

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Redução de acidez de gorduras provenientes da transformação de subprodutos avícolas

Dissertação de Mestrado

de

Isabel Maria Trovisco

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em
Savinor UTS



Orientador na FEUP: Doutora Teresa Margarida Correia de Poço Mata

Doutora Nídia de Sá Caetano

Orientador na Savinor UTS: Doutora Elisabete Alexandra Dias de Matos



Departamento de Engenharia Química

Fevereiro de 2016

Agradecimentos

Começo por agradecer à empresa Savinor UTS, por me ter concedido a possibilidade de realização da dissertação em ambiente empresarial.

Da Savinor UTS, à Doutora Elisabete Matos, agradeço a simpatia com que me recebeu nas instalações da Savinor UTS, o conhecimento e experiência transmitidos da empresa e do processo de obtenção das gorduras estudadas e a disponibilidade demonstrada.

Agradeço à orientadora, Doutora Teresa Mata pela excelente orientação, por todos os conhecimentos transmitidos e pelos conselhos nas diversas fases do meu trabalho. Obrigada pela sua simpatia e por todo o apoio prestado nas diferentes etapas da minha dissertação.

Agradeço também à coorientadora, Doutora Nídia Caetano por me ter acolhido num espaço que nunca deixou de ser também meu. Obrigada pela sua disponibilidade imediata para esclarecer todas as dúvidas que foram surgindo ao longo do meu trabalho, pela sua simpatia e pelo seu incentivo.

À minha colega, Ana Gabriel, agradeço toda a ajuda prestada. Obrigada pela tua boa disposição e por todos os momentos de partilha.

E, por último, mas não menos importantes, agradeço à minha família, ao meu namorado e aos meus amigos, por todo o apoio que me deram ao longo desta etapa da minha vida e por me darem alento e força neste meu propósito.

Resumo

A indústria de transformação de subprodutos produz gordura, a partir de subprodutos resultantes do abate de aves, que é utilizada em alimentos para aquicultura, pecuária, avicultura e animais domésticos. Uma medida da qualidade da gordura é o seu teor de ácidos gordos livres (AGL). Níveis elevados de AGL reduzem o teor de energia e digestibilidade das gorduras. A presença de AGL indica que a gordura foi exposta a água, a ácidos e/ou a enzimas que hidrolisam os triglicéridos. O nível de acidez depende do tempo e temperatura de processamento e também, da temperatura e duração do armazenamento dos subprodutos avícolas. Assim, é crítico para a indústria de transformação de subprodutos a obtenção de gordura com acidez reduzida e para tal são necessárias etapas de processo bem projetadas. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a redução da acidez de gordura de aves por esterificação enzimática com etanol, para conversão dos AGL em ésteres etílicos.

Foram recolhidas amostras de gordura de aves na empresa Savinor UTS, as quais foram caracterizadas quanto ao seu índice de acidez ($3,3-6,3 \text{ mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{gordura}}$), índice de iodo ($73-109 \text{ g}_{\text{iodo}}/100\text{g}_{\text{gordura}}$), viscosidade cinemática ($36,67-39,87 \text{ mm}^2/\text{s}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$), densidade ($0,918-0,924 \text{ g}/\text{cm}^3$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$) e teor de humidade ($0,2-0,4 \text{ m}\%$). Para a esterificação foram testadas quatro enzimas como catalisador (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme CALB L, Palatase 20000 L, todas da Novozymes) e seleccionada aquela para a qual foi maior a redução da acidez (Novozyme 435, uma lipase CALB imobilizada num transportador hidrofóbico ou resina acrílica). Foram estudadas diferentes condições operacionais: temperatura de reacção ($35, 45$ e $55 \text{ }^\circ\text{C}$), tempo de reacção (desde 0 até 5 h), razão enzima:gordura ($0,012$ e $0,024 \text{ m}/\text{m}$) e razão etanol:AGL ($1,5; 1,6$ e $3,1 \text{ m}/\text{m}$). Nas melhores condições de operação (2 h de tempo de reacção, temperatura entre 45 e $55 \text{ }^\circ\text{C}$, razão enzima:gordura de $0,024 \text{ m}/\text{m}$ e razão etanol:AGL de $1,6 \text{ m}/\text{m}$) os resultados mostram uma redução mínima de 57% de AGL apenas com um único passo reacional.

Concluiu-se que a esterificação enzimática é um método eficaz para a redução da acidez da gordura de aves, porque é menos sensível à presença de água na gordura do que a esterificação química e são usadas temperaturas mais baixas ($<60 \text{ }^\circ\text{C}$) o que permite preservar as propriedades nutricionais da gordura e reduzir os custos do processo. Além disso, uma vez que a Novozyme 435 é uma enzima imobilizada numa matriz sólida, sem perda significativa da actividade.

Palavras-chave: Acidez, esterificação enzimática, gordura de aves.

Abstract

The poultry rendering industry produces fat, from slaughter by-products, which are incorporated as ingredients in feeds for aquaculture, livestock, poultry and pet food. One measure of the fat quality is its free fatty acid (FFA) content as it is shown that increased levels of FFAs reduce the digestibility and energy content of fats. The presence of FFAs indicates that the fat was exposed to water, acids, and enzymes that hydrolyze triglycerides. The level of acidity depends on the rendering time and temperature and also on the temperature and duration of storage of the by-products. Thus, it is critical for the poultry rendering industry to obtain a fat with reduced acidity, for which well-designed process steps are required. Hence, this work aimed to study the reduction of acidity in poultry fat through enzymatic esterification with ethanol to convert FFA to ethyl-esters.

Poultry fat samples were collected in Savinor UTS and characterized for their acid value ($3.3\text{-}6.3 \text{ mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{fat}}$), iodine value ($73\text{-}109 \text{ g}_{\text{iodine}}/100\text{g}_{\text{fat}}$), kinematic viscosity ($3.67\text{-}39.87 \text{ mm}^2/\text{s}$ at 40°C), density ($0.918\text{-}0.924 \text{ g}/\text{cm}^3$ at 15°C) and moisture content ($0.2\text{-}0.4 \text{ wt}\%$). For the FFA esterification four enzymes were tested as catalyst (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme CALB L, Palatase 20000 L, all from Novozymes) and selected the one with the largest acid value reduction (Novozym® 435, a CALB lipase immobilized on a hydrophobic carrier or acrylic resin). Different operating conditions were studied: reaction temperature ($35, 45$ and 55°C) and time (from 0 to 5 h), enzyme/fat ratio (0.012 and $0.024 \text{ wt}/\text{wt}$) and ethanol/FFA ratio ($1.5; 1.6$ and $3.1 \text{ wt}/\text{wt}$). Results showed that at the best operating conditions (2 h of reaction time, temperature between 45 and 55°C , enzyme/fat mass ratio of 0.024 and ethanol/FFA mass ratio of 1.6) a 57 % minimum reduction of FFA is achieved in just one reaction step.

It is concluded that the enzymatic esterification is an effective method for the poultry fat acidity reduction because it is less sensitive to the presence of moisture in the fat than the chemically catalyzed reaction and the milder temperatures used ($<60^\circ\text{C}$) allow for the preservation of the fat nutritional properties with reduced energy input and cost. Furthermore, since the Novozym 435 is an immobilized enzyme, without significant activity loss.

Key words: Acidity, enzymatic esterification, poultry fat.

Declaração

Isabel Maria Trovisco declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Isabel Maria Trovisco

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento do tema	1
1.1.1	Características físico-químicas das gorduras e dos óleos	1
1.1.2	Gorduras de origem animal.....	1
1.1.3	Produção e consumo mundial e nacional de carne de aves	2
1.1.4	Valorização de subprodutos de origem animal	5
1.1.5	Oxidação das gorduras e dos óleos	7
1.2	Estado da Arte	10
1.2.1	Esterificação ácida	10
1.2.2	Esterificação enzimática.....	11
1.2.3	Fatores que influenciam a reacção de esterificação	13
1.3	Descrição do processo de produção de gorduras e farinhas de aves da Savinor UTS	15
1.4	Contributos do trabalho para o estado da arte	18
2.	Materiais e métodos	19
2.1	Caraterização da gordura	19
2.1.1	Determinação do índice de acidez	20
2.1.2	Determinação do índice de iodo.....	21
2.1.3	Determinação da viscosidade cinemática	22
2.1.4	Determinação da massa volúmica	23
2.1.5	Determinação do teor de água	23
2.2	Esterificação química	24
2.3	Esterificação enzimática	26
2.3.1	Escolha do catalisador enzimático	26
2.3.2	Variação dos parâmetros de reacção.....	27

