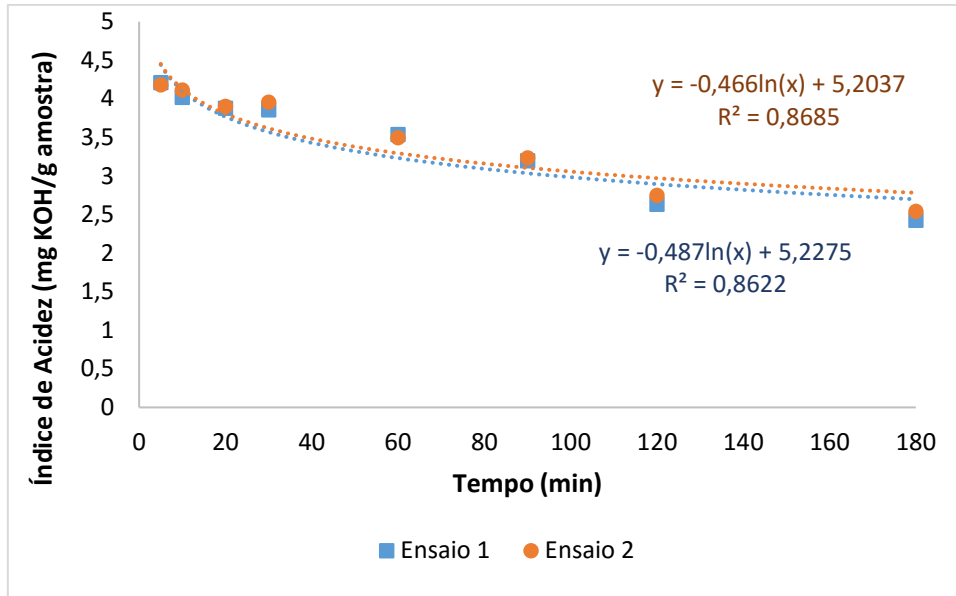


Figura A2.5 Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 2,44 m/m.

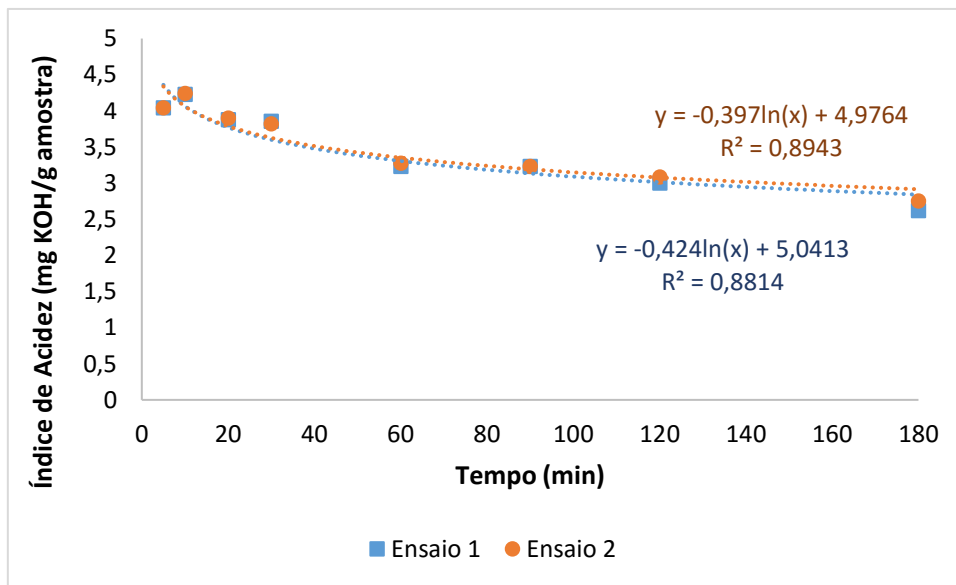


Figura A2.6. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 4,06 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

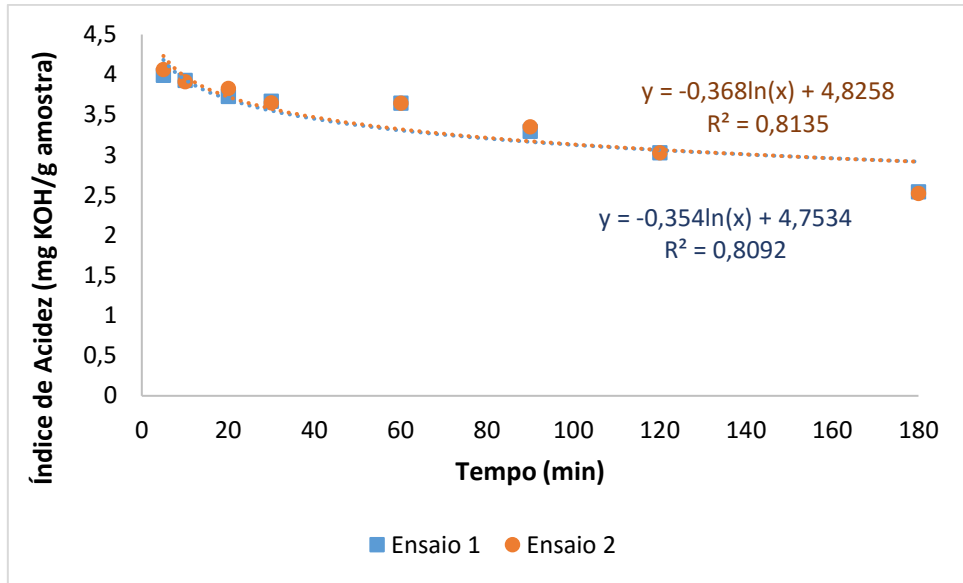


Figura A2.7. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 4,88 m/m.

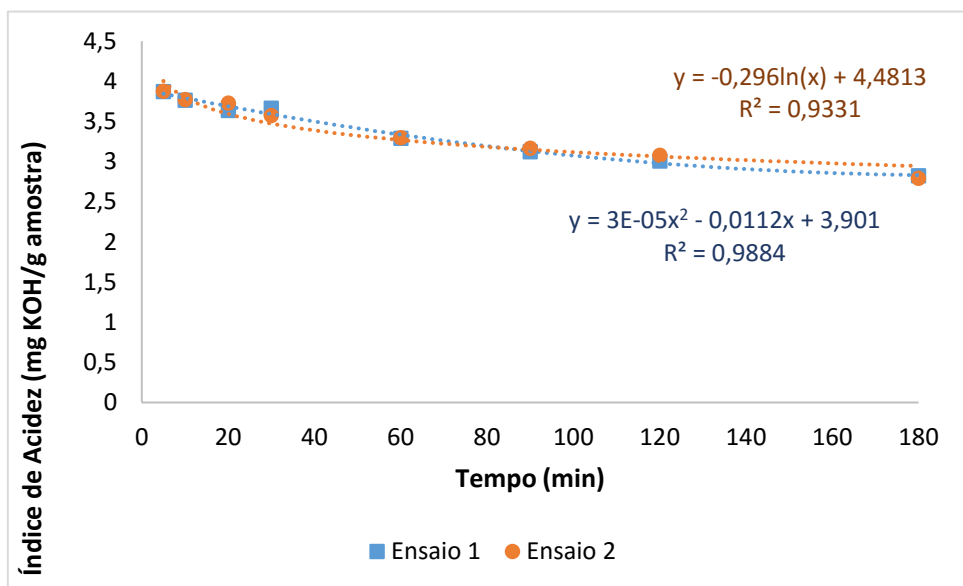


Figura A2.8. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão EtOH:AGL de 6,50 m/m.

Na Figura A2.9, Figura A2.10, Figura A2.11 e Figura A2.12 encontra-se representada a variação do índice de acidez em função do tempo, variando o parâmetro razão mássica enzima:gordura. Manteve-se constante a temperatura de 45 °C e a razão mássica EtOH:AGL de 3,25 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

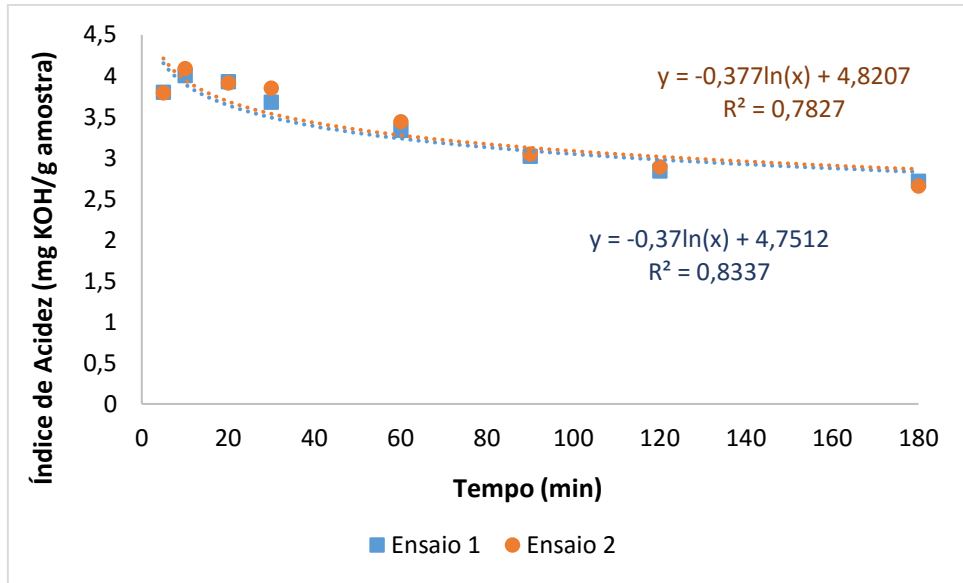


Figura A2.9. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0030 m/m.

