

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA - DEQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PPGEQ

ANA CAROLINA VEIRA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS DE VALOR AGREGADO A PARTIR
DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA**

SÃO CARLOS - SP

2021

ANA CAROLINA VEIRA

*PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS DE VALOR AGREGADO A PARTIR DO
DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA*

Texto da Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Angélica Marquetotti Salcedo
Vieira

SÃO CARLOS - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Carolina Vieira, realizada em 27/08/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (UFSCar)

Profa. Dra. Angélica Marquetotti Salcedo Vieira (UEM)

Profa. Dra. Mayerlenis Jiménez Rojas (UA)

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira (UNIFAL - MG)

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Dedico aos meus pais e amigos
que me apoiaram nessa etapa.*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos (LabEnz) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo Nº2016/10636-8) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001). Os autores agradecem à COCAMAR (Maringá, PR, Brasil) pelo fornecimento do destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) para o estudo.



AGRADECIMENTOS

Agradeço minha equipe espiritual, guardiões e mentores por todo amparo e orientação no meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço aos meus pais por todo amor e apoio incondicionais em todas as etapas e desafios da minha jornada.

Agradeço ao Professor Paulo Tardioli por toda dedicação, paciência e apoio durante todo o desenvolvimento da pesquisa e também por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço aos Professores Angelica Marquettotti Salcedo Vieira e Marcelo Fernandes Vieira, Carla Andreia Lorscheider e Denise Conceição de Gois Santos Michelin pela oportunidade que me proporcionaram de conhecer novos lugares e novas perspectivas trazendo uma bagagem muito rica para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a toda equipe do LabEnz que proporcionou todo suporte e auxílio para o desenvolvimento da pesquisa, assim como todo companheirismo e amizade no dia a dia dentro e fora do laboratório.

Agradeço a todos os amigos que fiz no DEQ - UFSCar por todo carinho em cada etapa compartilhada.

Agradeço a Maria e a Pazu por oferecerem lugares tão acolhedores para que eu pudesse evoluir e aprimorar meu ser para desfrutar com mais leveza essa jornada.

Agradeço a Bianca, Belê e Valéria pela amizade, apoio e conversas que contribuíram para eu enxergar as coisas com um olhar mais simples, agradável e divertido.

Agradeço a todos os funcionários do DEQ que contribuíram direta e indiretamente para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Agradeço aos meus amigos de longa data, que me acompanham há tempos e sempre demonstraram todo seu carinho, afeição e atenção durante todo meu caminho.

Agradeço as pessoas que convivi nesses últimos anos, que passaram pelo meu dia, e sem eu perceber, ajudaram a eu ter o conhecimento e experiência que tenho hoje, que foram muito relevantes para a conclusão dessa etapa.

“Quando somos atraídas para aventuras sobre as quais sabemos muito pouco, isso cria vida e desenvolve a alma.

Ao escalar a montanha desconhecida, adquirimos o verdadeiro conhecimento da psique instintiva e dos atos criativos que ela é capaz - essa é nossa meta. O aprendizado ocorre sob formas diferentes com pessoas diferentes. No entanto, o ponto de vista instintivo que emana do inconsciente selvagem, e que é cíclico, passa a ser o único que faz sentido e que dá sentido à vida, à nossa vida. Ele é aquilo que infalivelmente nos fala sobre o que fazer em seguida. Onde podemos encontrar esse processo que nos libertará? Na montanha.”

Clarissa Pinkola Estés

RESUMO

VIEIRA, A. C. **Produção Enzimática de Compostos de Valor Agregado a Partir do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja.** 2021. 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2018.

Busca-se em um processo industrial a utilização de subprodutos (ou resíduos) a fim de transformá-los em um produto com valor agregado. Na indústria de refino do óleo de soja, o destilado da desodorização (DDOS) é um subproduto com grande potencial biotecnológico devido ao seu alto conteúdo em glicerídeos e tocoferol. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de aplicação do DDOS na produção de biodiesel e éster graxo de xilose (éster com propriedades surfactantes/emulsificantes) pela rota enzimática. O DDOS foi físico-quimicamente caracterizado, apresentando um alto índice de saponificação devido ao alto teor de acilglicerídeos (aproximadamente 85 % em massa), principalmente de cadeia longa (C18). Um planejamento experimental mostrou que temperatura de 35 °C, concentração de enzima de 8,36% em peso e razão molar de 3,64: 1 (etanol: DDOS-SP) foram as melhores condições para a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs) a partir da fração saponificável do DDOS (DDOS-SP), rendendo um produto com até 90% (base mássica) em ésteres etílicos após um tratamento caustico para a remoção de ácidos graxos livres residuais. A fração saponificável do DDOS foi submetida a uma hidrólise catalisada por lipases livres e, posteriormente, o material rico em ácido graxo livre foi usado para produzir ésteres etílicos e ésteres graxos de xilose. A etapa de hidrólise rendeu materiais saponificáveis com 72,5 e 84,4% (base mássica) de ácidos graxos livres (AGLs) após 48 h de reação usando as lipases Eversa (formulação líquida de lipase de *Thermomyces lanuginosus* da Novozymes A/S) e PFL (lipase de *Pseudomonas fluorescens*), respectivamente. A reação simultânea de esterificação e transesterificação do hidrolisado enzimático, usando etanol como receptor acil, rendeu (em base mássica) um produto com 81,5% de ésteres, 8,3% de glicerídeos não convertidos e 10,2% de AGLs.. No caso de sínteses de ésteres de xilose, as lipases imobilizadas utilizadas permitiram obter conversões de xilose de até 89,2% (usando PFL no caso). O comportamento do consumo de xilose e AGLs sugeriu que uma mistura de mono-, di- e triésteres foi produzida, contendo principalmente frações alquílicas insaturadas ligadas à xilose. As capacidades de emulsificação (EC de até 12%) mostraram potencial aplicação dos produtos brutos como biosurfactantes.

Palavras-chave: Destilado da Desodorização do Óleo de Soja. Lipase. Biocombustível. Éster de xilose.

ABSTRACT

VIEIRA, A. C. **Enzymatic Production of Value-Added Compounds from Soybean Oil Deodorization Distillate**. 2021. 140p. Thesis (Doctorate in Chemical Engineering) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2018.

The use of by-products (or residues) is sought in an industrial process in order to transform them into a value-added product. In the soybean oil refining industry, deodorization distillate (SODD) is a by-product with great biotechnological potential due to its high content of glycerides and tocopherol. This work aimed to evaluate the potential application of SODD in the production of biodiesel and xylose fatty ester (ester with surfactant/emulsifying properties) through the enzymatic route. SODD was physicochemically characterized, presenting a high saponification index due to the high content of acylglycerides (approximately 85 wt.%), mainly long-chain (C18). An experimental design showed that temperature of 35 °C, enzyme concentration of 8.36 wt.% and molar ratio of 3.64: 1 (ethanol: SODD-SP) were found as the best conditions for the production of fatty acid ethyl esters (FAEEs) from the SODD saponifiable phase (SODD-SP), yielding a product with up to 90.8 wt.% ester yield after caustic treatment to reduce free fatty acids. The SODD saponifiable phase was hydrolyzed with free lipases and, later, the free fatty acid rich material was used to produce ethyl esters and xylose fatty esters. The hydrolysis step yielded saponifiable materials with 72.5 wt.% and 84.4 wt.% of free fatty acids (FFAs) after 48 h of hydrolysis using the lipases Eversa (liquid lipase formulation of *Thermomyces lanuginosus* from Novozymes A/S) and PFL (*Pseudomonas fluorescens* lipase), respectively. The simultaneous esterification and transesterification reaction of the latter material with ethanol yielded a product with 81.5 wt.% of esters, 8.3 wt.% of unconverted glycerides and 10.2 wt.% of FFAs. In the case of xylose ester syntheses, the immobilized lipases used allowed to obtain xylose conversions of up to 89.2% (using PFL in this case). The behavior of the consumption of xylose and FFAs suggested that a mixture of mono-, di- and triesters was produced, containing mainly unsaturated alkyl fractions linked to xylose. The emulsifying capacities (EC up to 12%) showed potential application of the crude products as biosurfactants.

Key-words: Soybean Oil Deodorizer Distillate. Lipase. Biofuel. Xylose Ester.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

Figura 1- Etapas da produção do óleo de soja. Destilado da desodorização do óleo de soja como um resíduo gerado no processo.

Capítulo 4

Fig. 1 Response surfaces of biodiesel reaction with SODD saponifiable phase (SODD-SP). a) Enzyme concentration vs. ethanol:SODD-SP molar ratio. b) temperature vs. ethanol:SODD-SP molar ratio. c) temperature vs. enzyme concentration. Z-axis indicates the ester yield (wt. %).

Fig. 2 Profile of fatty acid ethyl ester (FAEE) yield (wt.%) vs. time for the esterification/transesterification of SODD saponifiable phase (SODD-SP) (15 g) with ethanol (8.10 g). Reactions conditions: 48 h reaction; 35 °C; molar ratio of 3.64:1 (ethanol:SODD-SP) and 8.36 wt.% enzyme concentration.

Fig. S1. Correlation between experimental (observed values) and fitted (predicted values) ester yields (wt.%) of the esterification/transesterification with SODD saponifiable phase and ethanol using Eversa Transform 2.0 as biocatalyst.

Fig. S2. Pareto chart with the effects of the parameters and their interactions for the experimental design of the esterification/transesterification with SODD saponifiable phase and ethanol using Eversa Transform 2.0 as biocatalyst.

Fig. S3. Profiles for predicted values and desirability of the esterification/transesterification with SODD saponifiable phase and ethanol using Eversa Transform 2.0 as biocatalyst.

Capítulo 5

Fig. 1 Flowchart of the SODD hydrolysis process followed by the synthesis of (a) ethyl esters (biofuel) and (b) xylose esters (biosurfactants).

Fig. 2 Free fatty acid (FFA) yield profile (wt.%) vs. time for the hydrolysis of SODD by the enzymes Eversa Transform 2.0 and *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL). Reaction conditions: 48 h reaction; 37 °C; 4:1 mass ratio (H₂O:SODD) and 5% enzyme (m/m_{SODD}).

Fig. 3 Xylose conversion in the xylose ester synthesis for the esterification of FFA-rich SODD (0.42 g) by immobilized lipases in methyl-ethyl-ketone solvent (60 mL). Reaction conditions: 24 h reaction, 60 °C, 200 rpm, 7 mM xylose, 0.5% (m/m_{SODD}) enzyme concentration, and 11.44 g of molecular sieve.

Fig. 4 Free fatty acid conversion (% by weight) in the xylose ester synthesis for the esterification of FFA-rich SODD by immobilized lipase (0.42 g) in methyl-ethyl-ketone solvent (60 mL). Reaction conditions: 24 h reaction, 60 °C, 200 rpm, 7 mM xylose, 0.5% (m/m_{SODD}) enzyme concentration, and 11.44 g of molecular sieve.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 – Descrição das etapas de refino do óleo de soja, objetivos e processos envolvidos

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos do óleo de soja

Tabela 3 – Componentes presentes no destilado da desodorização do óleo de soja obtido a partir do refino do óleo de soja

Tabela 4 - Comparação esquemática das principais características das diferentes tecnologias disponíveis para a produção de combustíveis líquidos renováveis, a partir de óleos vegetais.

Capítulo 3

Tabela 1 – Gradiente da fase móvel (% , v/v)

Tabela 2 – Condições utilizadas no cromatógrafo gasoso

Capítulo 4

Table 1. Coded values of the input variables for statistical design

Table 2. Physicochemical properties of the soybean oil deodorizer distillate (SODD)

Table 3. Experimental design for the influences of three independent variables (real and coded) on the ester yield of the esterification/transesterification reaction with SODD saponifiable phase (SODD-SP) (experimental and predicted values).

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for ester yield (wt. %) from SODD saponifiable phase (SODD-SP) (response variable) as function of the independent variables (ethanol:SODD-SP molar ratio, enzyme concentration and temperature)

Table 5. Mass balance of the biodiesel production for components.

Table S1. Researches focused on the production of biodiesel by the enzymatic route from deodorizer distillates (DD) of vegetable oils.

Table S2. Studies of biodiesel production using Eversa® Transform lipase (liquid or immobilized) as biocatalyst.

Table S3. Coefficients of the polynomial model fitted in the statistical design

Capítulo 5

Table 1. Studies of fatty acid xylose esters using immobilized lipases.

Table 2. Tocopherol composition of the xylose esters mixture formed

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL - Ácidos graxos livres

AOCS - American Oil Chemists' Society

Asp - Aspartato

CALB - Lipase de *Candida antarctica* B

CTO - Crude Tall Oil

DAG - Diglicerídeos

DDOS – Destilado da desodorização do óleo de soja

FAEE – Fatty acid ethyl esters (Ésteres etílicos de ácidos graxos)

FFA – Free fatty acid

FAME - Fatty acid methyl ester

Glu – Glutamato

HPLC – High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

PFL - Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

p-NPB - p-Nitrofenilbutirato

Lys – Lisina

m/v - Massa/Volume

SO_x – Óxidos de enxofre

SODD - Soybean oil deodorizer distillate

SODD – SP – Saponifiable phase of soybean oil deodorizer distillate

TAG – Triglicerídeos

TBU – Unidade Tributirina

TLL - Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

U - Unidade enzimática

UV – Ultravioleta

v/v - Volume/Volume

wt. - For weight

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Motivação do tema do projeto de tese de doutorado	16
1.1 Introdução	17
1.2 Escolha do tema.....	20
1.3 Objetivos.....	22
1.3.1 Objetivo geral	22
1.3.2 Objetivos específicos.....	22
1.4 Estrutura da tese.....	22
Referências	23
Capítulo 2 – Revisão bibliográfica	29
2.1 Destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS).....	30
2.2 Lipases	36
2.2.1 Eversa	37
2.2.2 Lipase de Candida antarctica B	38
2.2.3 Lipase de Pseudomonas fluorescens	38
2.2.4 Lipase de Thermomyces lanuginosus.....	39
2.2.6 Imobilização de lipases.....	39
2.3 Biocombustíveis	41
2.3.1 Biodiesel	41
2.3.2 Ecodiesel.....	42
2.4 Ester de xilose.....	44
Referências	47
Capítulo 3 – Materiais e métodos	56
3.1 Materiais	56
3.2 Métodos	58
3.2.1 Métodos físico-químicos	58
3.2.1.1 Índice de acidez	58

3.2.1.2 Índice de iodo pelo método de Wijs	58
3.2.1.3 Índice de saponificação	59
3.2.1.4 Densidade	60
3.2.1.5 Viscosidade.....	60
3.2.1.6 Umidade	61
3.2.2 Métodos analíticos.....	61
3.2.2.1 Atividade hidrolítica frente a substratos de cadeia curta (tributirina como substrato)	61
3.2.2.2 Atividade frente a substratos sintéticos (p-nitrofenil-butirato).....	61
3.2.2.3 Determinação de proteínas	62
3.2.2.4 Reação de saponificação seguida de extração líquido-líquido	62
3.2.2.5 Reação de hidrólise enzimática	62
3.2.2.6 Reação de esterificação/transesterificação para a síntese de ésteres etílicos....	63
3.2.2.7 Polimento caustico do biodiesel	63
3.2.2.8 Reação de esterificação para a síntese de ésteres de xilose.....	63
3.2.2.9 Ensaios de capacidade de emulsão	64
3.2.3 Preparo de amostras.....	64
3.2.3.1 Preparo de amostra de material insaponificável para determinação de tocoferol por cromatografia em fase líquida	64
3.2.3.2 Preparo de amostra para caracterização de ácidos graxos livres, glicerídeos e ésteres de ácidos graxos por cromatografia líquida.....	65
3.2.3.3 Preparo de amostra para determinação da matéria glicéridica total do DDOS (AGL, MAG, DAG, TAG) por cromatografia em fase gasosa	66
3.2.4 Métodos cromatográficos	66
3.2.4.1 Determinação de tocoferol por cromatografia líquida.....	66
3.2.4.2 Determinação de ácidos graxos livres, glicerídeos e ésteres de ácidos graxos por cromatografia líquida.....	67
3.2.4.3 Quantificação de xilose por cromatografia líquida.....	68

3.3.4.4 Determinação de ácidos graxos livres por cromatografia gasosa.....	68
3.3.4.5 Determinação de ésteres metílicos e etílicos por cromatografia gasosa.....	69
3.3.4.6 Determinação de glicerol, TAG, DAG e MAG por cromatografia gasosa	70
Referências	71
Capítulo 4 – Enzymatic production of fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorizer distillate using a liquid lipase formulation	73
Abstract.....	74
4.1. Introduction	75
4.2 Materials and Methods	77
4.2.1 Materials	77
4.2.2 Characterization of the SODD.....	77
4.2.3 SODD saponification.....	77
4.2.4 Esterification/transesterification reaction using SODD saponifiable phase (SODD- SP) and ethanol.....	78
4.2.5 Caustic treatment	79
4.2.6 Tocopherol quantification by liquid chromatography	79
4.2.7 Quantification of esters by gas chromatography	79
4.2.8 Quantification of glycerol, TAGs, DAGs, and MAGs by gas chromatography	80
4.2.9 Quantification of free fatty acids by gas chromatography	80
4.3 Results and discussion.....	81
4.3.1 SODD characterization.....	81
4.3.2 Transesterification/esterification reaction	84
4.4 Conclusion.....	93
Funding.....	93
Acknowledgments	93
Supplementary Material	94
References	103

Capítulo 5 – Soybean oil deodorizer distillate as feedstock to produce fatty acid esters using ethanol and xylose as acyl acceptors	109
Abstract.....	110
5.1. Introduction	111
5.2 Materials and Methods	112
5.2.1 Materials	112
5.2.2 SODD hydrolysis reaction.....	113
5.2.3 Ethyl ester synthesis	116
5.2.4 Sugar ester synthesis.....	116
5.2.5 Emulsion Capacity Assays	116
5.2.6 Tocopherol quantification.....	117
5.2.7 Xylose determination.....	117
5.2.8 Glycerides quantification.....	118
5.2.9 Quantification of ethyl esters by gas chromatography	118
5.2.10 Quantification of FFAs by gas chromatography	119
5.3 Results and discussion.....	119
5.3.1 SODD hydrolysis reaction.....	119
5.3.2 Synthesis of FAEEs.....	121
5.3.3 Synthesis of xylose esters	123
5.3.4. Emulsion Capacity Assays	129
5.4 Conclusion.....	130
Funding.....	130
Acknowledgments	131
References	132
Capítulo 6 – conclusões e recomendações para trabalhos futuros.....	138
6.1 Conclusões.....	139
6.2 Recomendações para trabalhos futuros	140

CAPÍTULO 1 – MOTIVAÇÃO DO TEMA DO PROJETO DE TESE DE DOUTORADO

1.1 INTRODUÇÃO

O destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) é um dos resíduos industriais do refino do óleo de soja com potencial para obtenção de produtos com valor agregado (GUNAWAN; JU, 2009; GUNAWAN; KASIM; JU, 2008; PRETTO et al., 2017; YIN et al., 2015). Esse resíduo origina-se do processo de remoção de aldeídos, cetonas e outras substâncias voláteis que podem afetar o sabor e o odor do óleo de soja. O DDOS é composto majoritariamente por ácidos graxos livres, além de quantidades menores de acilgliceróis, escaleno, esterol e tocoferol (vitamina E) (GUNAWAN; KASIM; JU, 2008; KASIM et al., 2010).

A composição rica em ácidos graxos e triglicerídeos do DDOS o faz um subproduto com grande potencial para a produção de biocombustível (DU; WANG; LIU, 2007; POURZOLFAGHAR et al., 2016; WANG et al., 2006; YIN et al., 2016). O biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos (ou etílicos) de ácidos graxos (FAME ou FAEE, do inglês fatty acid methyl esters ou fatty acid ethyl esters, respectivamente) utilizado como um combustível alternativo ao óleo diesel, convencionalmente produzido a partir de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais. O biodiesel é biodegradável e atóxico, e apresenta menores emissões de material particulado e gases do efeito estufa (CO, CO₂ e SO_x), sendo, portanto, ambientalmente “amigável” (MA; HANNA, 1999; SIMS et al., 2010; TAN et al., 2010). A síntese industrial desse biocombustível é usualmente conduzida por transesterificação de triglicerídeos (óleos vegetais ou gorduras animais) em meio homogêneo com álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol), fazendo uso de catalisadores alcalinos (MA; HANNA, 1999; SIMS et al., 2010; TAN et al., 2010). Entretanto, esse processo apresenta algumas desvantagens, tais como, dificuldade de recuperação do glicerol, tratamento de efluente alcalino, interferência de ácidos graxos livres e água no processo (reações de saponificação, por exemplo), e alto consumo de energia (BAN et al., 2002; BORUGADDA; GOUD, 2012; SHIEH; LIAO; LEE, 2003). Além disso, o custo com óleos refinados pode representar até 80% do custo total do biodiesel. O uso de óleos não comestíveis e resíduos oleosos pode ser uma alternativa atrativa aos óleos comestíveis convencionalmente usados na produção de biodiesel (óleos de soja, canola e milho) (AGUIEIRAS et al., 2014; KAIEDA et al., 1999; PATIL et al., 2012; TAN et al., 2010; VESCOVI et al., 2016). Entretanto, essas matérias-primas tem alto conteúdo de ácidos graxos livres e seu processamento por transesterificação alcalina requer uma etapa adicional para reduzir o conteúdo de ácidos graxos livres abaixo de 0,5%, pois se esse valor é

excedido, haverá formação de sabão, reduzindo a conversão da reação (CANAKCI; GERPEN, 2001; TING et al., 2008).

Os ácidos graxos livres presentes no DDOS também podem ser utilizados na produção dos ésteres graxos de açúcares, que são surfactantes não iônicos (GUMEL et al., 2011) cujas propriedades emulsificantes devido à presença de uma “cauda” longa apolar de um ácido graxo e uma “cabeça” polar de um carboidrato (FRANZETTI et al., 2010; KHAN; RATHOD, 2015; VESCOVI et al., 2017). Essas substâncias são biodegradáveis, com ampla aplicação em muitos setores econômicos, tais como, alimentos, cosméticos, higiene bucal, detergentes e fármacos (BAKER et al., 2000; BERNAL; POVEDA-JARAMILLO; MESA, 2018; BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; GONÇALVES et al., 2021a; GUMEL et al., 2011; KHAN; RATHOD, 2015; KOSARIC, 1992; LIMA et al., 2018; REN; LAMSAL, 2017; STAROŃ et al., 2018; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017)

A síntese industrial de ésteres graxos de açúcares é realizada por transesterificação de ésteres metílicos de ácidos graxos (mais caros que ácidos graxos livres) com carboidratos na presença de catalisadores alcalinos ou metálicos. A reação requer alta temperatura (> 100°C) e o uso de pressão reduzida para remover metanol liberado do doador acila ativado, evitando competição com os grupos hidroxílicos dos carboidratos (GUMEL et al., 2011). Isso implica em alto custo com energia, produção de sub-produtos indesejáveis e baixa seletividade (FERRER et al., 2005; PATIL; DE LEONARDIS; NAG, 2011; SUTILI et al., 2013; YAN et al., 2001; ZHANG et al., 2013). Além disso, há outras dificuldades como o controle do grau de esterificação e a posição de acilação quando se utiliza a catálise alcalina (BOSCOLO, 2003; GUMEL et al., 2011). Entretanto, fazendo-se uso de lipases, devido as suas especificidades (especificidade quanto ao substrato, regioespecificidade e estereoespecificidade) (KAPOOR; GUPTA, 2012; VILLENEUVE et al., 2000) essas dificuldades podem ser facilmente contornadas. Portanto, a síntese enzimática de ésteres de açúcares pode ser uma excelente alternativa, a qual inclusive é utilizada em escala industrial para algumas aplicações (KHAN; RATHOD, 2015).

A lipase (triacilglicerol hidrolase, EC 3.1.1.3) é uma enzima que em meio orgânico, com baixa atividade de água, catalisa reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; EGGERT, 2012; KAPOOR; GUPTA, 2012; REETZ, 2002; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Lipases podem ser utilizadas em processos industriais tanto na forma livre como imobilizada. O emprego de lipases líquidas vem ganhando destaque na produção de biodiesel (MIBIELLI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021;

REMONATTO et al., 2018; WANCURA et al., 2019). Assim como as lipases imobilizadas, as formulações líquidas também podem ser reutilizadas no processo, sendo recuperadas do meio após a sua decantação, pois ao final da reação, a enzima permanece concentrada entre as camadas de ésteres graxos e glicerol e água, devido ao carácter anfifílico da sua molécula (LV et al., 2017). No entanto, há formulações em que os custos são reduzidos, fazendo com que a prática de reuso se torne desnecessária. Essas formulações são produzidas para atingir maiores atividades específicas e catalisar a reação sem sofrer inativação por adsorção de glicerol na superfície da enzima. Esta adsorção impacta diretamente na estabilidade operacional e perda de atividade enzimática, ocorrendo principalmente com lipases imobilizadas (WANCURA et al., 2019). No sistema de reação, com o uso de enzima solúvel, há a introdução de água no meio reacional, o que implica na formação de uma interface que propicia a ativação da lipase e contribui para a diluição do álcool presente na reação, reduzindo os efeitos de inibição da enzima (PEDERSEN et al., 2014).

Portanto, para a seleção de uma lipase para uma determinada aplicação deve-se considerar sua especificidade e estabilidade em diferentes sistemas de solventes (WANCURA et al., 2019). Assim, a utilização de lipases imobilizadas pode ser considerada para processos como a síntese de éster de açúcar. A imobilização melhora a eficácia nas condições de processo, principalmente quanto a atividade e a estabilidade operacional (DICOSIMO et al., 2013). Contudo, na escolha de uma estratégia de imobilização é preciso atentar-se às especificações do processo para o catalisador, abrangendo parâmetros como atividade enzimática geral, características de desativação e regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais do biocatalisador imobilizado (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002; RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES; BERENQUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Particularmente para lipases, a imobilização em suportes hidrofóbicos tem se mostrado vantajosa, devido às melhorias nas propriedades da enzima (MIRANDA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2010, 2019; VESCOVI et al., 2017). Devido ao mecanismo peculiar de ativação interfacial das lipases (VERGER, 1997) pode-se obter em uma única etapa purificação, imobilização e ativação (BASTIDA et al., 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998a; PALOMO et al., 2005).

Visando viabilizar a produção de biomoléculas de interesse comercial (biodiesel e éster de xilose) pela rota enzimática de uma forma que seja competitiva com a rota química, há que se desenhar um processo em que a rota enzimática seja a única alternativa ou que essa elimine

etapas onerosas do processamento químico. Lipases de baixo custo, ativas e estáveis em ambientes não naturais, seletivas quanto ao produto desejado, são alternativas interessantes para o desenvolvimento de um processo enzimático custo-efetivo. Com relação à matéria-prima, insumos oriundos de rejeitos industriais são muito atrativos do ponto de vista econômico e ambiental. O DDOS, resíduo do refino do óleo de soja, é uma fonte atrativa de ácidos graxos livres e, particularmente, o processamento enzimático visando à produção de ésteres etílicos e ésteres de xilose pode ser mais vantajosa em relação ao seu processamento químico, uma vez que lipases irão catalisar simultaneamente a esterificação dos ácidos graxos livres e a transesterificação dos acilgliceróis, o que não pode ser realizado em uma única etapa pela rota química. Nesse contexto, este trabalho visa por meio de uma rota enzimática, a biotransformação desse resíduo em produtos de larga aplicação em diferentes setores econômicos.

1.2 ESCOLHA DO TEMA

O tema de doutorado se insere em linhas de pesquisa do Projeto Temático BIOEN-FAPESP (Proc. Nº 2016/10636-8) “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas”: A proposta do Projeto Temático é aproveitar sinergias entre os processos de produção de bioetanol e biodiesel numa nova concepção de biorrefinaria integrada, em que “gargalos” da produção desses dois biocombustíveis de forma totalmente renovável podem ter soluções tecnicamente mais eficazes aproveitando subprodutos ainda problemáticos (por exemplo, glicerol) e explorando a produção de outras moléculas de maior valor agregado, tais como, ácido 3-hidroxi propiônico, ácido aspártico, nanocelulose, carotenoides, biossurfactantes, dentre outras.

É neste contexto que se insere esse trabalho de doutorado, avaliando a produção de biodiesel etílico e ésteres graxos de xilose a partir de biomassa residual do processamento de óleos vegetais (ácidos graxos do DDOS) por rota bioquímica utilizando lipases como catalisadores, obtendo produtos como biocombustíveis, surfactantes e emulsificantes, respectivamente.

O DDOS é uma mistura de várias substâncias, mas tem sua composição majoritária em (% mássica) ácidos graxos livres (45,38%), triacilgliceróis (18,45%), diacilgliceróis (4,85%), esqualeno (1,83%), ésteres esterílicos de ácidos graxos (3,91%), tocoferóis (6,40%) e esteróis

livres (5,36%) (GUNAWAN; KASIM; JU, 2008). Embora essa biomassa seja uma fonte rica de acilgliceróis, sua utilização na produção de biodiesel é escassa (CORRÊA et al., 2011; DU; WANG; LIU, 2007; FACIOLI; BARRERA-ARELLANO, 2001; SU et al., 2014; WANG et al., 2006; YIN et al., 2016; ZENG et al., 2017). A grande maioria das pesquisas com o DDOS tem focado especialmente o isolamento de fitoesteróis e tocoferóis. No caso do tocoferol, para ser comercializado como vitamina E, a pureza deve ser de pelo menos 60% e ser livre de ácidos graxos (PRETTO et al., 2017).