2.4	Modelo cinético	29
2.4.1	Cinética de 1ª ordem	29
2.4.2	Cinética de 2ª ordem	29
2.4.3	Energia de ativação.....	30
3.	Resultados e discussão	31
3.1	Caraterização da gordura	31
3.2	Esterificação química	32
3.3	Esterificação enzimática	33
3.3.1	Escolha do catalisador enzimático	33
3.3.2	Efeito da temperatura	35
3.3.3	Efeito da razão mássica álcool:AGL.....	36
3.3.4	Efeito da razão mássica enzima:gordura	37
3.3.5	Efeito do tempo de reação	38
3.3.6	Efeito do tipo de álcool	38
3.3.7	Ensaio nas melhores condições	39
3.4	Validação do modelo cinético	41
3.5	Determinação da energia de ativação da reação	42
4.	Conclusões	45
5.	Referências bibliográficas	47
Anexo 1	50
Anexo 2	57
Anexo 3	66

Notação e Glossário

R	Cadeia carbónica hidrofóbica do ácido gordo
R_1	Cadeia carbónica hidrofóbica do álcool
M_{KOH}	Massa molar de hidróxido de potássio
V	Volume
C	Concentração
m	Massa
WI	Índice de iodo
M_I	Massa molar de iodo
V_t	Volume do picnómetro
t	Tempo
G	Fator de correlação do viscosímetro
$K_{40^\circ\text{C}}$	Constante do viscosímetro à temperatura de 40 °C
W	Teor de água
C_A	Concentração do reagente A
C_B	Concentração do reagente B
X_A	Conversão do reagente A
C_{A0}	Concentração inicial do reagente A
C_{B0}	Concentração inicial do reagente B
k	Constante cinética da reação
A	Fator pré-exponencial
E	Energia de ativação
R	Constante dos gases perfeitos
T	Temperatura
C_{ac}	Concentração de ácido oleico
$C_{\text{ac}0}$	Concentração inicial de ácido oleico
$k_{1^\text{ª ordem}}$	Constante cinética de 1ª ordem
$k_{2^\text{ª ordem}}$	Constante cinética de 2ª ordem
IA_0	Índice de acidez inicial

Letras gregas

γ	Viscosidade cinemática
ρ	Densidade
Δ	Variação

Lista de Siglas

CE	Comunidade Europeia
EET	Encefalopatia Espongiforme Transmissível
UV	Ultra Violeta
AGL	Ácidos Gordos Livres
GRAS	Generally Recognized As Safe
UTS	Unidade de Transformação de Subprodutos
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto
IA	Índice de Acidez
ISO	International Organization for Standardization
BHA	Hidroxianisol Butilado
BHT	Hidroxitolueno Butilado
IUN	Unidade de Interesterificação (<i>Interesterification Unit</i>)
LU	Unidade de Lipase (<i>Lipase Unit</i>)
PLU	Unidade de laurato propílico (<i>Propil Laurate Unit</i>)

1. Introdução

1.1 Enquadramento do tema

1.1.1 Características físico-químicas das gorduras e dos óleos

As gorduras e os óleos pertencem à classe dos lípidos, cuja principal característica é serem insolúveis em água. O grupo dos óleos e das gorduras caracteriza-se por ter como principais componentes ácidos gordos e derivados destes, na forma livre ou combinada. Na forma combinada, os seus derivados são normalmente encontrados como triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos (Rohman et al, 2012; Ramalho & Suarez, 2013).

Os triglicerídeos são ésteres constituídos por três moléculas de ácidos gordos e uma molécula de glicerol. Os ácidos gordos são formados por uma cadeia carbónica longa (parte lipossolúvel) e por um grupo carboxilo terminal (parte ácida) (Rohman et al, 2012; Ramalho & Suarez, 2013).

As propriedades físicas e químicas das gorduras e dos óleos são determinadas pela composição de ácidos gordos e pela sua posição nas moléculas de glicerol. Quimicamente, todas as gorduras e óleos são ésteres de glicerina e ácidos gordos. Quanto às propriedades físicas, as gorduras e os óleos naturais variam muito consoante a proporção de ácidos gordos e a estrutura dos gliceróis de cada gordura/óleo. Usualmente, as gorduras e os óleos são referidos como triglicerídeos, porque a molécula de glicerina tem três grupos hidróxilo onde os ácidos gordos se podem ligar. Todos os triglicerídeos têm a mesma unidade de glicerina e portanto são os ácidos gordos que contribuem para a diversidade de propriedades (O'Brien, 2004).

1.1.2 Gorduras de origem animal

A composição química das gorduras e dos óleos animais varia de acordo com a espécie do animal, alimentação, sanidade, localização da gordura na carcaça e idade do animal (O'Brien, 2004).

A gordura animal é obtida a partir dos tecidos adiposos dos animais, normalmente associados a carnes, peles e ossos.

As gorduras de origem animal têm elevada quantidade de ácidos gordos saturados o que as torna sólidas à temperatura ambiente. Comparativamente com outras

gorduras de origem animal, as gorduras de aves apresentam elevado grau de insaturação sendo classificadas, por vezes, como óleos (Bellaver, 2004).

Na Tabela 1, apresenta-se a composição em ácidos gordos de gorduras e óleos de origem animal.

Tabela 1: Perfil de ácidos gordos de gorduras de origem animal (Bellaver, 2004).

Gordura/óleo	Ácidos gordos saturados (%, m/m)			Ácidos gordos insaturados (%, m/m)		
	C14:0 Mirístico	C16:0 Palmítico	C18:0 Esteárico	C18:1; Oleico	C18:2; Linoleico	C18:3; Linolénico
Óleo de frango	0,5	26,6	5,5	43,5	14,5	0,8
Óleo de peixes	6	10	2	24	2	25
Gordura de suíno	1,7	26,2	13,5	42,9	9	0,3
Gordura de bovino	4	32	23	38	3	-

1.1.3 Produção e consumo mundial e nacional de carne de aves

O setor avícola, principalmente o de frangos, tem vindo a tornar-se um dos maiores fornecedores de proteína animal para a alimentação humana, aumentando o número de animais abatidos e, conseqüentemente a quantidade de resíduos derivados do seu processamento.

Os países da União Europeia estão em quarto lugar no *ranking* mundial de produção de carne de aves, e em terceiro lugar no consumo da mesma carne (Bradescio, 2012).

Na Figura 1, representa-se graficamente a distribuição do consumo e da produção mundial de carne de aves.

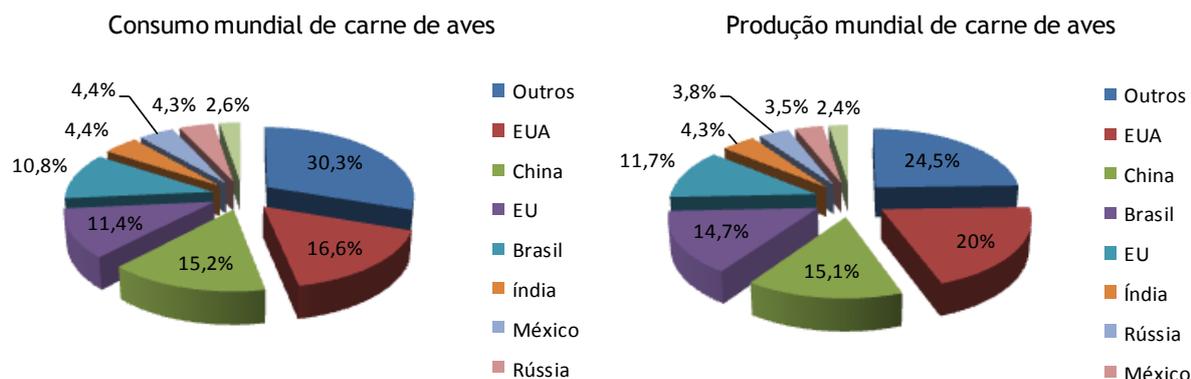


Figura 1: Consumo e produção mundial de carne de aves (Bradesco, 2012).

Em Portugal, a produção e o consumo de aves, essencialmente frango e peru, tem vindo a crescer devido não só a fatores de natureza económica mas também ao seu valor nutricional. Apesar das crises alimentares que, por vezes se fazem sentir no setor avícola, como por exemplo, a gripe das aves e os nitrofuranos, os profissionais de saúde incentivam o consumo de carnes brancas. Estas carnes têm uma quantidade proteica de elevado valor biológico e têm baixo teor de gordura, desde que sejam consumidas sem pele. As gorduras de aves são consideradas de boa qualidade, visto que se trata, em grande parte, de gorduras mono e poli-insaturadas. Este tipo de carne é ainda rica em ferro e é considerada uma boa fonte de vitaminas B, nomeadamente vitaminas B2 e B12 (vitaminas que ajudam na síntese de energia a partir dos nutrientes ingeridos) (Venturini et al, 2007).