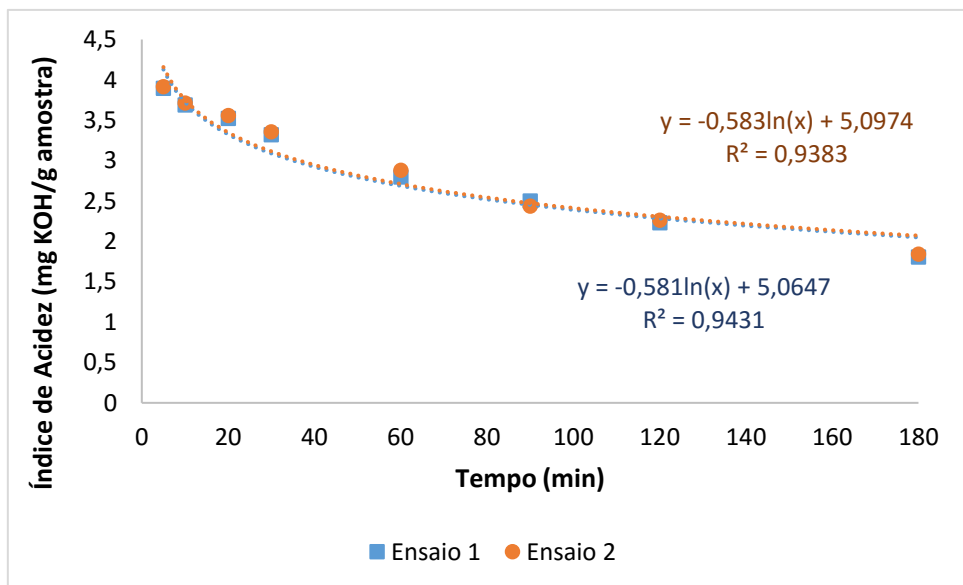


Figura A2.10. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0090 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

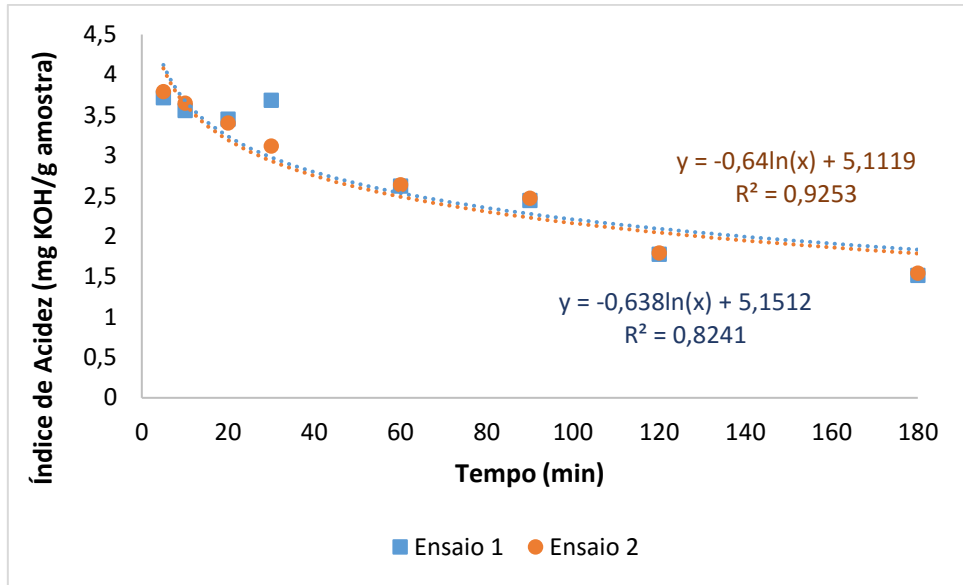


Figura A2.11. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0120 m/m.

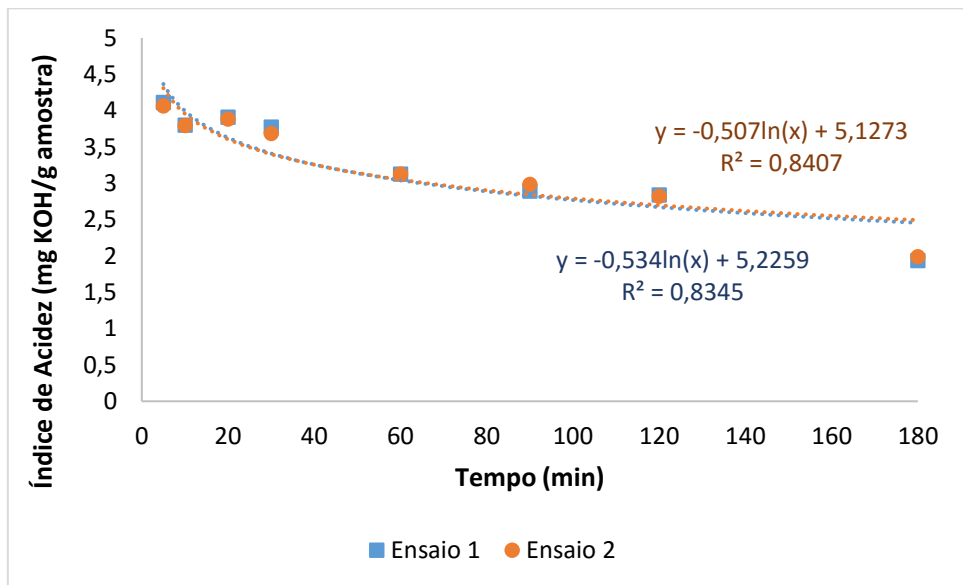


Figura A2.12. Variação do índice de acidez em função do tempo para a razão enzima:gordura de 0,0048 m/m.

## Anexo 3

Neste anexo encontram-se representados os ajustes aos diferentes modelos cinéticos para as diversas experiências realizadas.

- **Efeito da Temperatura**

Na Figura A3.1, Figura A3.2, Figura A3.3 e Figura A3.4 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a temperatura de 32,5 °C.

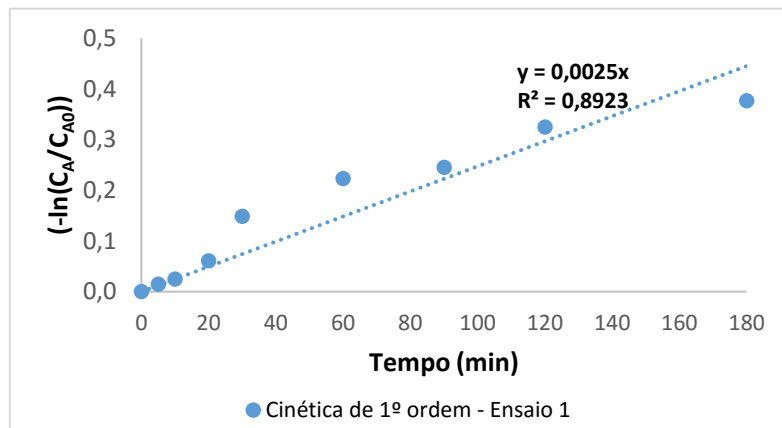


Figura A3.1. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 32,5 °C.

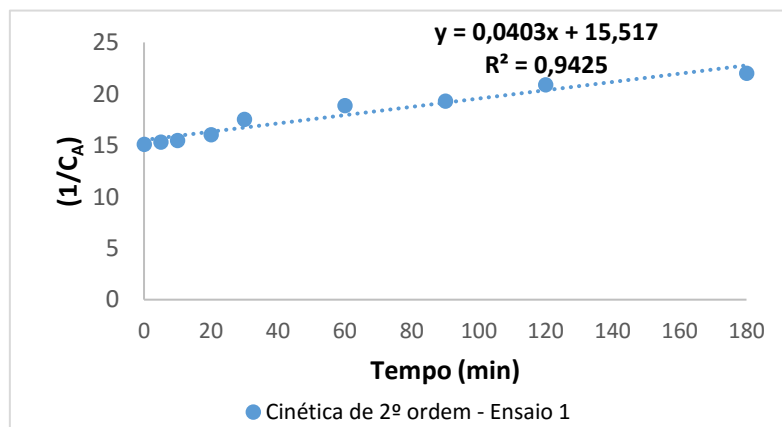


Figura A3.2. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 32,5 °C.

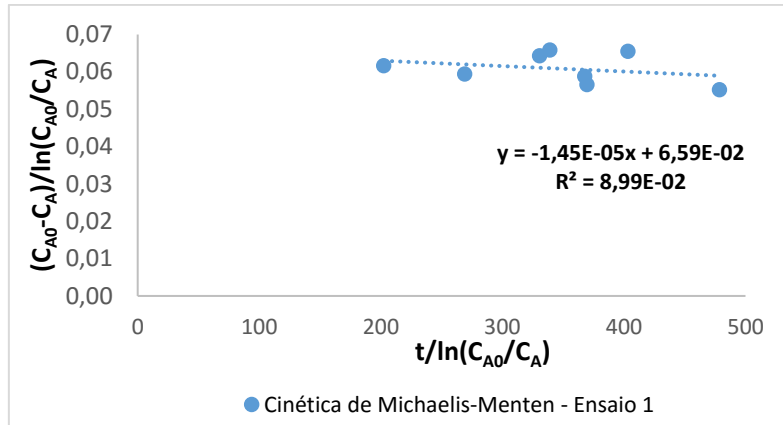


Figura A3.3. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 32,5 °C.

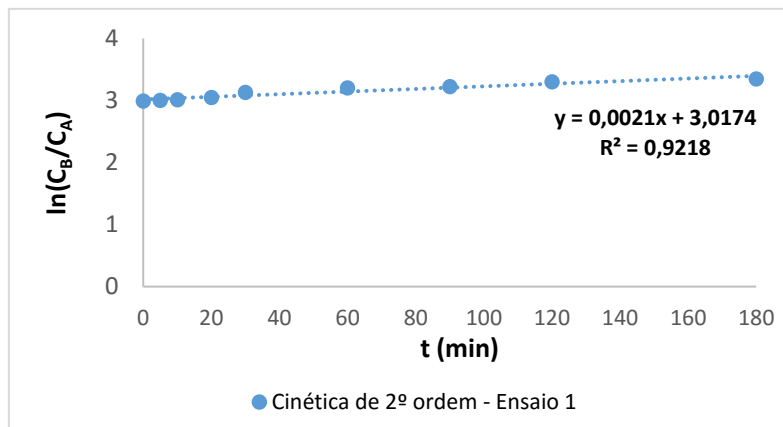


Figura A3.4. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 32,5 °C.

Na Figura A3.5, Figura A3.6, Figura A3.7 e Figura A3.8 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a temperatura de 35 °C.

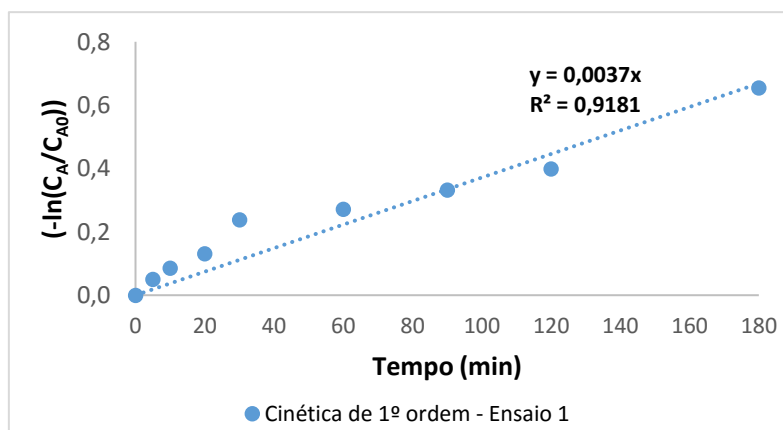


Figura A3.5. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 35 °C.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

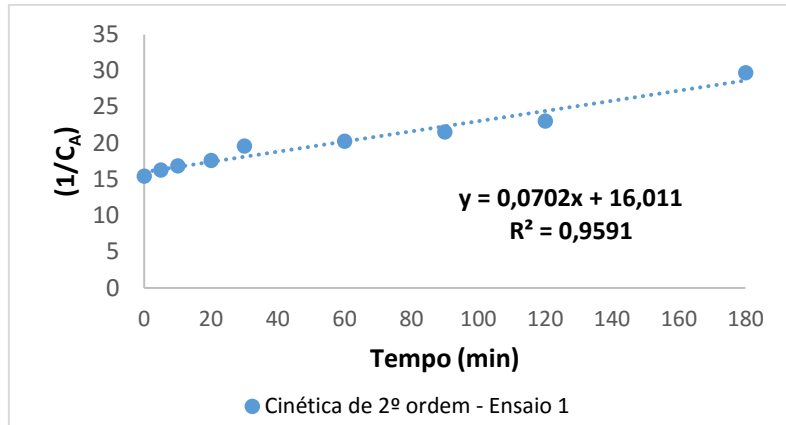


Figura A3.6. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 35 °C.