Para aproveitamento dos ácidos graxos livres (AGL) para produção de biodiesel e éster de açúcar, e dos tocoferóis e esteróis para aplicação em processos industriais, a concentração desses compostos (AGL e tocoferóis) em diferentes fases do DDOS é relevante. O método clássico para separação desses compostos é a saponificação (MANIET; JACQUET; RICHEL, 2019). A saponificação do DDOS e a posterior concentração dos ácidos graxos livres e tocoferóis irão gerar duas correntes com importantes aplicações dentro do grupo de pesquisa, sendo a utilização dos AGL objeto de estudo desse trabalho. A corrente rica em ácidos graxos é utilizada como matéria-prima para a produção de biodiesel e ésteres graxos de xilose. Dessa forma, essa pesquisa agrega valor a esse subproduto do refino do óleo de soja, além de utilizar uma fonte de triglicerídeos de baixo valor econômico na produção de biodiesel, não competindo com óleos refinados comestíveis, cuja utilização na indústria do biodiesel representa um custo elevado de matéria-prima.

Além disso, embora destilados da desodorização de óleo de soja, bem como outros óleos vegetais (palma, colza, etc.) têm sido reportados como matérias-primas na produção de biodiesel (CORRÊA et al., 2011; TEIXEIRA; SANTOS; CRESPO, 2012; YIN et al., 2015; ZENG et al., 2017) sua utilização como fonte de ácidos graxos para a produção de ésteres de açúcares ainda é inédita na literatura. Em relação aos ésteres de açúcares, há inúmeros trabalhos que exploram a sua produção usando vários carboidratos (frutose, sacarose, glicose, galactose, lactose, maltose, etc.) como receptores acilas (KHAN; RATHOD, 2015; LIMA et al., 2018; NETA et al., 2012). Entretanto, trabalhos que utilizam xilose como receptor acila ainda são escassos na literatura (ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016; BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; LIMA et al., 2017; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Utilizar os ácidos graxos livres (AGL) presentes no destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) para produção de compostos de interesse comercial (biodiesel e éster de xilose) utilizando a rota enzimática.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o uso da fração rica em AGL do DDOS para a produção de biodiesel por rota enzimática usando uma lipase líquida comercial especialmente formulada para a indústria de biodiesel (Eversa® Transform 2.0).
- b) Avaliar o uso da fração rica em AGL do DDOS para produção de ésteres graxos de xilose por rota enzimática usando diferentes lipases imobilizadas comerciais.

1.4 ESTRUTURA DA TESE

No primeiro capítulo apresenta-se uma introdução ao tema da tese, motivação do estudo do tema, e os objetivos propostos para o trabalho. No segundo capítulo faz-se uma revisão a partir da literatura científica dos principais tópicos que compõem a tese de doutorado, ou seja, as enzimas utilizadas, o subproduto do refino de óleo de soja empregado e os processos enzimáticos que esse subproduto foi submetido. No terceiro capítulo descreve-se os materiais e as metodologias empregadas, destacando as alternativas propostas para produção tanto do biodiesel quanto do éster de xilose, bem como as estratégias de maximização da produção de AGL e obtenção de tocoferol. Nos capítulos 4 e 5 são apresentados os resultados no formato de artigos científicos, abordando etapas de caracterização do DDOS, assim como ensaios de aplicação desse material para os produtos de interesse. No sexto capítulo faz-se as considerações finais e as sugestões para trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- ABDULMALEK, E.; HAMIDON, N. F.; RAHMAN, M. B. A. Optimization and characterization of lipase catalysed synthesis of xylose caproate ester in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 1–4, 2016.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.
- BAKER, I. J. A. et al. Sugar fatty acid ester surfactants: Base-catalyzed hydrolysis. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 3, n. 1, p. 29–32, 2000.
- BAN, K. et al. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 17, n. 3–5, p. 157–165, 2002.
- BASTIDA, A. et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.
- BERNAL, C.; POVEDA-JARAMILLO, J. C.; MESA, M. Raising the enzymatic performance of lipase and protease in the synthesis of sugar fatty acid esters, by combined ionic exchange - hydrophobic immobilization process on aminopropyl silica support. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 760–767, 2018.
- BIDJOU-HAIOUR, C.; KLAI, N. Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 4347–4350, 2013.
- BORUGADDA, V. B.; GOUD, V. V. Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4763–4784, 2012.
- BOSCOLO, M. Sucochemistry: Synthesis and potentialities for applications of some sucrose chemical derivates. **Química Nova**, v. 26, p. 906–912, 2003.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: **Methods in Molecular Biology**. In J. M. G ed. [s.l.: s.n.]. v. 1051p. 15–31.
- CANAKCI, M.; GERPEN, J. VAN. Biodiesel Production From Oils and Fats With High Free Fatty Acids. **Transactions of the ASAE (American Society of Agricultural Engineers)**, v. 44, n. 6, p. 1429–1436, 2001.

CORRÊA, I. N. DOS S. et al. Enzymatic Biodiesel Synthesis Using a Byproduct Obtained from Palm Oil Refining. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem. Soc. Rev**, v. 42, p. 6437–6474, 2013.

DU, W.; WANG, L.; LIU, D. Improved methanol tolerance during Novozym435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 173–176, 2007.

FACIOLI, N. L.; BARRERA-ARELLANO, D. Optimisation of enzymatic esterification of soybean oil deodoriser distillate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 12, p. 1193–1198, 2001.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998.

FERRER, M. et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 391–398, 2005.

FRANZETTI, A. et al. (Bio)surfactant and Bioremediation, Successes and Failures. **Research Signpost**, v. 661, n. 2, p. 145–156, 2010.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Reviewing research on the synthesis of CALB-catalyzed sugar esters incorporating systematic mapping principles. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, p. 1–23, 28 fev. 2021.

GUMEL, A. M. et al. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2079–2090, 2011.

GUNAWAN, S.; JU, Y. H. Vegetable oil deodorizer distillate: Characterization, utilization and analysis. **Separation and Purification Reviews**, v. 38, n. 3, p. 207–241, jul. 2009.

GUNAWAN, S.; KASIM, N. S.; JU, Y. H. Separation and purification of squalene from soybean oil deodorizer distillate. **Separation and Purification Technology**, v. 60, n. 2, p. 128–135, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb Technol**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2012.

KAIEDA, M. et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and**

Bioengineering, v. 88, n. 6, p. 627–631, 1999.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KASIM, N. S. et al. A simple two-step method for simultaneous isolation of tocopherols and free phytosterols from soybean oil deodorizer distillate with high purity and recovery. **Separation Science and Technology**, v. 45, n. 16, p. 2437–2446, 2010.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793–1806, 2015.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731–1737, 1992.

LIMA, L. N. DE et al. Mono- and heterofunctionalized silica magnetic microparticles (SMMPs) as new carriers for immobilization of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 491–499, 2017.

LIMA, L. N. et al. Performance of Different Immobilized Lipases in the Syntheses of Short- and Long-Chain Carboxylic Acid Esters by Esterification Reactions in Organic Media. **Molecules**, v. 23, p. 766, 2018.

LV, L. et al. Effect of water on lipase NS81006-catalyzed alcoholysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 239–244, 2017.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1–15, 1999.

MANIET, G.; JACQUET, N.; RICHEL, A. Recovery of sterols from vegetable oil distillate by enzymatic and non-enzymatic processes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 22, n. 4, p. 347–353, 2019.

MIBIELLI, G. M. et al. Enzymatic production of methyl esters from low-cost feedstocks. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101558, 2020.

MIRANDA, L. P. et al. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa® Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 817, 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, 1 fev. 2021.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n.

2, p. 57–66, 2002.

NETA, N. A. S. et al. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 27, p. 324–331, 2012.

PALOMO, J. M. et al. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.

PATIL, D.; DE LEONARDIS, A.; NAG, A. Synthesis of biosurfactants from natural resources. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 747–758, 2011.

PATIL, P. D. et al. Biodiesel Production from Waste Cooking Oil Using Sulfuric Acid and Microwave Irradiation Processes. **Journal of Environmental Protection**, v. 03, n. 01, p. 107–113, 2012.

PEDERSEN, A. T. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.

PRETTO, C. DE et al. Possibilities for Producing Energy, Fuels, and Chemicals from Soybean: A Biorefinery Concept. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–28, 2017.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 145–150, 2002.

REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 2018.

REN, K.; LAMSAL, B. P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. **Food Chemistry**, v. 214, p. 556–563, 2017.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268–1273, ago. 2010.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance

of Enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216–2238, 1 set. 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by surface response methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 103–106, 2003.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, 2010.

STARON, J. et al. Lactose esters: synthesis and biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 245–258, 2018.

SU, F. et al. Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized on Hydrophobic Carriers and Its Application in Biorefinery of Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 3, p. 935–945, 2014.

SUTILI, F. K. et al. Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 37–42, 2013.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628–634, 2010.

TEIXEIRA, A. R. S.; SANTOS, J. L. C.; CRESPO, J. G. Lipase-catalyzed consecutive batch reaction for production of steryl esters from vegetable oil deodorizer distillates. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 15, p. 5443–5455, 2012.

TING, W. et al. An enzymatic / acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. v. 39, p. 203–210, 2008.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, 2016.

VESCOVI, V. et al. Immobilized Lipases on Functionalized Silica Particles as Potential Biocatalysts for the Synthesis of Fructose Oleate in an Organic Solvent/Water System. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–16, 2017.

VESCOVI, V.; SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

WANCURA, J. H. C. et al. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1–20, 2019.

WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1–4, p. 29–32, 2006.

YAN, Y. et al. Regioselective lipase-catalyzed synthesis of glucose ester on a preparative scale. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 9, p. 583–587, 2001.

YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate enhanced by counter-current pulsed ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 53–58, 2015.

YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate using calcined duck eggshell as catalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 112, p. 199–207, 2016.

ZENG, L. et al. Preparation of Biodiesel with Liquid Synergetic Lipases from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 778–791, 2017.

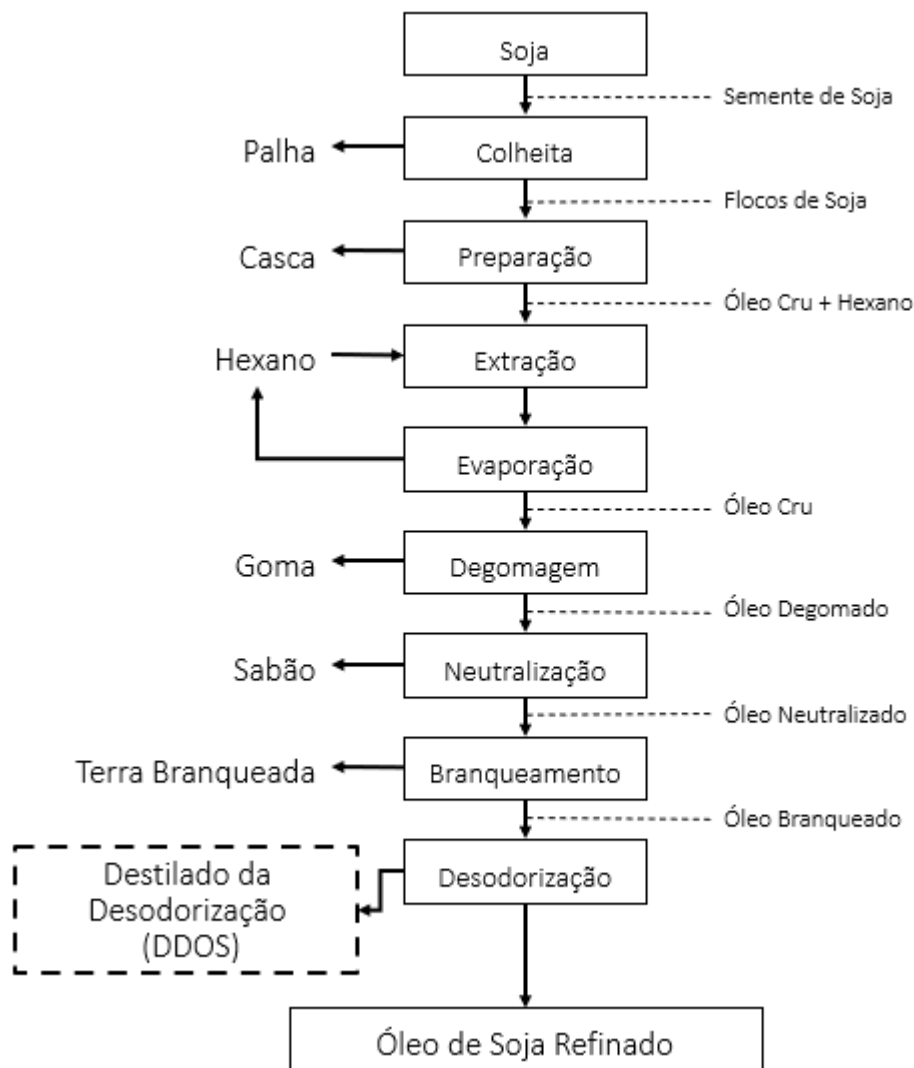
ZHANG, X. et al. Site-specific xylitol dicaprato ester synthesized by lipase from *Candida* sp. 99-125 with solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 61–66, 2013.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA (DDOS)

A extração do óleo de soja da semente (Figura 1) ocorre com a utilização de um solvente, como o hexano, e é seguido das seguintes etapas: preparação da semente, extração do óleo e dessolventização do óleo (bruto) e da farinha (HAMM; HAMILTON; CALLIAUW, 2013). O óleo é comercializado principalmente na forma bruta e degomada, sendo que o seu refino pode ser obtido na mesma instalação de extração e concentração da proteína presente no farelo, contribuindo para a redução dos custos de produção e o aumento da qualidade dos produtos finais (óleo refinado e concentrado proteico) (PRETTO et al., 2017).

Figura 1- Etapas da produção do óleo de soja. Destilado da desodorização do óleo de soja como um resíduo gerado no processo.



Fonte: Adaptada de PRETTO et al., 2017.

A produção do óleo de soja refinado visa a remoção de impurezas como ácidos graxos livres (AGLs), fosfolipídios, compostos voláteis, odoríferos e pigmentos escuros; envolve as etapas de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização (Tabela 1), nas quais são gerados, respectivamente, os seguintes resíduos: gomas, sabões, terra branqueada e destilado da desodorização (SINGH, 2010).

Tabela 1 – Descrição das etapas de refino do óleo de soja, objetivos e processos envolvidos

Etapa	Objetivo	Processo
Degomagem	Remoção de fosfolipídeos	Hidratação e centrifugação
Neutralização*	Remoção ou redução de ácidos graxos livres	Reação química entre os AGLs e uma base (geralmente NaOH)
Branqueamento	Eliminação ou clarificação da cor do óleo	Adsorção de pigmentos coloridos nos microporos de uma terra ativada, sob vácuo e a uma temperatura adequada
Desodorização	Remoção ou redução de compostos voláteis odoríferos	Destilação a vapor a vácuo a uma temperatura elevada de 200–250 °C e vácuo de 400 Pa

*Neste processo, goma não hidrolisável, metais residuais e matéria saponificável também são reduzidos ou removidos.

Fonte: Adaptada de PRETTO et al., 2017.

Os resíduos gerados nas etapas do processamento de óleos vegetais são fontes ricas de compostos de interesse comercial e nem sempre são aproveitados, como o DDOS, que é uma mistura de várias substâncias, mas principalmente é composto por ácidos graxos livres, muito semelhante ao óleo de soja (Tabela 2), possuindo em menor quantidade triacilgliceróis, diacilgliceróis, escaleno, tocoferóis e esteróis livres (GUNAWAN; JU, 2009; MANIET; JACQUET; RICHEL, 2019; SAINI; KEUM, 2016). O DDOS é proveniente da etapa de desodorização (processo de destilação em alta temperatura) do óleo de soja (SHERAZI; MAHESAR, 2016), que é aplicado para remover compostos voláteis responsáveis por odor, cor e sabor inaceitáveis no padrão de qualidade de óleos para comercialização (NAZ et al., 2012b; SHERAZI; MAHESAR, 2016).

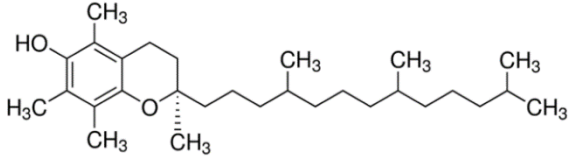
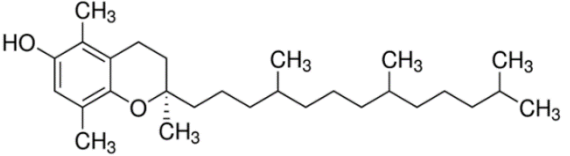
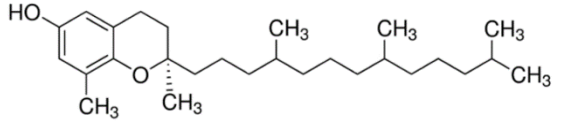
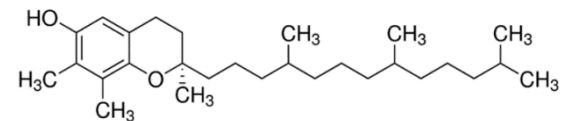
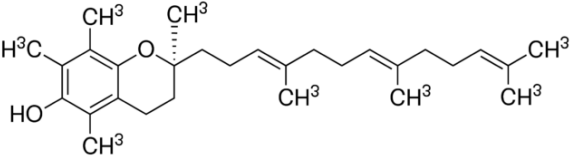
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos do óleo de soja

Componente	Nº de Carbonos	Quantidade (% em peso)
Ácido Alfa-linoleico (Poliinsaturado)	18:3	7-10
Ácido Linoleico (Poliinsaturado)	18:2	51
Ácido Oleico (Monoinsaturado)	18:1	23
Ácido Esteárico (Saturado)	18:0	4
Ácido Palmítico (Saturado)	16:0	10

Fonte: Adaptado CARRÍN; CRAPISTE, 2008.

Existem compostos menores no DDOS (Tabela 3) que têm aplicação nos setores alimentício, farmacêutico ou cosmético incluídos no material glicéridico que é utilizado para a produção de biocombustíveis (ECHIM et al., 2009). Por exemplo, o tocoferol é comercializado como vitamina E com pureza de pelo menos 60% e livre de ácidos graxos (PRETTO et al., 2017); escaleno é usado como um hidratante e antioxidante na indústria de cosméticos (WANG; FANG, 2004) e os fitoesteróis são usados em comprimidos e até em cremes para os olhos, têm propriedades calmantes e redutoras do colesterol (DUMONT; NARINE, 2007b). A grande maioria das pesquisas com o DDOS têm focado especialmente no isolamento de fitoesteróis e tocoferóis (MANIET; JACQUET; RICHEL, 2019), tendo um campo a ser explorado na sua aplicação como base de outros produtos de interesse comercial, como o biodiesel e os ésteres de açúcar.

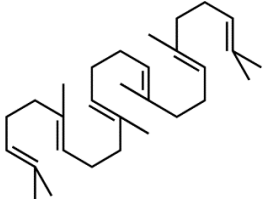
Tabela 3 – Componentes presentes no destilado da desodorização do óleo de soja obtido a partir do refino do óleo de soja

Composto Bioativo	Estrutura Química	Fórmula	Massa Molecular (g/mol)	Quantidade (% m/m)
Alfa-Tocoferol		$C_{29}H_{50}O_2$	430,71	0,8
Beta-Tocoferol		$C_{28}H_{48}O_2$	416,68	0,4–0,5
Delta-Tocoferol		$C_{27}H_{46}O_2$	402,65	4,4–5,6
Gama-Tocoferol		$C_{28}H_{48}O_2$	416,68	10,7–11,3
Alfa-Tocotrienol		$C_{29}H_{44}O_2$	424,66	-----

Continuação da tabela 1

Beta- Tocotrienol		$C_{28}H_{42}O_2$	410,63	-----
Delta- Tocotrienol		$C_{27}H_{40}O_2$	396,61	-----
Gama- Tocotrienol		$C_{28}H_{42}O_2$	410,63	-----
Campesterol		$C_{28}H_{48}O$	400,68	5,1–5,7
Estigmasterol		$C_{29}H_{48}O$	412,69	4,1–4,8
Beta-Sitosterol		$C_{29}H_{50}O$	414,71	7,9–8,3

Final da tabela 1

Escaleno		$C_{30}H_{50}$	410,72	1,3-2,1
----------	---	----------------	--------	---------

Fonte: Adaptado de SHERAZI; MAHESAR, 2016.

2.2 LIPASES

As lipases (triacilglicerol-hidrolases, EC 3.1.1.3) são carboxil-esterases que catalisam a hidrólise (e síntese) de triglicerídeos de cadeia longa, ou seja, ésteres de glicerol com um comprimento de cadeia superior a 10 átomos de carbono. As lipases se diferenciam uma das outras pelo comprimento e arquitetura das ligações da dobra α/β -hidrolase de suas proteínas, o que permite sua compatibilidade com uma ampla diversidade de substratos. Além disso, lipases costumam ser estáveis em solventes orgânicos, atuam em uma ampla faixa de pH e temperatura e exibem uma alta enantiosseletividade (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012; SARDA; DESNUELLE, 1958).

Dentre as reações catalisadas por lipases, a hidrólise ocorre em meio aquoso, na qual a enzima realiza a quebra dos triglicerídeos na interface óleo-água liberando ácidos graxos e glicerol. Em meio orgânico, estas enzimas catalisam reações de esterificação, transesterificação e acidólise ou interesterificação. Na reação de esterificação, álcoois e ácidos carboxílicos reagem gerando ésteres e água. Na reação de transesterificação, um radical acila de um éster é transferido para um glicerol (glicerólise) ou para um álcool (alcoólise). No caso da acidólise ou interesterificação, o mecanismo de reação é similar, ocorrendo a troca de radicais acilas de um glicerídeo com um ácido graxo livre (acidólise) ou com um ácido graxo derivado de outro glicerídeo (interesterificação) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995; HE; ZHU; CHEN, 2018).

As lipases possuem um mecanismo peculiar de catálise, denominado ativação interfacial. Em meio aquoso homogêneo, as moléculas de lipase estão em equilíbrio conformacional entre duas formas: uma fechada, em que o sítio ativo está isolado do meio por uma cadeia polipeptídica chamada “tampa”, e uma aberta, em que a tampa é deslocada expondo o sítio ativo ao meio (SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997).

Na presença de alguma superfície hidrofóbica (gotas de óleo, proteínas hidrofóbicas, suportes hidrofóbicos, etc.), a forma aberta da lipase adsorve-se a essa superfície devido à exposição de áreas hidrofóbicas das vizinhanças do sítio ativo e da face interna da tampa. Esse mecanismo catalítico tem sido muito explorado na imobilização desta enzima em suportes hidrofóbicos, permitindo em uma única etapa purificação, imobilização, estabilização e ativação de várias lipases (BASTIDA et al., 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; PALOMO et al., 2002; DE LIMA et al., 2013; MANOEL et al., 2015).

Outra característica das lipases é sua especificidade, podendo esta ser classificada como: especificidade pelo substrato, regioespecificidade, enantioespecificidade. Quanto à especificidade pelo substrato, as lipases possuem especificidade de acordo com o tipo ou comprimento de cadeia de ácido graxo, seja ela saturada ou insaturada, curta, média ou longa. A regioespecificidade diz respeito à especificidade em relação a posição do radical acila no esqueleto de glicerol. Neste caso, as lipases podem ser: (i) não-específicas, que hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, em qualquer posição do glicerol; (ii) 1,3-específicas, que hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários na posição sn-1 ou sn-3 do glicerol. E por fim, a enantioespecificidade diz respeito à capacidade das lipases optarem preferencialmente por certas formas isoméricas de seus substratos ou produtos, isômeros R ou S (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010; BERGER; SCHNEIDER, 1991; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KAPOOR; GUPTA, 2012; MACRAE; HAMMOND, 1985).

As lipases podem ser produzidas tanto por origem animal, como por plantas, porém a maior diversidade de lipases é de origem microbiana (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012).

2.2.1 *Eversa*

A Eversa® Transform 2.0 (Eversa) é uma formulação líquida de lipase geneticamente modificada a partir da lipase originária do fungo *Thermomyces lanuginosus* (NIELSEN et al., 2016). Essa formulação, de baixo custo, pode ser utilizada no processo de produção de biodiesel, sem necessariamente ser reutilizada (LV et al., 2017; PEDERSEN et al., 2014). Alguns autores como Miranda et al., (2020) e Nielsen et al., (2016) obtiveram bons rendimentos em ésteres etílicos de ácidos graxos, 98,9%, 97,5%, respectivamente, utilizando essa lipase. A maioria dos trabalhos de produção de biodiesel com Eversa utilizaram óleo de soja (MIBIELLI et al., 2019; MIRANDA et al., 2020; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016) e óleo de mamona (ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017a, 2017b, 2019) como material glicéridico. Há pesquisas em que optou-se por subprodutos industriais, como sebo de gado desacidificado (WANCURA et al., 2018), óleo residual de indústria avícola (COPPINI et al., 2019) CTO (*Crude Tall Oil*) do processo de polpação Kraft (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017), óleo de sardinha branqueada (HE et al., 2017), contudo, estudos com essa enzima catalisando reações com destilado da desodorização do óleo de soja ainda são escassos na literatura.

2.2.2 Lipase de *Candida antarctica* B

A lipase de *Candida antarctica* B (CALB) é uma lipase que costuma ser imobilizada no suporte Lewatit VP OC 1600 para comercialização, sendo amplamente utilizada em reações de esterificação (ORTIZ et al., 2019). Esta forma de utilização do biocatalizador favorece sua estabilidade em relação a formulação solúvel, assim como aumenta a atividade volumétrica e permite uma melhor recuperação desse material para etapas cíclicas de aplicação (DULĘBA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). A imobilização da CALB tem sido bastante utilizada com foco na produção de ésteres de açúcar (MAI et al., 2014; NETA et al., 2012; RUFINO et al., 2010; VESCOVI et al., 2016), tendo bons resultados para reações com xilose como acceptor acila, com rendimento de 64 % (ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016), 67 % (BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013) e 74,8 % (MÉLINE et al., 2018), sendo sua forma imobilizada comercial (Novozym 435) a que tem apresentado maiores rendimentos de éster de açúcar (GONÇALVES et al., 2021a). Além disso, a sua seletividade em relação aos ácidos graxos de cadeia longa e média (CAO; BORNSCHEUER; SCHMID, 1999) faz com que seja empregada com maior frequência nos estudos de sínteses de ésteres.

2.2.3 Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

A lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) é uma lipase não específica (KAPOOR; GUPTA, 2012; PAQUES; MACEDO, 2006), comumente utilizada em sínteses orgânicas, sendo aplicada tanto na sua forma livre quanto imobilizada. Contudo, sua aplicação na formulação livre para reações utilizando DDOS como fonte de acilgliceróis em reações de hidrólise ainda é pouco encontrada. Quanto a sua aplicação para síntese de ésteres de açúcar, observou-se estudos utilizando frutose e ácido oleico (VESCOVI et al., 2017), xilitol e ácido oleico (RUFINO et al., 2010) e frutose e vinil butirato, hexanoato, octanoato, decanoato, laurato (SIN; CHO; LEE, 1998), todos com a enzima em sua forma imobilizada. Entretanto, sua aplicação na produção de ésteres de açúcar, tendo xilose como acceptor acila e o DDOS hidrolisado como doador acila, ainda é escassa na literatura, o que pode ser observado nos trabalhos (ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016; BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; BOUZAOUIT; BIDJOU-HAIOUR, 2015; GONÇALVES et al., 2021b; LIMA et al., 2017; MÉLINE et al., 2018; SIEBENHALLER et al., 2017, 2018; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017), em que a fonte de ácidos graxos é diferente do DDOS.

2.2.4 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é uma lipase 1,3 específica (KAPOOR; GUPTA, 2012; PAQUES; MACEDO, 2006) termoestável disponível comercialmente na forma solúvel e imobilizada (Lipozyme TL IM®), sendo comumente utilizada na hidrólise e transesterificação de óleos e gorduras, esterificação de ácidos graxos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) e em estudos de síntese de ésteres de açúcar utilizando sacarose e laurato de vinila (FERRER et al., 2000), sacarose, glicose, maltose e laurato e palmitato de vinila (FERRER et al., 2005), frutose e ácido oleico (VESCOVI et al., 2017) e lactulose e ácido palmítico (BERNAL; POVEDA-JARAMILLO; MESA, 2018).

Assim como descrito para as demais enzimas compiladas nessa tese, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* também possui relatos escassos quanto a sua aplicação em ésteres graxos de xilose utilizando DDOS hidrolisado, sendo em sua maioria aplicada em fontes como ácidos graxos comerciais (ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016; BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; BOUZAOUT; BIDJOU-HAIOUR, 2015; GONÇALVES et al., 2021b; LIMA et al., 2017; MÉLINE et al., 2018; SIEBENHALLER et al., 2017, 2018; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017).

2.2.6 Imobilização de lipases

O conceito de imobilização de enzimas pode ser definido por confinamento dessas biomoléculas em algum local ou material insolúvel para que se possa utilizá-las repetida ou continuamente (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002).