Na Tabela 2, apresentam-se as quantidades dos principais nutrientes constituintes da carne de aves.

Tabela 2: Informação nutricional da carne de aves (Venturini et al, 2007).

Nutriente	Quantidade (em 100 g de frango)
Proteínas (g)	25
Ferro (g)	1,61
Calorias (kcal)	129
Gordura (g)	3,75
Gordura saturada (g)	1,07

Portugal é um dos países da União Europeia que regista consumos mais elevados de carne de aves, com uma capitação superior a 25 kg/habitante/ano, sendo a média europeia de aproximadamente 22 kg/habitante/ano (Moura, 2010).

Segundo os últimos dados estatísticos publicados pelo Instituto Nacional de Estatística - Statistics Portugal, desde Fevereiro de 2013 a Fevereiro de 2015 a produção de aves aumentou 7,6 % em volume, registando em média 23 000 toneladas de aves por mês (I.N.E, 2015).

Na Figura 2, representa-se graficamente a evolução da produção industrial de carne de aves em Portugal entre Maio de 2014 e Maio de 2015.

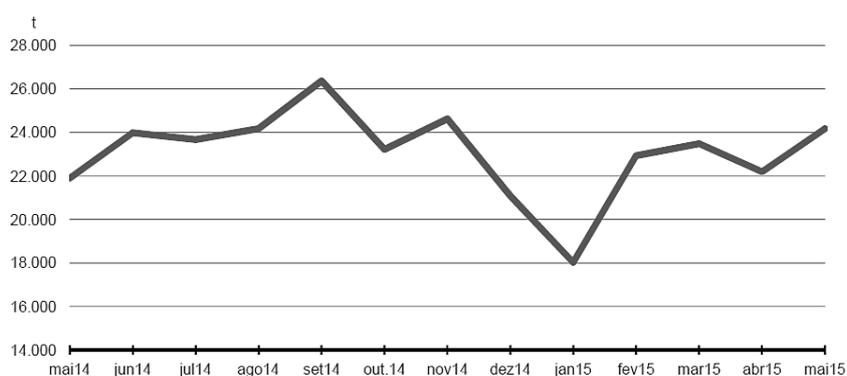


Figura 2: Produção industrial de carne de aves em Portugal (I.N.E, 2015).

Atualmente, grande parte da carne de aves é comercializada desmanchada, e não inteira. Isto leva a um aumento de subprodutos resultantes do abate e da desmancha, tal como a pele e a gordura da zona abdominal. Estes subprodutos representam cerca de 30 % do peso da ave viva e originam cerca de 11 % de gordura (Moreira, 2009). Na Tabela 3 apresentam-se as quantidades, em percentagem relativa ao peso do animal, de subprodutos resultantes do abate e da desmancha de aves.

Tabela 3: Subprodutos resultantes do abate e da desmancha de aves (Moreira, 2009).

Subproduto	Percentagem (%)
Ossos e resíduos	14,00
Vísceras	7,29
Penas	6,34
Sangue	2,37

1.1.4 Valorização de subprodutos de origem animal

Com a crescente preocupação ambiental decorrente do consumo excessivo de recursos fósseis e naturais, a valorização de subprodutos de origem animal surge como uma medida importante de sustentabilidade e responsabilidade sociais. De modo a garantir o máximo de segurança no uso das gorduras de origem animal são estabelecidas e cumpridas regras restritas no que diz respeito à utilização de subprodutos de origem animal. Segundo o regulamento CE 1774/2002 os resíduos animais são classificados em três categorias.

Matérias da categoria 1: *Partes do corpo de animais suspeitos de estarem infetados ou estarem efetivamente infetados com uma EET (encefalopatia espongiforme transmissível); Animais não incluídos nas categorias de animais de criação e dos animais selvagens; Animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos; Animais selvagens em que haja suspeita de estarem infetados com doenças transmissíveis aos seres humanos e aos animais; Produtos derivados de animais a que tenham sido administradas substâncias proibidas ou que contenham resíduos de contaminantes ambientais; Todas as matérias animais recolhidas aquando do tratamento de águas residuais das unidades de transformação da categoria 1 e misturas de matérias da categoria 1, com matérias de categoria 2 ou 3, ou de ambas.*

Matérias da categoria 2: *Chorume e conteúdo do aparelho digestivo; Matérias animais recolhidas aquando do tratamento de águas residuais de matadouros; Produtos de origem animal que contenham resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes, cujas concentrações excedam os limites da legislação comunitária; Produtos de origem animal, com exceção de matérias de categoria 1, importados de outros países que não cumpram os requisitos veterinários comunitários; Animais ou partes de animais que não tenham sido abatidos para consumo humano, incluindo animais abatidos para erradicação de uma doença epizoótica; misturas de matérias de categoria 2 com matérias da categoria 3.*

Matérias da categoria 3: *Partes de animais abatidos, próprias para o consumo humano mas que, por motivos comerciais, não se destinam a esse fim; Partes de animais, rejeitadas como impróprias para o consumo humano, mas que não estão afetadas por quaisquer sinais de doenças transmissíveis ao ser humano e aos animais; Couros, peles, cascos, cornos, cerdas de suínos e penas originárias de*

animais abatidos em matadouro, depois de submetidos a inspeção e avaliados como próprios para consumo humano; Subprodutos animais derivados do fabrico de produtos destinados ao consumo humano, incluindo ossos desengordurados e torresmos; Restos de géneros alimentícios de origem animal, para além de restos de cozinha e de outros que não se destinem ao consumo humano, por motivos comerciais ou devido a problemas de fabrico ou embalagem; Leite cru originário de animais que não tenham doenças transmissíveis ao ser humano ou aos animais; Peixes ou outros animais marinhos, exceto mamíferos marinhos, capturados em alto mar para a produção de farinha de peixe; Subprodutos frescos de peixe provenientes de fábricas de produtos à base de peixe destinados ao consumo humano; Cascas de ovos originárias de animais que não tenham doenças transmissíveis ao ser humano e a animais; Sangue, couros, peles e penas originários de animais saudáveis.

Atualmente, as gorduras de origem animal são usualmente utilizadas para a produção de rações animais. Para este fim apenas é permitida a utilização de matérias da categoria 3.

As gorduras e os óleos provenientes da transformação de subprodutos animais são utilizados na produção de rações como uma excelente fonte de energia e de ácidos gordos essenciais. A utilização destes ingredientes tem como objetivo aumentar o nível energético das rações, melhorar a palatabilidade das mesmas, melhorar a conversão alimentar, melhorar a absorção de vitaminas lipossolúveis, assim como melhorar a consistência das rações fareladas e/ou peletizadas (Pupa, 2004).

Adequadamente preparadas e estabilizadas, as gorduras contribuem para corrigir alguns problemas causados pela falta de ácidos gordos, como a descamação da pele, a necrose, problemas de reprodução, lactação e crescimento retardado. O uso de gorduras elimina a pulverulência das rações, o que tem um duplo efeito benéfico na melhoria da aparência das rações, aumentando a palatabilidade e reduzindo as perdas resultantes da poeira. Outra função importante é a de facilitar a absorção de vitaminas lipossolúveis, cálcio, pigmentos, odorantes, entre outros (Pupa, 2004).

A nível económico o uso de gorduras em rações é também conveniente pois permite a utilização de materiais pouco energéticos e de baixa palatabilidade que, normalmente, são de menor custo. A combinação destes produtos com as gorduras resulta num produto final energética e economicamente rentável. Outra vantagem do uso de gorduras nas rações animais é a diminuição do desgaste das máquinas,

principalmente das peletizadoras, facilitando a peletização e reduzindo o consumo de energia elétrica (Pupa, 2004).

1.1.5 Oxidação das gorduras e dos óleos

A oxidação das gorduras e dos óleos está na origem do desenvolvimento de rancidez, produção de compostos responsáveis pela alteração da cor, odor, sabor, textura, reversão e ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de reações de cisão. Este tipo de reações não só diminui o valor nutritivo dos lípidos, como podem gerar compostos nocivos indesejáveis (Scrimgeour, 2005; Lewandowski, 1989).

Os fenómenos de oxidação dos lípidos dependem de diversos mecanismos reacionais que estão relacionados com a estrutura química das gorduras/óleos e com o meio ambiente onde estas se encontram. O número e a natureza das insaturações, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor e a presença de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa das gorduras e dos óleos (Silva et al., 1999).

Na Figura 3, encontra-se esquematizado o processo geral de oxidação dos lípidos.