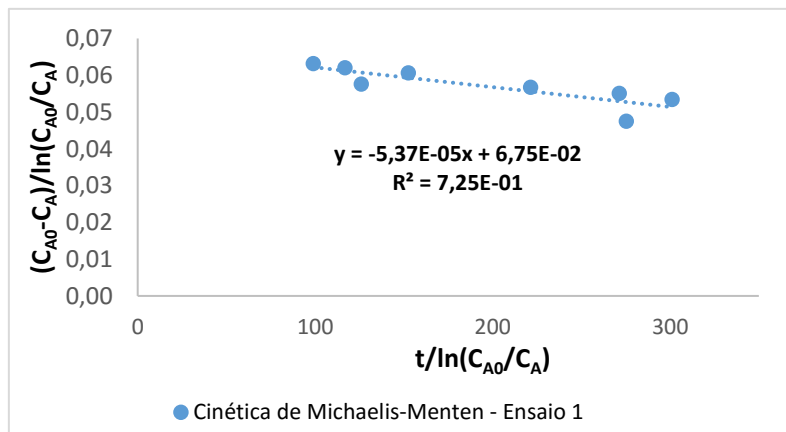


Figura A3.7. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 35 °C.

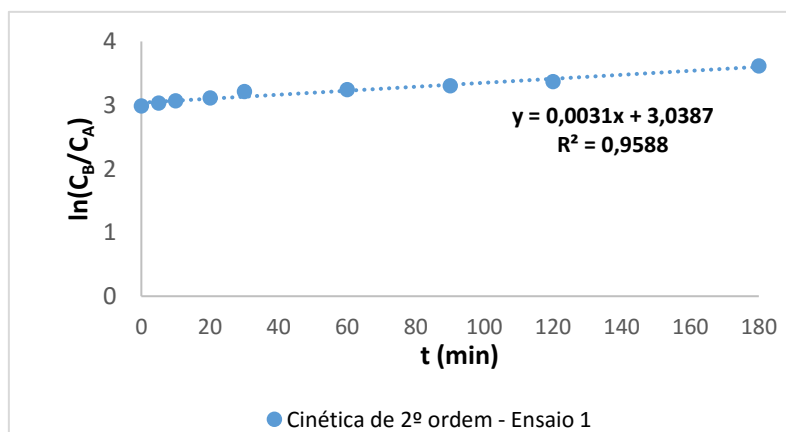


Figura A3.8 Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 35 °C.

Na Figura A3.9, Figura A3.10, Figura A3.11 e Figura A3.12 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a temperatura de 40 °C.

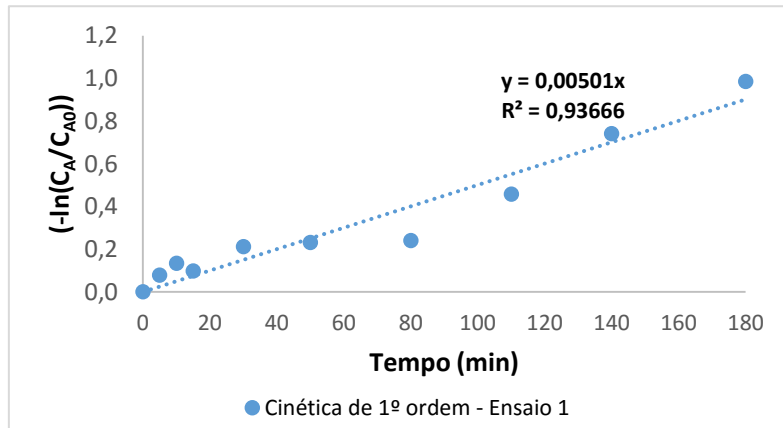


Figura A3.9. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 40 °C.

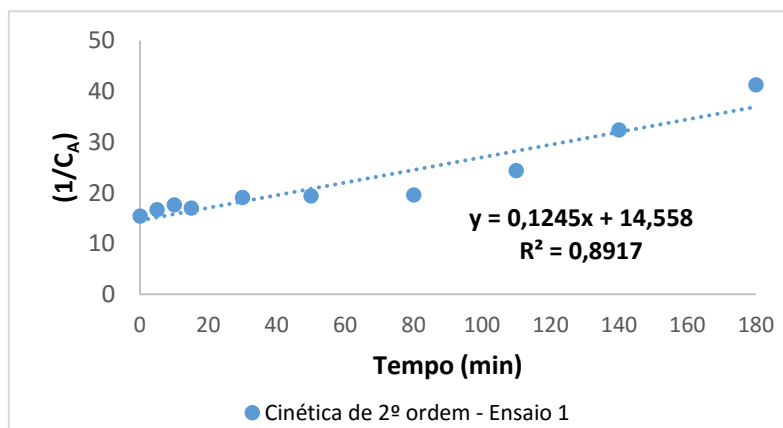


Figura A3.10. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 40 °C.

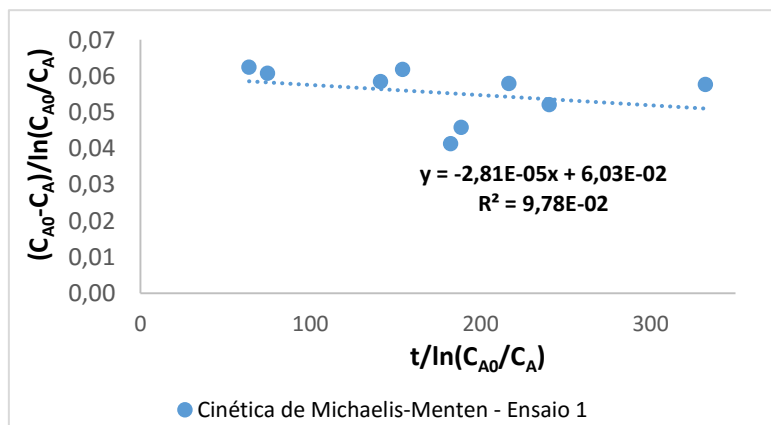


Figura A3.11. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 40 °C.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

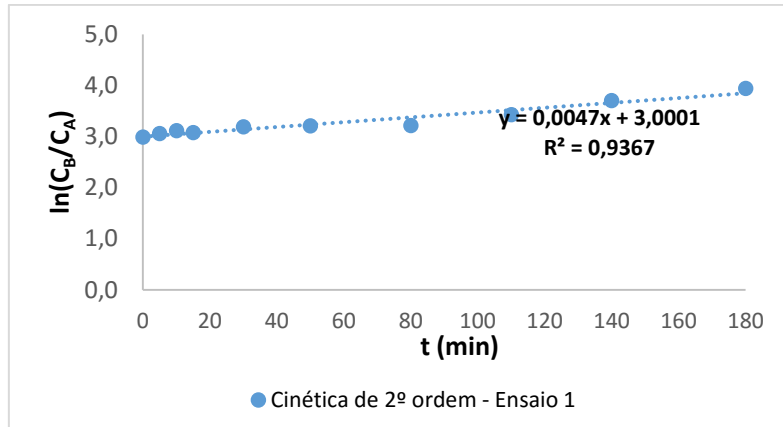


Figura A3.12. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 40 °C.

Na Figura A3.13, Figura A3.14, Figura A3.15 e Figura A3.16 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a temperatura de 42,5 °C.

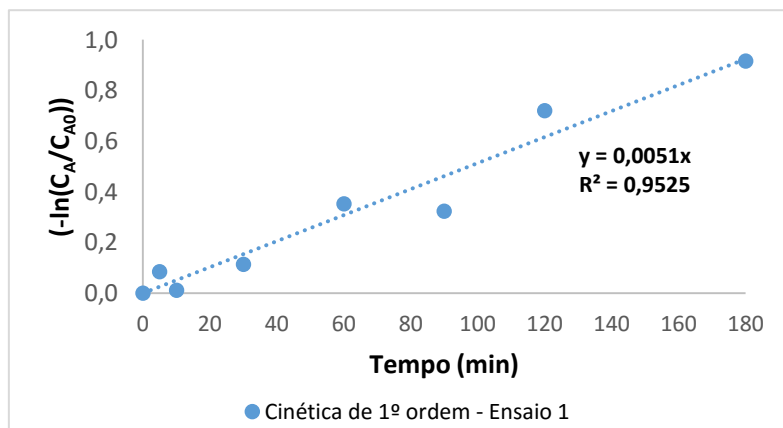


Figura A3.13. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 42,5 °C.

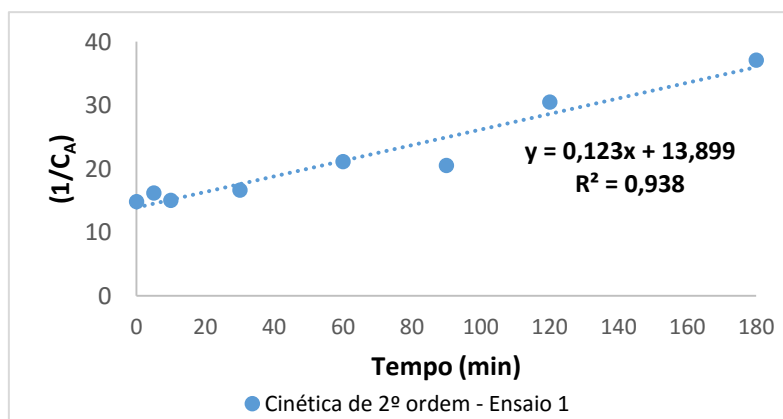


Figura A3.14. Ajuste ao modelo cinético segunda ordem para a temperatura de 42,5 °C.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

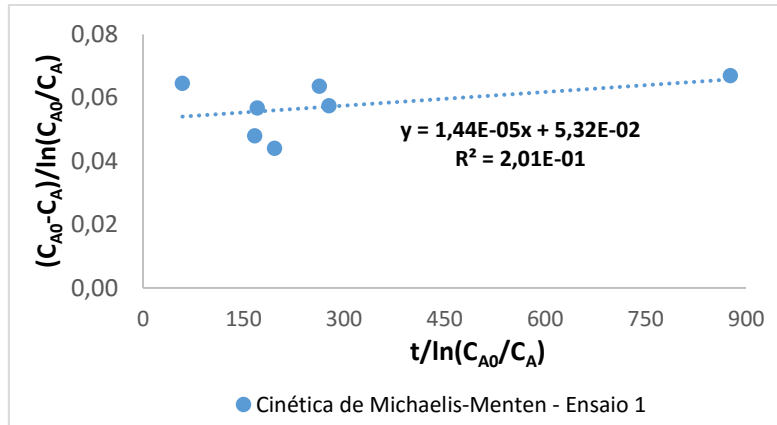


Figura A3.15. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 42,5 °C.