A imobilização de enzimas é uma prática vantajosa principalmente para o uso industrial, uma vez que a imobilização enzimática permite o desenvolvimento de processos contínuos em larga escala, contribuindo para a redução dos custos operacionais associados ao biocatalisador, devido à possibilidade de sua reutilização no processo (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019). Além disso, diminui a potencial contaminação do produto por resíduos enzimáticos, reduzindo-se assim os custos de purificação do produto. Também, pode-se citar ganhos na parte operacional da enzima como o aumento da sua estabilidade térmica e química, além de possibilitar a co-imobilização com outras enzimas (DICOSIMO et al., 2013).

Entretanto, há que se atentar para algumas desvantagens que nos permite aprimorar os métodos de imobilização. Uma delas é a perda de atividade enzimática devido à possíveis

deformações no sítio ativo da enzima durante a imobilização. Outras desvantagens são alterações nas propriedades cinéticas, devido a mudanças na estrutura tridimensional da enzima e limitações na transferência de massa. Além disso, deve-se atentar para os custos do suporte e das técnicas escolhidas para a imobilização, para que a imobilização seja viável do ponto de vista técnico-econômico (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002).

Desta maneira, o objetivo das imobilizações enzimáticas é aprimorar as propriedades da enzima como estabilidade, atividade ou especificidade, produzindo um biocatalisador heterogêneo, para que desta maneira obtenha-se resultados de reação altamente seletivos, tanto em termos estruturais quanto estereoquímicos, sob condições relativamente brandas (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998a; KOPP et al., 2015; LIMA et al., 2015; MIRANDA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2019).

Os métodos de imobilização compreendem adsorção, ligação iônica, ligação covalente, reticulação, aprisionamento e encapsulamento. Dentre estes, destaca-se a adsorção que é uma técnica simples e envolve interações de superfície reversíveis (principalmente forças hidrofóbicas) entre enzima e suporte. Neste procedimento não há necessidade de alterações químicas no suporte ou enzimas, caracterizando esse processo como simples, barato, rápido e reversível. Os materiais comumente utilizados neste método de imobilização são carvão ativado, sílica, polímeros naturais ou sintéticos, etc. Outro método que se pode ressaltar é o de ligação covalente, que se baseia neste tipo de ligação entre um suporte e alguns grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima. Neste caso, o suporte deve ser ativado inicialmente por um reagente específico, para tornar seus grupos funcionais fortemente eletrofilicos, os quais possam reagir com grupos nucleofílicos fortes da enzima, favorecendo-se assim a formação de ligações fortes entre suporte e enzima e, conseqüentemente, a estabilidade da imobilização (GARCIA-GALAN et al., 2011; MATEO et al., 2007; MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002; VESCOVI et al., 2017).

As lipases possuem um mecanismo peculiar de catálise, denominado ativação interfacial (SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997). Na presença de alguma superfície hidrofóbica (gotas de óleo, proteínas hidrofóbicas, suportes hidrofóbicos, etc.), a forma aberta da lipase adsorve-se a essa superfície devido à exposição de áreas hidrofóbicas das vizinhanças do sítio ativo e da face interna da tampa. Esse mecanismo catalítico tem sido muito explorado na imobilização desta enzima em suportes hidrofóbicos, permitindo em uma única etapa purificação, imobilização, estabilização e ativação de várias lipases (BASTIDA et al., 1998; DE LIMA et al., 2013; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998b; MANOEL et al., 2015;

PALOMO et al., 2002). Há grande variedade de suportes hidrofóbicos utilizados para imobilização de lipases, aplicados em meios que variam de totalmente aquosos a anidros, incluindo em alguns casos líquidos iônicos ou fluidos supercríticos (RODRIGUES et al., 2019).

2.3 BIOCOMBUSTÍVEIS

2.3.1 Biodiesel

O biodiesel é produzido pela esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta por uma reação na presença de um catalisador. O processo convencional utiliza metanol, devido ao seu custo ser inferior aos demais álcoois. (MA; HANNA, 1999; MONTEIRO et al., 2021). São combustíveis biodegradáveis e não tóxicos e com emissões reduzidas durante a sua combustão (KNOTHE, 2005).

O catalizador pode ser químico (catalizador alcalino ou ácido) ou enzimático, sendo o primeiro mais comumente utilizado na indústria por possibilitar altos rendimentos de reação em um menor tempo. Entretanto, as desvantagens do processo químico são a alta demanda de energia e potencial poluição, além de ser custosa a recuperação do catalisador e do glicerol, pois este é contaminado com altas concentrações de sais alcalinos, devido ao uso do metóxido de sódio nas plantas industriais (PIZARRO; PARK, 2003). A reação de transesterificação catalisada por lipases (AKOH et al., 2007; ZHANG et al., 2012) é uma alternativa atrativa, pois ocorre em condições mais amenas e não há produção de sais alcalinos, gerando biodiesel e glicerol com alta pureza.

As matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel compreendem gorduras animais, óleos vegetais (comestível e não-comestível), óleos usados ou residuais. (ATABANI et al., 2012). A produção de biodiesel a partir de óleos vegetais comestíveis é comum em países como Brasil, Estados Unidos e Argentina, sendo o óleo de soja o mais utilizado (AVHAD; MARCHETTI, 2015). Apesar da grande diversidade de matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção do biodiesel, a busca de alternativas de baixo custo é recorrente. Dentre elas, o destilado da desodorização de óleo vegetais são utilizados em diferentes técnicas tanto na presença quanto na ausência de catalizador. (LIU; WANG, 2009; MALVADE; SATPUTE, 2013; SOMNUK; SOYSUWAN; PRATEEPCHAIKUL, 2019; YIN et al., 2015, 2016). O DDOS é um subproduto com potencial para esse fim, devido a sua composição rica em ácidos graxos e triglicerídeos (YIN et al., 2015). E com a finalidade de evitar a produção de

sais alcalinos, para gerar biodiesel e glicerol com alta pureza, o uso de rota enzimática para realizar este processo é vantajoso (AKOH et al., 2007).

Alguns estudos relatam o uso de destilados de desodorização de óleo vegetal (soja, palma, colza, etc.) como matéria-prima na produção de biodiesel por rota enzimática utilizando em grande parte catalisadores imobilizados (CORRÊA et al., 2011; DU; WANG; LIU, 2007; FACIOLI; BARRERA-ARELLANO, 2001; SU et al., 2014; WANG et al., 2006; ZENG et al., 2017). No entanto, poucos estudos utilizam lipases em sua formulação líquida, principalmente no caso do DDOS, sendo uma questão a ser explorada.

2.3.2 *Ecodiesel*

O Ecodiesel é um biocombustível composto por uma mistura de 2/3 de ésteres (etílicos ou metílicos) e 1/3 de acilgliceróis (especificamente monoacilgliceróis) que foram transesterificados/esterificados parcialmente. O termo Ecodiesel foi proposto por (LUNA et al., 2014) para diferenciar do biodiesel, devido à presença de monoacilglicerídeos. A obtenção desse biocombustível requer exclusivamente o uso de lipases 1,3-específicas e que a migração de radicais acilas da posição sn-2 para sn-1/sn-3 seja (DU et al., 2005; GOG et al., 2012; LUNA et al., 2014; MONTEIRO et al., 2021) A Tabela 4 compara as características do Ecodiesel com diferentes biocombustíveis semelhantes ao biodiesel.

Tabela 4 - Comparação das principais características das diferentes tecnologias disponíveis para a produção de combustíveis líquidos renováveis a partir de óleos vegetais.

Tipo	Biodiesel EN 14214	Biocombustíveis semelhantes ao biodiesel		
Nome	Biodiesel	Gliperol®	DMC-Biod®	Ecodiesel®
Reativo	Etanol e metanol	Acetato de metila	Carbonato de metila	Etanol
Catalizador	NaOH ou KOH	Ácidos, bases ou lipase	Bases ou lipases	Lipases
Produtos	3 FAME ou 3 FAEE	Triacetato de glicerol + 3 FAME	Carbonato de Glicerol de Ácido Graxo + 2 FAME	1 Monoglicerídeo + 2 FAEE
Subprodutos	Glicerol	Sem perdas	Sem perdas	Sem perdas
Processo de separação e limpeza	Complexo	Não requer	Não requer	Não requer
Investimento em instalações	Médio	Baixo	Baixo	Baixo
Ácidos graxos livres e / ou água no óleo de partida	Ácidos graxos livres são transformados em sabão	Ácidos graxos livres são transformados em biocombustíveis	Ácidos graxos livres são transformados em biocombustíveis	Ácidos graxos livres são transformados em biocombustíveis
Custo do catalisador	Baixo	Alto	Alto	Alto
Impacto ambiental	Alto. Efluentes alcalinos e salinos são gerados. O tratamento de águas residuais é necessário.	Baixo	Baixo	Baixo

FAME - Éster etílico de ácido graxo; FAEE - Éster metílico de ácido graxo. Fonte: LUNA et al., 2017.

O Ecodiesel não gera subprodutos em sua produção, realizada em temperaturas amenas que favorece a regioseletividade das enzimas em seu processo catalítico, minimizando as usuais adversidades da produção de biodiesel padrão, além de poder ser empregado também como biocombustível em misturas duplas diesel/Ecodiesel e triplas diesel/Ecodiesel/álcool em máquinas movidas a diesel (LUNA et al., 2017). No entanto, a presença de monoglicerídeos no Ecodiesel aumenta levemente os valores de viscosidade das misturas, não sendo aconselhável a utilização de misturas duplas nas quais o Ecodiesel esteja presente em percentual superior a 50% (HURTADO et al., 2019).

A redução de custos de energia e água na lavagem do biocombustível, e o aumento do desempenho do processo, são dois fatores vantajosos do Ecodiesel, já que as matérias-primas reativas se transformam em biocombustível (LUNA et al., 2013; MONTEIRO et al., 2021). A simplificação do processo de limpeza desse biocombustível faz com que o processo possa abranger uma gama maior de óleos residuais como matéria prima, podendo estes serem parcialmente purificados durante as reações de esterificação/transesterificação (HURTADO et al., 2019). Caso haja etanol não gasto no processo enzimático, este pode permanecer na mistura, integrando uma parte do produto e podendo ser utilizado diretamente como combustível (LUNA et al., 2017).

O Ecodiesel possui alta capacidade de lubrificação, além de propriedades físico-químicas semelhantes às do biodiesel convencional, devido a presença de monoglicerídeos (CALERO et al., 2020). No caso do uso do DDOS como fonte glicéridica para o preparo desse biocombustível, além das vantagens citadas acima, destaca-se a presença de tocoferol e fitoesteróis que poderia contribuir para a estabilidade oxidativa de um biocombustível composto por alquil ésteres de ácidos graxos insaturados, devido as suas atividades antioxidantes (SAINI; KEUM, 2016).

2.4 ESTER DE XILOSE

Os ésteres de açúcares são surfactantes não iônicos, não tóxicos, inodoros, biodegradáveis e com atividade antimicrobiana, cujas características os tornam um produto de grande interesse para usos na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (DUMAS; BONTE, 2002; GHOSH; JONES, 2017; HILL; RHODE, 1999; KHAN; RATHOD, 2015; KOSARIC, 1992; SANTOS et al., 2016). Podem ser produzidos por rota química ou

enzimática, por meio de uma reação de esterificação de um açúcar ($C_n(H_2O)_n$) e um ácido graxo (RCO_2H) (GUMEL et al., 2011).

As pesquisas visando a produção do éster de xilose utilizam um doador acila comercial, ou seja, ácidos graxos específicos, sendo escasso o uso de subprodutos industriais para tal fim. Além disso, é importante a escolha de solvente orgânicos que dissolvam o substrato de modo a permitir que a tanto a solubilidade do produto quanto a esterificação sejam baixa para favorecer a cristalização de uma maneira que haja um equilíbrio que contribua para a formação do éster (YAN et al., 1999). Poucos são os estudos nos quais o solvente utilizado na reação é aceito pela indústria alimentícia. No trabalho de Bidjou-Haiour e Klai, (2013), os autores utilizaram a metil-etil-cetona, que é um solvente biocompatível para a produção de aditivos alimentares. As reações de síntese de éster de xilose, acontecem em sua maioria, em faixa de temperatura de 46-60 °C, utilizando enzimas imobilizadas e podendo atingir até 85% de conversão em éster (BOUZAOUT; BIDJOU-HAIOUR, 2015).

No contexto de uma biorrefinaria, a xilose é um açúcar atrativo para ser usado como receptor acila na síntese de ésteres de açúcares, pois ela pode ser obtida a partir da hidrólise da xilana (principal componente da fração hemicelulósica), fração essa obtida no pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol 2G e ainda subutilizada. Dessa forma, o aproveitamento da fração hemicelulósica para a produção de produtos de interesse comercial poderia contribuir para uma maior viabilidade econômica do etanol 2G. (DOTTORI; ASHLEY COOPER BENSON; BAY, 2013; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017)

Os ésteres de xilose contribuem para estimular a síntese e secreção de proteoglicanos e glicosaminoglicanos por queratinócitos epidérmicos, o que os tornam compostos relevantes para emprego na formulação de cosméticos e fármacos, em especial os com função dermatológica. Os ésteres de xilose possuem característica lipofílica que é relevante para que a xilose penetre na pele, seguida pela liberação do açúcar que ocorre devido à presença de esterases na epiderme. Essa característica contribui para a função hidratante desses produtos, bem como para prevenir e tratar os efeitos do envelhecimento que se dá pelo declínio de proteoglicanos e glicosaminoglicanos na pele com a idade. Dessa forma, os ésteres de xilose podem ser utilizados para qualquer aplicação que tenha o objetivo de estimular a síntese dos glicanos citados (DUMAS; BONTE, 2002).

A produção desses ésteres pode ser feita tanto pelas rotas química ou enzimática. A síntese química, comumente utilizada pela indústria, requer grande demanda de energia, pois a reação ocorre em altas temperaturas (150–240 °C), possui baixa seletividade e pode formar

subprodutos tóxicos, que tornam o produto inaceitável para certas aplicações, como por exemplo em cosméticos, requerendo, portanto, purificação e, conseqüentemente, gerando custos adicionais (KHAN; RATHOD, 2015).

A utilização de enzimas, como as lipases, é uma alternativa para superar os inconvenientes anteriormente citados, uma vez que a catálise ocorre em baixas temperaturas (30–70°C) e baixa pressão, resultando na formação de produtos puros, incolores e inodoros, permitindo uma redução no número de etapas de reação devido à regioespecificidade, satisfazendo uma gama maior de aplicações e reduzindo custos (GONÇALVES et al., 2021a)

REFERÊNCIAS

- ABDULMALEK, E.; HAMIDON, N. F.; RAHMAN, M. B. A. Optimization and characterization of lipase catalysed synthesis of xylose caproate ester in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 1–4, 2016.
- ADEWALE, P.; VITHANAGE, L. N.; CHRISTOPHER, L. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, v. 154, p. 81–91, 15 dez. 2017.
- AKOH, C. C. et al. Enzymatic Approach to Biodiesel Production Enzymatic Approach to Biodiesel Production. v. 55, n. September, p. 8995–9005, 2007.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Castor oil transesterification catalysed by liquid enzymes: Feasibility of reuse under various reaction conditions. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 913–918, 2017a.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Transesterification of Castor Oil Catalyzed by Liquid Enzymes: Optimization of Reaction Conditions. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 40, p. 2863–2868, 2017b.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Investigation of the use of ceramic membranes in recovering liquid enzymes for castor oil transesterification. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 769–774, 2019.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: Review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100–118, 2012.
- AVHAD, M. R.; MARCHETTI, J. M. **A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 4 jun. 2015.
- ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: Sources, applications and properties - A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15–29, 2010.
- BASTIDA, A. et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Lipases in organic solvents: The fatty acid chain length profile. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 9, p. 641–645, 1991.

BERNAL, C.; POVEDA-JARAMILLO, J. C.; MESA, M. Raising the enzymatic performance of lipase and protease in the synthesis of sugar fatty acid esters, by combined ionic exchange - hydrophobic immobilization process on aminopropyl silica support. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 760–767, 2018.

BIDJOU-HAIOUR, C.; KLAI, N. Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 4347–4350, 2013.

BOUZAOUT, N.; BIDJOU-HAIOUR, C. Optimization of lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose ester using statistical experimental designs. **Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 1, p. 261–269, 2015.

CALERO, J. et al. Optimization by response surface methodology of the reaction conditions in 1,3-selective transesterification of sunflower oil, by using CaO as heterogeneous catalyst. **Molecular Catalysis**, v. 484, p. 110804, 1 mar. 2020.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, 1999.

CARRÍN, M. E.; CRAPISTE, G. H. Mathematical modeling of vegetable oil–solvent extraction in a multistage horizontal extractor. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 3, p. 418–425, 2008.

COPPINI, M. et al. Production of methyl esters by enzymatic hydroesterification of chicken fat industrial residue. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 923–928, 2019.

CORRÊA, I. N. DOS S. et al. Enzymatic Biodiesel Synthesis Using a Byproduct Obtained from Palm Oil Refining. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

DE LIMA, L. N. et al. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 118–123, 2013.

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem. Soc. Rev**, v. 42, p. 6437–6474, 2013.

DOTTORI, F. A.; ASHLEY COOPER BENSON, R.; BAY, N. **Fractionation of lignocellulosic biomass for cellulosic ethanol and chemical production** United States, 2013.

DU, W. et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed

transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 68–71, 1 dez. 2005.

DU, W.; WANG, L.; LIU, D. Improved methanol tolerance during Novozym435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 173–176, 2007.

DULEBA, J. et al. Lipase B from *Candida antarctica* — the wide applicable biocatalyst in obtaining pharmaceutical compounds. **Medical Research Journal**, v. 4, n. 3, p. 174–177, 17 out. 2019.

DUMAS, M.; BONTE, F. **Uses of d-xylose, the esters thereof and oligosaccharides containing xylose for improving the functionality of epidermal cells** US Pat 6,495,147 B1, 2002.

DUMONT, M. J.; NARINE, S. S. **Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization** **Food Research International**, out. 2007.

ECHIM, C. et al. Production of biodiesel from side-stream refining products. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 11, p. 1131, 2009.

FACIOLI, N. L.; BARRERA-ARELLANO, D. Optimisation of enzymatic esterification of soybean oil deodoriser distillate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 12, p. 1193–1198, 2001.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998a.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998b.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FERRER, M. et al. Chemical versus enzymatic catalysis for the regioselective synthesis of sucrose esters of fatty acids. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 130, p. 509–514, 2000.

FERRER, M. et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 391–398, 2005.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to

improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 633–639, 1995.

GHOSH, B.; JONES, A. D. Profiling, characterization, and analysis of natural and synthetic acylsugars (sugar esters). **Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 892–905, 2017.

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

GONÇALVES, M. C. P. et al. Reviewing research on the synthesis of CALB-catalyzed sugar esters incorporating systematic mapping principles. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, p. 1–23, 28 fev. 2021a.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Lipozyme 435-Mediated Synthesis of Xylose Oleate in Methyl Ethyl Ketone. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **3317**, v. 26, n. 11, p. 3317, 1 jun. 2021b.

GUMEL, A. M. et al. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2079–2090, 2011.

GUNAWAN, S.; JU, Y. H. Vegetable oil deodorizer distillate: Characterization, utilization and analysis. **Separation and Purification Reviews**, v. 38, n. 3, p. 207–241, jul. 2009.

HAMM, W.; HAMILTON, R. J.; CALLIAUW, G. **Edible oil processing**. 2. ed. Wiley, Chichester: [s.n.].

HE, W.-S.; ZHU, H.; CHEN, Z.-Y. Plant Sterols: Chemical and Enzymatic Structural Modifications and Effects on Their Cholesterol-Lowering Activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 12, p. 3047–3062, 28 mar. 2018.

HE, Y. et al. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445–456, 1 jan. 2017.

HILL, K.; RHODE, O. Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications. **Lipid - Fett**, v. 101, n. 1, p. 25–33, 1999.

HURTADO, B. et al. Synthesis, Performance and Emission Quality Assessment of Ecodiesel from Castor Oil in Diesel/Biofuel/Alcohol Triple Blends in a Diesel Engine. **Catalysts**, v. 9, n. 40, p. 1–21, 2019.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793–1806, 2015.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059–1070, 25 jun. 2005.

KOPP, W. et al. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 193, p. 217–228, 2015.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731–1737, 1992.

LIMA, L. N. DE et al. Mono- and heterofunctionalized silica magnetic microparticles (SMMPs) as new carriers for immobilization of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 491–499, 2017.

LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 2015.

LIU, Y.; WANG, L. Biodiesel production from rapeseed deodorizer distillate in a packed column reactor. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 2009.

LUNA, C. et al. Biofuel that keeps glycerol as monoglyceride by 1,3-selective ethanolysis with pig pancreatic lipase covalently immobilized on AlPO₄ support. **Energies**, v. 6, n. 8, p. 3879–3900, 2013.

LUNA, C. et al. Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 31 ago. 2014.

LUNA, C. et al. Application of Enzymatic Extracts from a CALB Standard Strain as Biocatalyst within the Context of Conventional Biodiesel Production Optimization. **Molecules** 2017, Vol. 22, Page 2025, v. 22, n. 11, p. 2025, 21 nov. 2017.

LV, L. et al. Effect of water on lipase NS81006-catalyzed alcoholysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 239–244, 2017.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1–15, 1999.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and Future Applications of Lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–218, 1985.

MAI, N. L. et al. Ionic liquids as novel solvents for the synthesis of sugar fatty acid ester.

- Biotechnology Journal**, v. 9, n. 12, p. 1565–1572, 2014.
- MALVADE, A. V.; SATPUTE, S. T. Production of palm fatty acid distillate biodiesel and effects of its blends on performance of single cylinder diesel engine. **Procedia Engineering**, v. 64, p. 1485–1494, 2013.
- MANIET, G.; JACQUET, N.; RICHEL, A. Recovery of sterols from vegetable oil distillate by enzymatic and non-enzymatic processes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 22, n. 4, p. 347–353, 2019.
- MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. p. 71, 2015.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2 maio 2007.
- MÉLINE, T. et al. d-Xylose and l-arabinose laurate esters: Enzymatic synthesis, characterization and physico-chemical properties. **Enzyme and microbial technology**, v. 112, p. 14–21, 2018.
- MIBIELLI, G. M. et al. Lab and pilot plant FAME production through enzyme-catalyzed reaction of low-cost feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 150–156, 2019.
- MIRANDA, L. P. et al. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa® Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 817, 2020.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, 1 fev. 2021.
- MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 2, p. 57–66, 2002.
- NAZ, S. et al. Determination of unsaponifiable constituents of deodorizer distillates by GC-MS. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 6, p. 973–977, 14 jun. 2012.
- NETA, N. A. S. et al. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 27, p. 324–331, 2012.
- NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 905–910, 2016.

ORTIZ, C. et al. Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science and Technology**, v. 9, n. 10, p. 2380–2420, 2019.

PALOMO, J. M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, n. 20, p. 279–286, 2002.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, fev. 2006.

PEDERSEN, A. T. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1077–1082, 2003.

PRETTO, C. DE et al. Possibilities for Producing Energy, Fuels, and Chemicals from Soybean: A Biorefinery Concept. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–28, 2017.

REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 254–262, 2016.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

RUFINO, A. R. et al. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 5–9, 2010.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. **Food Research International**, v. 82, p. 59–70, 2016.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 18 mar. 2016.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513–521, 1958.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 1998.

SHERAZI, T. H. S.; MAHESAR, A. S. Vegetable Oil Deodorizer Distillate: A Rich Source

of the Natural Bioactive Components. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 12, p. 957–966, 2016.

SIEBENHALLER, S. et al. Beechwood carbohydrates for enzymatic synthesis of sustainable glycolipids. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.

SIEBENHALLER, S. et al. Integrated Process for the Enzymatic Production of Fatty Acid Sugar Esters Completely Based on Lignocellulosic Substrates. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 421, 2018.

SIN, Y. M.; CHO, K. W.; LEE, T. H. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 91–94, 1998.

SINGH, G. (AGRONOMIST). **The soybean : botany, production and uses**. [s.l.] CABI, 2010.

SOMNUK, K.; SOYSUWAN, N.; PRATEEPCHAIKUL, G. Continuous process for biodiesel production from palm fatty acid distillate (PFAD) using helical static mixers as reactors. **Renewable Energy**, v. 131, p. 100–110, 2019.

SU, F. et al. Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized on Hydrophobic Carriers and Its Application in Biorefinery of Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 3, p. 935–945, 2014.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, 2016.

VESCOVI, V. et al. Immobilized Lipases on Functionalized Silica Particles as Potential Biocatalysts for the Synthesis of Fructose Oleate in an Organic Solvent/Water System. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–16, 2017.

VESCOVI, V.; SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

WANCURA, J. H. C. et al. Production of biodiesel catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 11, p. 2361–2368, 2018.

WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B:**

Enzymatic, v. 43, n. 1–4, p. 29–32, 2006.

WANG, Q.; FANG, Y. **Analysis of sugars in traditional Chinese drugs***Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2004.

YAN, Y. et al. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters - Removal of byproducts by azeotropic distillation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 725–728, 1999.

YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate enhanced by counter-current pulsed ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 53–58, 2015.

YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate using calcined duck eggshell as catalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 112, p. 199–207, 2016.

ZENG, L. et al. Preparation of Biodiesel with Liquid Synergetic Lipases from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 778–791, 2017.

ZHANG, B. et al. **Enzyme immobilization for biodiesel production***Applied Microbiology and Biotechnology*, jan. 2012.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Destilado de desodorização de óleo de soja (DDOS, COCAMAR, Maringá, PR, Brasil). Lipase Eversa® Transform 2.0 (Novozymes A/S, Bagsværd, DK). Lipase de *Pseudomonas fluorescens*, trifluoreto de boro em metanol (10-15%), padrões de α -, β -, γ - e δ -tocoferóis, ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico; heptadecanoato de metila; dioleína, monooleína, trioleína, butanotriol, tricaprina, N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e xilose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e clorofórmio (Exodus Científica, Sumaré, SP, Brasil). Iodeto de potássio, fenolftaleína, hidróxido de sódio (NaOH), ácido acético ($\text{H}_4\text{C}_2\text{O}_2$), fosfato de sódio, tetrocloroeto de carbono, álcool metílico (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil). Amido solúvel e hidróxido de potássio (KOH) (Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Barcelona, Espanha). Álcool etílico 99%, solução de Wijs, etil-metil-cetona (Neon Analytical Reagents, Suzano, SP, Brasil). n-Hexano e n-propanol (Honeywell, Charlotte, NC, EUA), ácido clorídrico (HCl), sulfato de sódio e éter etílico (Quemis, Joinville, SC, Brasil), acetonitrila (Tedia Way, Fairfield, OH, EUA). Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Immozyme - IMMAPF T2 150), lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Immozyme - TLL T2 150), lipase *Candida antarctica B* imobilizadas (Immozyme CALB T2 150), (Chiral Vision, Leiden, Holanda). Peneira molecular (3 Å) (JT Baker, New Jersey, NJ, USA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico e foram usados como recebidos.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Métodos físico-químicos

3.2.1.1 Índice de acidez

Realizou-se a análise conforme a norma (AOCS Ca 5A-40, 1992). Pesou-se aproximadamente 2 g de amostra homogêneas e líquidas em frasco erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de solução de éter-álcool (2:1, v/v) neutra e duas gotas do indicador fenolftaleína. Titulou-se a mistura com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o aparecimento da coloração rósea. Procedeu-se da mesma forma para o branco, composto por todos os reagentes exceto o DDOS, e o cálculo do índice de acidez foi realizado segundo as Equações 1 e 2:

$$\text{Índice de acidez} \left(\frac{\text{mg KOH}}{\text{g}} \right) = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times 56,105}{M_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

$$\text{Índice de acidez}(\%) = \frac{\text{Índice de acidez} \left(\frac{\text{mg KOH}}{\text{g}} \right)}{1,99} \quad (2)$$

Em que: V_{NaOH} é o volume gasto de NaOH na titulação (mL); M_{NaOH} é a molaridade do NaOH usado na titulação; e M_{amostra} é a massa de DDOS expressa em gramas. O resultado do índice de acidez (em %) é obtido através da divisão do resultado em miligramas de KOH por grama da amostra pelo fator 1,99

3.2.1.2 Índice de iodo pelo método de Wijs

Determinou-se o índice de iodo segundo a norma (AOCS Cd 1-25, 1990). Pesou-se aproximadamente 0,25 g da amostra, líquida e filtrada, em um frasco erlenmeyer de 500 mL com tampa. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de tetracloreto de carbono e 25 mL de solução de Wijs no frasco que contém a amostra. Agitou-se a solução até ficar homogênea e deixou-se em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 min. Depois desse período, adicionou-se 10 mL da solução de iodeto de potássio 15% (m/v) e 100 mL de água recentemente fervida e fria. Titulou-se com solução de tiosulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma

fraca coloração amarela, acrescentou-se 2 mL de solução indicadora de amido 1% (m/v) e continuou a titulação até o completo desaparecimento da cor azul. O índice de iodo no controle (branco, composto por todos os reagentes exceto o DDOS) foi determinado de forma similar e o seu cálculo realizado pela Equação 3:

$$\text{Índice de Iodo} = \frac{(Vb - Va) \times M \times 12,89}{P} \quad (3)$$

Em que: M é molaridade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Vb é o volume em mL gasto na titulação do branco, Va é o volume em mL gasto na titulação da amostra e P é a massa em g da amostra.