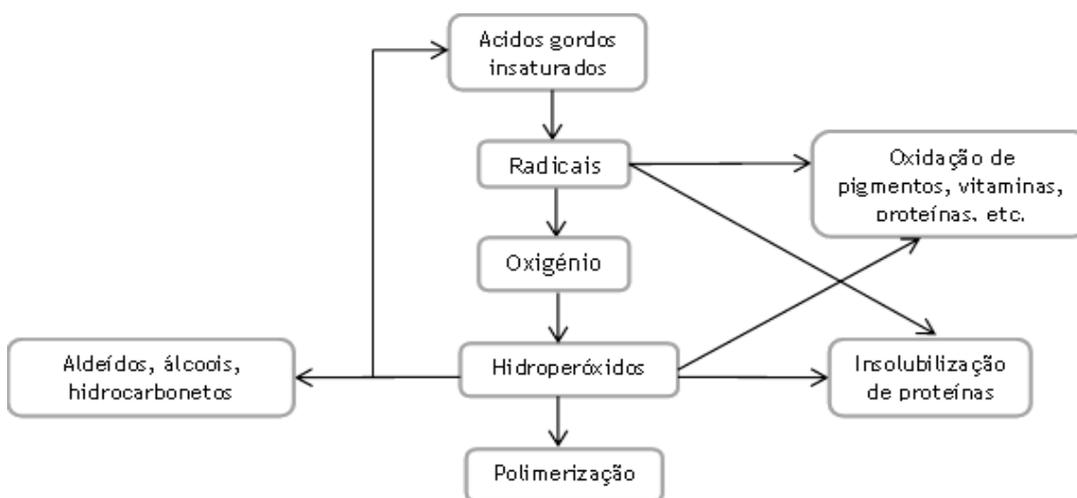


Figura 3: Esquema geral da oxidação de gorduras e óleos (Silva et al., 1999).

Em função do meio e dos agentes oxidativos, a degradação das gorduras e dos óleos pode ocorrer principalmente por autooxidação, fotoxidação e oxidação enzimática (Silva et al., 1999).

Autoxidação: Trata-se de um processo químico, que envolve reações em cadeia de radicais livres, usualmente dividido em iniciação, propagação e terminação da cadeia (Scrimgeour, 2005).

Na fase de iniciação ocorre o desaparecimento dos subprodutos da oxidação (oxigênio e lípidos insaturados). Na etapa de propagação aparecem os produtos primários da oxidação com estruturas variáveis, consoante a natureza dos ácidos gordos presentes (peróxidos e hidroperóxidos). Por fim, na fase de terminação surgem os produtos secundários da oxidação obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e compostos não-voláteis) (Silva et al., 1999).

Na Figura 4, estão representadas as reações que ocorrem em cada etapa da autoxidação.

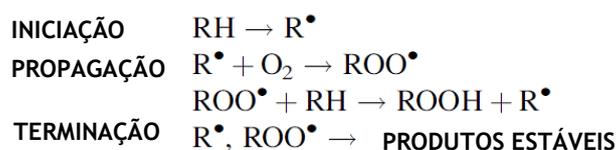


Figura 4: Reações em cadeia de radicais livres (Scrimgeour, 2005).

Fotoxidação: É promovida pela radiação UV na presença de sensibilizadores (p.ex: clorofila e mioglobina) e de oxigênio que funciona como intermediário reativo. O mecanismo envolve reações radicalares que formam hidroperóxidos que se degradam em aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (Silva et al., 1999).

Oxidação enzimática: As lipoxigenases são as enzimas responsáveis pela oxidação enzimática dos lípidos. Estas enzimas atuam sobre os ácidos gordos poli-insaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada. Os produtos resultantes são peróxidos e hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas, que podem sofrer degradação. As lipoxigenases são também responsáveis pela iniciação de novos processos oxidativos, pois têm a capacidade de co-oxidar substratos (ex: carotenóides, tocoferóis, clorofila e proteínas) (Silva et al., 1999).

Na Figura 5, encontra-se esquematizado o mecanismo de oxidação enzimática catalisado por uma lipoxigenase.

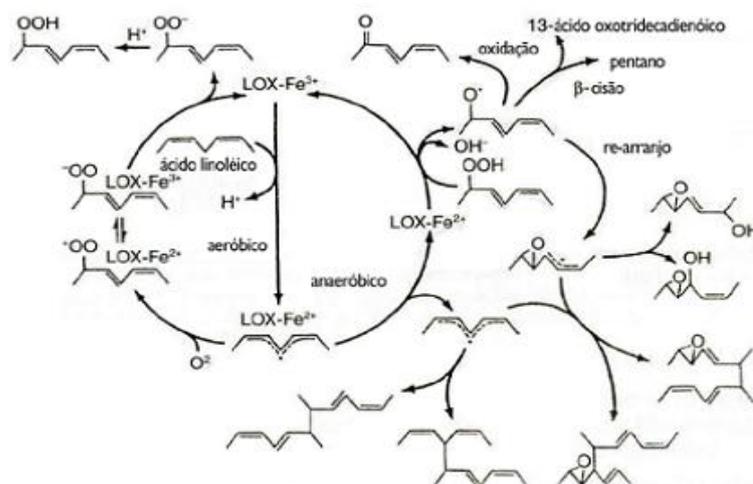


Figura 5: Oxidação enzimática catalisada por uma lipoxigenase (Anónimo, 2010).

A oxidação aumenta o teor de ácidos gordos livres (AGL) nas gorduras e nos óleos de origem animal o que influencia a qualidade do produto final pretendido e causa impactos económicos na sua produção. O teor de AGL nestas gorduras varia ao longo do ano, como se pode observar na Figura 6. Nos meses de verão o teor de AGL aumenta substancialmente devido à rápida degradação dos subprodutos resultantes da desmancha dos animais pela ação do calor (Moreira, 2009).

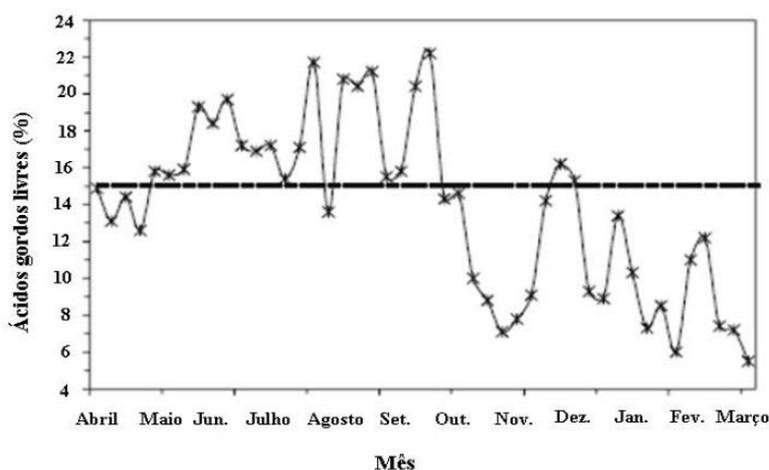


Figura 6: Variação da percentagem de AGL na gordura animal ao longo do ano (Moreira, 2009).

A oxidação dos óleos e das gorduras pode ser adiada, retardada ou impedida pela adição de antioxidantes. Estas substâncias retardam o desenvolvimento do ranço e de outras deteriorações decorrentes do processo de oxidação. Os antioxidantes podem inibir ou retardar a oxidação de duas formas distintas: pela eliminação de radicais

livres (antioxidante primário) ou por um mecanismo que não envolve uma atividade sequestrante direta de radicais livres (antioxidante secundário) (Anónimo, 2010).

1.2 Estado da Arte

A redução da acidez de gorduras e óleos tem como base a obtenção de glicerídeos e ésteres menos suscetíveis de serem oxidados do que os ácidos gordos livres (Ciftci et al., 2011).

Na desacidificação de óleos e/ou gorduras ocorre a conversão dos AGL em glicerídeos neutros, com os restantes grupos hidroxilos livres no óleo/gordura (Misra & Nandi, 2014).

Um dos métodos utilizados para a redução da acidez de gorduras e óleos de origem animal é a esterificação. Esta funciona como um pré-tratamento de óleos e gorduras com elevado teor de acidez (entre 5-30 % de ácidos gordos livres) em que os ácidos gordos livres são convertidos em ésteres utilizando um álcool de cadeia curta e um ácido catalítico ou uma lípase (Vilela, 2010).

1.2.1 Esterificação ácida

Na esterificação de ácidos gordos com álcoois de cadeia curta, como o metanol e o etanol, são usados catalisadores ácidos. Os catalisadores ácidos aumentam a velocidade da reação promovendo a protonação do grupo carbonila do ácido, originando um carbocatião. Este carbocatião sofre um ataque nucleofílico do álcool à carbonila formando um intermediário tetraédrico. A desprotonação do complexo intermediário origina então uma molécula de éster e elimina uma molécula de água. A Figura 7, representa o mecanismo da esterificação ácida, onde R representa a cadeia carbónica hidrofóbica do ácido gordo e R₁ representa a cadeia carbónica hidrofóbica do álcool (Ramos et al., 2011; Alves et al., 2014).