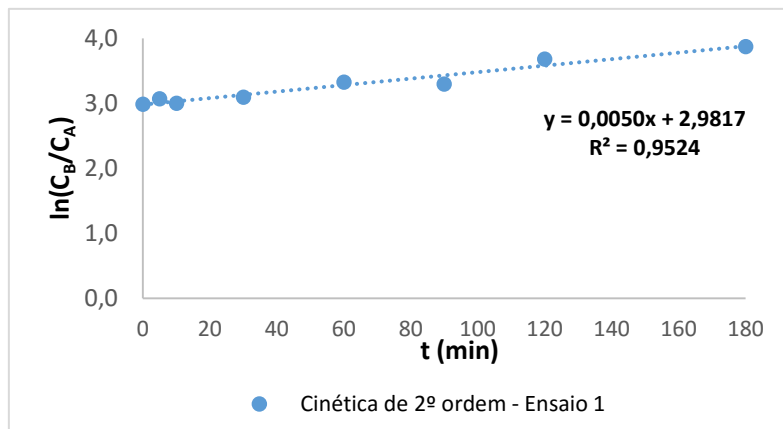


Figura A3.16. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 42,5 °C.

Na Figura A3.17, Figura A3.18, Figura A3.19 e Figura A3.20 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a temperatura de 47,5 °C.

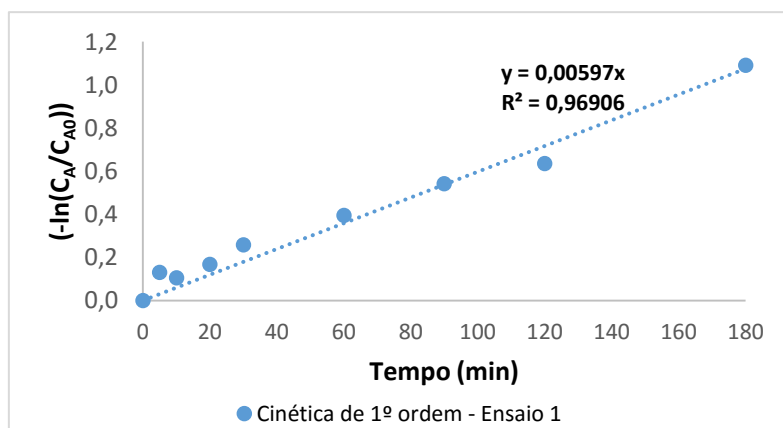


Figura A3.17. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a temperatura de 47,5 °C.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

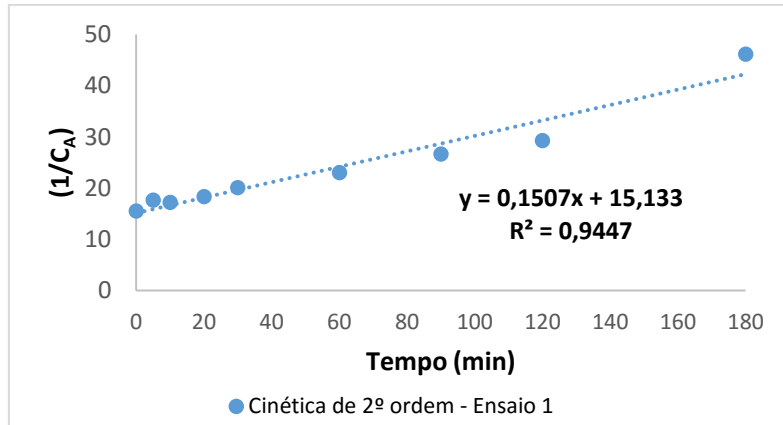


Figura A3.18. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a temperatura de 47,5 °C.

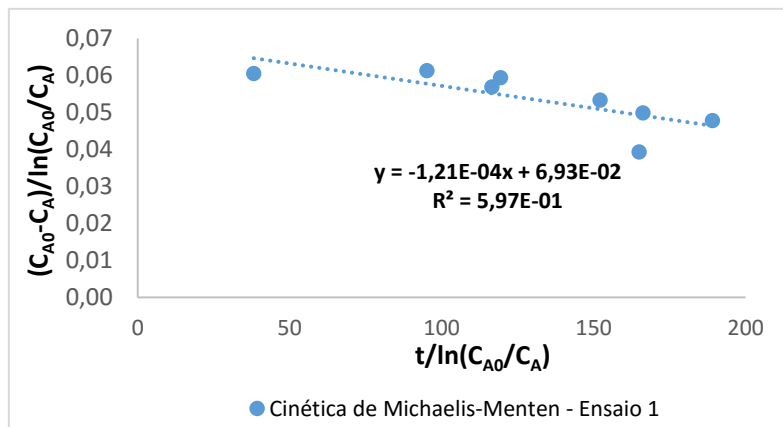


Figura A3.19. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a temperatura de 47,5 °C.

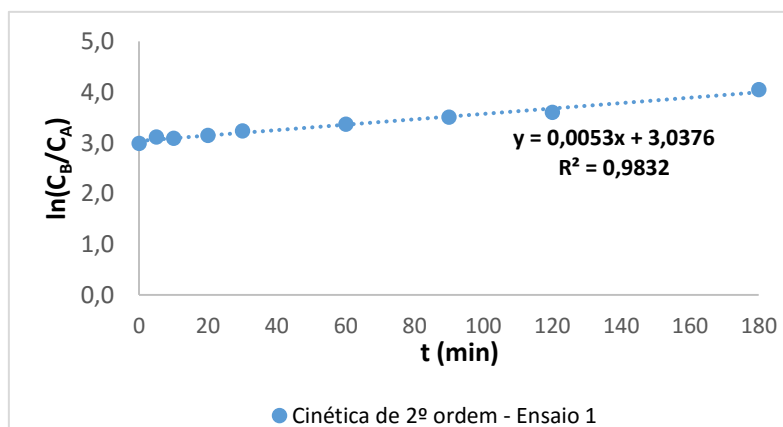


Figura A3.20. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a temperatura de 47,5 °C.

- Efeito da Razão Mássica EtOH:AGL

Na Figura A3.21, Figura A3.22, Figura A3.23 e Figura A3.24 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.

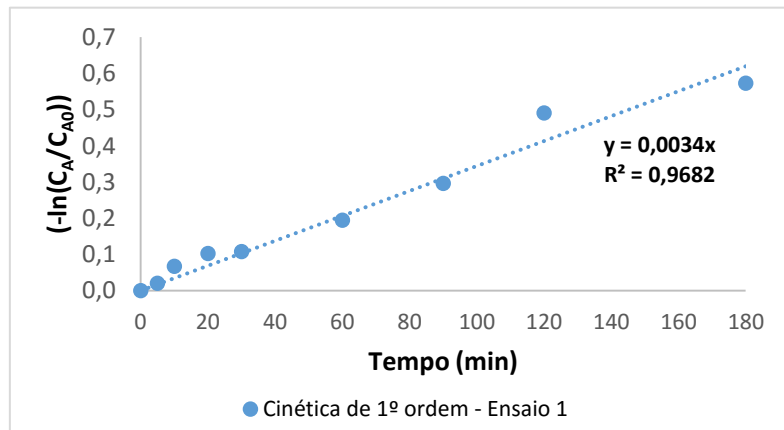


Figura A3.21. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.

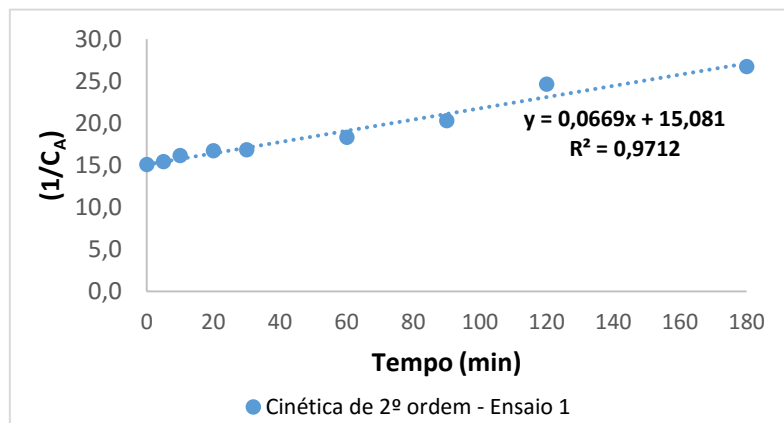


Figura A3.22. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

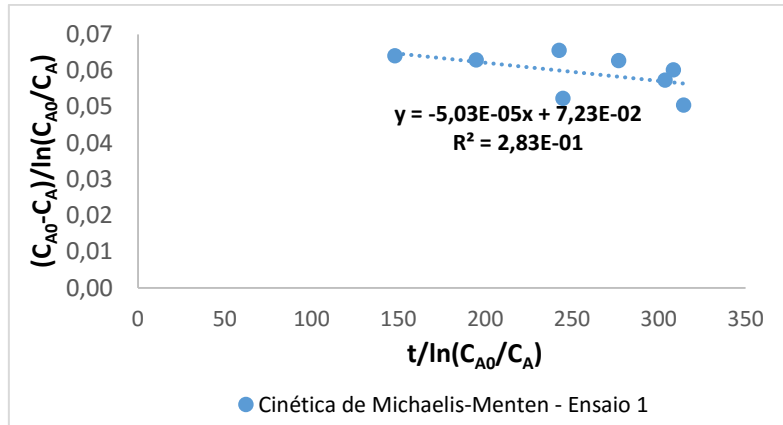


Figura A3.23. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.

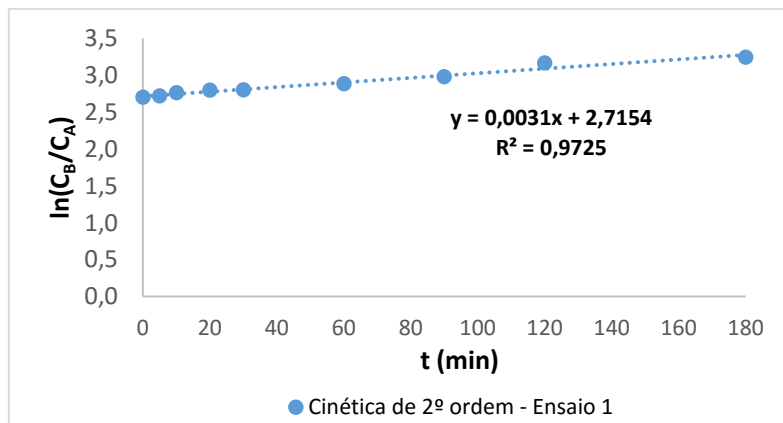


Figura A3.24. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 2,44 m/m.

Na Figura A3.25, Figura A3.26, Figura A3.27 e Figura A3.28 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.