3.2.1.3 Índice de saponificação

O índice de saponificação foi determinado segundo a norma (AOCS Cd 3-25, 1990). Pesou-se a amostra em um balão de vidro e anotou-se o peso. Na sequência, adicionou-se 25 mL de solução alcoólica de KOH 40 % (m/v) (40 g de KOH, 20 mL de água e 980 mL de etanol anidro). Conectou-se o balão a um condensador e ferveu-se a solução por 75 min em uma manta de aquecimento até que a amostra fosse completamente saponificada. Depois que o frasco esfriou, desconectou-se o condensador e adicionou-se 1 mL da solução indicadora de fenolftaleína. Titulou-se o conteúdo do balão com a solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M até que a coloração rosa desaparecesse. Calculou-se o índice de saponificação segundo a Equação 4:

$$\text{Índice de Saponificação} = \frac{(V_{\text{Branco}} - V_{\text{HCl}}) \times M_{\text{HCl}} \times 56,11}{M_{\text{amostra}}} \quad (4)$$

Em que: V_{HCl} é o volume de solução de HCl em mL gasto na titulação da amostra; V_{Branco} é o volume de solução de HCl em mL gasto na titulação do branco (composto por todos os reagentes exceto o DDOS); M_{HCl} é a molaridade da solução de HCl e M_{amostra} é a massa de amostra em g.

3.2.1.4 Densidade

Determinou-se a densidade seguindo o método oficial (AOCS Cc 10a-25, 1990). Uma amostra de DDOS foi aquecida à temperatura de (20-23°C) e em seguida adicionada em um picnômetro (previamente pesado). Este foi mantido fechado em banho-maria na temperatura de (25°C ± 0,1) por 30 min. Ao final desse tempo, o picnômetro contendo a amostra foi novamente pesado e a densidade calculada pela Equação 5:

$$\text{Densidade Relativa (25°C)} = \frac{A-B}{C} \quad (5)$$

Em que: A é a massa do picnômetro contendo o DDOS (g); B é a massa do picnômetro vazio (g); e C é a massa de água na temperatura de 25°C (g).

3.2.1.5 Viscosidade

A viscosidade foi analisada utilizando-se um reômetro (Brookfield DV-III Ultra com banho TC-650, Brookfield Brasil, Middleboro, MA, EUA) e spindle SC4-27, nas temperaturas de 25°C e 40°C. A Equação 6 (lei de potência) foi ajustada aos dados experimentais de tensão e taxa de deformação usando o programa Rheocalc V3.3 Build 49-1:

$$\tau = k \times \gamma^n \quad (6)$$

Em que: τ é a tensão, k é o índice de consistência, γ é a taxa de deformação, e n é o índice de comportamento do escoamento.

O fluido pode requerer uma variação da taxa de cisalhamento gradativamente maior ou menor com o aumento da tensão de cisalhamento, seguindo uma relação exponencial regulada pelo parâmetro n (índice de comportamento do escoamento). Se o valor de n for maior que 1, o fluido é dito dilatante, se o valor de n for menor que 1, então o fluido é dito pseudoplástico. (XANTHOS, 2005). Dado que para o DDOS analisado o n foi muito próximo de 1, o fluido foi considerado newtoniano, por este motivo assumiu-se o valor de k como a viscosidade.

3.2.1.6 Umidade

Determinou-se a umidade do DDOS seguindo uma adaptação do método (AOCS Ca 2b-38, 2004), usando-se uma balança analisadora de umidade (Marte científica, modelo ID50, São Paulo, SP, Brasil). Pesou-se uma amostra de DDOS na balança e aqueceu a amostra a 130°C na própria balança. O peso da amostra seca foi anotado e a umidade determinada pela Equação 7:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{Perda de massa (g)}}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (7)$$

Em que: a perda de massa é a diferença entre o peso da amostra antes de aquecer e depois do aquecimento.

3.2.2 Métodos analíticos

3.2.2.1 Atividade hidrolítica frente a substratos de cadeia curta (tributirina como substrato)

A atividade de hidrólise de tributirina foi baseada na metodologia descrita por (BEISSON et al., 2000), com adaptações. O método consiste na hidrólise de uma mistura de 1,5 mL de tributirina, 6 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,3 e 16,5 mL de água destilada a 37°C por 5 min. O ácido butírico liberado é titulado com solução de KOH 0,02 M em titulador pH-Stat (Titrindo 907, Methrom, Suíça). Uma unidade de hidrólise de tributirina (TBU) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido butírico por minuto nas condições de ensaio.

3.2.2.2 Atividade frente a substratos sintéticos (p-nitrofenil-butirato)

As atividades de hidrólise de p-nitrofenil-butirato (p-NPB) foi determinada espectrofotometricamente acompanhando-se o aumento da absorbância em 348 nm devido à liberação de p-nitrofenol nas seguintes condições: 0,4 mM de p-NPB em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 a 25°C (PALOMO et al., 2005). Uma unidade (U) de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio.

3.2.2.3 Determinação de proteínas

O teor de proteína das preparações de lipases foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina do soro bovino como proteína padrão. Sucintamente, 25 µL de amostra de proteína são misturados em 1 mL do Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e após 5 min de reação mede-se a absorvância em 595 nm.

3.2.2.4 Reação de saponificação seguida de extração líquido-líquido

A concentração de tocoferóis foi realizada por meio de uma reação de saponificação a frio baseada na metodologia (AOCS CE 6A-40, 2004) com adaptações. Aproximadamente 100 mL da amostra de DDOS foram pesados em um frasco Erlenmeyer. Volumes de 600 mL de solução alcoólica 10% (v/v), 100 mL de solução de KOH 50% (m/v) foram adicionados, e este conteúdo foi deixado sob agitação magnética por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 55 mL de éter etílico e o material transferido para um funil de separação. Ambas as fases foram tituladas com HCl 0,1 M para neutralização. O material saponificável foi lavado duas vezes com um volume de água destilada quente proporcional ao da amostra, seco durante a noite em estufa a 60 °C e utilizado para esterificação / transesterificação enzimática.

3.2.2.5 Reação de hidrólise enzimática

As reações de hidrólise foram conduzidas segundo a metodologia de Vescovi et al., (2016b) com adaptações. A reação foi realizada em reatores tampados de 500 mL com agitadores com pás triplas, à 37 °C. Utilizou-se 50 g de DDOS, 220 g de água destilada (razão DDOS:água, 1:4 (m/m)), 5 % de enzima (m/m_{DDOS}). Durante a reação foram retiradas alíquotas para acompanhar a quantidade de AGL no meio, sendo essas amostras centrifugadas (10000 rpm, 15 min, 5 °C) para posterior análise por cromatografia gasosa. Ao final da reação, todo o meio foi centrifugado (8000 rpm, 20 min, 5 °C) e o ácido graxo formado foi lavado duas vezes com água quente na proporção 1:1 (AGL:água), centrifugado (8000 rpm, 20 min, 5 °C) e seco em estufa a 70 °C para posterior uso nas reações de esterificação/transesterificação. O ensaio foi realizado em duplicata e os resultados (conversão vs. tempo) foram expressos como valores médios ± média desvios.

3.2.2.6 *Reação de esterificação/transesterificação para a síntese de ésteres etílicos*

As variáveis operacionais temperatura, razão molar etanol: FFA e concentração de lipase foram otimizadas por delineamento de experimentos (RCCD) 2^3 com três pontos centrais e seis pontos axiais, visando o rendimento máximo do biodiesel. Os dados foram analisados e representados graficamente no software Statistica versão 7.0 (Stat Soft), e conduzidos com nível de significância $\alpha = 0,05$. Na etapa de otimização, todos os testes foram realizados em frascos fechados e agitador orbital (Modelo MA832, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 250 rpm por 16 h.

Após definidas as condições ótimas, as reações de esterificação foram conduzidas em um reator batelada (termostático e mecanicamente agitado) para testes de perfil de desempenho ao longo do tempo (0-48 h) e avaliação do uso da peneira molecular. Ao final das reações, o biodiesel foi lavado com água destilada, centrifugado e seco em estufa para quantificação dos ésteres formados por cromatografia gasosa: ésteres etílicos de ácidos graxos conforme EN 14103.

3.2.2.7 *Polimento caustico do biodiesel*

Após a reação de esterificação/ transesterificação foi feita a lavagem do material de acordo com o teor de AGLs quantificado, segundo (NIELSEN et al., 2016). Tomando esse valor como base, adicionou-se um volume de solução de NaOH a 4% (m/v) ao biodiesel de forma que a proporção fosse 1,15 moles de base por mol de AGLs residuais. A reação foi agitada em um agitador (SL - 222, Solab, Piracicaba, SP, Brasil) a 60 °C, 60 rpm, por 1 h. Em seguida, a mistura foi decantada por 10 min a 60 °C, e posteriormente centrifugada a 8000 rpm por 10 min a 25 °C. A fase leve foi recuperada, lavada duas vezes com um volume de água destilada quente proporcional ao da amostra, e seco durante a noite em estufa a 60 °C.

3.2.2.8 *Reação de esterificação para a síntese de ésteres de xilose*

A síntese de ésteres de xilose foi realizada baseada na metodologia de Gonçalves et al. (2021) com adaptações. A reação foi conduzida a 60 °C em frascos fechados sob condições predefinidas (7 mM de xilose em 60 mL de etil-metil-cetona, 0,42 g de AGL produzidos na hidrólise do DDOS, 11,44 g de peneira molecular e 0,5 % de enzima (m/v)) em agitador orbital

(Modelo MA832, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 250 rpm por 24 h. Ao final, o meio reacional foi centrifugado (10000 rpm por 5 min, 25 °C) para remoção da peneira e enzima. Amostras do meio reacional foram retiradas e diretamente usadas para análise de AGL por cromatografia gasosa. Amostras também foram retiradas e secas em estufa a 70 °C overnight para análises de tocoferol e consumo de xilose por cromatografia líquida.

3.2.2.9 *Ensaio de capacidade de emulsão*

Os testes de capacidade de emulsão foram realizados em duplicata, adicionando 50 mg do produto de reação foram dissolvidos em 1 mL de água e misturados com 2 ml de querosene a um tubo de teste. O conteúdo do tubo foi homogeneizado continuamente por 2 min em temperatura ambiente (25 °C) e deixado em repouso por 24 h. Após este período, a altura da região emulsificada e a altura da coluna total foram medidas, e a capacidade de emulsão foi calculada de acordo com a Equação 8 (CAVALCANTI et al., 2017).:

$$CE (\%) = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (8)$$

Onde He: altura da região emulsionada e Ht: altura da coluna total.

3.2.3 *Preparo de amostras*

3.2.3.1 *Preparo de amostra de material insaponificável para determinação de tocoferol por cromatografia em fase líquida*

A amostra foi preparada de acordo com o método (AOCS Ce 8-89, 2004). Pesou-se cerca de 2 g da amostra em um frasco âmbar de fundo plano de 100 mL e adicionou-se 8 mL de etanol 96% agitando suavemente. Em seguida, se acrescentou 100 mg de pirogalol e agitou novamente para dissolver. Foi feita a purga do frasco com nitrogênio, adicionados 4 mL de solução de KOH 60% (m/m), feita a purga novamente com nitrogênio e fechado o recipiente. O frasco foi colocado em banho-maria a 26 °C com agitação vigorosa por 10 min.

Após, adicionou-se 50 mL de água deionizada ao frasco e transferiu-se o conteúdo para um funil de separação de 250 mL. Na sequência, lavou-se o frasco com 50 mL de éter dietílico e transferiu-se as lavagens para o funil. O funil foi agitado por 1 min, depois aguardou-se as

fases se separarem e retirou-se a fase aquosa inferior. A fase aquosa foi extraída mais quatro vezes com alíquotas de 30 mL de éter dietílico e ao final foi combinado os extratos de éter.

Os extratos de éter dietílico combinados foram lavados com 50 mL de água (agitando cuidadosamente para evitar a formação de emulsão) e em seguida diluídos em 30 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,01 mol/L. Na sequência adicionou-se 50 g de sulfato de sódio anidro, mexendo suavemente para absorver a água. O extrato foi filtrado em papel filtro, o conteúdo foi transferido para um balão redondo coberto com papel alumínio e rota-evaporado a uma temperatura não superior a 40 °C. No caso de algum resíduo líquido permanecer no frasco, etanol 99% foi adicionado (20 mL) e novamente rota-evaporado até ficar seco.

O balão foi pesado antes e depois da rota-evaporação a fim de se obter a massa seca final para adequar a diluição em hexano para quantificação por cromatografia líquida.

3.2.3.2 Preparo de amostra para caracterização de ácidos graxos livres, glicerídeos e ésteres de ácidos graxos por cromatografia líquida

O conteúdo de triglicerídeos (TAG), diglicerídeos (DAG), monoglicerídeos (MAG) e ésteres dos ácidos graxos (E-AG) presentes no DDOS foi quantificado por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) segundo metodologia de (HOLČAPEK et al., 1999) adaptada.

Para isso, as amostras de DDOS foram preparadas pesando-se 0,05 g e diluindo em 500 µl de solução de 2-propanol-hexano (5:4, v/v). Um volume de 10 µl desta solução foi novamente diluído em 1490 µl do solvente e em seguida a amostra foi filtrada em filtros de 0,20 µm e analisada por RP-HPLC.

Os teores dos componentes (TAG, DAG, MAG e E-AG) da amostra foram quantificados por grupos em termos de composição porcentual (Equação 9) equivalente à razão mássica entre o grupo e a amostra total:

$$X_{grupo} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{\sum A_{grupo}}{\sum A_{total}} \times 100 \quad (9)$$

Onde, X_{grupo} é a fração mássica de cada grupo na amostra total, $\sum A_{grupo}$ é a soma das áreas de todos os picos correspondente ao grupo e $\sum A_{total}$ é a soma das áreas de todos os picos. Cada grupo tem o seguinte intervalo de tempo de retenção: MAG e AGL entre 3 e 8 min, E-AG entre 9 e 12 min, DAG entre 13 e 17 min e TAG entre 18 e 22 min, aproximadamente.

3.2.3.3 Preparo de amostra para determinação da matéria glicéridica total do DDOS (AGL, MAG, DAG, TAG) por cromatografia em fase gasosa

Para a quantificação do conteúdo total de AGL, MAG, DAG e TAG no DDOS foi realizada uma etapa prévia de esterificação/transesterificação da matéria glicéridica para a sua quantificação como ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME).

FAME foram preparados segundo o método (AOCS Ce 2-66, 2004). Adicionou-se a um balão de 125 mL aproximadamente 0,2 g de DDOS e 5 mL de solução de NaOH 0,5 M em metanol. Colocou-se o balão acoplado a um condensador em uma manta aquecedora com agitação e manteve-se o sistema a 60°C por 10 min. Em seguida, pipetou-se 5 mL de trifluoreto de boro 10-15% (v/v) em metanol, elevou-se a temperatura até a ebulição, mantendo-a nessas condições por 2 min. Após resfriar, adicionou-se 5 mL de heptano e após 1 min adicionou-se 15 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Após misturar, completou-se o volume do balão com solução saturada de NaCl até a boca. Após a decantação da fração insolúvel, uma alíquota da fração solúvel foi retirada e lavada para a análise de ésteres metílicos por cromatografia gasosa. Realizou-se a lavagem da seguinte forma: adicionou-se 2 mL de água fervente a 2 mL da amostra, esse conteúdo foi agitado e centrifugado a 10000 rpm (9600g) por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se a fase leve e colocou-a em outro eppendorf. Esse procedimento foi repetido por mais 2 vezes, e ao final a fase leve foi seca em estufa a 50°C *overnight* (16-24 h). Para injeção no cromatógrafo, 50 mg de amostra foram misturados a 1 mL de solução de heptadecanoato de metila em hexano (10 mg/L).

3.2.4 Métodos cromatográficos

3.2.4.1 Determinação de tocoferol por cromatografia líquida

Os tocoferóis presentes na amostra foram analisados segundo o método (AOCS Ce 8-89, 2004) com adaptações. As amostras foram preparadas realizando a diluição de 0,5 g em 25 mL de n-hexano; para os padrões, a diluição foi de 10 mg em 100 mL de n-hexano, para obter-se a alíquota para análise. Cerca de 10 mL da solução estoque foi rota-evaporada a 40 °C para remoção do solvente, em seguida adicionou-se 10 mL de metanol e agitou-se para dissolver o tocoferol. A concentração do padrão de α -tocoferol (como $\mu\text{g/mL}$ de α -tocoferol) foi obtida pela medida da absorbância desta solução a 292 nm e dividindo-se o valor da absorbância lida

por 0,0076. Para as soluções-padrões estoques de β , γ , δ -tocoferóis foi procedido da mesma maneira, apenas considerando os valores de absorbância e fatores abaixo:

- 296 nm β -tocoferol = 0,0089
- 298 nm γ -tocoferol = 0,0091
- 298 nm δ -tocoferol = 0,0087

O sistema de cromatografia líquida utilizado era composto por um cromatógrafo Waters E 2695 (Waters Co., Milford, MA, EUA) e detector UV (Photodiode Array Detector, Waters Co., Milford, MA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Luna® Silica 100 (250 x 4.6 mm x 5 μ m, Phenomenex INC., Torrance, CA, EUA) a temperatura ambiente. A fase móvel era composta por n-hexano:isopropanol na proporção 98:2 (% , v/v) com vazão de 1 mL/min, volume de injeção 20 μ L. O tempo de análise de cada amostra era de 12 min.

O teor de α -tocoferol presente em uma amostra, em μ g/g, é dado pela equação 10:

$$\alpha - \text{tocoferol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{C \times a \times D \times 25}{A \times m} \quad (10)$$

C = concentração do padrão de α -tocoferol (μ g/mL)

A = medida da área do pico obtido pelo padrão de α -tocoferol

a = medida da área do pico obtida pela amostra de α -tocoferol

m = massa da amostra

D = fator da diluição

Os teores de β , γ e δ -tocoferóis da amostra são calculados como o procedimento anterior usando os dados do cromatograma do correspondente padrão de tocoferol.

3.3.4.2 Determinação de ácidos graxos livres, glicerídeos e ésteres de ácidos graxos por cromatografia líquida

O sistema de cromatografia líquida utilizado era composto por um cromatógrafo Waters E 2695 (Waters Co., Milford, MA, EUA) e detector UV (Photodiode Array Detector, Waters Co., Milford, MA, EUA).

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Ascentis Express C18 (10 cm x 46 mm x 2.7 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) a 40°C. A fase móvel era composta por

água (Fase A), acetonitrila (Fase B) e isopropanol:hexano na proporção 5:4 (% , v/v) (Fase C) com vazão de 1 mL/min, volume de injeção 20 µL e detecção em 205 nm. A proporção das fases com o tempo é descrita na Tabela 1 (HOLČAPEK et al., 1999).

Tabela 1 – Gradiente da fase móvel (% , v/v)

Tempo (min)	Fase A (%)^a	Fase B (%)^b	Fase C (%)^c
0	30	70	0
10	0	100	0
20	0	50	50
25	0	50	50
25,01	0	100	0
30	30	70	0
40	30	70	0

^aFase A: água ultrapura

^bFase B: acetonitrila

^cFase C: isopropanol:hexano na proporção 5:4 (% , v/v)

3.3.4.3 Quantificação de xilose por cromatografia líquida

O consumo de xilose foi avaliado usando a metodologia descrita por Vescovi; Santos; Tardioli (2017) com adaptações. Inicialmente, o meio reacional foi centrifugado a 10000 rpm, 25 °C, por 5 min; posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi retirado e seco em estufa a 70°C *overnight*. Após evaporação do solvente, foi adicionado 1 mL de água destilada às amostras, feita a homogeneização e a filtração em filtros de seringa de 0,22 µm. A concentração de xilose foi medida utilizando um HPLC Breeze (Waters Co., Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração (RID, Waters Co., Milford, MA, EUA) e uma coluna Sugar Pak-I (300 × 6,5 mm × 10 µm, Waters Co., Milford, MA, EUA) mantida a 80 °C. A fase móvel foi composta por uma solução de EDTA-Ca (50 mg/L) a uma vazão de 0,5 mL/min, com volume de injeção de 20 µL e tempo de análise de 20 min.

3.3.4.4 Determinação de ácidos graxos livres por cromatografia gasosa

Os ácidos graxos livres foram quantificados por cromatografia gasosa de acordo com metodologia adaptada do Catálogo de Agilent Technologies (2011). Foi utilizado um cromatógrafo de gás (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com um detector de ionização de chama (FID, 250 ° C), um injetor split-splitless (250 ° C, proporção de divisão 40: 1) e uma coluna Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek Corporation,

Bellefonte, PA, EUA). O ajuste da temperatura do forno foi de 120 ° C durante 1 min; 120 ° C-250 ° C a 10 ° C / min; 250 ° C por 5 min. Hélio foi usado como gás de arraste (42 cm/s, 24 psi a 120 ° C, 1,8 mL/min).

As amostras foram dissolvidas em diclorometano na concentração de 0,016 g/mL, e os padrões foram preparados em cinco concentrações diferentes (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L) para ajuste da curva de calibração.

3.3.4.5 Determinação de ésteres metílicos e etílicos por cromatografia gasosa

Ésteres metílicos e etílicos foram quantificados por cromatografia em fase gasosa segundo a norma EN 14103, com modificações. Utilizou-se o cromatógrafo Agilent (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com detector de ionização de chama (FID, 250 °C) e coluna Rtx-Wax (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA) a uma temperatura de 210 °C, hélio como gás de arraste e heptadecanoato de metila como padrão interno. As demais condições estão descritas na Tabela 2:

Tabela 2 – Condições utilizadas no cromatógrafo gasoso

Temperatura do injetor	250 °C
Pressão	19,91 psi
Vazão total	54 mL/min
Taxa de Split	50:1
Temperatura do detector	250 °C
Vazão do He	30 mL/min
Vazão do ar sintético	400 mL/min
Vazão de H₂	25 mL/min

A amostra da reação foi centrifugada a 9.000 rpm por 10 min a 5 °C para recuperação da fase leve que foi lavada com água destilada quente e centrifugada, sendo realizada essa etapa por três vezes. Após a lavagem, a amostra foi seca em estufa overnight a 60°C. Para quantificação, 50 mg de amostra foram diluídas em 1 mL de solução de heptadecanoato de metila (10 mg/mL, em heptano), tendo como volume de injeção 1 µL. O rendimento dos FAEE/FAME (em % massa) foi calculado de acordo com a equação 11:

$$\text{Rendimento FAEE/FAME} = \frac{(\sum A) - (A_{SI})}{A_{SI}} \times \frac{(C_{SI}) - (V_{SI})}{m} \times 100 \quad (11)$$

Onde, $\sum A$ é a soma das áreas de todos os picos de ésteres presentes no cromatograma com cadeias carbônicas entre C14:0 e C24:0, A_{SI} é a área do pico do padrão interno heptadecanoato de metila (C17), C_{SI} é a concentração da solução do padrão interno heptadecanoato de metila em heptano (10 mg/mL), V_{SI} é o volume da solução do padrão interno heptadecanoato de metila em heptano (1 mL) e m é a massa da amostra (em gramas).

3.3.4.6 Determinação de glicerol, TAG, DAG e MAG por cromatografia gasosa

O conteúdo de glicerol livre, TAG, DAG e MAG (em % massa) foi determinado por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Agilent (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma coluna Select Biodiesel (glicerídeos, UM + 2 m RG, 15 m x 0,32 mm x 0,1 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e um detector de ionização de chama. A rampa de temperatura foi de 50 °C por 1 min, aquecimento a 180 °C a 15 °C / min, 230 °C a 7 °C / min e 380 °C a 10 °C / min, mantida por 10 min. A temperatura do detector era de 380 °C e o hélio foi usado como gás de arraste. As curvas de calibração foram construídas com padrões de dioleína, monooleína e trioleína, butanotiol e tricaprina como padrões internos e N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) como reagente de derivatização. A preparação, análise e quantificação das amostras foram realizadas de acordo com o método ASTM D6584.

REFERÊNCIAS

- AGILENTE TECHNOLOGIES. **The Essential Chromatography and Spectroscopy Catalog**. 2011–2012. ed. Canadá: [s.n.].
- AOCS CA 2B-38. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5. ed. Champaign, USA: AOCS, 2004.
- AOCS CA 5A-40. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.
- AOCS CC 10A-25. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.
- AOCS CD 1-25. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.
- AOCS CD 3-25. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.
- AOCS CE 2-66. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, USA: AOCS, 2004.
- AOCS CE 6A-40. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, USA: [s.n.].
- AOCS CE 8-89. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5. ed. Champaign, USA: AOCS, 2004.
- BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133–153, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CAVALCANTI, R. M. F. et al. Screening, Production and Characterization of Biosurfactants

from Caatinga's Filamentous Fungi. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 6, p. 23–28, 2017.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Lipozyme 435-Mediated Synthesis of Xylose Oleate in Methyl Ethyl Ketone. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **3317**, v. 26, n. 11, p. 3317, 1 jun. 2021.

HOLČAPEK, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 1, p. 13–31, 8 out. 1999.

NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 905–910, 2016.

PALOMO, J. M. et al. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.

VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2016.

VESCOVI, V.; SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

XANTHOS, M. **Functional Fillers for Plastics**. [s.l.] Wiley, 2005.

CAPÍTULO 4 – ENZYMATIC PRODUCTION OF FATTY ACID ETHYL ESTERS FROM
SOYBEAN OIL DEODORIZER DISTILLATE USING A LIQUID LIPASE
FORMULATION

ABSTRACT

Soybean oil deodorizer distillate (SODD), a by-product of the soy oil refining, is a rich source of fatty acids and others compounds in minor amounts, such as tocopherols and phytosterols. Despite of that, this by-product remains underused. This work aimed to use crude SODD and the SODD saponifiable phase (SODD-SP) for the enzymatic production of fatty acid ethyl esters (FAEEs) using the liquid lipase formulation Eversa Transform 2.0 as catalyst. From an experimental design, a temperature of 35 °C, an enzyme concentration of 8.36 wt.%, and a molar ratio of 3.64:1 (ethanol:SODD-SP) were found as the best conditions for FAEEs production from SODD-SP (up to 90.8 wt.% ester yield after caustic treatment). Although our product did not meet the standards of a biodiesel (min. 96.5 wt.% of FAEEs), it has great potential to be used as biofuel because the ester content represents around 98% of the SODD saponifiable matter. And the unsaponifiable compounds, especially tocopherols and phytosterols (natural antioxidants), can probably improve other properties of the biofuel, such as the oxidative stability of the unsaturated fatty acid moieties.

Key words: SODD; Eversa Transform; Biofuel; Ethanolysis; Tocopherols.

4.1. INTRODUCTION

The soybean oil deodorizer distillate (SODD) is a by-product of the soy oil refining, generated in the oil deodorization step (SHERAZI; MAHESAR, 2016) applied to remove volatile compounds responsible for unacceptable odor, color and taste in the quality standard of oils for commercialization (NAZ et al., 2012a; SHERAZI; MAHESAR, 2016). This by-product is mostly composed of free fatty acids, acylglycerols and smaller amounts of tocopherols, free sterols and scalene (DE CAMARGO; FRANCHIN; SHAHIDI, 2018; GUNAWAN; KASIM; JU, 2008; SAINI; KEUM, 2016).

Due to the high content of saponifiable matter (up to 90 wt.%), deodorizer distillates (DDs) of vegetable oils (soy, palm, rapeseed, etc.) have been exploited as raw material for biodiesel production (Table S1) (CORRÊA et al., 2011; DU; WANG; LIU, 2007; FACIOLI; BARRERA-ARELLANO, 2001; SU et al., 2014; WANG et al., 2006; ZENG et al., 2017)

Most works have used immobilized lipases for biodiesel production from DDs (Table S1). However, the cost of immobilizing could make the overall process unattractive under an industrial point of view (CORRÊA et al., 2011; DU; WANG; LIU, 2007; FACIOLI; BARRERA-ARELLANO, 2001; SU et al., 2014; WANG et al., 2006; ZENG et al., 2017). There is in the market a low-cost liquid lipase (Eversa Transform, a variant lipase from *Thermomyces lanuginous*) specially formulated for the biodiesel industry (LV et al., 2017; MONTEIRO et al., 2021; NIELSEN et al., 2016; PEDERSEN et al., 2014). This enzyme exhibits excellent performance in both liquid and immobilized forms, with both methanol and ethanol as acyl acceptors, and using refined and acid feedstocks (alkyl esters yields up to 99%) (Table S2) (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017; ANDERSON et al., 2019; ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017b, 2017c, 2017a, 2019; COPPINI et al., 2019; HE et al., 2017; MIBIELLI et al., 2019; MIRANDA et al., 2020; MONROE et al., 2020; NGUYEN et al., 2018; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016, 2018; WANCURA

et al., 2018). According to our research in the scientific literature, there is still no works on the production of biodiesel from SODD using liquid Eversa.

In this context, this work aimed to evaluate the performance of liquid Eversa in the production of biodiesel from SODD. As this by-product has other compounds than the saponifiable ones, we also evaluated a previous saponification step of the crude SODD as an attempt to increase the saponifiable content and to recover tocopherols, which is currently marketed as vitamin E (PRETTO et al., 2017).