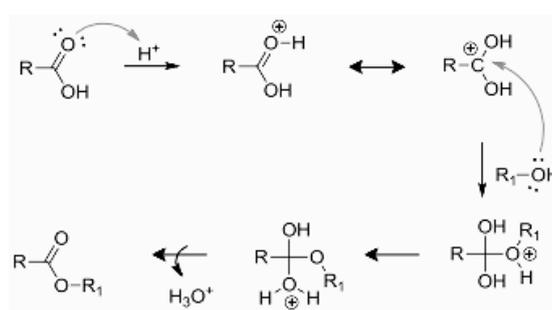


Figura 7: Mecanismo de esterificação ácida (Ramos et al, 2011).

A gordura de aves tem propriedades semelhantes às dos óleos vegetais, apresentando-se no estado líquido à temperatura ambiente, o que facilita a reação de esterificação (Moreira, 2009).

Aranda et al. (2008) estudaram a cinética da reação de esterificação ácida do óleo de palma e verificaram que, dos catalisadores ácidos testados aqueles em que obteve conversões mais elevadas em ésteres foram os ácidos sulfúrico e metanosulfônico (conversões superiores a 90 %, à temperatura de 130 °C, durante 60 minutos).

Torres (2011) realizou esterificações ácidas com ácido sulfúrico, a 50 °C durante 90 minutos, com o objetivo de reduzir a acidez de gorduras provenientes de resíduos do setor avícola. Os resultados deste estudo confirmam uma redução do índice de acidez de 2 mgKOH/g gordura para aproximadamente 0,7 mgKOH/g gordura.

1.2.2 Esterificação enzimática

A utilização de enzimas como biocatalisadores tem benefícios em termos de produtividade, de custos e de proteção ambiental. As reações enzimáticas realizam-se a baixas temperaturas, com menos reações paralelas, obtém-se produtos mais puros e rendimentos elevados. As reações são muito seletivas, são produzidos poucos resíduos e os gastos com equipamentos são reduzidos (Novozymes Biopharma, 2016).

As enzimas, nomeadamente as lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3), desempenham um papel fundamental na tecnologia de esterificação. Estas enzimas catalisam a hidrólise de gorduras e óleos libertando ácidos gordos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, in vivo (Scrimgeour, 2005).

As lipases são as enzimas mais utilizadas em bio-transformações devido à sua capacidade de funcionar em sistemas aquosos e não-aquosos sem a necessidade de se usarem cofatores e coenzimas. Têm atividade numa faixa de pH relativamente grande (4-9) e a temperaturas desde a ambiente até 70 °C (Hayes, 2004; Richetti, 2009).

Estas enzimas são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais e as suas propriedades variam conforme a sua proveniência. Estas podem ser encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos. As lipases microbianas são as mais utilizadas e, na sua maioria, não são nocivas para a saúde humana e animal, sendo reconhecidas com estatuto GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Industrialmente, os fungos são mais valorizados porque as enzimas por eles

produzidas são normalmente extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação (Richetti, 2009).

As misturas de esterificação geralmente contêm apenas os substratos e as enzimas, sendo a água um sub-produto da reação. Durante a reação de esterificação, por cada mole de éster sintetizado é formada uma mole de água. A água gerada durante a esterificação é considerada o parâmetro mais importante a ser controlado de modo a se obterem elevadas conversões (Richetti, 2009).

Na Figura 8, estão esquematizadas as reações de esterificação enzimática.

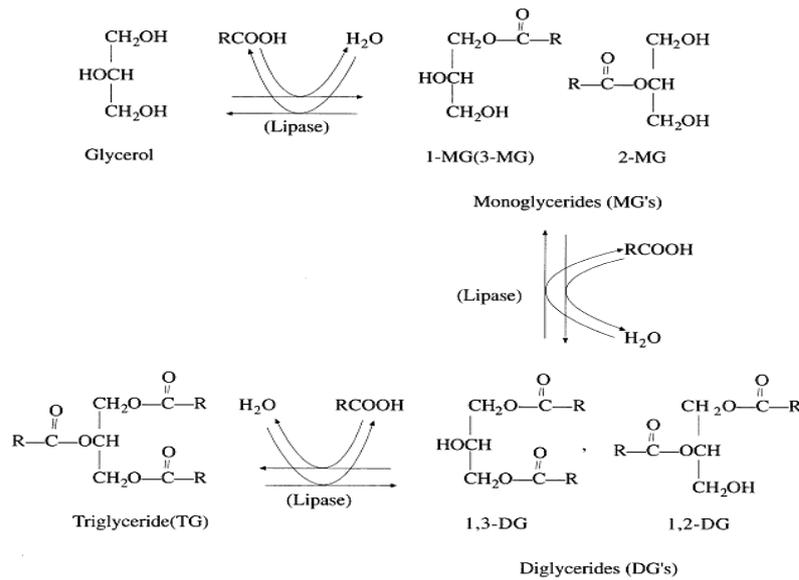


Figura 8: Reações de esterificação catalisadas por enzimas (Makasci, 1996).

Mirsra e Nandi (2014) estudaram a desacidificação do óleo de farelo de arroz por esterificação enzimática e conseguiram uma diminuição da percentagem de AGL de 35,5 % para 2,1 %. Usaram como catalisador uma enzima originária de *Candida antartica* (Novozyme 435) à temperatura de 45 °C, durante 8 h (Misra & Nandi, 2014). Também Rosset (2011) realizou um trabalho sobre esterificação enzimática de óleo de soja com uma lipase de *Candida antartica* e obteve um rendimento em ésteres de 84,1 %. A reação decorreu durante 24 h, à temperatura de 32 °C, a 130 rpm e na presença de etanol.

Soumonou e Bornscheuer (2003) realizaram estudos com enzimas de origem *Rhizomucor miehei* e conseguiram obter um rendimento em ésteres de 80 % a partir da esterificação de óleo de girassol à temperatura de 40 °C.

1.2.3 Fatores que influenciam a reacção de esterificação

As variáveis que mais afetam o rendimento da conversão de ácidos gordos em ésteres são: a razão mássica álcool:AGL, a quantidade disponível de matérias-primas (teor de ácidos gordos livres e presença de água), a temperatura, o tipo de álcool, o tempo de reacção, a quantidade e o tipo de catalisador (Skrbic et al., 2015).

Razão mássica álcool:AGL: Esta razão depende do tipo de catalisador utilizado, uma vez que a atividade do catalisador depende, por sua vez, do tipo de álcool usado. Para cadeias lineares a atividade diminui com o aumento do comprimento da cadeia, devido à diminuição da polaridade, o que reduz a atividade da molécula e a produção de ésteres. Razões molares muito baixas requerem maiores tempos de reacção e razões molares muito elevadas embora aumentem o rendimento da reacção, dificultam a recuperação dos produtos. Torna-se, portanto, necessário encontrar uma razão ótima que permite obter rendimentos elevados e recuperações de produtos mais fáceis (Leão, 2009; Torres, 2011).

Tipo de álcool: Em geral, álcoois de cadeia curta como o metanol, o etanol, o propanol e o butanol podem ser usados em reacções de esterificação no sentido de se obter maior rendimento em ésteres. De entre estes álcoois os mais frequentemente utilizados são o metanol e o etanol, sendo que o etanol apresenta menos riscos de utilização e menor toxicidade (Torres, 2011).

Canakci e Gerpen (1999) investigaram o efeito de diferentes álcoois na esterificação de óleo de soja, concluindo que o mais eficiente é o etanol. Na Tabela 4 encontram-se os resultados deste estudo.

Tabela 4: Efeito do tipo de álcool no rendimento em ésteres (Canakci & Gerpen, 1999).

Tipo de álcool	Rendimento em ésteres (%)
Metanol	87,8
Etanol	95,8
1-Butanol	92,1
2-Propanol	92,9

Temperatura: A temperatura da reação tem influência quer na velocidade da reação quer no rendimento em ésteres. A reação é, geralmente, levada a cabo perto do ponto de ebulição do álcool utilizado. Até a um determinado limite, quanto mais elevada for a temperatura maior é a quantidade de produto formado em menos tempo (Leão, 2009; Torres, 2011).

Experiências realizadas por Peng (2008) demonstram que a temperatura aumenta a velocidade da reação até a um determinado limite, a partir do qual o aumento da temperatura não tem influência. O mesmo pode ser observado com o acréscimo da quantidade de catalisador.