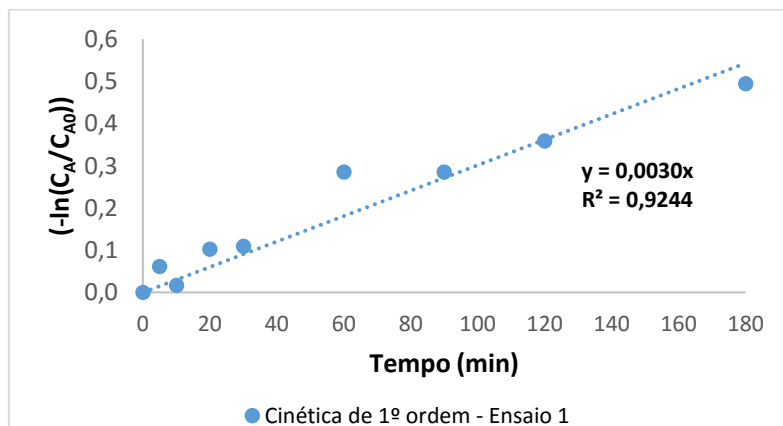


Figura A3.25. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.

Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

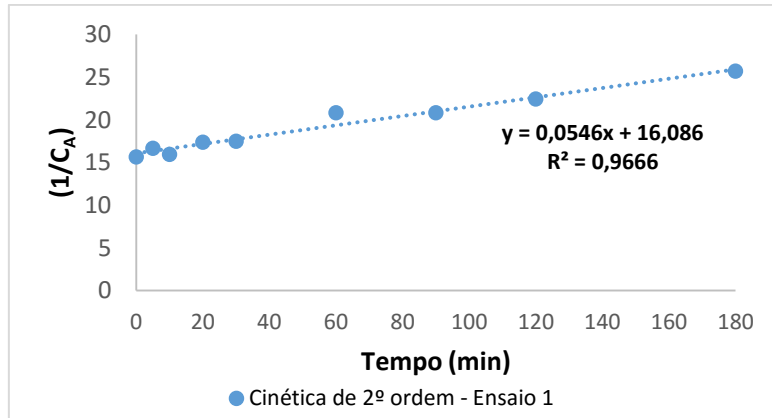


Figura A3.26. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.

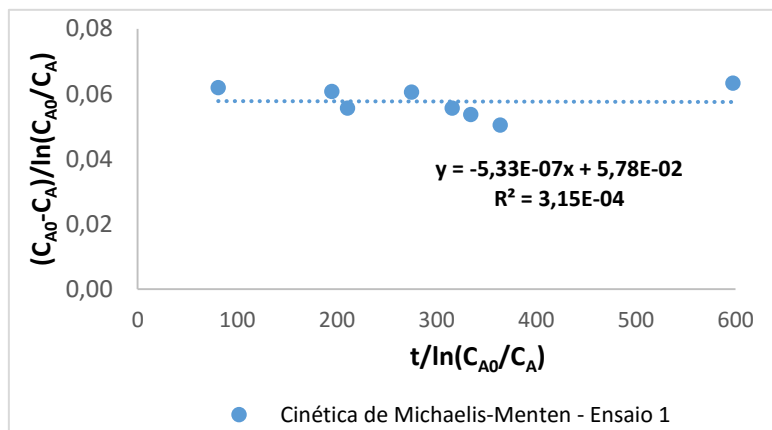


Figura A3.27. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.

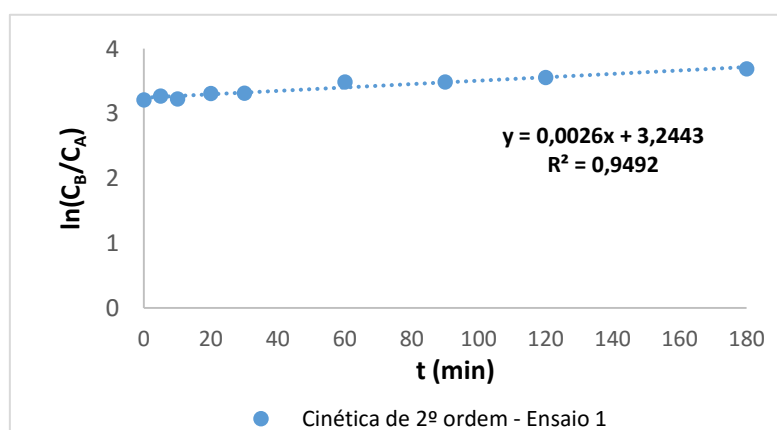


Figura A3.28. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 4,06 m/m.

Na Figura A3.29, Figura A3.30, Figura A3.31 e Figura A3.32 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.

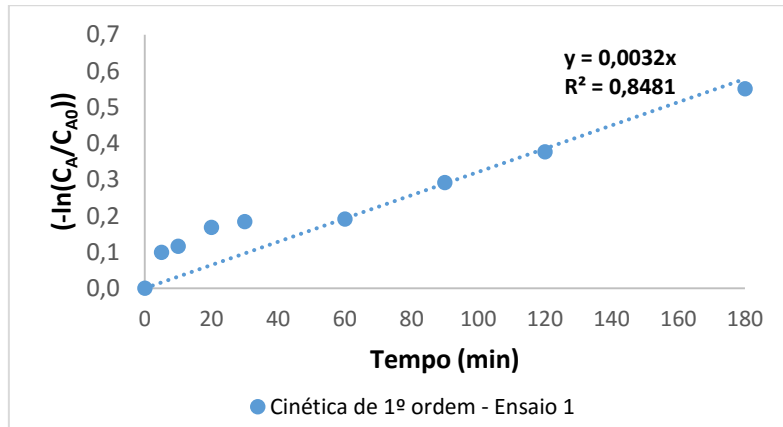


Figura A3.29. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.

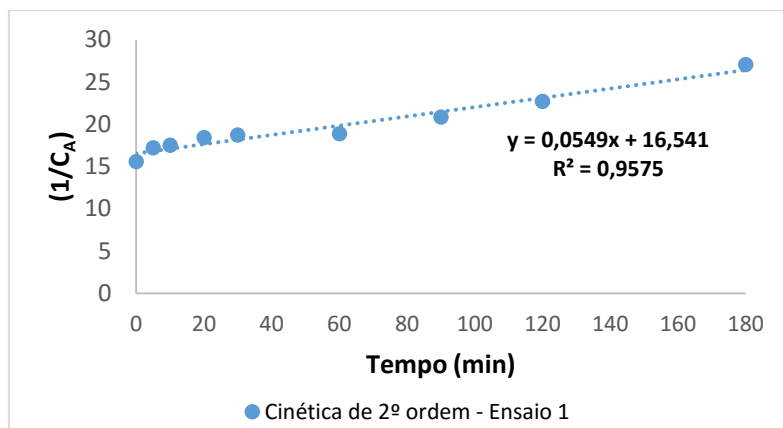


Figura A3.30. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.

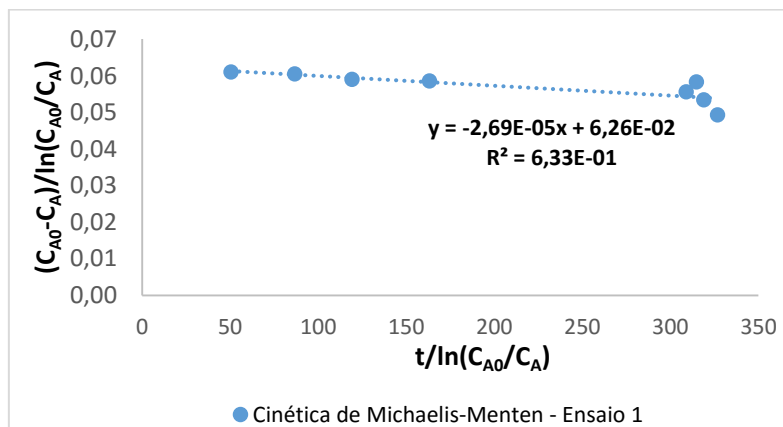


Figura A3.31. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

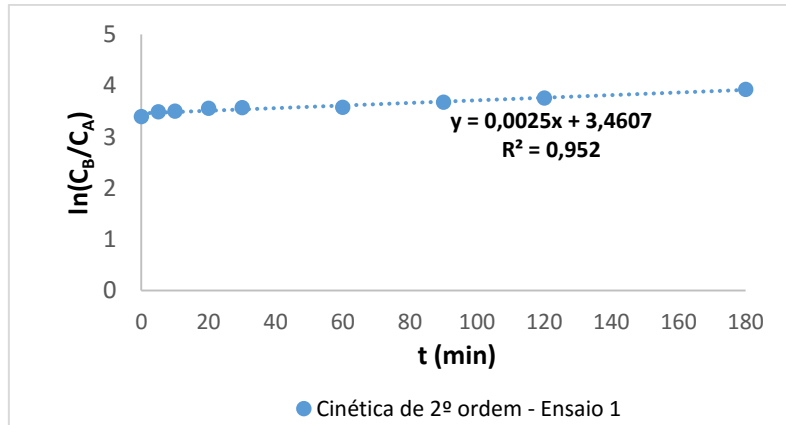


Figura A3.32. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 4,88 m/m.

Na Figura A3.33, Figura A3.34, Figura A3.35 e Figura A3.36 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m.

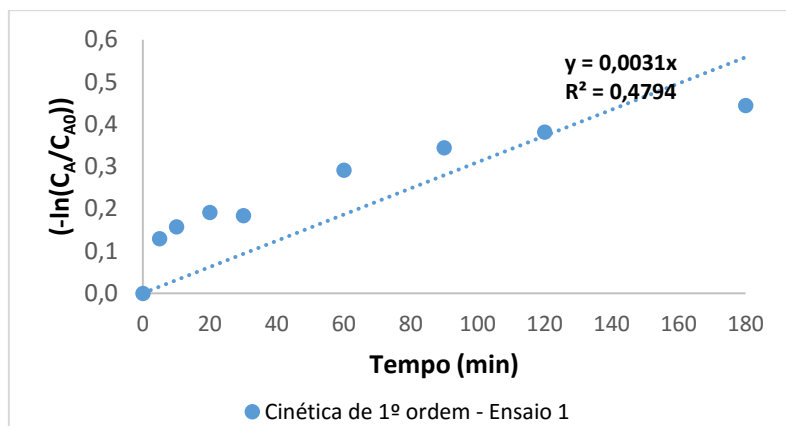


Figura A3.33. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m.

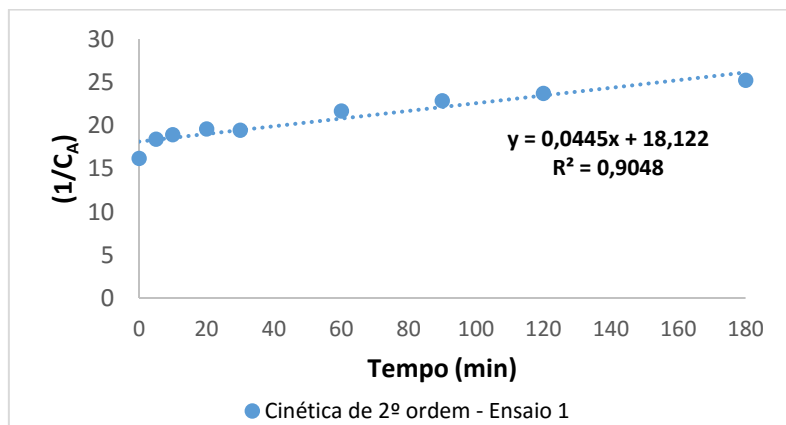


Figura A3.34. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m.