It is important to consider that according to the international standards, the biodiesel must have at least 96.5 wt.% of alkyl esters (EN 14103; ASTM D6751). Several approaches have been reported to increase the esters content when the final product does not meet these standards. For example, if the biodiesel has high acidity (above the recommended, max. 0.25 wt.% (MIRANDA et al., 2020; NIELSEN et al., 2016)), a caustic polishing is a good strategy to reduce the acidity up to within range acceptable. Furthermore, some studies have proposed to use a biofuel as a mixture of FAEE (or FAME) and non-converted acylglycerols, called Ecodiesel (CALERO et al., 2015, 2020; HURTADO et al., 2019; LUNA et al., 2014, 2017; MONTEIRO et al., 2021). That is, a biofuel that does not generate by-products in its production, carried out at mild temperatures that favors enzymes regioselectivity in catalytic process, minimizing the standard biodiesel production usual adversities (MONTEIRO et al., 2021); in addition, it can be used in diesel/biofuel double blends and diesel/biofuel/alcohol triple blends in a diesel engine (HURTADO et al., 2019). In our case, a product composed of FAEE and unsaponifiable compounds, mainly tocopherols and phytoesterols (natural antioxidants), could be advantageous for other properties of a biofuel rich in unsaturated fatty acids moieties, for example, oxidative stability.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Materials

Soybean oil deodorizer distillate (SODD) was supplied by COCAMAR (Maringá, PR, Brazil). Eversa® Transform 2.0 (Novozymes A/S, Bagsværd, DK) was purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). Chromatography standards (α -, β -, γ - and δ -tocopherols, methyl heptadecanoate, monoolein, diolien, triolein, butanethiol, tricarpine, free fatty acids) and N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) were purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were analytical grade and were used as received.

4.2.2 Characterization of the SODD

SODD was characterized in terms of acidity index (AOCS CA 5A-40, 1990), iodine index (AOCS CD 1-25, 1990), saponification index (AOCS CD 3-25, 1990), density (AOCS CC 10A-25, 1990) and humidity (AOCS CA 2B-38, 2004). Viscosity at 40 °C was measured in a Brookfield Rheometer (Brookfield DV-III Ultra with TC-650 bath, Brookfield Brazil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) with a SC4-27 spindle.

4.2.3 SODD saponification

The saponifiable matter from SODD was obtained by a cold saponification reaction according to the AOCS methodology (AOCS CE 6A-40, 2004) with adaptations. SODD (100 mL), 10% (v/v) alcohol solution (600 mL) and 50% (w/v) KOH solution (100 mL) were added in an Erlenmeyer flask, and the mixture was stirred (in a magnetic stirrer) for 1 h at room temperature. After, 55 mL of ethyl ether were added, and the material was transferred to a separation funnel. Both phases were titrated with 0.1 M HCl for neutralization. The saponifiable

phase was washed twice with hot distilled water (volume ratio 1:1), dried overnight in an oven at 60 °C, and used for enzymatic esterification/transesterification.

4.2.4 Esterification/transesterification reaction using SODD saponifiable phase (SODD-SP) and ethanol

A statistical design was performed to define the reaction conditions: ethanol:SODD-SP molar ratio, enzyme concentration and temperature (Table 1). The ethanol:SODD-SP molar ratio was calculated based on the saponification index (SI) using Equations (1) and (2):

$$\text{SODD-SP (mol)} = m_{\text{SODD-SP}}(\text{g}) \times SI \left(\frac{\text{mg}_{\text{KOH}}}{\text{g}_{\text{SODD-SP}}} \right) \times \frac{1}{MM_{\text{KOH}}} \left(\frac{\text{mol}}{\text{g}} \right) \times 10^{-3} \left(\frac{\text{g}}{\text{mg}} \right) \quad (1)$$

$$\text{Ethanol:SODD-SP molar ratio} \left(\frac{\text{mol}_{\text{ethanol}}}{\text{mol}_{\text{SODD-SP}}} \right) = m_{\text{ethanol}}(\text{g}) \times \frac{1}{MM_{\text{ethanol}}} \left(\frac{\text{mol}}{\text{g}} \right) \times \frac{1}{\text{mol}_{\text{SODD-SP}}} \quad (2)$$

The data were analyzed and represented graphically using the software Statistica version 7.0 (Stat Soft), with a significance level of $\alpha = 0.05$. In the optimization stage, all tests were performed in closed flasks and orbital shaker (Model MA832, Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) at 250 rpm for 16 h. After defined the best conditions, the esterification/transesterification reactions were conducted in a batch reactor (50 mL working volume, thermostated and mechanically stirred at 2000 rpm) to get the ester yield profile with the time (0-48 h) using both crude SODD and SODD-SP.

Table 1. Coded values of the input variables for statistical design

Variables		-1.68	-1	0	+1	+1.68
Molar ratio (ethanol:SODD-SP)	X1	1.96:1	2.3:1	2.8:1	3.3:1	3.64:1
Enzyme concentration (wt.%)	X2	1.64	3	5	7	8.36
Temperature (°C)	X3	26.6	30	35	40	43.4

4.2.5 Caustic treatment

A volume of 4% NaOH solution (w/v) was added to the biodiesel to reach 1.15 moles of base per mole of residual free fatty acid (FFA). The reaction mixture was stirred in a shaker (SL – 222, Solab, Piracicaba, SP, Brazil) at 60 °C, 60 rpm, for 1 h. Then, the mixture was decanted for 10 min at 60 °C, and centrifuged at 8000 rpm for 10 min at 25 °C. The light phase (upper oily phase) was recovered, washed twice with hot distilled water (volume ratio 1:1), and dried overnight in an oven at 60 °C.

4.2.6 Tocopherol quantification by liquid chromatography

Tocopherols were analyzed according to the AOCS method (AOCS CE 8-89, 2004) with adaptations. The liquid chromatography system was a Waters E2695 chromatograph (Waters Co., Milford, MA, USA) equipped with UV detector (Photodiode Array Detector, Waters Co., Milford, MA, USA). The chromatographic separation was performed in a Luna® Silica 100 column (250 x 4.6 mm x 5 µm, Phenomenex INC., Torrance, CA, USA) at room temperature. The mobile phase was a mixture n-hexane:isopropanol (98:2, v/v) at a flow rate of 1 mL/min, 20 µL injection volume, 12 min analysis time.

4.2.7 Quantification of esters by gas chromatography

The yield of ethyl esters (FAEEs) (in wt.%) was determined by gas chromatography according to EN-14103, with modifications. An Agilent chromatograph (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used, equipped with a flame ionization detector (FID set at 250 °C) and a Rtx-Wax column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) at a temperature of 210 °C, with helium as carrier gas and methyl heptadecanoate as an internal standard. The samples were centrifuged at 9000 rpm for 10 min at 5 °C, the light phase was washed with hot distilled water and centrifuged (three times), and dried overnight in an oven at 60 °C. For quantification, 50 mg of sample were diluted in 1 mL

of methyl heptadecanoate solution (10 mg/ml, in heptane) and 1 μ L was injected in the equipment.

4.2.8 Quantification of glycerol, TAGs, DAGs, and MAGs by gas chromatography

The content of free glycerol, TAGs, DAGs, and MAGs (in wt.%) was determined by gas chromatography in an Agilent chromatograph (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a Select Biodiesel column (glycerides, UM + 2 m RG, 15 m x 0.32 mm x 0.1 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a flame ionization detector. The temperature ramp was 50 $^{\circ}$ C for 1 min, heating to 180 $^{\circ}$ C at 15 $^{\circ}$ C /min, 230 $^{\circ}$ C at 7 $^{\circ}$ C /min and 380 $^{\circ}$ C at 10 $^{\circ}$ C /min, maintained for 10 min. The detector temperature was 380 $^{\circ}$ C and helium was used as the carrier gas. The calibration curves were constructed with diolein, monoolein and triolein standards, butanethiol and tricaprine as internal standards, and N-methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) as derivatization reagent. Sample preparation, analysis and quantification were performed according to the ASTM D6584.

4.2.9 Quantification of free fatty acids by gas chromatography

Free fatty acids were quantified by gas chromatography according to methodology adapted from the Agilent Technologies Catalog (2011). A gas chromatograph (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used, equipped with a flame ionization detector (FID set at 250 $^{\circ}$ C), a split-splitless injector (250 $^{\circ}$ C, split ratio 40:1) and an Rtx-WAX column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA). The oven temperature was set at 120 $^{\circ}$ C for 1 min, heating to 250 $^{\circ}$ C at 10 $^{\circ}$ C/min, and 250 $^{\circ}$ C for 5 min. Helium was used as carrier gas (42 cm/s, 24 psi at 120 $^{\circ}$ C, 1.8 mL/min). The samples were dissolved in dichloromethane at a concentration of 0.016 g/mL, and the standards were prepared in five different concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g/L) to adjust the calibration curve.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 SODD characterization

As the SODD is a by-product of oil refining, its composition depends on the oil source and the processing steps. In this way, its physical-chemical characterization is important to verify the particularities of the raw material under study. The physical-chemical properties of the SODD (Table 2) show a saponification index (181.62 ± 0.96 mg KOH/g) close to that reported by (YIN et al., 2015, 2016) (154.87 mg KOH/g ± 2.62), who used SODD for biodiesel production. According to (ANVISA, 1999), the saponification index of refined soybean oil is in the range 189-195 mg KOH/g, indicating that SODD had similar characteristics to refined oil in terms of this index, due to the similarity of values for this index

Table 2. Physicochemical properties of the soybean oil deodorizer distillate (SODD)

Parameter	Results	Method
Acidity index (mgKOH/g) (25 °C)	34.19±0.52	(AOCS CA 5A-40. 1990)
Iodine index by the Wijs method (gI ₂ /100g) (25°C)	112.98±0.32	(AOCS CD 1-25. 1990)
Saponification index (mgKOH/g) (25 °C)	181.62±0.96	(AOCS CD 3-25. 1990)
Kinematic viscosity (mPa.s) (40 °C)	32.74±0.01	Note 1
Kinematic viscosity (mPa.s) (20 °C)	57.10±0.01	Note 1
Moisture (%) (130 °C)	1.33±0.04	(AOCS CA 2B-38. 2004)
Saponifiable matter as fatty acid methyl esters (FAME) (wt.%)	85.15 ± 0.53	(AOCS CE 2-66. 2004; DUVEKOT. 2011)
α-Tocopherol (g/100g) (%)	0.37 ± 0.001	(AOCS CE 8-89. 2004)
β-Tocopherol (g/100g) (%)	0.09 ± 0.005	(AOCS CE 8-89. 2004)
δ-Tocopherol (g/100g) (%)	0.36 ± 0.003	(AOCS CE 8-89. 2004)
γ-Tocopherol (g/100g) (%)	1.01 ± 0.003	(AOCS CE 8-89. 2004)
Total of tocopherols (g/100g) (%)	1.83	(AOCS CE 8-89. 2004)
Palmitic acid (C16) (g/100g) (%)	3.19 ± 0.01	(AGILENTE TECNOLOGIES. 2011)
Stearic acid (C18) (g/100g) (%)	0.99 ± 0.03	(AGILENTE TECNOLOGIES. 2011)
Oleic acid (C18:1) (g/100g) (%)	5.43 ± 0.04	(AGILENTE TECNOLOGIES. 2011)
Linoleic acid (C18:2) (g/100g) (%)	7.91 ± 0.15	(AGILENTE TECNOLOGIES. 2011)
Linolenic acid (C18:3) (g/100g) (%)	0.95 ± 0.06	(AGILENTE TECNOLOGIES. 2011)
Total of free fatty acids (g/100g) (%)	18.47	(AGILENTE TECNOLOGIES. 2011)

Note 1. Rheometer (Brookfield DV-III Ultra with bath TC-650. Brookfield Brazil. Middleboro. MA. EUA) and spindle SC4-27. program Rheocalc V3.3 Build 49-1.

Regarding to the FFAs content, the SODD acidity index (34.19 ± 0.52 mg KOH/g) was lower than that previously reported for deodorizer distillates of soybean oil (107.64 ± 228 mg KOH/g) (YIN et al., 2015, 2016), palm oil (191.69 mg KOH/g) (CORRÊA et al., 2011), rice oil (163.66 ± 0.57 mg KOH/g) (SAHU; GHOSH; BHATTACHARYYA, 2018), and rapeseed oil (97.61 ± 1.87 mg KOH/g) (LIU; WANG, 2009). In general, the content of FFAs of vegetable oil by-products depend on the composition of the original oil, as well as the deodorization conditions; thus, the physical-chemical parameters of deodorizer distillates can vary according to the oilseed (SHERAZI; MAHESAR, 2016).

The iodine index is a parameter related to the degree of the oil unsaturation (AOCS Cd 1-25, 1990). The value obtained for the SODD ($112.98 \pm 0.96 \text{ gI}_2/100 \text{ g}$) was around twice higher than that obtained for palm oil deodorizer distillate ($63.8 \text{ gI}_2/100\text{g}$) (CORRÊA et al., 2011), since soybean oil is rich in polyunsaturated fatty acids, while palm oil in saturated fatty acids. However, for biodiesel production it is recommended an iodine index less than $115 \text{ gI}_2/100\text{g}$ (KNOTHE, 2002). The moisture of SODD (1.33%) was higher than those of refined oils (less than 0.5%) (BARROS; WUST; MEIER, 2008), but this parameter must be corrected for biodiesel production, since the presence of water may favor the hydrolysis of the esters produced, thus reducing the reaction yield (MIRANDA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2020). The kinematic viscosity of the SODD at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($57.10 \pm 0.01 \text{ m Pa. s}$) was very close to that of refined soybean oil (BROCK et al., 2008) that is consistent with the high content of acylglycerols (mono-, di- and triacylglycerols) in the SODD ($\sim 70 \text{ wt.}\%$).

The total content of free fatty acids (FFAs) and acylglycerides (MAG, DAG, and TAG) was also quantified by gas chromatography in terms of fatty acid methyl esters (FAMES). For that, all glyceridic material was previously submitted to an alkaline transesterification with methyl alcohol, converting it totally into FAMES. Table 2 shows that the SODD is mainly composed of saponifiable matter ($85.15 \pm 0.53 \text{ wt.}\%$), which makes it an excellent raw material to produce biodiesel.

Soybean oil is a good source of tocopherols (α -, β -, γ - and δ -tocopherols). According to the literature, the amounts of tocopherols found in crude soybean oil are as follows (in $\text{mg}/100 \text{ g}$ of oil): α -tocopherol (9.53–12.0), β -tocopherol (1.00–1.31), γ -tocopherol (61.0–69.9) and δ -tocopherol (23.9–26.0) (DE CAMARGO; FRANCHIN; SHAHIDI, 2018), but part of these compounds are lost in the oil deodorization. The total of tocopherols in the SODD was around tenfold lower than those reported in the literature (16.3–18.2%) (SHERAZI; MAHESAR, 2016). This difference can be attributed to the fact that the degradation of

tocopherols occurs quickly (SAINI; KEUM, 2016). Tocopherols are prone to degradation at alkaline conditions and at high temperature (up to 61% degradation at 300 °C during the oil distillation process) (GUNAWAN; JU, 2009).

The FFAs in the SODD were majority composed of linoleic, oleic and palmitic acids, since soybean oil is composed of linoleic acid (51%), oleic acid (23%), palmitic acid (10%), linolenic acid (7-10%) and stearic acid (4%) (KONG et al., 2019). However, the total content of FFAs (18.47 %) found in this work was lower than those reported by Kasim et al. (2010) and Gunawan; Kasim and Ju (2008), $41.15 \pm 0.39\%$ and $45.38 \pm 2.13\%$, respectively. However, this parameter is dependent of the deodorization process (temperature and pressure) (SHERAZI; MAHESAR, 2016).

A cold saponification process was adopted in this study aiming to recovery tocopherols present in the SODD. The saponifiable phase (93.03 wt.% saponification index, 2.25 wt.% FFA and 1.33 wt.% tocopherols) was selected to carry out the fatty acid ethyl esters production tests (discussed below). The saponification process degraded a large part of tocopherols, mainly α -tocopherol, as will be discussed below, Tocopherol's degradation during saponification process was also reported by Maniet; Jacquet and Richel, (2019).

4.3.2 Transesterification/esterification reaction

The levels of the variables of the statistical design were based on reaction conditions previously reported for the synthesis of biodiesel using Eversa Transform (Table S2) to establish a range of parameters that encompassed a large part of those works. The response variable was analyzed in terms of the reaction ester yield (mass basis).

The experimental runs resulted ester yields (in wt.%) ranging from 59.30 to 82.06% (Table 3 showing experimental and predict ester yields). Analysis of variance (ANOVA) (Table 4) allowed determining the significant parameters. The F-values of model and Lack of Fit were

24.448 (p-value <0.0002, 95%-confidence level) and 14.402 (p-value > 0.08) (Table S3), respectively, indicating that the fitted model (Eq. 1) represents well the behavior of our system (R-squared value of 0.9692). The difference between adjusted and predicted R-squared is recommended to be less than 0.20. The adjusted R-squared and predicted R-squared values were 0.9295 and 0.8890, indicating good representativity of experimental dataset and capability of extrapolating the model, respectively.

A second order (Eq. 1) model was fitted to the experimental data of ester yield vs. the coded independent variables X1 (ethanol:SODD-SP molar ratio), X2 (enzyme concentration, in wt. %) and X3 (temperature, in °C):

$$\begin{aligned}
 \text{Yield} = & 72.50 + 1.67X_1 - 0.50X_1^2 + 4.04X_2 + 0.94X_2^2 - 3.67X_3 - 0.98X_3^2 - \\
 & 0.35X_1X_2 + 2.62X_1X_3 - 0.62X_2X_3
 \end{aligned} \tag{1}$$

A good agreement was observed between experimental and predicted (from Eq. 1) responses (Fig S1).

Table 3. Experimental design for the influences of three independent variables (real and coded) on the ester yield of the esterification/transesterification reaction with SODD saponifiable phase (SODD-SP) (experimental and predicted values).

Assays	Molar ratio (ethanol:SODD- SP)	Enzyme concentration (wt. %)	Temperature (°C)	Ester yield experimental (%)	Ester yield Predicted (%)
1	2.3:1 (-1)	3 (-1)	30 (-1)	73.00±2.55	72.38
2	3.3:1 (+1)	3 (-1)	30 (-1)	70.77±0.79	70.46
3	2.3:1 (-1)	7 (+1)	30 (-1)	81.91±0.80	82.40
4	3.3:1 (+1)	7 (+1)	30 (-1)	80.10±1.37	80.48
5	2.3:1 (-1)	3 (-1)	40 (+1)	59.30±1.60	61.14
6	3.3:1 (+1)	3 (-1)	40 (+1)	69.36±1.03	69.70
7	2.3:1 (-1)	7 (+1)	40 (+1)	67.57±1.68	67.28
8	3.3:1 (+1)	7 (+1)	40 (+1)	74.40±1.34	75.84
9	1.96:1 (-1.68)	5 (0)	35 (0)	67.98±0.72	69.70
10	3.64:1 (+1.68)	5 (0)	35 (0)	73.90±2.06	75.28
11	2.8:1 (0)	1.64 (-1.68)	35(0)	67.99±4.44	68.36
12	2.8:1 (0)	8.36 (+1.68)	35 (0)	82.06±4.87	81.93
13	2.8:1 (0)	5 (0)	26.6 (-1.68)	72.94±1.61	76.42
14	2.8:1 (0)	5 (0)	43.4 (+1.68)	65.14±4.32	63.08
15	2.8:1 (0)	5 (0)	35 (0)	72.03±0.45	72.49
16	2.8:1 (0)	5 (0)	35 (0)	72.74±1.01	72.49
17	2.8:1 (0)	5 (0)	35 (0)	72.76±0.25	72.49

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for ester yield (wt. %) from SODD saponifiable phase (SODD-SP) (response variable) as function of the independent variables (ethanol:SODD-SP molar ratio, enzyme concentration and temperature)

Factor	SS*	DF*	MS*	F calculated	p-value
Model	527.9898	9	58.6655	24.4483	0.000176
(1)Molar ratio (ethanol:SODD- SP)(L)	38.0718	1	38.0718	179.989	0.005510
Molar ratio (ethanol:SODD-SP)(Q)	2.8603	1	2.8603	13.522	0.066644
(2)Enzyme concentration (wt.%(L)	223.2497	1	223.2497	1055.441	0.000946
Enzyme concentration (wt.%(Q)	9.9646	1	9.9646	47.109	0.020575
(3)Temperature (°C)(L)	184.3259	1	184.3259	871.424	0.001146
Temperature (°C)(Q)	10.7223	1	10.7223	50.691	0.019162
1L by 2L	0.9895	1	0.9895	4.678	0.163034
1L by 3L	54.7595	1	54.7595	258.882	0.003841
2L by 3L	3.0462	1	3.0462	14.402	0.062951
Lack of Fit	12.0879	5	2.4176	11.429	0.082403
Pure Error	0.4230	2	0.2115		
Total SS	549.5108	16			

*DF: degree of freedom; SS: sum of squares; MS: mean square; R-squared=0.9692; adjusted R-squared=0.9295; predicted R-squared=0.8890.

Figure 1 shows the response surfaces constructed from the model (Eq.1). As expected, both enzyme concentration (more expressive) and molar ratio influenced positively the ester yield, i.e., an increase in these parameters leads to higher ester yields. Particularly, as SODD has high content of FFAs and its esterification generates water as by-product, the reaction was favored using excess of ethanol, which shifts the reaction equilibrium towards the products (HE et al., 2017; MIBIELLI et al., 2020). On the other hand, temperature negatively affected the ester yield, i.e., the reaction was favored at lower temperatures because high temperatures can inactivate the enzyme. These effects and their magnitudes are clearly showed in the Pareto chart (Fig. S2).

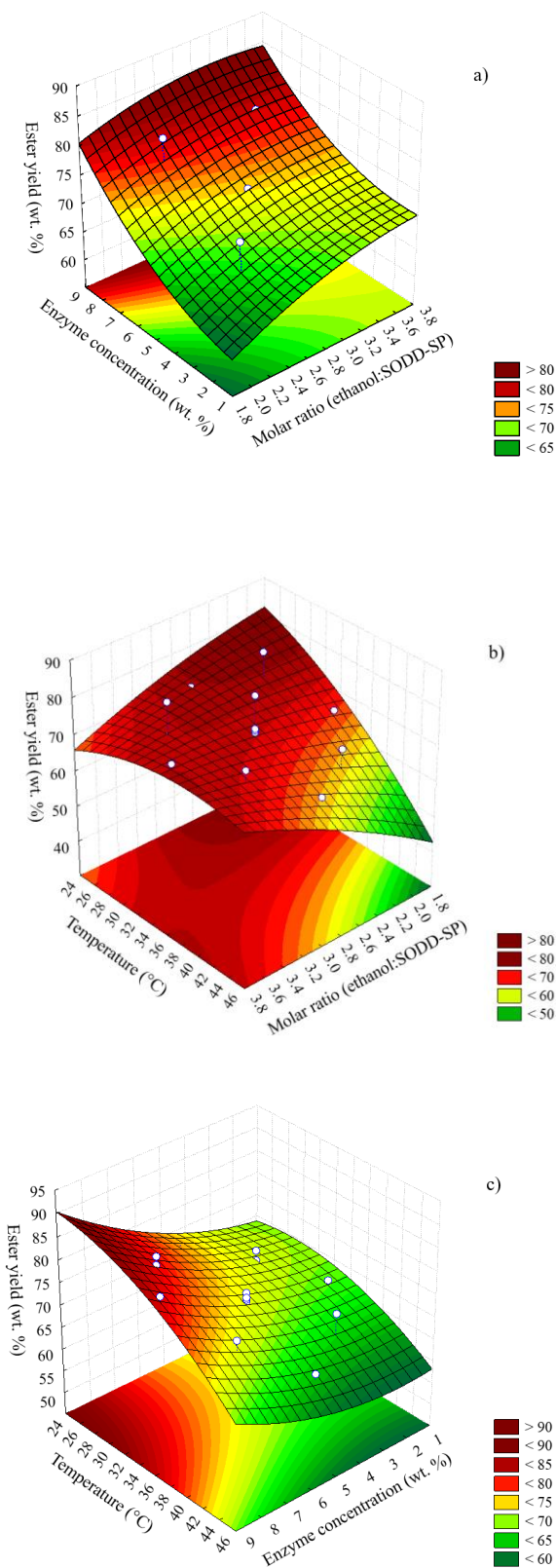


Fig. 1 Response surfaces of biodiesel reaction with SODD saponifiable phase (SODD-SP). a) Enzyme concentration vs. ethanol:SODD-SP molar ratio. b) temperature vs. ethanol:SODD-SP molar ratio. c) temperature vs. enzyme concentration. Z-axis indicates the ester yield (wt. %).

The highest FAEE yield was reached at 35 °C, 8.36 wt.% enzyme concentration and 3.64:1 molar ratio (ethanol:SODD-SP) (Fig. S3). Under these conditions, the model predicted an ester yield of 83.31 wt.%, which could be experimentally validated (83.25±1.11 wt.%). Figure 2 shows that the reaction equilibrium was reached after 23 h reaction (86.56 wt.% ester yield), after which the ester yield remains practically constant (86.84 wt.% after 48 h reaction). This result is very closed to that reported by Wancura et al. (WANCURA et al., 2018) (85.08 %) using methanol, deacidified cattle tallow and liquid Eversa.

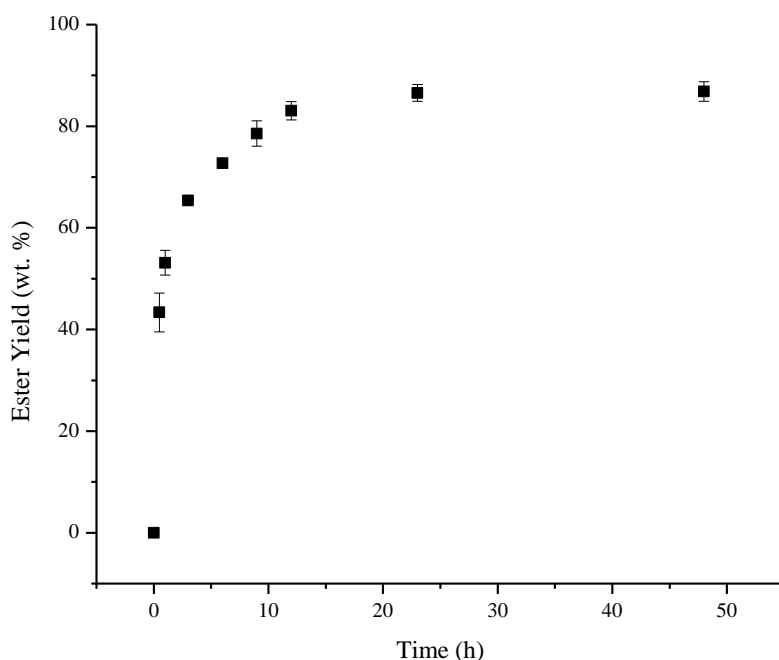


Fig. 2 Profile of fatty acid ethyl ester (FAEE) yield (wt.%) vs. time for the esterification/transesterification of SODD saponifiable phase (SODD-SP) (15 g) with ethanol (8.10 g). Reactions conditions: 48 h reaction; 35 °C; molar ratio of 3.64:1 (ethanol:SODD-SP) and 8.36 wt.% enzyme concentration.

Under the best conditions described above, an experiment was carried out using both SODD and SODD-SP to perform a mass balance per component (FAEEs, FFAs and tocopherols) (Table 5).

Table 5. Mass balance of the biodiesel production for components.