Quantidade e tipo de catalisador: O catalisador influencia diretamente a velocidade da reação e pode ser recuperado do processo sem sofrer qualquer alteração. O catalisador não afeta o equilíbrio da reação, altera apenas a velocidade da reação quer no sentido direto, quer no sentido inverso. Os catalisadores podem ser homogéneos ou heterogéneos. Os homogéneos são aqueles que se encontram na mesma fase que os reagentes e os heterogéneos encontram-se numa fase diferente dos reagentes. A catálise homogénea é a mais utilizada industrialmente pelo facto de a catálise heterogénea ser mais lenta. No entanto, a catálise heterogénea permite a reutilização do catalisador entre 5 a 10 vezes, sem perda de actividade. (Leão, 2009; Torres, 2011).

Tempo de reacção: O tempo de reação está diretamente relacionado com a razão mássica álcool:AGL, com a temperatura e a quantidade e tipo de catalisador (Torres, 2011).

1.3 Descrição do processo de produção de gorduras e farinhas de aves da Savinor UTS

A empresa Savinor UTS, do grupo Soja de Portugal, presta serviços de recolha, tratamento e valorização de subprodutos de origem animal, nomeadamente de aves, de mamíferos, de peixes e de penas, desde 1984.

Os subprodutos de aves, de mamíferos e de peixes pertencentes às categorias 2 e 3 são recolhidos na região norte de Portugal e na Galiza. Estes são tratados e transformados em gorduras e farinhas na sede da empresa Savinor UTS localizada na Trofa. As gorduras e as farinhas obtidas de subprodutos de categoria 3 têm como destino final a produção de rações animais. Já as gorduras originárias de subprodutos de categoria 2 são utilizadas para a produção de biodiesel e as farinhas para a produção de adubos e fertilizantes.

O processo de produção de gorduras e farinhas de origem animal de categoria 3 engloba três linhas de produção distintas independentes umas das outras: aves, mamíferos e peixes. Neste subcapítulo é descrito pormenorizadamente o processo de produção de gorduras e farinhas obtidas de subprodutos de aves (Comunicação pessoal).

Os resíduos de aves afluentes à Savinor UTS são essencialmente originários das empresas Avicasal - Sociedade Avícola, SA e Savinor - Sociedade Avícola do Norte, SA. Aquando da recolha, é adicionado ácido acético, que inibe a ação bacteriana e a degradação dos subprodutos por via enzimática, e ácido lignosulfónico, que estabiliza o meio ácido tornando possível o manuseamento dos subprodutos no decorrer de todo o processo produtivo e impede a deterioração dos equipamentos. Em seguida, os subprodutos são enviados para a zona de receção onde são depositados numa tolva sob condições adequadas de higiene, proteção e segurança (Comunicação pessoal).

Na fase seguinte, os resíduos entram num triturador onde são triturados até à granulometria de aproximadamente 30 mm (com limite máximo de 40 mm), para garantir que a esterilização chegue ao núcleo das partículas. Junto ao triturador existe um íman para remoção dos materiais ferrosos (Comunicação pessoal).

A jusante do triturador existe um digestor com um veio misturador onde os resíduos são digeridos e secos simultaneamente. Este digestor funciona à pressão máxima de 6 bar, controlada na camisa que circunda o digestor, e à temperatura mínima de 101

°C, podendo ser atingida a temperatura de 110-115 °C no seu interior (se ultrapassar os 116 °C o digerido queima), durante o tempo mínimo de 110 minutos, até atingir um teor de humidade baixo (aproximadamente 0 %). Assim, esta etapa do processo permite a eliminação de toda a água existente nos subprodutos animais. Dentro do digestor existe um veio com pás gigantes que promovem a mistura no seu interior, com movimento à retaguarda para manter o material dentro do digestor, alternado com movimento à vanguarda, quando se pretende fazer a descarga do mesmo. Os condensados libertados pelo digestor são reencaminhados para um tanque, enquanto os gases são enviados para condensadores onde se efetua a separação dos condensados e dos não-condensados. Os condensados são enviados para a ETAR da Savinor UTS, onde são devidamente tratados, enquanto os não-condensados são tratados por um lavador de gases (Comunicação pessoal).

O material digerido é descarregado numa tolva e em seguida encaminhado para uma prensa, onde o material é esmagado e é feita a separação da torta/farinha e dos óleos/gorduras. Esta é a fase mais crítica do processo e que merece uma maior atenção dependendo da natureza dos resíduos. Se os resíduos forem muito moles ou já estiverem deteriorados a prensagem é difícil e não se efectua, encaminhando-se o material diretamente para a tolva de receção. Quanto mais elevada for a corrente do motor do equipamento, maior é a resistência que o material digerido oferece e mais efetiva é a prensagem (Comunicação pessoal).

Após a prensagem são obtidos dois produtos distintos: as gorduras e as farinhas. Os óleos ou gorduras prensadas passam por um primeiro crivo ou peneira para retirar partículas de maiores dimensões, as quais são reintroduzidas na tolva de receção do digestor. Os óleos ou gorduras são encaminhados para um depósito intermédio onde vão alimentar um *tricanter* ou centrífuga de três fases (a operar a 3000-3500 rpm), e onde se adiciona água a 50 °C, de modo a fazer a separação horizontal das três fases: gorduras, lamas e água. As gorduras desidratadas são armazenadas em recipientes apropriados; as lamas são reintroduzidas no processo de produção (na tolva de receção do digestor) e a água é enviada para a ETAR da Savinor UTS (Comunicação pessoal).

A torta ou farinha é encaminhada por um parafuso sem fim, munido de um sistema de arrefecimento por contracorrente de ar com o objetivo de arrefecer a torta que sai da prensa, num percurso de cerca de uma dezena de metros. Em seguida, a torta passa por um moinho onde é moída à granulometria pretendida. O ar libertado pelo

sistema parafuso sem fim mais arrefecedor e pelo moinho é tratado por um filtro de mangas. Obtida a farinha na granulometria desejada, esta é encaminhada por um parafuso sem fim até ao crivo, onde é peneirada e tratada com antioxidantes (BHA e BHT). Finalmente, a farinha peneirada é levada por um elevador de alcatruz para o silo de armazenagem, ou segue para a estação de ensaque, onde é colocada em *big bags*, consoante a necessidade de escoamento do produto.

A Figura 9 diz respeito ao fluxograma geral do processo de obtenção de gordura e farinha de aves da Savinor UTS (Comunicação pessoal).