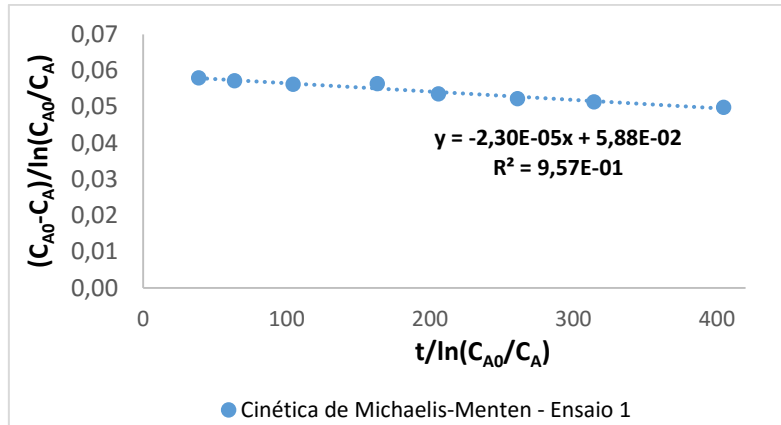


Figura A3.35. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m.

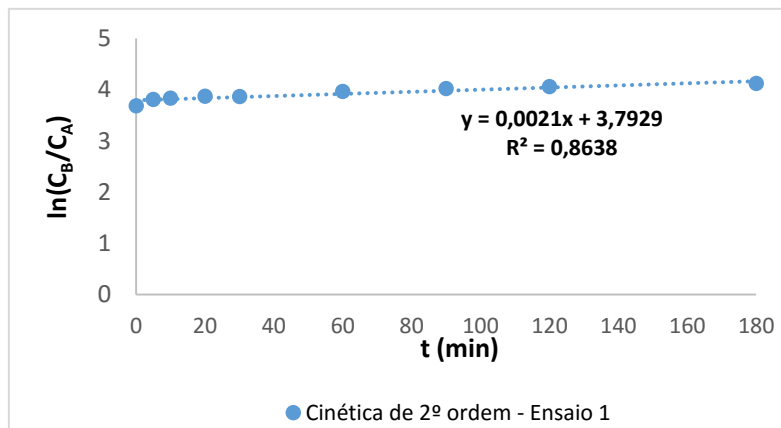


Figura A3.36. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 6,50 m/m.

- Efeito da Razão Enzima:gordura

Na Figura A3.37, Figura A3.38, Figura A3.39 e Figura A3.40 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m.

Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

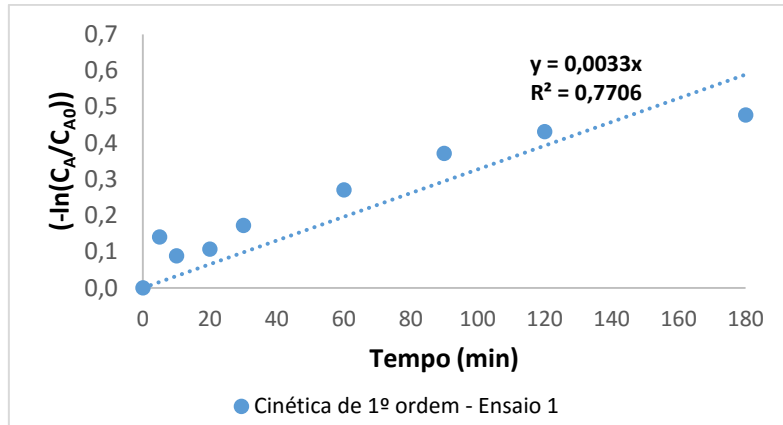


Figura A3.37. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m.

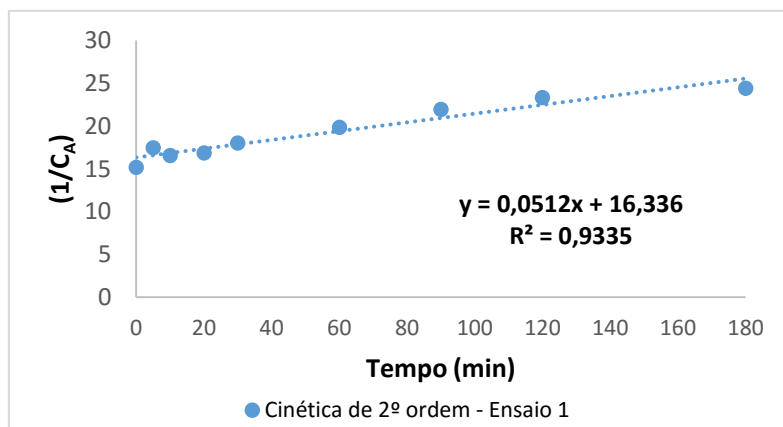


Figura A3.38. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m.

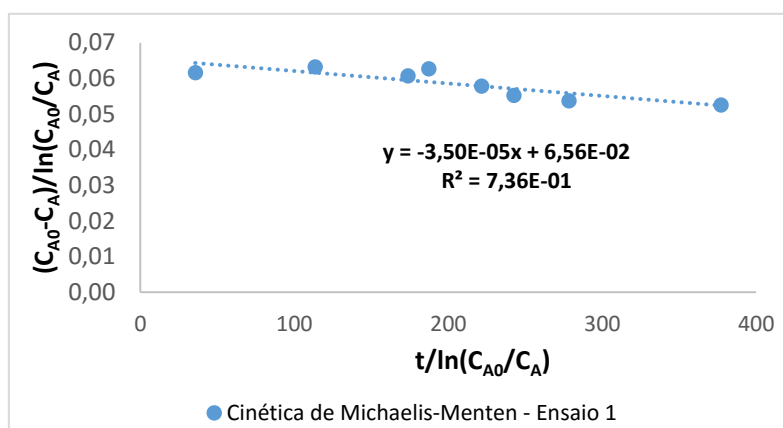
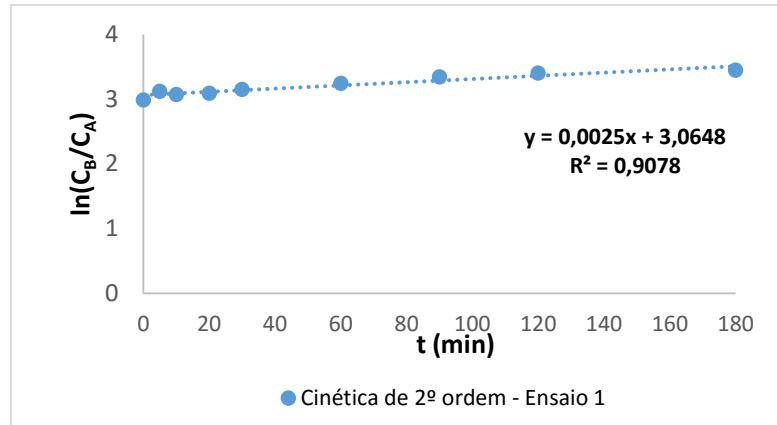


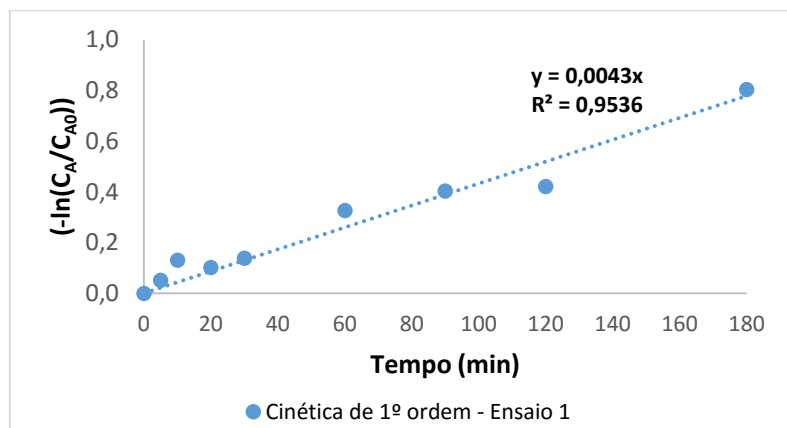
Figura A3.39. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática



**Figura A3.40.** Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0030 m/m.

Na Figura A3.41, Figura A3.42, Figura A3.43 e Figura A3.44 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m.



**Figura A3.41.** Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m.

Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

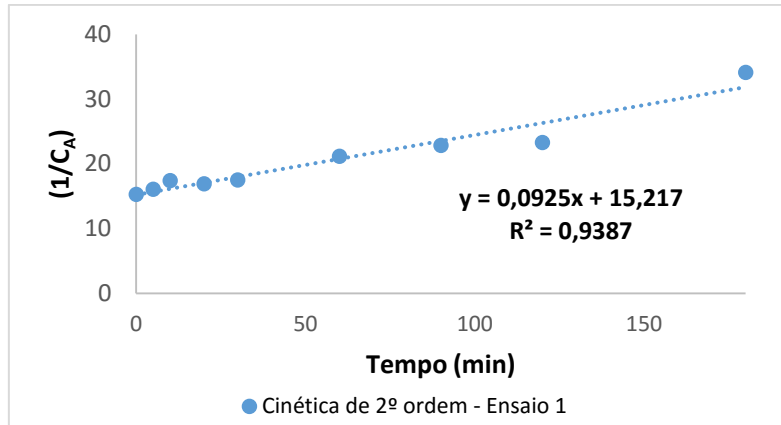


Figura A3.42. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m.

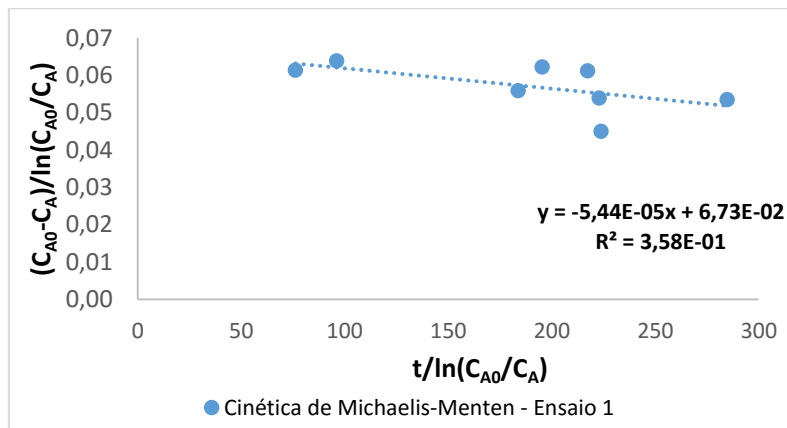


Figura A3.43. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m.

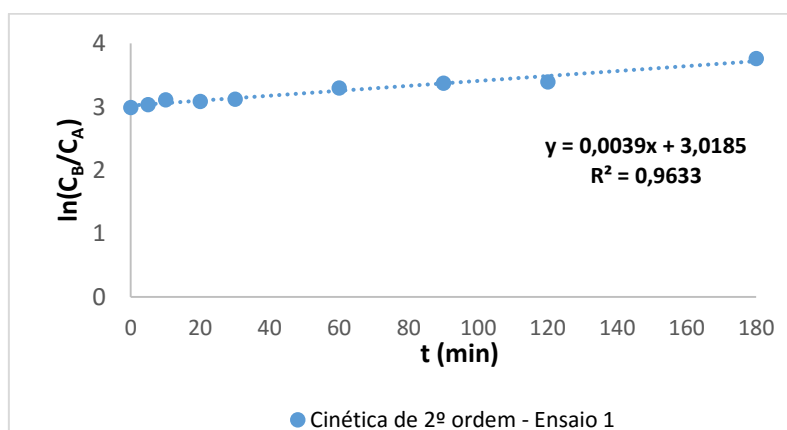


Figura A3.44. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0048 m/m.