FAEEs production (reaction step)						Caustic treatment		
Inputs			Outputs			Outputs		
Component	wt. %	Dry mass(g)	Component	wt. %	Dry mass(g)	Component	wt. %	Dry mass(g)
Crude SODD		15.04	Crude FAEEs		10.25	Crude FAEEs		6.81
SI	91.27±0.88	13.73	Saponifiable:			Saponifiable:		
FFAs	17.18±0.26	2.58	FAEEs	76.85±0.65	7.88	FAEEs	82.42±0.78	5.61
Acyl-gly ^a	74.09	11.14	FFAs	5.08±0.01	0.52	FFAs	1.08±0.08	0.07
Toc-total	1.83	0.28	Acyl-gly	1.59	0.16	Acyl-gly	0.94	0.06
α-tocopherol	0.37 ± 0.001		Glycerol	0.04 ± 0.01		Glycerol	0.04 ± 0.004	
β-tocopherol	0.09 ± 0.005		MAGs	0.73 ± 0.01		MAGs	0.42 ± 0.04	
γ-tocopherol	1.01 ± 0.003		DAGs	0.79 ± 0.09		DAGs	0.45 ± 0.05	
δ-tocopherol	0.36 ± 0.003		TAGs	0.03 ± 0.01		TAGs	0.03 ± 0.003	
			Toc-total	1.39	0.14	Toc-total	0.41	0.03
			α-tocopherol	0.06 ± 0.01		α-tocopherol	0.002 ± 0.001	
			β-tocopherol	0.07 ± 0.001		β-tocopherol	0.005 ± 0.001	
			γ-tocopherol	0.99 ± 0.01		γ-tocopherol	0.19 ± 0.003	
			δ-tocopherol	0.27 ± 0.001		δ-tocopherol	0.22 ± 0.01	
Others		1.04	Others		1.55	Others		1.04
Total Mass		15.04			10.25			6.81
				Mass recovery	68.2%		Mass recovery	66.4%
SODD – SP		15.01	Crude FAEEs		11.67	Crude FAEEs		8.37
SI	93.03±1.08	13.96	Saponifiable:			Saponifiable:		
FFAs	2.25±0.13	0.34	FAEEs	86.56±0.31	10.10	FAEEs	90.83±0.82	7.60
Acyl-gly ^a	90.78	13.62	FFAs	2.77±0.08	0.32	FFAs	0.82±0.08	0.07
Toc-total	1.33	0.20	Acyl-gly	1.89	0.22	Acyl-gly	1.03	0.09
α-tocopherol	0.34 ± 0.01		Glycerol	0.05 ± 0.01		Glycerol	Not detectable	
β-tocopherol	0.01 ± 0.003		MAGs	0.90 ± 0.05		MAGs	0.50 ± 0.02	
γ-tocopherol	0.84 ± 0.01		DAGs	0.87 ± 0.23		DAGs	0.53 ± 0.09	
δ-tocopherol	0.14 ± 0.001		TAGs	0.07 ± 0.03		TAGs	Not detectable	
			Toc-total	1.01	0.12	Toc-total	0.67	0.06
			α-tocopherol	0.20 ± 0.05		α-tocopherol	0.06 ± 0.02	
			β-tocopherol	0.01 ± 0.001		β-tocopherol	0.01 ± 0.002	
			γ-tocopherol	0.67 ± 0.02		γ-tocopherol	0.49 ± 0.03	
			δ-tocopherol	0.13 ± 0.001		δ-tocopherol	0.11 ± 0.002	
Others		0.85	Others		0.91	Others		0.55
Total Mass		15.01			11.67			8.37
				Mass recovery	77.7%		Mass recovery	71.7%

SODD – soybean oil deodorizer distillate; FFAs – free fatty acids; FAEEs – fatty acid ethyl esters; SI – saponification index; Toc-total – sum of α-, β-, γ-, δ-tocopherol. SODD-SP – SODD saponifiable phase; Others – other compounds (phytoeterols, scalene, etc.) not measured; Acyl-gly – sum of monoglycerides, diglycerides, triglycerides and free glycerol. Reactions conditions: 24 h reaction; 35 °C; ethanol:SODD-SP molar ratio of 3.64:1, 8.36 wt.% enzyme, and 6.74 g of molecular sieves (only for FAEEs production from hydrolyzed SODD).

^a Values indirectly calculated as (SI – FFAs).

The production of FAEEs using liquid lipases, such as Eversa, results in a significant increase in free fatty acids at the beginning of the reaction, which must be regulated to achieve high ester yields (NIELSEN et al., 2016; WANCURA et al., 2019). Thus, to reduce residual FFAs, the caustic treatment of the material was used in this work. In this case, biodiesel from SODD-SP after caustic treatment presented 90.83 wt.% FAEEs, 1.03 wt.% non-converted glycerides and 0.82 wt.% FFAs. On the other hand, biodiesel from crude SODD after caustic treatment presented lower content of FAEEs (82.42 wt.%) and similar amounts of non-converted glycerides and FFAs (0.94 and 1.08 wt.%, respectively) (Table 5). Both products met the standards of a biodiesel regarding to free glycerin (max. 0.25%), MAGs (max. 0.70%) and TAGs (max. 0.20%), but not met the values recommended to FAEEs (min. 96.5 wt.%), DAGs (max. 0.20 wt.%) and FFAs (max. 0.50 mg KOH/g) (ANP, 2014). However, it has been reported that biofuels containing bound glycerol have several advantageous as biofuels (CALERO et al., 2015, 2020; HURTADO et al., 2019; LUNA et al., 2014, 2017; MONTEIRO et al., 2021).

The crude SODD acidity was 17.18 wt.%, a value almost 8-fold higher than that of the SODD-SP (etheric phase of the SODD saponification) (2.25 wt.%). Even using raw material with different acidities, the Eversa performance was similar, demonstrating the enzyme's versatility for use in different substrates, enabling the production of esters with both high and low acidity oils (VARGAS et al., 2018). The ester yields (after caustic treatment) for both raw materials (82.42 and 90.83 wt.%) showed that the reaction conversion were very close to the maximum values (90.3 and 97.6% conversion), taking into account only the saponifiable content (91.27 and 93.03 wt.%, respectively). It should be noted that others compounds may be present in the final product, such as tocopherols, phytosterols and squalene, initially present in the SODD (15.23-23.54%) (GUNAWAN; KASIM; JU, 2008; KASIM et al., 2010; SHERAZI; MAHESAR, 2016).

The excellent performance of Eversa in the synthesis of alkyl esters from different raw materials is well documented in the literature. Miranda et al. (2020) obtained FAEE yields around 90 wt.% after 48 h of reaction in the presence of 6.0% water, using liquid Eversa and refined soybean oil. After a caustic treatment, the ester yield could be increased to 98.2 wt.%. Other authors, using the same enzyme and methanol as acyl acceptor, obtained similar yields: 96% (MIBIELLI et al., 2019), 96.7 % (REMONATTO et al., 2016), and 97.5 % (NIELSEN et al., 2016). Regarding to the acyl donor, Facioli e Barrera-Arellano (2002) obtained 88% conversion of SODD to FAEEs; however, the enzyme used was the *Mucor miehei* immobilized lipase (Lipozyme^{IM}). Wang et al. (2006) and Du, Wang and Liu (2007) reported ester yields of 97% and 95% (calculated as the percentage of methyl esters measured in relation to the theoretical methyl esters amount), respectively, using SODD, Novozym 435 and methanol as acyl acceptor. These brief review shows that our results are very closed to those previously reported using other systems acyl donors-acyl acceptors-enzyme.

Regarding to the total tocopherol, the biodiesel produced contained 50% and 60% of the total present in the crude SODD and in the SODD-SP, respectively. After caustic treatment these values decreased to 10% and 30%, respectively. The greatest losses occurred in the caustic treatment, mainly for α - and δ -tocopherols. Although our final product has still not met the values recommend to biodiesel for some parameters (such as FAEEs, min. 96.5 wt.%), a deep study focused on this matter could adjust it as biofuel an even recover other value-added compounds. A deep study of separating FAEEs, FFAs, tocopherols, and other compounds, as well as the economic analysis of these processes is in progress in our group.

4.4 CONCLUSION

Soybean oil deodorizer distillate (SODD) was a promising raw material to produce fatty acid ethyl esters using a liquid lipase especially performed to work in the presence of high content of free acids. Under the best reaction conditions established by statistical design designed (35 °C, 8.36% enzyme load, 3.64:1 ethanol:SODD molar ratio and 23 h reaction) and caustic treatment to reduce free fatty acids, the ester yield reached 82.4 wt.%, which correspond to 90.3% of the saponifiable matter of SODD. A previous step of mild SODD saponification enhanced the ester yield to 90.8 wt.% (~ 98% of the saponifiable matter in the SODD saponifiable phase). However, tocopherols (and probably others unsaponifiable compounds) could not to be efficiently separated, remaining mostly in the FAEE mixture (around 60% of the total present in the starting material).

FUNDING

This work was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant number 2016/10636-8]; in part by “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) [Finance Code 001]; “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) [grant number 315092/2020-3]; “Ministerio de Ciencia e Innovación” (Spanish Government) [grant number CTQ2017-86170-R]; and “Consejo Superior de Investigaciones Científicas” (CSIC) [grant number AEP045].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank COCAMAR (Maringá, PR, Brazil) for providing the soybean oil deodorizer distillate (SODD).

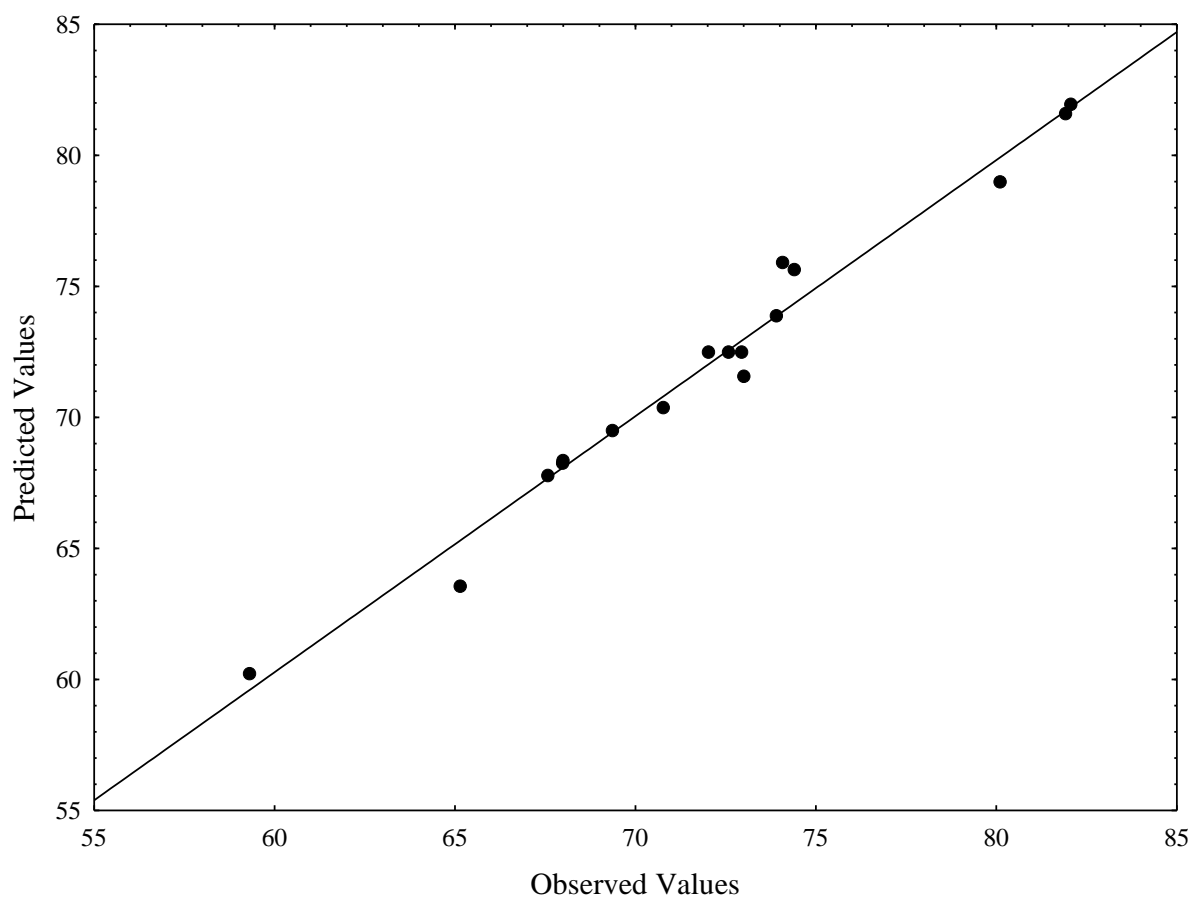


Fig. S1. Correlation between experimental (observed values) and fitted (predicted values) ester yields (wt.%) of the esterification/transesterification with SODD saponifiable phase and ethanol using Eversa Transform 2.0 as biocatalyst.

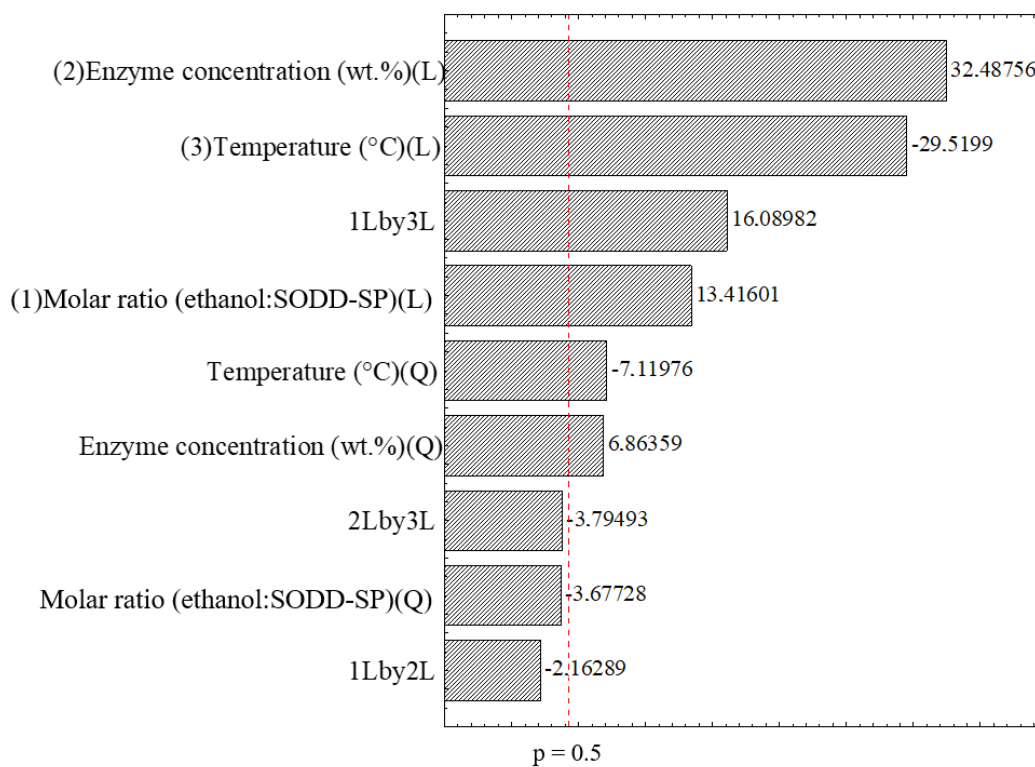


Fig. S2. Pareto chart with the effects of the parameters and their interactions for the experimental design of the esterification/transesterification with SODD saponifiable phase and ethanol using Eversa Transform 2.0 as biocatalyst.

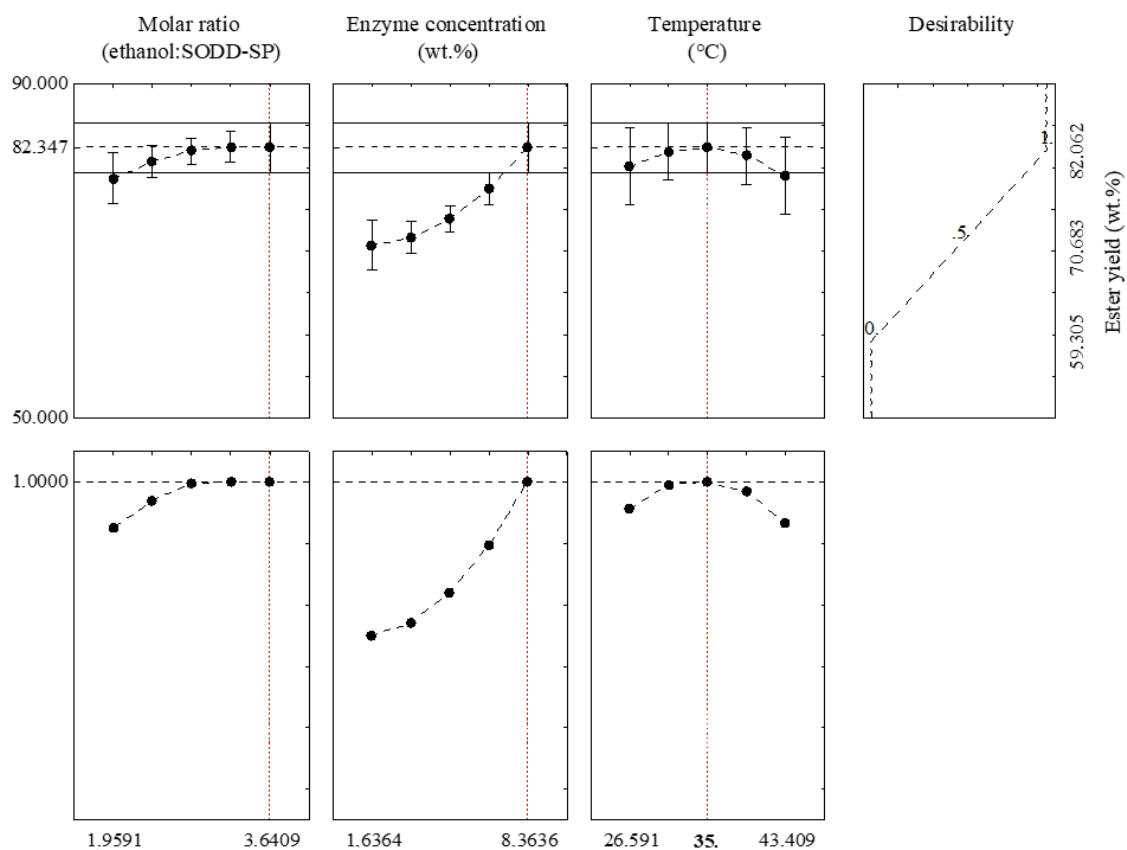


Fig. S3. Profiles for predicted values and desirability of the esterification/transesterification with SODD saponifiable phase and ethanol using Eversa Transform 2.0 as biocatalyst.

Table S1. Researches focused on the production of biodiesel by the enzymatic route from deodorization distillates (DD) of vegetable oils.

DD source oil	Alcohol	Reaction conditions	Biocatalyst	Yield (%)	Reference
Soy	Methanol	Methanol:DD 2.3:1 (molar ratio) 53.6 °C 2 h	Lipozyme IM	88	(FACIOLI; BARRERA-ARELLANO, 2001)
Soy	Methanol	Methanol:DD 3.6:1 (molar ratio) 40 °C 24 h	Novozym 435	97	(WANG et al., 2006)
Soy	Methanol	Methanol:DD 3.9:1 (molar ratio) 40 °C 24 h	Novozym 435	95	(DU; WANG; LIU, 2007)
Palm	Ethanol Methanol	2 g of alcohol added in two steps to 8 g of DD 60 °C 2.5 h	Novozym 435 Lipozyme RM-IM ^b Lipozyme TL-IM ^c	93	(CORRÊA et al., 2011)
Rapeseed	Ethanol	Ethanol:DD 4:1 (molar ratio) 40 °C 30 h	Lipase from <i>Rhizopus oryzae</i> immobilized on hydrophobic macroporous resin NKA ^d	98.23	(SU et al., 2014)
Rapeseed	Methanol	Methanol:DD 167 µL:2 g 34 °C 6 h	Lipase from <i>Rhizopus oryzae</i>	98.16	(ZENG et al., 2017)

^aLipozyme IM - *Mucor miehei* lipase Immobilized on a macroporous ion exchange resin

^bLipozyme RM-IM - *Rhizomucor miehei* lipase Immobilized on a macroporous ion exchange resin

^cLipozyme TL-IM - *Thermomyces lanuginosus* lipase Immobilized on a macroporous ion exchange resin

^dNKA - Neurokinin A

Table S2. Studies of biodiesel production using Eversa® Transform lipase (liquid or immobilized) as biocatalyst.

Acyl donor	Acyl acceptor	Reaction Conditions	Biocatalyst form	Yield (%)	Reference
Soy oil	Ethanol	6:1 alcohol: oil (molar ratio) 12 U esterification/g oil 40 °C 1500-1700 rpm 24 h	Magnetic CLEAs	98.9	(MIRANDA et al., 2020)
Glyceril trioleate	Fusel oil	5:1 alcohol:oil (molar ratio) 2 wt.% enzyme 35 °C 250 rpm 24 h	Liquid	> 97%	(MONROE et al., 2020)
Deacidified cattle tallow	Methanol	4.5:1 alcohol: oil (molar ratio) 1.0 wt.% enzyme 35 °C 300 rpm 6.0 wt.% water 8 h	Liquid	85.08	(WANCURA et al., 2018)
Soy oil	Methanol	550 kg oil 2.2 kg methanol 0.2 wt.% enzyme 45 °C 20.0 wt% water 100 ppm NaOH 24 h	Liquid	96	(MIBIELLI et al., 2019)

Table S2 continue

Castor oil	Methanol	6:1 alcohol: oil (molar ratio) 5.0 wt.% enzyme 35 °C 5.0 wt.% Water 8 h	Liquid	83	(ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2019)
Residual oil from a poultry industry	Methanol	100 g oil 1.5 eqv. alcohol 0.3 wt.% enzyme 45 °C 1.5 wt.% water 250 rpm 24 h	Liquid (NS 40116 trademark)	90.61	(COPPINI et al., 2019)
Cotton seed oil	Methanol	6:1 alcohol: oil (molar ratio) 5 wt.% enzyme 35 °C 6 wt.% water 250 rpm 24 h	Liquid	98.5	(ANDERSON et al., 2019)
Sunflower oil	Ethanol	1:4 alcohol: oil (molar ratio) 4.1 mL hexane 10 wt.% enzyme 40 °C 150 rpm 3 h	Immobilized on Sepabeads	99	(REMONATTO et al., 2018)

Table S2 continue

Oleic acid	Methanol	3.44:1 alcohol:acid (molar ratio) 11.98% enzyme 35.25 °C 2.5 h	Liquid	96.73	(NGUYEN et al., 2018)
CTO of the kraft pulping process	Methanol	1.5:1 alcohol: oil (molar ratio) 1 wt.% enzyme 500 rpm 40 °C 16 h	Liquid	96.57	(ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017)
Castor oil	Methanol	6:1 alcohol: oil (molar ratio) 5 wt.% enzyme 5 wt.% water 750 rpm 35 °C 8 h	Liquid	94.21	(ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017b)
Castor oil	Methanol	6:1 alcohol: oil (molar ratio) 5 w.t% enzyme 5 wt.% water 750 rpm 35 °C 8 h	Liquid	Not informed	(ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017c)
Bleached sardine oil	Ethanol	8:1 alcohol: oil (molar ratio) 60 U enzyme 10 wt.% water 25 °C 4 h	Liquid	93.98	(HE et al., 2017)

Table S2 continue

Castor oil	Methanol	6:1 alcohol: oil (molar ratio) 10 wt.% enzyme 750 rpm 35 °C 8 h	Liquid	94.21	(ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017a)
Soy oil	Methanol	1.5 eqv. methanol 1 wt.% enzyme 2.5 wt.% water 250 rpm 35 °C 16 h	Liquid	96.7	(REMONATTO et al., 2016)
Soy oil	Methanol	1.5 eqv. methanol 0.2 wt.% enzyme 3 wt.% water 500 rpm 35 °C 24 h	Liquid	97.5	(NIELSEN et al., 2016)
Saponifiable phase of soybean oil deodorizer distillate (SODD – SP)	Ethanol	3.64:1 ethanol:SODD-SP (molar ratio) 8.36 wt.% enzyme 35 °C and 48 h	Liquid	90.83	This work

Table S3. Coefficients of the polynomial model fitted in the statistical design

Factor	Coeff.	Std Err. Coeff.	p-value
Mean/Interc.	72.49909	0.2650	0.000013
(1)Molar ratio (ethanol:SODD-SP)(L)	1.66965	0.1245	0.005510
Molar ratio (ethanol:SODD-SP)(Q)	-0.50371	0.1372	0.066644
(2)Enzyme concentration (wt.%(L)	4.04315	0.1245	0.000946
Enzyme concentration (wt.%(Q)	0.94016	0.1372	0.020575
(3)Temperature (°C)(L)	-3.67382	0.1245	0.001146
Temperature (°C)(Q)	-0.97525	0.1372	0.019162
1L by 2L	-0.35170	0.1626	0.163034
1L by 3L	2.61628	0.1626	0.003841
2L by 3L	-0.61707	0.1626	0.062951

REFERENCES

- ADEWALE, P.; VITHANAGE, L. N.; CHRISTOPHER, L. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, v. 154, p. 81–91, 15 dez. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25 DE AGOSTO DE 2014**. Disponível em: <<https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-45-2014?origin=instituicao&q=45>>. Acesso em: 26 fev. 2021.
- AGILENTE TECHNOLOGIES. **The Essential Chromatography and Spectroscopy Catalog**. 2011–2012. ed. Canadá: [s.n.].
- ANDERSON, S. et al. Evaluation of Dominant Parameters in Lipase Transesterification of Cottonseed Oil. **Transactions of the ASABE**, v. 62, n. 2, p. 467–474, 2019.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Transesterification of Castor Oil Catalyzed by Liquid Enzymes: Optimization of Reaction Conditions. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 40, p. 2863–2868, 2017a.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Evaluation of Reaction Mechanisms and Kinetic Parameters for the Transesterification of Castor Oil by Liquid Enzymes. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 34, p. 9478–9488, 2017b.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Castor oil transesterification catalysed by liquid enzymes: Feasibility of reuse under various reaction conditions. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 913–918, 2017c.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Investigation of the use of ceramic membranes in recovering liquid enzymes for castor oil transesterification. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 769–774, 2019.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO Nº 482, DE 23 DE SETEMBRO DE 1999**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_482_1999_COMP.pdf/0b31ce35-6d43-42d6-8184-549de494987a?version=1.0>. Acesso em: 20 out. 2019.
- AOCS CA 2B-38. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5. ed. Champaign, USA: AOCS, 2004.
- AOCS CA 5A-40. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and**

recommended practices of the American Oil Chemists` Society. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.

AOCS CC 10A-25. **AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society.** 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.

AOCS CD 1-25. **AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society.** 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.

AOCS CD 3-25. **AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society.** 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.

AOCS CE 2-66. **AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society.** Champaign, USA: AOCS, 2004.

AOCS CE 6A-40. **AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society.** Champaign, USA: [s.n.].

AOCS CE 8-89. **AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society.** 5. ed. Champaign, USA: AOCS, 2004.

BARROS, A. C.; WUST, E.; MEIER, H. F. ESTUDO DA VIABILIDADE TÉCNICO-CIENTÍFICA DA PRODUÇÃO DE BODIESEL PARTIR DE RESÍDUOS GORDUROSOS. **Eng. sanit. ambient**, v. 13, n. 3, p. 255–262, 2008.

BROCK, J. et al. Experimental measurements of viscosity and thermal conductivity of vegetable oils. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 28, n. 3, p. 564, 2008.

CALERO, J. et al. An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1437–1452, 1 fev. 2015.

CALERO, J. et al. Optimization by response surface methodology of the reaction conditions in 1,3-selective transesterification of sunflower oil, by using CaO as heterogeneous catalyst. **Molecular Catalysis**, v. 484, p. 110804, 1 mar. 2020.

COPPINI, M. et al. Production of methyl esters by enzymatic hydroesterification of chicken fat industrial residue. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 923–928, 2019.

CORRÊA, I. N. DOS S. et al. Enzymatic Biodiesel Synthesis Using a Byproduct Obtained from Palm Oil Refining. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

DE CAMARGO, A. C.; FRANCHIN, M.; SHAHIDI, F. Tocopherols and tocotrienols: Sources, analytical methods, and effects in food and biological systems. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 561–570, 2018.

DU, W.; WANG, L.; LIU, D. Improved methanol tolerance during Novozym435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 173–176, 2007.

DUVEKOT, C. **Determination of total FAME and linolenic acid methyl esters in biodiesel according to EN-14103**. Disponível em:
<<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8983EN.pdf>>.

FACIOLI, N. L.; BARRERA-ARELLANO, D. Optimisation of enzymatic esterification of soybean oil deodoriser distillate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 12, p. 1193–1198, 2001.

FACIOLI, N. L.; BARRERA-ARELLANO, D. Optimización del proceso de esterificación química del destilado de desodorización del aceite de soja previamente saponificado y acidulado. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 2, p. 218–225, 2002.

GUNAWAN, S.; JU, Y. H. Vegetable oil deodorizer distillate: Characterization, utilization and analysis. **Separation and Purification Reviews**, v. 38, n. 3, p. 207–241, jul. 2009.

GUNAWAN, S.; KASIM, N. S.; JU, Y. H. Separation and purification of squalene from soybean oil deodorizer distillate. **Separation and Purification Technology**, v. 60, n. 2, p. 128–135, 2008.

HE, Y. et al. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445–456, 1 jan. 2017.

HURTADO, B. et al. Synthesis, Performance and Emission Quality Assessment of Ecodiesel from Castor Oil in Diesel/Biofuel/Alcohol Triple Blends in a Diesel Engine. **Catalysts**, v. 9, n. 40, p. 1–21, 2019.

KASIM, N. S. et al. A simple two-step method for simultaneous isolation of tocopherols and free phytosterols from soybean oil deodorizer distillate with high purity and recovery. **Separation Science and Technology**, v. 45, n. 16, p. 2437–2446, 2010.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 9, p. 847–854, 2002.

KONG, W. et al. An energy-friendly alternative in the large-scale production of soybean oil. **Journal of Environmental Management**, v. 230, p. 234–244, 2019.

LIU, Y.; WANG, L. Biodiesel production from rapeseed deodorizer distillate in a packed column reactor. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 2009.

LUNA, C. et al. Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 31 ago. 2014.

LUNA, C. et al. Application of Enzymatic Extracts from a CALB Standard Strain as Biocatalyst within the Context of Conventional Biodiesel Production Optimization. **Molecules** 2017, Vol. 22, Page 2025, v. 22, n. 11, p. 2025, 21 nov. 2017.

LV, L. et al. Effect of water on lipase NS81006-catalyzed alcoholysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 239–244, 2017.