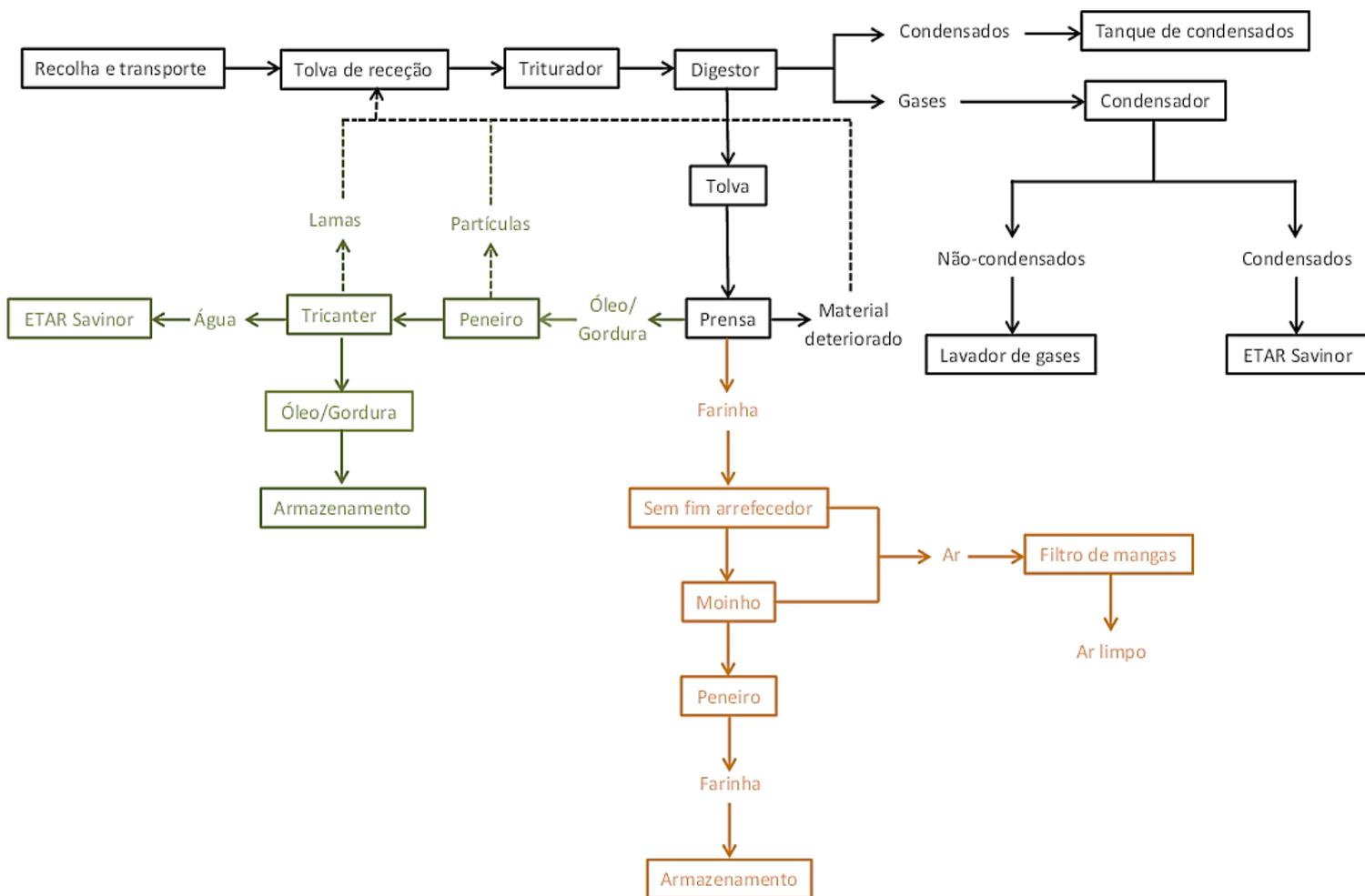


Figura 9: Fluxograma geral do processo de obtenção de gordura e farinha de aves da Savinor UTS.

1.4 Contributos do trabalho para o estado da arte

Tendo em conta a revisão e síntese bibliográfica descritas no subcapítulo 1.2 com a realização deste trabalho pretende-se contribuir para o estado da arte pelos seguintes aspetos:

- Pesquisa e estudo do processo de obtenção de gorduras a partir da transformação de subprodutos de aves;
- Caraterização da gordura de aves;
- Identificação das tecnologias de redução da acidez da gordura;
- Estudo da redução da acidez da gordura de aves por esterificação ácida;
- Pesquisa e teste de diferentes catalisadores enzimáticos;
- Estudo da redução da acidez da gordura de aves e dos parâmetros da reação de esterificação enzimática.
- Análise da cinética da reação de esterificação enzimática e do efeito da temperatura na constante cinética.

2. Materiais e métodos

2.1 Caracterização da gordura

A gordura de aves utilizada neste trabalho experimental é resultante do processo de transformação de subprodutos de aves da empresa Savinor UTS e foi obtida de matérias animais de categoria 3, provenientes do matadouro da própria empresa.

As amostras de gordura de aves foram recolhidas nas instalações da Savinor UTS em frascos de 1 kg e posteriormente transferidas para o Laboratório de Tecnologia do ISEP, onde foram colocadas num frigorífico para que as condições de armazenamento fossem mantidas ao longo de todo o trabalho experimental.

Estudaram-se três amostras de gordura de aves cujas datas de recolha e processamento se encontram na Tabela 5.

Tabela 5: Datas de recolha e processamento das amostras estudadas.

Amostra	Data de recolha	Data de processamento
1	24/7/2015	16/10/2015 - 16/11/2015
2	28/8/2015	18/11/2015 - 16/12/2015
3	23/9/2015	17/12/2015 - 18/12/2015

Nas Figuras 10 e 11, encontram-se representados os frascos de armazenamento das amostras e cada uma das gorduras que foi estudada, respetivamente.



Figura 10: Frascos de armazenamento das amostras.



Figura 11: Amostras de gordura analisadas.

O primeiro passo do trabalho experimental foi a caracterização das amostras. Avaliou-se o índice de acidez, o índice de iodo, a viscosidade cinemática, a densidade e o teor de humidade.

2.1.1 Determinação do índice de acidez

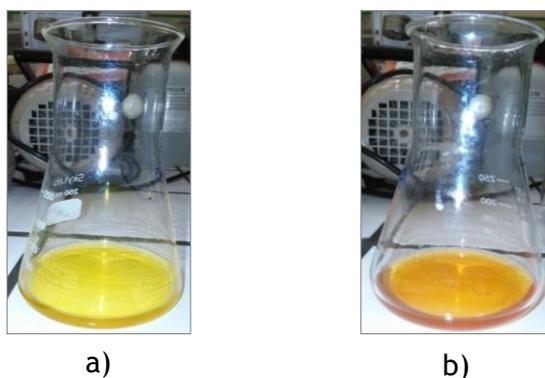
O índice de acidez avalia o teor de ácidos gordos livres presentes na gordura e é definido como os miligramas de KOH requeridos para neutralizar os AGL num grama de amostra. A determinação do índice de acidez da gordura é o parâmetro mais importante de caracterização da matéria-prima uma vez que é este o foco principal de todo o trabalho.

Avaliou-se o índice de acidez por titulação volumétrica de acordo com a norma NP EN ISO 660:2002.

Pesou-se cerca de 5 g de gordura para um matraz de 250 ml e adicionou-se 50 ml de mistura equimolar de solvente (éter dietílico (95 %) + etanol (96 %)), previamente neutralizada com KOH. Titulou-se a mistura, na presença de indicador de fenolftaleína, com uma solução alcoólica de KOH 0,1 M.

Realizou-se um ensaio padrão onde se colocou num matraz de 250 ml todos os reagentes descritos acima, à exceção da amostra de gordura.

A Figura 12 representa a mistura de reagentes e a amostra antes da titulação (Figura 12a) e após a titulação (Figura 12b).



*Figura 12: Titulação volumétrica para determinação do índice de acidez
a) fase inicial; b) ponto de viragem.*

Por fim, calculou-se o índice de acidez (IA) expresso em miligramas de KOH por grama de amostra, através da Equação 1:

$$IA = \frac{M_{KOH} \times V \times C}{m} \quad (1)$$

Em que M_{KOH} representa a massa molar de hidróxido de potássio (56,1 g/mol), V o volume de solução de hidróxido de potássio gasto na titulação, em ml, C é a concentração exata da solução de hidróxido de potássio, em mol/L, e m a massa da amostra de gordura, em g.

2.1.2 Determinação do índice de iodo

O índice de iodo permite inferir acerca do grau de saturação da gordura. As gorduras insaturadas têm um índice de iodo maior do que as gorduras saturadas. O índice de iodo é dado como o número de gramas de iodo absorvido por 100 gramas de amostra.

Avaliou-se o índice de iodo por titulação volumétrica com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1 M, seguindo a norma ISO 3961:1996.

Pesou-se 0,13-0,15 g de amostra para um matraz de 250 ml e adicionou-se 20 ml de solvente (mistura de ácido acético glacial + ciclohexano (50:50)) e 25 ml de reagente de wijs 0,1 mol/L (solução de iodo de cloro). Agitou-se a mistura e deixou-se repousar no escuro cerca de 1h. De seguida, adicionou-se 20 ml de solução de iodeto de potássio 100 g/L e 150ml de água.

Realizou-se um ensaio padrão onde se colocou num matraz de 250 ml todos os reagentes acima descritos, à exceção da amostra de gordura. Posteriormente, titulou-se a mistura na presença de indicador de amido. Na Figura 13, apresenta-se a mistura antes da titulação (Figura 13a) e no ponto de viragem (Figura 13b).

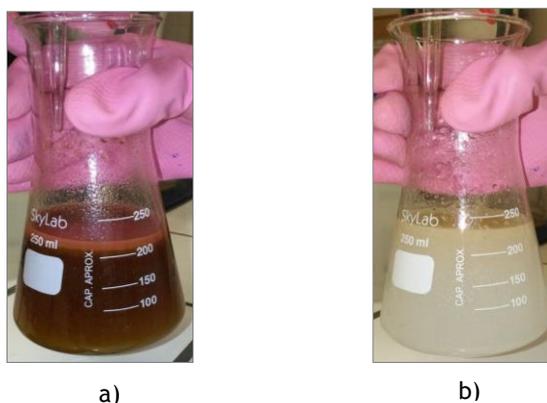


Figura 13: Titulação volumétrica para determinação do índice de iodo a) fase inicial; b) ponto de viragem.

O índice de iodo calculou-se através da Equação 2:

$$WI = \frac{M_I \times C \times (V_1 - V_2)}{m} \quad (2)$$

Em que, M_I é a massa molar de iodo (12,69 g/mol), C é a concentração exata da solução de tiosulfato de sódio, em mol/L, V_1 é o volume da solução de tiosulfato de sódio utilizado na titulação do ensaio padrão, em ml, V_2 é o volume da solução de tiosulfato de sódio utilizado na titulação da amostra, em ml, e m a massa de amostra, em g.