Na Figura A3.45, Figura A3.46, Figura A3.47 e Figura A3.48 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m.

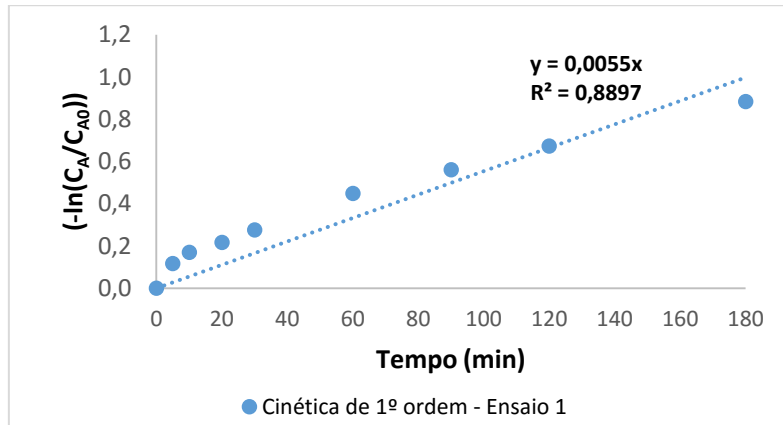


Figura A3.45. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m.

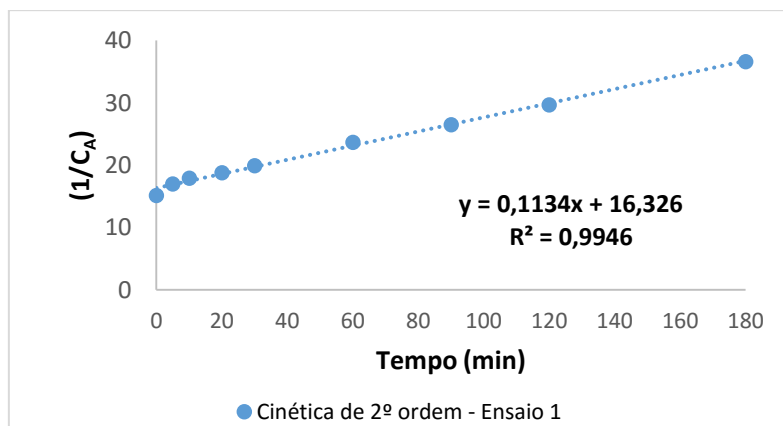


Figura A3.46. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m.

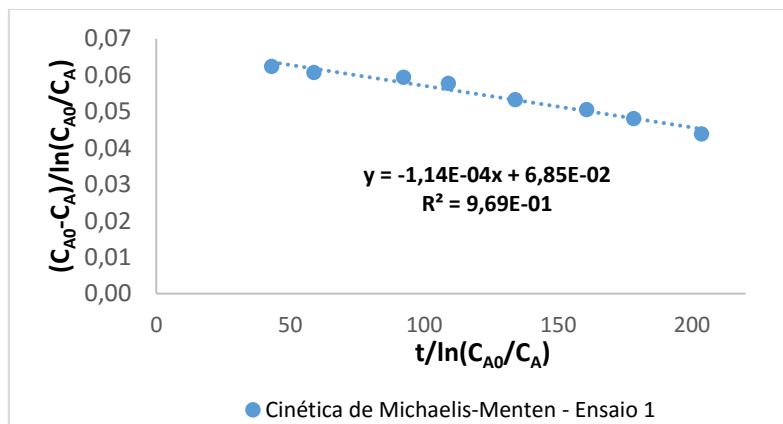
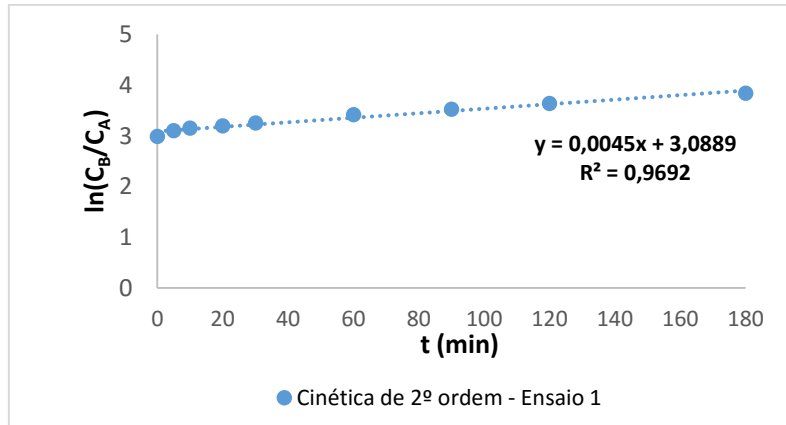


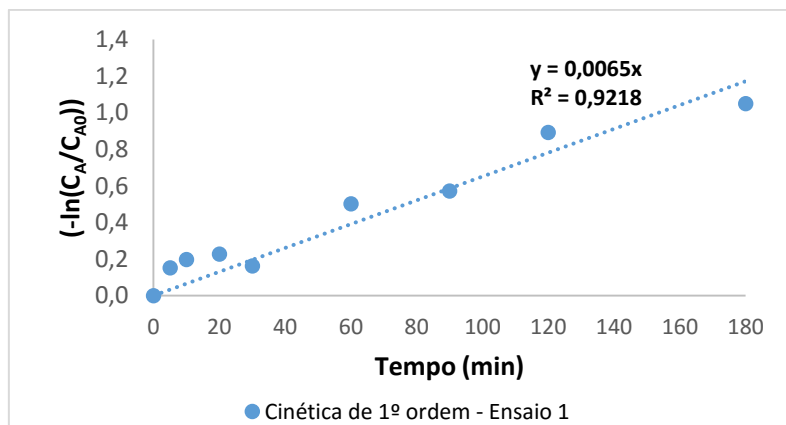
Figura A3.47. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

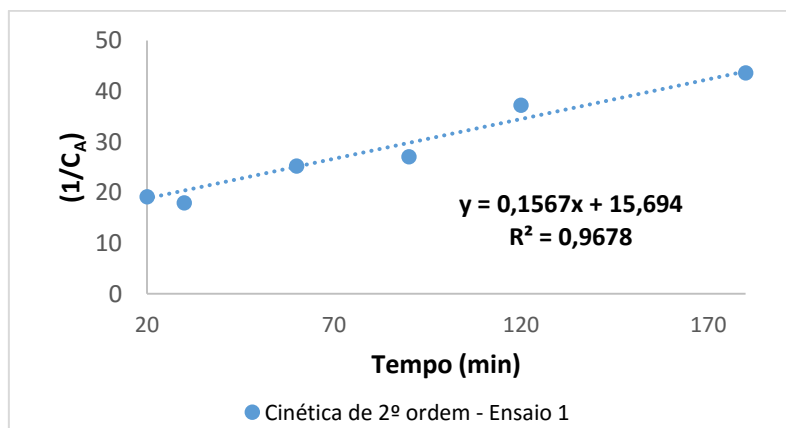


**Figura A3.48.** Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0090 m/m.

Na Figura A3.49, Figura A3.50, Figura A3.51 e Figura A3.52 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m.



**Figura A3.49.** Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m.



**Figura A3.50.** Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

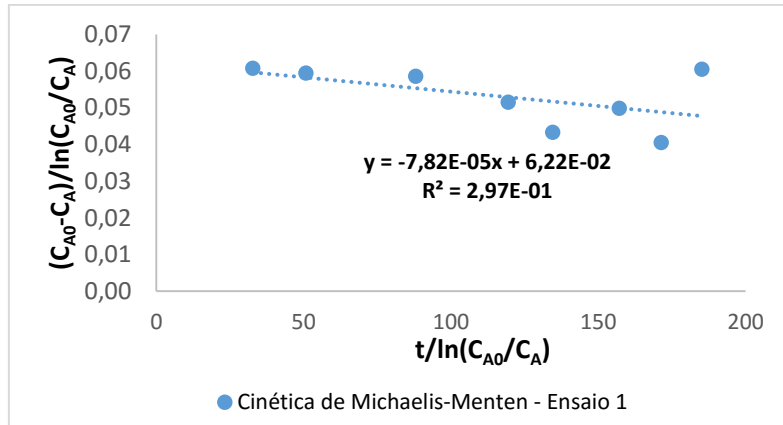


Figura A3.51. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m.

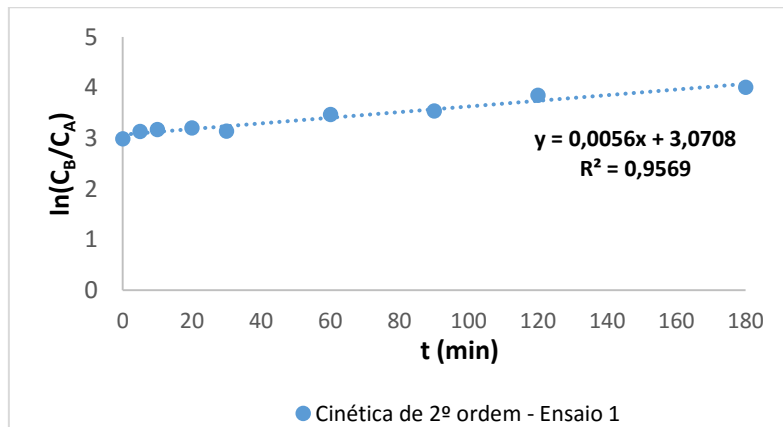


Figura A3.52. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica enzima:gordura de 0,0120 m/m.

- Utilização de Etanol a 90 %

Na Figura A3.53, Figura A3.54, Figura A3.55 e Figura A3.56 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.

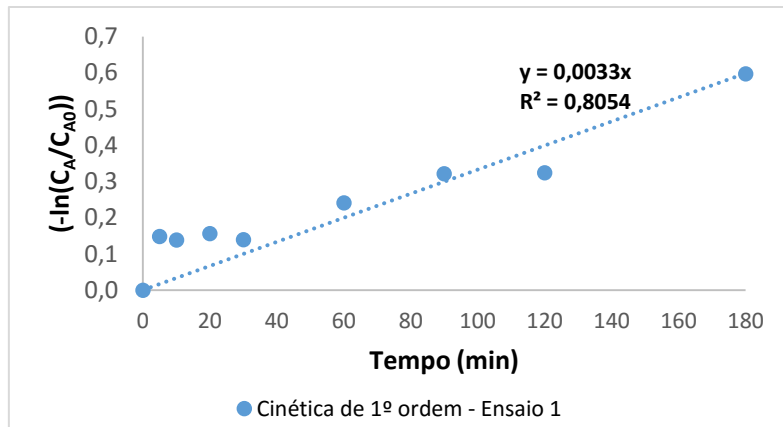


Figura A3.53. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.