MANIET, G.; JACQUET, N.; RICHEL, A. Recovery of sterols from vegetable oil distillate by enzymatic and non-enzymatic processes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 22, n. 4, p. 347–353, 2019.

MCCURRY, J.D.; WANG, C.-X. **Analysis of Glycerin and Glycerides in Biodiesel (B100) Using ASTM D6584 and EN14105**. Disponível em:
<<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-7269CHCN.pdf>>.

MIBIELLI, G. M. et al. Lab and pilot plant FAME production through enzyme-catalyzed reaction of low-cost feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 150–156, 2019.

MIBIELLI, G. M. et al. Enzymatic production of methyl esters from low-cost feedstocks. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101558, 2020.

MIRANDA, L. P. et al. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa® Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 817, 2020.

MONROE, E. et al. Superior performance biodiesel from biomass-derived fusel alcohols and low grade oils: Fatty acid fusel esters (FAFE). **Fuel**, v. 268, p. 117408, 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, out. 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, 1 fev. 2021.

NAZ, S. et al. Rapid determination of free fatty acid content in waste deodorizer distillates

using single bounce-attenuated total reflectance-FTIR spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 6, p. 1570–1573, 2012.

NGUYEN, H. et al. Liquid Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid with Methanol for Biodiesel Production in the Presence of Superabsorbent Polymer: Optimization by Using Response Surface Methodology. **Energies**, v. 11, n. 5, p. 1085, 2018.

NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 905–910, 2016.

PEDERSEN, A. T. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

PRETTO, C. DE et al. Possibilities for Producing Energy, Fuels, and Chemicals from Soybean: A Biorefinery Concept. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–28, 2017.

REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 254–262, 2016.

REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 2018.

SAHU, S.; GHOSH, M.; BHATTACHARYYA, D. K. Isolation of the unsaponifiable matter (squalene, phytosterols, tocopherols, γ -oryzanol and fatty alcohols) from a fatty acid distillate of rice bran oil. **Grasas y Aceites**, v. 69, n. 3, p. 1–8, 2018.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. **Food Research International**, v. 82, p. 59–70, 2016.

SHERAZI, T. H. S.; MAHESAR, A. S. Vegetable Oil Deodorizer Distillate: A Rich Source of the Natural Bioactive Components. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 12, p. 957–966, 2016.

SU, F. et al. Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized on Hydrophobic Carriers and Its Application in Biorefinery of Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 3, p. 935–945, 2014.

VARGAS, M. et al. Lipases as biocatalyst for biodiesel production. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1835p. 377–390.

WANCURA, J. H. C. et al. Production of biodiesel catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 11, p. 2361–2368, 2018.

- WANCURA, J. H. C. et al. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1–20, 2019.
- WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1–4, p. 29–32, 2006.
- YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate enhanced by counter-current pulsed ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 53–58, 2015.
- YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate using calcined duck eggshell as catalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 112, p. 199–207, 2016.
- ZENG, L. et al. Preparation of Biodiesel with Liquid Synergetic Lipases from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 778–791, 2017.

CAPÍTULO 5 – SOYBEAN OIL DEODORIZER DISTILLATE AS FEEDSTOCK TO PRODUCE FATTY ACID ESTERS USING ETHANOL AND XYLOSE AS ACYL ACCEPTORS

ABSTRACT

Alkyl fatty acids and sugar fatty acids are widely used as biofuel and cosmetic/pharmaceutical ingredients, respectively. These esters are mainly produced by chemical route that has several disadvantages, mainly as to the product purity and environment concerns. This work aimed to evaluate the enzymatic production of ethyl and xylose fatty esters using a by-product of the soybean oil refining, viz., the soybean oil deodorizer distillate (SODD), which is mainly composed of saponifiable matter (> 80 wt.%). First, SODD's glycerides were hydrolyzed with free lipases (*Pseudomonas fluorescens* lipase and Eversa Transform®) and further the free fatty acid-rich material was used to produce ethyl esters (using the liquid lipase formulation Eversa Transform®) and xylose fatty esters (using three commercial immobilized lipases, viz. *Candida antarctica* lipase B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) and *Pseudomonas fluorescens* lipase (LPF)). All steps were carried out at low temperatures (< 60 °C) compared to the chemical routes. The hydrolysis step yielded saponifiable materials with 72.5 and 84.4 wt.% of free fatty acids (FFAs) after 48 h hydrolysis using Eversa and PFL, respectively. The esterification/transesterification reaction of the later material with ethanol yielded a product with 81.5 wt.% esters, 8.3 wt.% non-converted glycerides and 10.2 wt.% FFAs, which could be used as fuel after a further purification step to remove FFAs. In the case of xylose esters syntheses, the lipases used allowed to achieve xylose conversions up to 89.2% (using PFL). The behavior of xylose and FFAs consumption suggested that a mixture of mono-, di- and triesters was produced, containing mainly unsaturated alkyl moieties linked to the xylose. All products contained tocopherols in their composition that could contribute to an increased oxidative stability due to the antioxidant activities of the tocopherols.

Keywords: Eversa Transform®; Ethanolysis; Sugar Esters; Xylose; Tocopherols.

5.1. INTRODUCTION

The soybean oil deodorizer distillate (SODD) is a by-product generated in the last stage of the soybean oil refining aiming to remove undesirable aroma and flavor of the oil, including sterols, hydrocarbons, tocopherols and fatty acids (GUNAWAN; JU, 2009; MANIET; JACQUET; RICHEL, 2019; SAINI; KEUM, 2016). The distillation step is usually carried out injecting direct steam or superheated nitrogen between 220 to 260 °C. Thus, volatile compounds pass through condensers and are collected as SODD (SHERAZI; MAHESAR, 2016). The SODD is mainly composed of free fatty acids (FFAs), triacylglycerols (TAGs), diacylglycerols (DAGs), tocopherols, squalene and free sterols. Despite the commercial value of tocopherols (components of vitamin E) present in the SODD, the large amount of fatty acids (including oleic, linoleic and palmitic acids) make the SODD an interesting feedstock to produce biofuel (mixture of ethyl esters) and biosurfactants (sugar esters) (VISIOLI et al., 2016).

Some works have been exploited vegetable oil deodorizer distillates as feedstock to produce biodiesel using chemical catalysts (bases or acids) (ZHANG; YU; ZENG, 2017) (YIN et al., 2016) (NETA et al., 2012), but only Zeng et al. (ZENG et al., 2017) used liquid lipases as catalysts. However, according to our knowledge the production of sugar esters from saponifiable matter of the SODD was not yet reported.

Sugar esters are non-ionic, non-toxic, odorless, biodegradable surfactants with antimicrobial activity, whose characteristics make them a product of great interest in the food, pharmaceutical and cosmetic industries (GHOSH; JONES, 2017; KHAN; RATHOD, 2015; SANTOS et al., 2016). There are several works reporting the production of sugar esters using various carbohydrates as acyl receptors, such as fructose (HIDAYAT et al., 2016; VESCOVI et al., 2016), sucrose (INPRAKHON et al., 2017; NETA et al., 2012), glucose (MAI *et al.*, 2014; REN; LAMSAL, 2017), galactose (CAO; BORNSCHEUER; SCHMID, 1999; SOMASHEKAR; DIVAKAR, 2007), lactose (ENAYATI et al., 2018; NETA et al., 2012;

PERINELLI et al., 2018), and maltose (FERRER *et al.*, 2005; WOUDEBERG-VAN OOSTEROM; VAN RANTWIJK; SHELDON, 1996). However, studies using xylose as acyl receptor are still scarce in the literature (ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016; BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; LIMA *et al.*, 2018; VESCOVI *et al.*, 2017).

In this context, this work aimed to evaluate the production of ethyl and xylose esters with biofuel and biosurfactant properties, respectively, using SODD as source of glycerides. To achieve this goal, first the SODD glycerides (mainly TAG and DAGs) were hydrolyzed with free 1,3-specific and non-specific lipases (Eversa and *Pseudomonas fluorescens* lipase, respectively). After, the FFAs-rich matter was used as substrate in the esterification/transesterification reaction with ethanol and xylose as acyl acceptors. In the case of using ethanol, a liquid lipase formulation Eversa was used as biocatalyst, because this enzyme was specially formulated to be used in the biodiesel production from highly-acid feedstocks (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017; ANDERSON et al., 2019; ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017b, 2017a, 2019; COPPINI et al., 2019; HE et al., 2017; MIBIELLI et al., 2019; MIRANDA et al., 2020; MONROE et al., 2020; NGUYEN et al., 2018; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016, 2018; WANCURA et al., 2018). In the case of using xylose, commercial immobilized lipases were used as biocatalysts, such as *Candida antarctica* lipase B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL), *Pseudomonas fluorescens* lipase (LPF).

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Materials

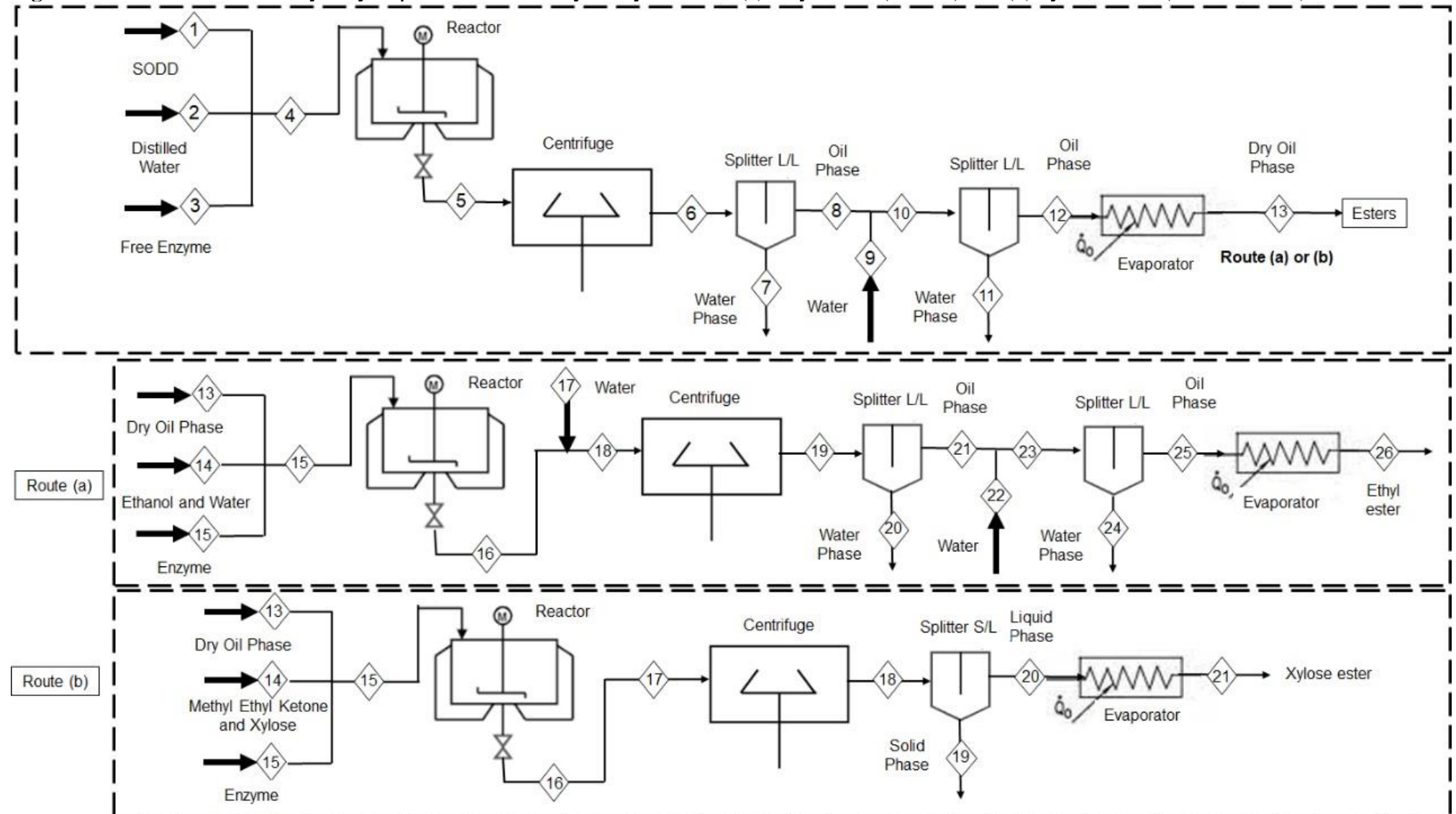
SODD was obtained from COCAMAR (Maringá, PR, Brazil). Its physic-chemical properties was previously characterized (Table 1 – Chapter 4). Liquid lipase Eversa® Transform 2.0 (Novozymes A/S, Bagsværd, DK), *Pseudomonas fluorescens* lipase, α -, β -, δ -

and γ -tocopherols, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, and xylose were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Immobilized lipase, viz. *Pseudomonas fluorescens* lipase (Immozyme - IMMAPF T2 150), *Thermomyces lanuginosus* lipase (Immozyme - TLL T2 150), and *Candida antarctica* lipase B (Immozyme CALB T2 150) were purchased from Chiral Vision (Leiden, Netherlands). Molecular sieve (3 Å) was acquired from JT Baker (New Jersey, NJ, USA). All other chemicals were analytical grade and were used as received.

5.2.2 SODD hydrolysis reaction

The hydrolysis of SODD were carried out at 37 °C in a thermostatically controlled closed reactor with mechanical stirring. The reaction medium was composed of 50 g of SODD, 200 g of distilled water (1:4 SODD/water mass ratio) and 2.5 g of free enzyme (5%, m/m_{SODD}). The reaction was monitored by measuring FFAs released in the reaction medium by gas chromatography. At the end of the reaction, the medium was washed twice with hot distilled water (1:1 volume ratio), dried overnight in an oven at 60 °C, and used for enzymatic esterification/transesterification reactions (Fig. 1)

Fig. 1 Flowchart of the SODD hydrolysis process followed by the synthesis of (a) ethyl esters (biofuel) and (b) xylose esters (biosurfactants).



5.2.3 Ethyl ester synthesis

The synthesis of ethyl esters was carried out at 35 °C for 48 h in a thermostatically controlled closed reactor with mechanical stirring. The molar ratio was 3.64: 1 (ethanol:SODD), 8.36% enzyme concentration (m/v) (Chapter 4), and 6.7 g of molecular sieve. At the end, the reaction medium was centrifuged, the oily phase was washed with distilled water at approximately 60 °C and dried in an oven at 60 °C overnight. The fatty acid of ethyl esters (FAEEs) were quantified by gas chromatography and according acidity index AOCS CA 5A-40 (1990).

5.2.4 Sugar ester synthesis

The synthesis of xylose esters was performed according to Gonçalves et al. (2021) with adaptations. The reaction was carried out at 60°C in closed vials under predefined conditions (7 mM of xylose in 60 mL ethyl-methyl-ketone, 0.42 g of SODD, 11.44 g of molecular sieve and 0.5% of enzyme (m/v)) in an orbital shaker (Model MA832, Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) at 250 rpm for 24 h. SODD was used in excess (5:1 (m/m)) because of better xylose conversions reported (GONÇALVES et al., 2021b). At the end, the reaction medium was centrifuged (10000 rpm for 5min, 25 °C) to remove molecular sieve and enzyme. Samples were taken in methyl ethyl ketone for FFA analysis by gas chromatography. And another part of the samples was removed and dried in an oven at 70 °C overnight, for analysis of tocopherol and xylose consumption by liquid chromatography.

5.2.5 Emulsion Capacity Assays

Emulsion capacity tests were performed in duplicate dissolving 50 mg of the product reaction in 1 mL of water and adding in 2 mL of kerosene to a tube test. The tube contents were continuously homogenized for 2 min at room temperature (25 °C) and left to rest for 24 h. After this period, the height of the emulsified region and the height of the total column were

measured, and the emulsion capacity were calculated according to Equation 1 (CAVALCANTI et al., 2017).

$$EC (\%) = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Where H_e : height of the emulsified region and H_t : height of the total column.

5.2.6 Tocopherol quantification

Tocopherols were analyzed according to the AOCS method (AOCS CE 8-89, 2004) with adaptations. The liquid chromatography system was a Waters E2695 chromatograph (Waters Co., Milford, MA, USA) equipped with UV detector (Photodiode Array Detector, Waters Co., Milford, MA, USA). The chromatographic separation was performed in a Luna® Silica 100 column (250 x 4.6 mm x 5 µm, Phenomenex INC., Torrance, CA, USA) at room temperature. The mobile phase was a mixture n-hexane:isopropanol (98:2, v/v) at a flow rate of 1 mL/min, 20 µL injection volume, 12 min analysis time.

5.2.7 Xylose determination

Xylose consumption was evaluated according to Vescovi, Santos and Tardioli (2017) with adaptations. The reaction medium was centrifuged at 10000 rpm, 25 °C, for 5 min, and 1 mL of the supernatant was withdrawn and dried in an oven at 70 °C overnight. After evaporation of the solvent, 1 mL of distilled water was added to the samples, homogenized, and filtered through 0.22 µm syringe filters. The xylose concentration was measured using a Breeze HPLC equipped with a refractive index (RID) detector and a Sugar Pak-I column (300 × 6.5 mm × 10 µm) maintained at 80°C. The mobile phase was composed of EDTA-Ca solution (50 mg/L) at a flow rate of 0.5 mL/min, with an injection volume of 20 µL and an run time of 20 min.

5.2.8 *Glycerides quantification*

The content of glycerides and FAEEs was analyzed using the methodology of (HOLČAPEK et al., 1999) adapted for reverse phase liquid chromatography. The liquid chromatography system was a Waters E2695 chromatograph (Waters Co., Milford, MA, USA) equipped with a UV detector (205 nm) (Photodiode Array Detector, Waters Co., Milford, MA, USA). The chromatographic separation was performed in an Ascentis Express C-18 column (10 cm x 46 mm x 2.7 μ m) at 40 °C. The injection volume and the flow rate used were 20 μ l and 1 mL/min, respectively. The mobile phase gradient was composed of mixtures of water (A) acetonitrile (B) and 2-propanol-hexane solution (C, 5:4 v/v). The 40 min ternary gradient used was: 30% A + 70% B in 0 min, 100% B in 10 min, 50% B + 50% C in 20 min until isocratic elution for the last 5 min.

5.2.9 *Quantification of ethyl esters by gas chromatography*

The yield of ethyl esters (FAEEs) (in wt.%) was determined by gas chromatography according to EN-14103, with modifications. An Agilent chromatograph (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used, equipped with a flame ionization detector (FID set at 250 °C) and a Rtx-Wax column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) at a temperature of 210 °C, with helium as carrier gas and methyl heptadecanoate as an internal standard. The samples were centrifuged at 9000 rpm for 10 min at 5 °C, the light phase was washed with hot distilled water and centrifuged (three times), and dried overnight in an oven at 60 °C. For quantification, 50 mg of sample were diluted in 1 mL of methyl heptadecanoate solution (10 mg/ml, in heptane) and 1 μ L was injected in the equipment.

5.2.10 Quantification of FFAs by gas chromatography

FFAs were quantified by gas chromatography according to methodology adapted from the Agilent Technologies Catalog (2011). A gas chromatograph (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used, equipped with a flame ionization detector (FID set at 250 °C), a split-splitless injector (250 °C, split ratio 40:1) and an Rtx-WAX column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA). The oven temperature was set at 120 °C for 1 min, heating to 250 °C at 10 °C/min, and 250 °C for 5 min. Helium was used as carrier gas (42 cm/s, 24 psi at 120 °C, 1.8 mL/min). The samples were dissolved in dichloromethane at a concentration of 0.016 g/mL, and the standards were prepared in five different concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g/L) to adjust the calibration curve.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 SODD hydrolysis reaction

Figure 2 shows the profiles of SODD hydrolysis using Eversa and PFL, at free forms, as biocatalysts. After 48 h hydrolysis, the reaction products using Eversa (a genetically-modified variant of *Thermomyces lanuginosus* lipase (NIELSEN et al., 2016) were composed of (in wt.%) 72.48 ± 2.91 FFAs, 8.02 ± 0.05 monoglycerides (MAGs), 7.12 ± 0.01 diglycerides (DAGs), 8.62 ± 0.03 triglycerides, 3.76 ± 0.01 esters, and 0.28 total tocopherols (0.09 ± 0.004 α -tocopherol, 0.12 ± 0.11 β -tocopherol, 0.04 ± 0.001 δ -tocopherol, and 0.03 ± 0.001 γ -tocopherol). Other works using *Thermomyces lanuginosus* lipase report 89% (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011) and 94% (VESCOVI et al., 2016) of hydrolysis conversions using soybean oil and waste cooking oil, respectively.

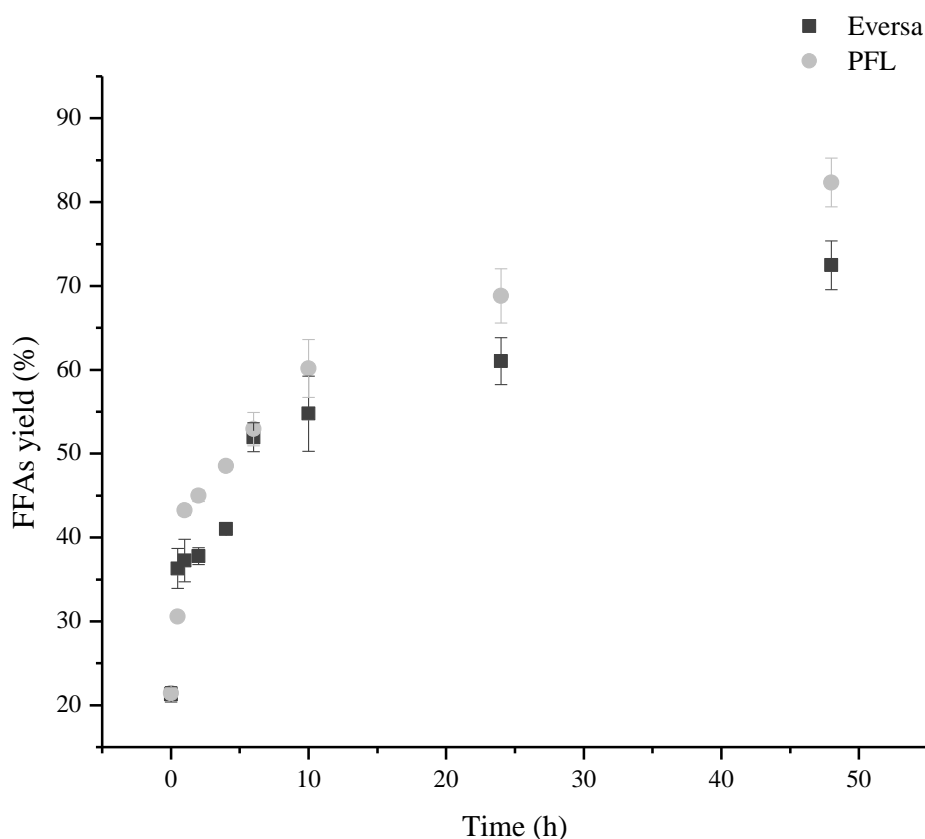


Fig. 2 Free fatty acid (FFA) yield profile (wt.%) vs. time for the hydrolysis of SODD by the enzymes Eversa Transform 2.0 and *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL). Reaction conditions: 48 h reaction; 37 °C; 4:1 mass ratio (H₂O:SODD) and 5% enzyme (m/ms_{SODD}).

With *Pseudomonas fluorescens* lipase (PLF), the hydrolysis product was composed of (in wt.%) 84.34 ± 2.71 FFAs, 8.09 ± 0.02 MAGs, 7.10 ± 0.01 DAGs, 0.74 ± 0.03 TAGs, 1.73 ± 0.01 esters., and 0.16 total tocopherols (0.04 ± 0.03 α -tocopherol, 0.09 ± 0.001 β -tocopherol, 0.01 ± 0.005 δ -tocopherol, and 0.02 ± 0.01 γ -tocopherol).

Eversa (as the *Thermomyces lanuginosus* lipase) is a 1,3-specific lipase (NIELSEN et al., 2016) that mainly releases acyl moieties linked to the *sn*-1 and *sn*-3 positions at the glycerol backbone, being the hydrolysis of TAGs to DAGs faster than the hydrolysis of MAGs (KAPOOR; GUPTA, 2012; PAQUES; MACEDO, 2006). On the other hand, PFL is a non-specific lipase that randomly cleaves acylglycerol molecules generating free fatty acids and glycerol, as well as mono and diglycerides (KAPOOR; GUPTA, 2012; PAQUES; MACEDO,

2006). Thus, the different regiospecificities of the lipases explains the best performance of PFL in the SODD hydrolysis. The hydrolysate produced by PFL was selected for further studies due to its higher content of FFAs.

5.3.2 Synthesis of FAEEs

The esterification/transesterification of FFAs-rich SODD (SODD hydrolyzed by PFL containing 84.34 wt.% FFAs) with ethanol catalyzed by liquid Eversa produced a product containing (in wt.%) 81.49 ± 0.04 FAEEs, 10.25 ± 0.35 FFAs, 2.38 ± 0.02 MAGs, 5.75 ± 0.01 DAGs, and 0.14 ± 0.03 TAGs. In relation to the saponifiable matter, the FAEEs mass yield reached 89.29%, showing the excellent performance of this enzyme for highly-acid raw materials (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017; ANDERSON et al., 2019; ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017b, 2017a, 2019; COPPINI et al., 2019; HE et al., 2017; MIBIELLI et al., 2019; MIRANDA et al., 2020; MONROE et al., 2020; NGUYEN et al., 2018; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016, 2018; WANCURA et al., 2018). Esterification/transesterification of FFAs-rich SODD (SODD hydrolyzed by Eversa, 72.48 wt.% FFAs) with ethanol catalyzed by liquid Eversa yielded a product containing (in wt.%) 80.02 ± 0.11 FAEEs, 8.07 ± 0.19 FFAs, 2.41 ± 0.09 MAGs, 7.64 ± 0.01 DAGs, and 1.86 ± 0.01 TAGs (Table 1).

Both products did not meet the conventional biodiesel's standards, but it could be used as an alternative biofuel with improved lubricity capacity mainly due its content of MAGs/DAGs (CALERO et al., 2020). However, product' FFAs content requires still to be reduced to around 0.25 wt.% to meet the international standards' biodiesel. It is reported that a caustic treatment can reduce the FFAs content very well (MIRANDA et al., 2020; NIELSEN et al., 2016). In our case, this caustic treatment could increase the FAEEs content to around 89 wt.% but maintaining the FFAs content still high (>9 wt.%, Table 1). Probably, an optimization

study of these treatment, mainly regarding to the mol ratio base/FFAs, could solved this problem.

Table 1. Mass balance of FAEEs production from hydrolyzed SODD, both steps catalyzed by liquid Eversa

FAEEs production (reaction step)						Caustic treatment		
Inputs			Outputs			Outputs		
Component	wt. %	Dry mass(g)	Component	wt. %	Dry mass(g)	Component	wt. %	Dry mass(g)
Hydrolyzed SODD		15.05	Crude FAEEs		8.06	Crude FAEEs		5.61
			Saponifiable:			Saponifiable:		
SI ^a	96.24	14.48	FAEEs	80.02±0.11	6.45	FAEEs	88.83±0.85	4.98
FFAs	72.48±2.91	10.88	FFAs	8.07±0.19	0.65	FFAs	9.16±0.001	0.51
Acyl-gly	23.76	3.57	Acyl-gly	11.91	0.96	Acyl-gly	1.82	0.10
Glycerol	N.d.		Glycerol	N.d.		Glycerol	0.73±0.08	
MAGs	8.02 ± 0.05		MAGs	2.41 ± 0.09		MAGs	1.09±0.07	
DAGs	7.12 ± 0.01		DAGs	7.64 ± 0.01		DAGs	N.d.	
TAGs	8.62 ± 0.03		TAGs	1.86 ± 0.01		TAGs	N.d.	
Total tocopherol	0.41	0.06	Total tocopherol	0.21	0.02	Total tocopherol	0.29	0.02
α-tocopherol	0.10 ± 0.003		α-tocopherol	0.01 ± 0.005		α-tocopherol	0.06 ± 0.05	
β-tocopherol	0.10 ± 0.08		β-tocopherol	0.07 ± 0.003		β-tocopherol	0.07 ± 0.004	
γ-tocopherol	0.06 ± 0.01		γ-tocopherol	0.03 ± 0.04		γ-tocopherol	0.04 ± 0.02	
δ-tocopherol	0.15 ± 0.02							
Others		0.54	Others			Others		
Total Mass		15.05			8.08			5.61
			Mass recovery		53.6%	Mass recovery		69.4%

SODD – soybean oil deodorizer distillate; FFAs – free fatty acids; FAEEs – fatty acid ethyl esters; SI – saponification index; total tocopherol – sum of α-, β-, γ-, δ-tocopherol. SODD-SP – SODD saponifiable phase; Others – other compounds (phytoeterols. scalene. etc.) not measured; Acyl-gly – sum of monoglycerides. diglycerides. triglycerides and free glycerol. Reactions conditions: 24 h reaction; 35 °C; ethanol:SODD-SP molar ratio of 3.64:1, 8.36 wt.% enzyme, and 6.74 g of molecular sieves (only for FAEEs production from hydrolyzed SODD).

^a Values indirectly calculated as (FFAs+total acylglycerides, determined by gas chromatography).

The biofuel also contains tocopherols, a total of 0.22 wt.% (0.08 ± 0.07, 0.08 ± 0.01, 0.04 ± 0.01 and 0.02 ± 0.02 of α-, β-, δ- and γ-tocopherol, respectively) and 0.21-0.29 wt.% (Table 1) for PFL-hydrolyzed SODD and Eversa-hydrolyzed-SODD as starting feedstock, respectively. The antioxidant activity of tocopherols (SAINI; KEUM, 2016) could be

advantageous for biodiesels mainly produced from polyunsaturated fatty materials, which are prone to oxidation .

5.3.3 Synthesis of xylose esters

Figure 3 shows higher xylose conversion after 24 h reaction using PFL as biocatalyst (89.20%), followed by TLL (80.20%) and by CALB (51.80%). Lima et al. (2017) and Abdulmalek; Hamidon e Rahman, (2016) reported similar values for immobilized CALB, ranging from 50 – 57% at 46 °C using tert-butyl alcohol as solvent, and 64% at 60 °C using dimethylsulfoxide as solvent, respectively. Bidjou-Haiour e Klai (2013) and Gonçalves et al., (2021) used methyl ethyl ketone as solvent and obtained 67% and 98% of xylose conversions using immobilized CALB, respectively. Table 2 shows that the most explored lipases in the synthesis of xylose fatty esters are CALB (ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016; BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; GONÇALVES et al., 2021b; MÉLINE et al., 2018; SIEBENHALLER et al., 2017, 2018), *Candida cylindracea* lipase (BOUZAOUIT; BIDJOU-HAIOUR, 2015) and *Porcine pancreas* lipase (BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017), being TLL and PLF sparsely used for this type of reaction. Besides, commercial FFAs are conventionally used in the xylose ester synthesis, being the SODD not yet reported for this purpose. Thus, our results shows that TLL/PFL and SODD have great potential of application in the synthesis of biosurfactants (xylose esters). However, an economic analysis is needed to show the economic viability of the process using these reaction systems (xylose-SODD-PFL and xylose-SODD-TLL).

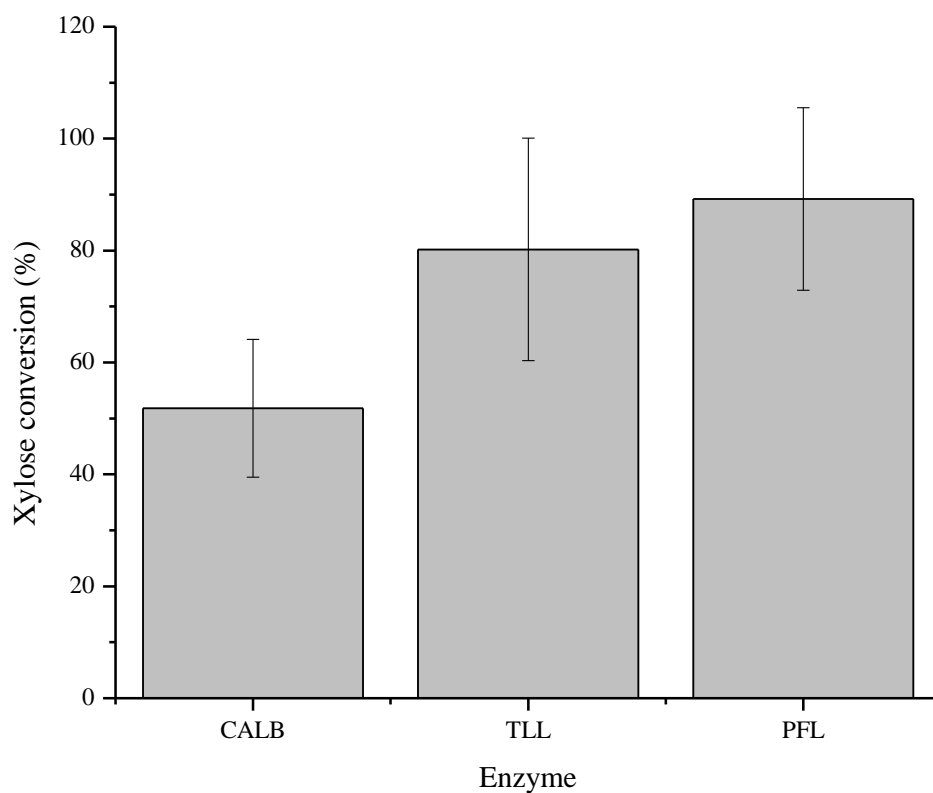


Fig. 3 Xylose conversion in the xylose ester synthesis for the esterification of FFA-rich SODD (0.42 g) by immobilized lipases in methyl-ethyl-ketone solvent (60 mL). Reaction conditions: 24 h, 60 °C, 200 rpm, 7 mM xylose, 0.5% (m/m_{SODD}) enzyme concentration, and 11.44 g of molecular sieve.

Table 2. Studies of fatty acid xylose esters using immobilized lipases.

Acyl Donor	Solvent	Reaction Conditions	Biocatalyst	Conversion (%)	Reference
Lauric acid Stearic acid Lauric acid	Methyl ethyl ketone	60 °C – 72h	PPL – Celite ^a PPL – Celite ^a Novozym 435 ^b	63.0 31.0 67.0	(BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013)
Lauric acid	Tetrahydrofuran	60 °C – 72h	CCL - Celite ^c	85.0	(BOUZAOUT; BIDJOU-HAIOUR, 2015)
Caproic acid	Dimethylsulfoxide	60 °C – 24h	Novozym 435 ^b	64.0	(ABDULMALEK; HAMIDON; RAHMAN, 2016)
Oleic acid Oleic acid Oleic acid Lauric acid Lauric acid Lauric acid Oleic acid Oleic acid Oleic acid Lauric acid Lauric acid Lauric acid	Tert butyl alcohol	46-55°C – 48h	CALB-IM ^d CALB-SMMP-Octil ^e CALB-SMMP-Octil-Glu ^f CALB-IM ^d CALB-SMMP-Octil ^e CALB-SMMP-Octil-Glu ^f CALB-IM ^d CALB-SMMP-Octil ^e CALB-SMMP-Octil-Glu ^f CALB-IM ^d CALB-SMMP-Octil ^e CALB-SMMP-Octil-Glu ^f	52.0 (46°C) 50.0 (46°C) 57.0 (46°C) 54.0 (46°C) 50.0 (46°C) 50.0 (46°C) 65.0 (55°C) 61.0 (55°C) 69.0 (55°C) 65.0 (55°C) 66.0 (55°C) 66.0 (55°C)	(LIMA <i>et al.</i> , 2017)
Caprylic acid Oleic acid Butyric acid	Tert butyl alcohol Tert pentyl alcohol	60 °C – 24h	PPL-OS ^g	70	(VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017)
Fatty acids from lignocellulosic biomass	Deep eutectic solvent (DES)	50 °C – 72h	Novozym 435 ^b	----	(SIEBENHALLER <i>et al.</i> , 2017)

End Table 2

Vinyl laurate	-----	50 °C - 4 h	Novozym 435 ^b	74.8	(MÉLINE <i>et al.</i> , 2018)
Fatty acids from lignocellulosic biomass	Deep eutectic solvent (DES)	50 °C – 70h	iCALB ^b	----	(SIEBENHALLER <i>et al.</i> , 2018)
Oleic acid	Methyl-ethyl-ketone	60°C – 24h	Lipozyme 435 ^h	98	(GONÇALVES <i>et al.</i> , 2021b)
Soybean oil deodorizer distillate (SODD)	Methyl-ethyl-ketone	60°C – 24h	CALB	51.80	(This work)
			TLL	80.20	
			PFL	89.20	

^aPorcine pancreas lipase (PPL) immobilized on Celite

^bLipase B from *Candida antarctica* immobilized on a hydrophobic support (acrylic resin)

^cLipase from *Candida cylindracea* (CCL) immobilized on Celite

^dLipase B from *Candida antarctica* immobilized on Immobeads (CALB IM – T2-350)

^eLipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic silica microparticles (SMMP) functionalized with octyl groups

^fLipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic silica microparticles (SMMP) heterofunctionalized with octyl and glutaraldehyde groups

^gPorcine pancreas lipase (PPL) immobilized on silica functionalized with octyl groups

^hLipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic support (acrylic resin)

Figure 4 shows five fatty acids in the SODD composition and in turn in the biosurfactant (palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids). For PFL-catalyzed synthesis the conversion of total fatty acids was 44.08% (8.82 % \pm 1.65 palmitic acid, 8.5% \pm 0.37 stearic acid, 9.03 % \pm 1.73 oleic acid, 10.73 % \pm 1.31 linoleic acid, and 7.00 \pm 0.50 linolenic acid). In turn, for TLL the conversion of total fatty acids was 50.49% (11.21% \pm 2.87 palmitic acid, 9.89 % \pm 2.22 stearic acid, 10.18 % \pm 2.06 oleic acid, 11.6% \pm 1.40 linoleic acid, and 7.61 % \pm 0.63 linolenic acid). And for CALB 60.09% (12.94% \pm 1.17 palmitic acid, 21.77 % \pm 4.76 stearic acid, 6.99 % \pm 4.92 oleic acid, 10.57% \pm 1.01 linoleic acid, and 12.63 % \pm 4.23 linolenic acid).

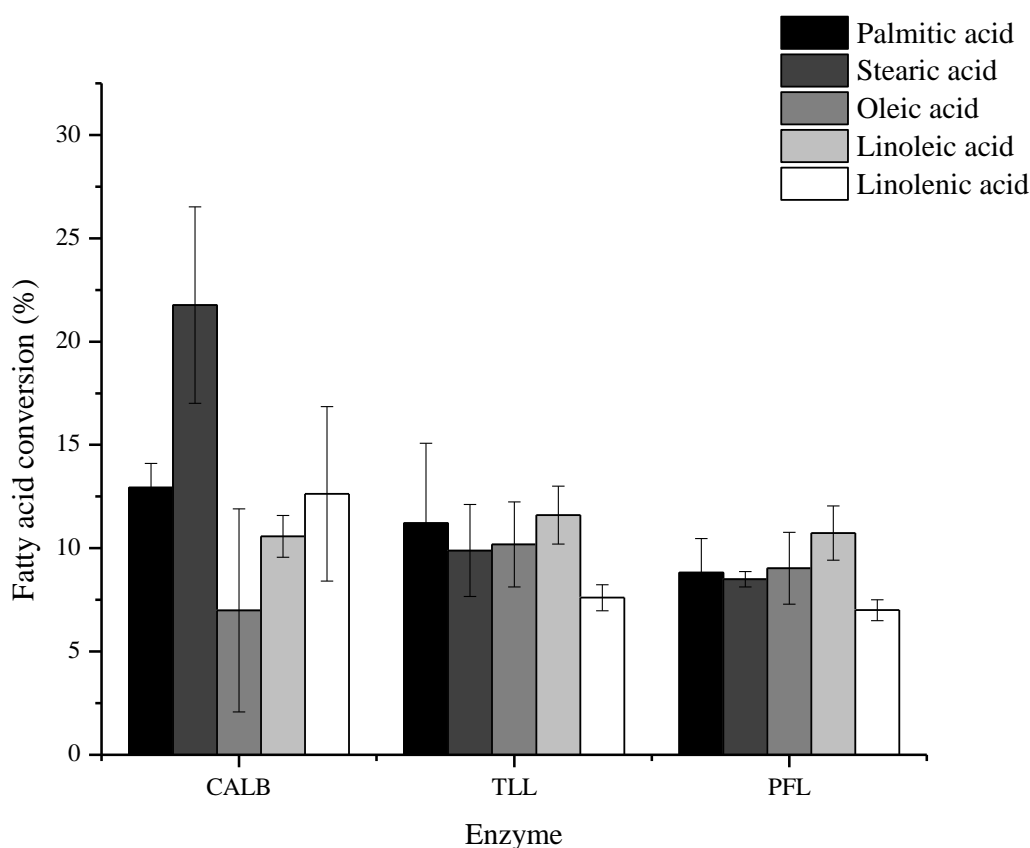


Fig. 4 Free fatty acid conversion (% by weight) in the xylose ester synthesis for the esterification of FFA-rich SODD by immobilized lipase (0.42 g) in methyl-ethyl-ketone solvent (60 mL). Reaction conditions: 24 h reaction, 60 °C, 200 rpm, 7 mM xylose, 0.5% (m/m_{SODD}) enzyme concentration, and 11.44 g of molecular sieve.

Whether only xylose monoesters are produced, the maximum fatty acid conversions would be 17.84%, 16.04% and 10.36% using PFL, TLL and CALB, respectively. However, for all enzymes the total conversions were higher than 40%, suggesting the formation of a mixture of mono-, di- and triesters of xylose. Gonçalves et al. (2021) also reported the formation of mixtures of esters using immobilized CALB (Lipozyme 435) in the synthesis of xylose oleate in methyl ethyl ketone.

The products (biosurfactants) produced also contained tocopherols in their compositions (total of 0.27 wt.%, 0.84 wt.% and 0.96 wt.% for PFL, TLL and CALB-catalyzed syntheses, respectively) (Table 3) that could be advantageous for applications in food, pharmaceutical and cosmetic purposes due to the tocopherols' antioxidant activities (SAINI; KEUM, 2016), besides the fact that the products are rich in health-benefit polyunsaturated fatty moieties, as showed above.

Table 23. Tocopherol composition of the xylose esters mixture formed

Composition in wt.% for synthesis catalyzed by:			
Tocopherol	PFL	TLL	CALB
α	0.01 ± 0.001	0.14 ± 0.07	0.17 ± 0.03
β	0.19 ± 0.003	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
γ	0.05 ± 0.01	0.30 ± 0.05	0.26 ± 0.01
δ	0.02 ± 0.004	0.35 ± 0.06	0.49 ± 0.07
Total	0.27	0.84	0.96

Specially, xylose fatty esters are relevant compounds for use in cosmetics and pharmaceuticals, especially those with dermatological functions (DUMAS; BONTE, 2002). The tocopherols and phytosterols present in the product add antioxidant activity (SAINI; KEUM, 2016) to the xylose fatty esters produced. In this way, there is an improvement in its composition for a possible cosmetic sector application, since phytosterols and tocopherols are already applied in eye creams, for example (DUMONT; NARINE, 2007a). Furthermore, the production of esters through the enzymatic route results in greater product purity (better

colorless and odorless) than those produced by chemical route, which can satisfy a wider range of applications in the cosmetics and food sectors (KHAN; RATHOD, 2015).

5.3.4. *Emulsion Capacity Assays*

The xylose esters synthesized by the enzymes CALB, TLL and PFL, presented the following emulsification capacities $12.00\% \pm 2.67$, $6.67\% \pm 1.78$, and $4.00\% \pm 0$, respectively. The tests showed lower emulsion capacities compared to the commercial sugar ester (sucrose monolaurate), 10% (GONÇALVES et al., 2021), for TLL and PFL, and higher for the ester synthesized by CALB. The reaction catalyzed by CALB most likely produced a greater amount of monoesters compared to others, since esterification reactions that preferentially produce carbohydrate monoesters instead of an esters mixture tend to have greater emulsifying capacities (AI; XIAO; JIANG, 2021; GONÇALVES et al., 2021b). It is also observed that the source of fatty acids used for synthesis of ester, hydrolyzed SODD, already has a high emulsification capacity, $14.58\% \pm 3.61$, while no emulsion formation was observed for crude SODD.

Gonçalves et al., (2021) obtained similar results, 6.25%, with the xylose oleate production, and they reported that the product contained more than one fatty acid residue, which resulted in an increase in product hydrophobicity, directly impacting the emulsifying capacity, which may eventually reduce (EL-LAITHY; SHOUKRY; MAHRAN, 2011), what is observed considering the values of hydrolysate emulsification capacity used as a fatty acids source and the final products, the xylose esters. The hydrophobicity reduction means that the protein is more likely to form hydrogen bonds with water molecules in the aqueous environment, resulting in conformational elongation, so structural flexibility is positively correlated with emulsification capacity (AI; XIAO; JIANG, 2021; LI et al., 2019). However, the addition of D-xylose improves the emulsification capacity, as noted by Ai; Xiao; Jiang, (2021), and this was

confirmed in this work. Was observed in the reaction blank, which did not contain enzyme, emulsification capacity value of $18.67 \% \pm 3.56$.

5.4 CONCLUSION

SODD showed to be an interesting raw material to produce valuable compounds, such as fatty acid ethyl and xylose esters. Under the evaluate conditions, the ethyl ester mass yield reached 81.49 wt.% using a liquid lipase specially formulated for using in biodiesel production from acid feedstocks. The non-conventional biofuel synthetized was also composed of monoglycerides and tocopherols/phytosterols, which could contribute to better biofuel properties, such as lubricity and oxidative stability, respectively. SODD also showed a promising feedstock to produce non-ionic biosurfactants, in this work xylose fatty esters. Under the adopted conditions, a xylose and fatty acid conversions of 89.2% and >40% were reached using immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase, respectively, indicating the formation of a mixture of esters with good emulsion capacity. The synthesized product may be applied for food, cosmetic and pharmaceuticals purposes because of its tocopherols' content (antioxidant compounds).

FUNDING

This work was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant number 2016/10636-8]; in part by “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) [Finance Code 001]; “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) [grant number 315092/2020-3]; “Ministerio de Ciencia e Innovación” (Spanish Government) [grant number CTQ2017-86170-R]; and “Consejo Superior de Investigaciones Científicas” (CSIC) [grant number AEP045].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank COCAMAR (Maringá, PR, Brazil) for providing the soybean oil deodorizer distillate (SODD).

REFERENCES

- ABDULMALEK, E.; HAMIDON, N. F.; RAHMAN, M. B. A. Optimization and characterization of lipase catalysed synthesis of xylose caproate ester in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 1–4, 2016.
- ADEWALE, P.; VITHANAGE, L. N.; CHRISTOPHER, L. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, v. 154, p. 81–91, 15 dez. 2017.
- AGILENTE TECHNOLOGIES. **The Essential Chromatography and Spectroscopy Catalog**. 2011–2012. ed. Canadá: [s.n.].
- AI, M.; XIAO, N.; JIANG, A. Molecular structural modification of duck egg white protein conjugates with monosaccharides for improving emulsifying capacity. **Food Hydrocolloids**, v. 111, p. 106271, 1 fev. 2021.
- ANDERSON, S. et al. Evaluation of Dominant Parameters in Lipase Transesterification of Cottonseed Oil. **Transactions of the ASABE**, v. 62, n. 2, p. 467–474, 2019.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Transesterification of Castor Oil Catalyzed by Liquid Enzymes: Optimization of Reaction Conditions. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 40, p. 2863–2868, 2017a.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Castor oil transesterification catalysed by liquid enzymes: Feasibility of reuse under various reaction conditions. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 913–918, 2017b.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Investigation of the use of ceramic membranes in recovering liquid enzymes for castor oil transesterification. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 769–774, 2019.
- AOCS CA 5A-40. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.
- AOCS CE 8-89. **AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5. ed. Champaign, USA: AOCS, 2004.
- BIDJOU-HAIOUR, C.; KLAI, N. Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 4347–4350, 2013.
- BOUZAOUIT, N.; BIDJOU-HAIOUR, C. Optimization of lipase catalyzed synthesis of fatty

acid xylose ester using statistical experimental designs. **Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 1, p. 261–269, 2015.

CALERO, J. et al. Optimization by response surface methodology of the reaction conditions in 1,3-selective transesterification of sunflower oil, by using CaO as heterogeneous catalyst. **Molecular Catalysis**, v. 484, p. 110804, 1 mar. 2020.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, 1999.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. A. et al. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

CAVALCANTI, R. M. F. et al. Screening, Production and Characterization of Biosurfactants from Caatinga's Filamentous Fungi. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 6, p. 23–28, 2017.

COPPINI, M. et al. Production of methyl esters by enzymatic hydroesterification of chicken fat industrial residue. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 923–928, 2019.

DUMAS, M.; BONTE, F. **Uses of d-xylose, the esters thereof and oligosaccharides containing xylose for improving the functionality of epidermal cells** US Pat 6,495,147 B1, 2002.

DUMONT, M.-J.; NARINE, S. S. Characterization of Flax and Soybean Soapstocks, and Soybean Deodorizer Distillate by GC-FID. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 12, p. 1101–1105, 2007.

DUVEKOT, C. **Determination of total FAME and linolenic acid methyl esters in biodiesel according to EN-14103**. Disponível em:

<<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8983EN.pdf>>.

EL-LAITHY, H. M.; SHOUKRY, O.; MAHRAN, L. G. Novel sugar esters proniosomes for transdermal delivery of vinpocetine: preclinical and clinical studies. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 77, n. 1, p. 43–55, jan. 2011.

ENAYATI, M. et al. Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. **Food Chemistry**, 2018.

FERRER, M. et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from

Thermomyces lanuginosus and Candida antarctica B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 391–398, 2005.

GHOSH, B.; JONES, A. D. Profiling, characterization, and analysis of natural and synthetic acylsugars (sugar esters). **Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 892–905, 2017.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Lipozyme 435-Mediated Synthesis of Xylose Oleate in Methyl Ethyl Ketone. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **3317**, v. 26, n. 11, p. 3317, 1 jun. 2021.

GUNAWAN, S.; JU, Y. H. Vegetable oil deodorizer distillate: Characterization, utilization and analysis. **Separation and Purification Reviews**, v. 38, n. 3, p. 207–241, jul. 2009.

HE, Y. et al. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445–456, 1 jan. 2017.

HIDAYAT, C. et al. Enzymatic Synthesis of Bio-Surfactant Fructose Oleic Ester Using Immobilized Lipase on Modified Hydrophobic Matrix in Fluidized Bed Reactor. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 2016.

HOLČAPEK, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, 1999.

INPRAKHON, P. et al. Lipase-catalyzed synthesis of sucrose monoester: Increased productivity by combining enzyme pretreatment and non-aqueous biphasic medium. **Journal of Biotechnology**, 2017.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793–1806, 2015.

LI, R. et al. Relationship between surface functional properties and flexibility of soy protein isolate-glucose conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 349–357, 1 out. 2019.

LIMA, L. N. DE et al. Mono- and heterofunctionalized silica magnetic microparticles (SMMPs) as new carriers for immobilization of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 491–499, 2017.

LIMA, L. N. et al. Performance of Different Immobilized Lipases in the Syntheses of Short- and Long-Chain Carboxylic Acid Esters by Esterification Reactions in Organic Media. **Molecules**, v. 23, p. 766, 2018.

MAI, N. L. et al. Ionic liquids as novel solvents for the synthesis of sugar fatty acid ester.

- Biotechnology Journal**, v. 9, n. 12, p. 1565–1572, 2014.
- MANIET, G.; JACQUET, N.; RICHEL, A. Recovery of sterols from vegetable oil distillate by enzymatic and non-enzymatic processes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 22, n. 4, p. 347–353, 2019.
- MÉLINE, T. et al. d-Xylose and l-arabinose laurate esters: Enzymatic synthesis, characterization and physico-chemical properties. **Enzyme and microbial technology**, v. 112, p. 14–21, 2018.
- MIBIELLI, G. M. et al. Lab and pilot plant FAME production through enzyme-catalyzed reaction of low-cost feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 150–156, 2019.
- MIRANDA, L. P. et al. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa® Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 817, 2020.
- MONROE, E. et al. Superior performance biodiesel from biomass-derived fusel alcohols and low grade oils: Fatty acid fusel esters (FAFE). **Fuel**, v. 268, p. 117408, 2020.
- NETA, N. A. S. et al. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 27, p. 324–331, 2012.
- NGUYEN, H. et al. Liquid Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid with Methanol for Biodiesel Production in the Presence of Superabsorbent Polymer: Optimization by Using Response Surface Methodology. **Energies**, v. 11, n. 5, p. 1085, 2018.
- NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 905–910, 2016.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, fev. 2006.
- PERINELLI, D. R. et al. Lactose oleate as new biocompatible surfactant for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2018.
- REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa ® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 254–262, 2016.
- REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 2018.
- REN, K.; LAMSAL, B. P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. **Food Chemistry**, v. 214, p. 556–563, 2017.
- SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A

review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. **Food Research International**, v. 82, p. 59–70, 2016.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 18 mar. 2016.

SHERAZI, T. H. S.; MAHESAR, A. S. Vegetable Oil Deodorizer Distillate: A Rich Source of the Natural Bioactive Components. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 12, p. 957–966, 2016.

SIEBENHALLER, S. et al. Beechwood carbohydrates for enzymatic synthesis of sustainable glycolipids. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.

SIEBENHALLER, S. et al. Integrated Process for the Enzymatic Production of Fatty Acid Sugar Esters Completely Based on Lignocellulosic Substrates. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 421, 2018.

SOMASHEKAR, B. R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of l-alanyl esters of carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007.

VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2016.

VESCOVI, V. et al. Immobilized Lipases on Functionalized Silica Particles as Potential Biocatalysts for the Synthesis of Fructose Oleate in an Organic Solvent/Water System. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–16, 2017.

VESCOVI, V.; SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

VISIOLI, L. J. et al. Production of esters from soybean oil deodorizer distillate in pressurized ethanol. **Fuel Processing Technology**, v. 149, p. 326–331, 1 ago. 2016.

WANCURA, J. H. C. et al. Production of biodiesel catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 11, p. 2361–2368, 2018.

WOUDENBERG-VAN OOSTEROM, M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 3, p. 328–333, 1996.

YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate using calcined duck eggshell as catalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 112, p. 199–207, 2016.

ZENG, L. et al. Preparation of Biodiesel with Liquid Synergetic Lipases from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 778–791, 2017.

ZHANG, X.; YU, J.; ZENG, A. Optimization and modeling for the synthesis of sterol esters from deodorizer distillate by lipase-catalyzed esterification. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 270–278, 2017.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES

O destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS), um subproduto do refino do óleo de soja, mostrou-se uma matéria-prima promissora na produção de ésteres etílicos e ésteres de xilose. A busca na literatura científica mostrou uma escassez de pesquisas utilizando DDOS na produção dessas biomoléculas. Na produção de ésteres etílicos, sob as melhores condições de reação estabelecidas por um planejamento estatístico (35 ° C, carga de enzima de 8,36%, razão molar de 3,64: 1 etanol: DDOS), tempo de reação de 23 h, Eversa líquida como catalisador e tratamento cáustico do produto para reduzir o conteúdo de ácidos graxos livres (AGLs), o rendimento em ésteres atingiu 82,4% (base mássica), que corresponde a 90,3% da matéria saponificável do DDOS.

Em uma outra abordagem para obtenção dos ésteres etílicos utilizou-se matéria rica em AGLs obtida após a hidrólise do DDOS usando duas lipases livres (Eversa e lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL)). Nesse estudo, observou-se que a etapa de hidrólise rendeu materiais saponificáveis com 72,5 e 84,4% (base mássica) de AGLs após 48 h de reação usando Eversa e PFL, respectivamente. E quando esse material foi aplicado na reação de esterificação/transesterificação com etanol rendeu um produto com 81,5% em massa de ésteres, 8,3% em massa de glicerídeos não convertidos e 10,2% em massa de AGLs. Este produto poderia ser usado como combustível após uma etapa de purificação para remover AGLs. Ambos os biocombustíveis não convencionais sintetizados continham também monoglicerídeos e tocoferóis/fitoesteróis, que podem, provavelmente, contribuir para melhorar a lubricidade e a estabilidade oxidativa, respectivamente, do biocombustível.

O hidrolisado do DDOS, rico em AGLs, também foi aplicado na síntese de ésteres de xilose por reação de esterificação catalisada por lipases imobilizadas de *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida antarctica* (CALB). Nas condições adotadas (60°C, 24 h de reação, razão mássica SODD:xilose de 5:1, etil-metil-cetona como solvente e peneira molecular), foram obtidas conversões de xilose de até 89,2% (com PFL). O comportamento do consumo de xilose e AGLs sugeriu a produção de uma mistura de mono-, di- e triésteres, contendo principalmente frações alquílicas insaturadas ligadas à xilose. A mistura de ésteres de xilose apresentou boa capacidade de emulsificação (EC de até 12%) e a presença de tocoferóis (biomoléculas com atividade antioxidante) em sua composição, sendo, portanto, um material com potencial aplicação como biossurfactante para fins alimentícios, cosméticos e farmacêuticos.

6.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas etapas experimentais realizadas e nos resultados obtidos, verifica-se que ainda há lacunas a serem preenchidas e espaço para explorar o tema. Assim, sugere-se os seguintes estudos para trabalhos futuros:

- Avaliação técnico-econômica e ambiental da produção enzimática de ésteres etílicos a partir de DDOS e usando a lipase líquida Eversa;
- Avaliação do desempenho de outras enzimas comerciais de menores custos para síntese de éster de xilose.
- Purificação/separação dos ésteres de xilose produzidos a partir de ácidos graxos livres do DDOS por técnicas de separação líquido-líquido e/ou destilação a vácuo.
- Avaliação de um sistema livre de solventes e/ou solventes ecológicos na produção do éster de xilose.
- Avaliação do uso de xilose obtida através da extração e hidrólise de xilana do bagaço de cana para aplicação na síntese de ésteres de açúcar.
- Avaliação da viabilidade econômica do processo de obtenção da xilose a partir do processo de extração e hidrólise de xilana do bagaço de cana para aplicação na síntese de ésteres de açúcar.