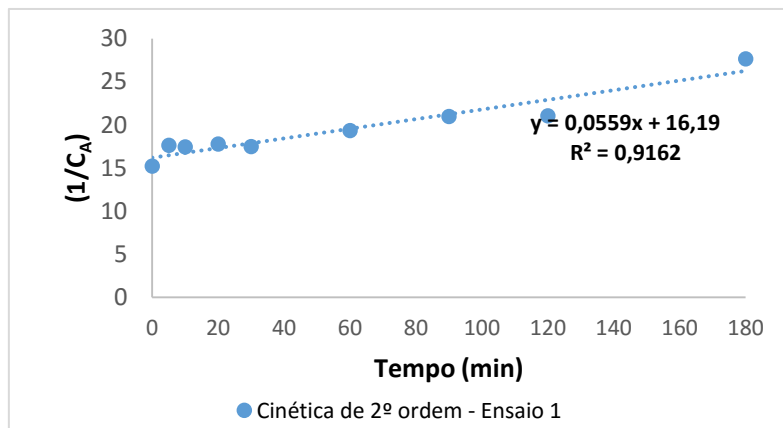


Figura A3.54. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.

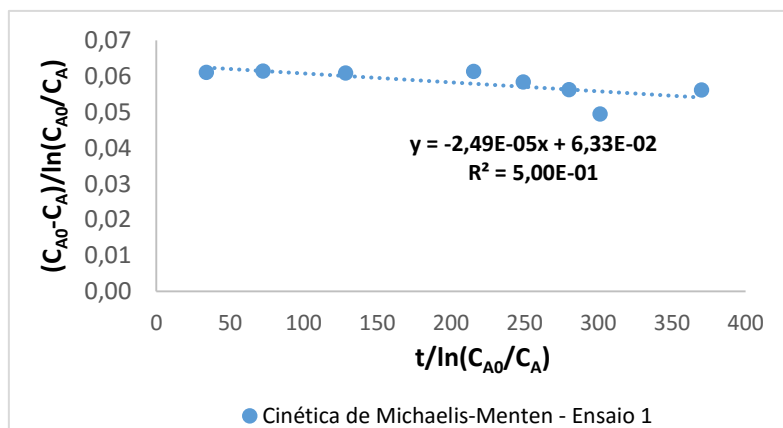


Figura A3.55. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

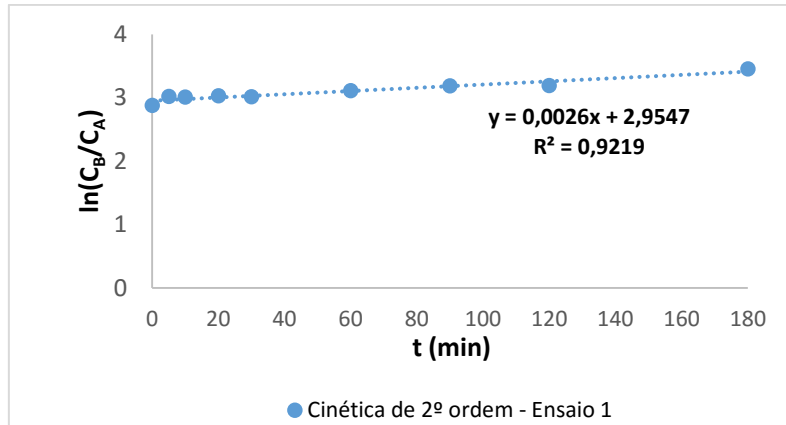


Figura A3.56. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 2,93 m/m.

Na Figura A3.57, Figura A3.58, Figura A3.59 e Figura A3.60 estão representados os ajustes cinéticos realizados para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.

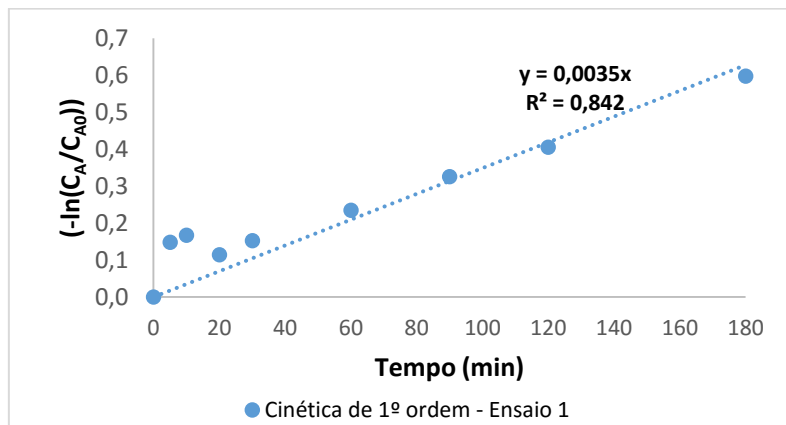


Figura A3.57. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.

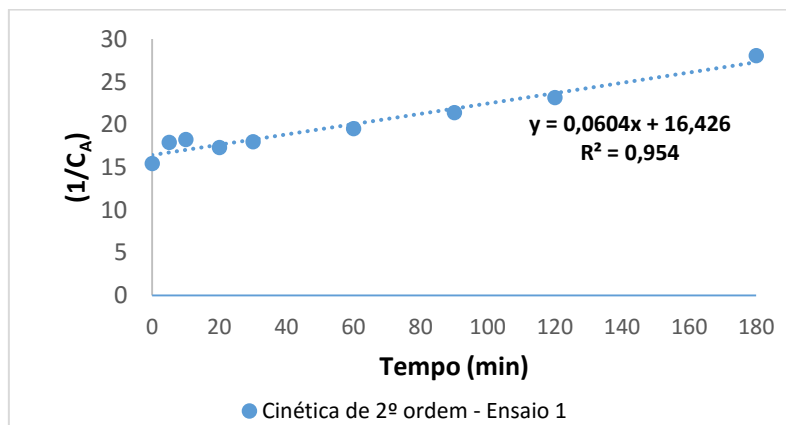


Figura A3.58. Ajuste ao modelo cinético de segunda ordem para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.

Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

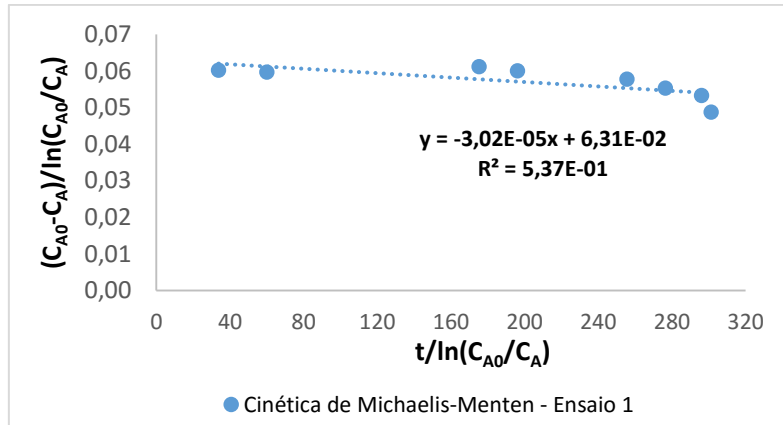


Figura A3.59. Ajuste ao modelo cinético de Michaelis-Menten para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.

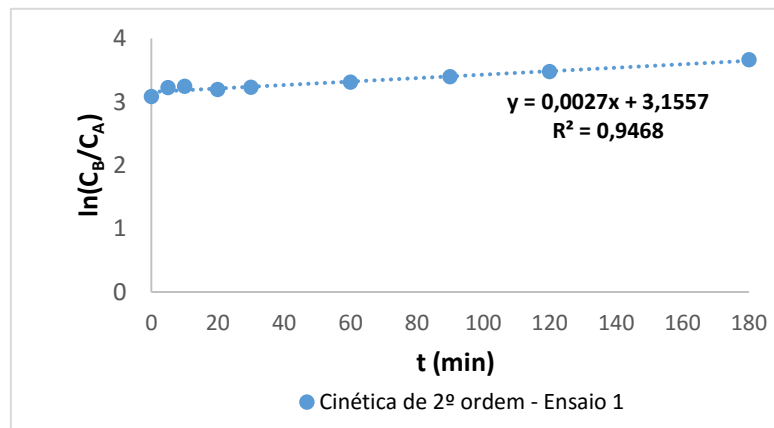


Figura A3.60. Ajuste ao modelo cinético de primeira ordem em relação a ambos os reagentes para a razão mássica EtOH:AGL de 3,58 m/m.

## Anexo 4

Na Figura A4.1 e na Figura A4.2 estão representados os resultados estatísticos obtidos para a cinética de segunda ordem em relação ao ácido oleico e para a cinética de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes, ácido oleico e etanol, respetivamente.

### SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,9725356
Quadrado de R	0,945825493
Quadrado de R ajustado	0,936796409
Erro-padrão	2,763988647
Observações	8

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	800,2760352	800,2760352	104,7532008	5,07296E-05
Residual	6	45,83779944	7,63963324		
Total	7	846,1138346			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	15,72346165	1,379440545	11,39843374	2,73361E-05	12,34809223	19,09883107	12,34809223	19,09883107
Variável X 1	0,164366623	0,016059425	10,23490112	5,07296E-05	0,125070627	0,20366262	0,125070627	0,20366262

### RESULTADO RESIDUAL

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>	<i>Residuais-padrão</i>
1	15,72346165	-0,235137613	-0,091888095
2	16,54529477	1,698073576	0,663580544
3	17,36712789	1,83641774	0,717643275
4	19,01079412	-0,884370444	-0,345598111
5	25,58545905	-2,19652528	-0,858367658
6	30,51645776	-4,363377263	-1,705139457
7	35,44745646	3,845952284	1,502937884
8	45,30945386	0,298967	0,116831619

**Figura A4.1.** Análise Estatística para a cinética de segunda ordem em relação ao ácido oleico.

## Redução de acidez de gorduras de mamífero por catálise enzimática

### SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,976722275
Quadrado de R	0,953986402
Quadrado de R ajustado	0,946317468
Erro-padrão	0,087356768
Observações	8

### ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,949293166	0,949293166	124,396235	3,09848E-05
Residual	6	0,04578723	0,007631205		
Total	7	0,995080396			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	3,063753121	0,043597671	70,27332063	5,58697E-10	2,957073463	3,17043278	2,957073463	3,17043278
Variável X 1	0,00566101	0,000507563	11,15330601	3,09848E-05	0,004419047	0,006902973	0,004419047	0,006902973

### RESULTADO RESIDUAL

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>	<i>Residuais-padrão</i>
1	3,063753121	-0,076227667	-0,942517585
2	3,09205817	0,051540307	0,637270536
3	3,120363219	0,072369858	0,894817682
4	3,176973317	-0,039527528	-0,488738426
5	3,403413708	-0,020887181	-0,258259708
6	3,573244001	-0,082609373	-1,021424241
7	3,743074294	0,144404332	1,785488507
8	4,082734881	-0,04906275	-0,606636765

**Figura A4.2.** Análise Estatística para a cinética de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes, ácido oleico e etanol.