2.1.3 Determinação da viscosidade cinemática

Determinou-se a viscosidade cinemática usando um viscosímetro capilar de vidro de 200 mm, à temperatura de 40 °C, de acordo com a norma ISO 3104:1994.

Pipetou-se cerca de 10ml de amostra para o viscosímetro previamente imerso num banho de água a 40 °C e fez-se subir a amostra no capilar até que o bordo superior da amostra ultrapassasse o limite superior de referência (ponto 1 na Figura 14a). Deixou-se a amostra descer no viscosímetro, entre os dois traços de referência (pontos 1 e 2 na Figura 14a) e determinou-se o tempo de escoamento da amostra com auxílio de um cronómetro.

A Figura 14, representa uma ilustração de um viscosímetro capilar (Figura 14a) e a montagem experimental da determinação do tempo de escoamento da amostra no interior do viscosímetro (Figura 14b).

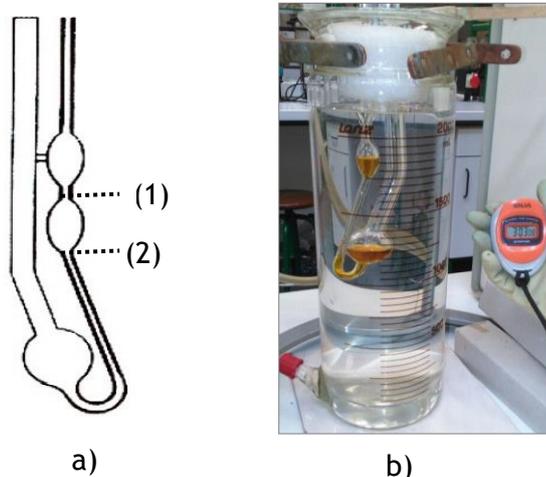


Figura 14: a) Esquema do viscosímetro de capilar; b) determinação do tempo de escoamento.

Calculou-se a viscosidade cinemática, expressa em mm²/s, através da Equação 3:

$$\gamma = K(t - G) \quad (3)$$

Em que, K é a constante do viscosímetro para a temperatura de 40 °C, t o tempo de escoamento, em s, e G o fator de correlação do viscosímetro (0 para valores de tempo de escoamento superiores a 280 segundos).

2.1.4 Determinação da massa volúmica

Para a determinação da massa volúmica da gordura de aves usou-se o método do picnómetro, seguindo a norma NP 938:1988. Para tal pesou-se, precisamente, um picnómetro vazio de 50 cm³ de capacidade, em seguida pesou-se o mesmo cheio com água destilada e depois com amostra de gordura de aves.

A massa volúmica, expressa em g/cm³, foi calculada pela Equação 4:

$$\rho_t = \frac{m_2 - m_1 + A}{V_t} \quad (4)$$

Em que, m_2 é a massa do picnómetro com a amostra de gordura, em g, m_1 a massa do picnómetro vazio, em g, V_t o volume do picnómetro à temperatura de referência, em cm³, e A a impulsão aproximada, em g, sofrida no ambiente da balança pelo conteúdo do picnómetro dada pela expressão $A = 0,0012 \times (m_3 - m_1)$ (m_3 é a massa do picnómetro com água destilada, em g).

A capacidade do picnómetro, V_t , é dada pela Equação 5:

$$V_t = \frac{m_3 - m_1 + A}{\rho_{(H_2O)_t}} \quad (5)$$

Em que ρ_{H_2O} é a massa volúmica da água à temperatura de referência de 20 °C, em g/cm³.

2.1.5 Determinação do teor de água

O teor de água, expresso em percentagem mássica, determinou-se por titulação Karl Fischer, segundo a norma ISO 8534:1996.

Colocou-se solvente anídrico no vaso de reação do equipamento de Karl Fischer até o eletrodo ficar imerso. De seguida adicionou-se solvente de Karl Fischer até o equipamento indicar o ponto final da titulação. Pesou-se 5 a 20 g de amostra de gordura, adicionou-se ao vaso de reação e titulou-se com reagente de Karl Fischer até ao ponto final da titulação. Registou-se o volume de reagente de Karl Fischer gasto na titulação.

Calculou-se o teor de água pela Equação 6:

$$W = \frac{V \times \rho}{m} \times 100 \quad (6)$$

Em que W é o teor de água, em percentagem mássica, V o volume de reagente de Karl Fischer, em ml, ρ é a água equivalente de reagente de Karl Fischer, em g/ml, e m a massa de amostra, em g.

Na Figura 15, apresenta-se o equipamento utilizado para determinação do teor de água das amostras.



Figura 15: Equipamento usado para determinação do teor de água.

2.2 Esterificação química

Realizaram-se ensaios de esterificação química da gordura de aves utilizando-se como catalisador o ácido sulfúrico e como reagente o metanol. Foi usado o metanol porque este é mais reativo e menos higroscópico do que o etanol.

Numa primeira fase, determinou-se o índice de acidez inicial conforme descrito no subcapítulo 2.1.1. Em seguida calcularam-se as quantidades de H_2SO_4 e CH_3OH necessárias para a reação de esterificação ácida, conforme o índice de acidez inicial da gordura. Aqueceu-se a gordura de forma a homogeneizar as amostras. Pesou-se 5g de gordura, previamente homogeneizada, para os frascos de reação (12 frascos). De

seguida adicionou-se 0,5 ml de metanol (razão álcool:AGL de 1,1 m/m) e uma gota de ácido sulfúrico concentrado. Colocaram-se os frascos num banho termostático com agitação e previamente aquecido a 65 °C. Retiraram-se os frascos a tempos de reação diferentes (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 90 e 120 minutos) até perfazer o tempo de reação de 2 h.

Nas Figuras 16 e 17, estão representados os frascos de reação e o banho termostático utilizados nos ensaios de esterificação química.

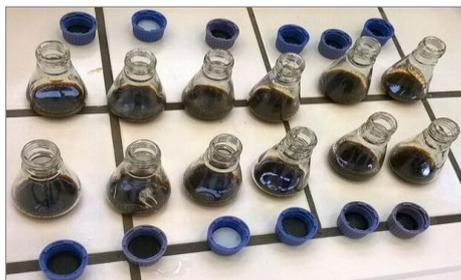


Figura 16: Frascos de reação utilizados na esterificação ácida.



Figura 17: Banho termostático usado para a realização da esterificação ácida.

Após a reação de esterificação ácida procedeu-se à separação de fases por decantação. Transferiu-se o conteúdo de cada frasco de reação para funis de decantação e realizaram-se lavagens com 100ml de água desionizada quente (cerca de 80 °C), deixou-se decantar e descartou-se a fase aquosa (metanol, ácido sulfúrico e água). Foram feitas sucessivas lavagens até a água de lavagem atingir um pH neutro. Verificou-se o pH da água de lavagem com papel indicador.

Na Figura 18, apresenta-se a montagem experimental da separação de fases por decantação.



Figura 18: Separação de fases por decantação.

Recolheu-se a fase pesada (gordura esterificada) para dois matrizes de 250 ml e pesou-se, rigorosamente, a massa colocada em cada um. De seguida determinou-se o

índice de acidez. Realizou-se este procedimento ao longo de todo o tempo de esterificação para as restantes amostras.

2.3 Esterificação enzimática

2.3.1 Escolha do catalisador enzimático

Testaram-se quatro enzimas diferentes: a Lipozyme RM IM, a Lipozyme CALB L, a Palatase 20000 L e a Novozyme 435, todas da *Novozymes*.

Na Tabela 6 descrevem-se algumas características das lipases estudadas, facultadas pelo fornecedor.

Tabela 6:Caraterísticas das lipases estudadas.

Enzima	Origem	Atividade*	pH ótimo	Temperatura ótima	Substrato específico
Lipozyme RM IM	<i>Rhizomucour Miehei</i>	275 IUN/g	7-10	30-50° C	Ésteres
Lipozyme CALB L	<i>Candida Antartica B</i>	5000 LU/g	5-9	30-60° C	Ésteres e álcoois
Palatase 20000L	<i>Rhizomucour Miehei</i>	20000 LU/g	7-10	30-50° C	Ésteres
Novozyme 435	<i>Candida Antartica B</i>	10000 PLU/g	5-9	30-60° C	Ésteres e álcoois

*LU=Unidade de lípase; PLU=Unidade de laurato propílico e IUN=Unidade de interesterificação (1PLU=1IUN=LU).

Realizaram-se quatro esterificações de modo a testar cada uma das enzimas escolhidas. Usou-se etanol absoluto como reagente e os ensaios realizaram-se a 45 °C, durante 180 minutos. Não foi usado o metanol porque as enzimas habitualmente desnaturam facilmente na presença deste álcool.

Primeiro estimaram-se as quantidades de catalisador e de reagente mínimas necessárias para a esterificação enzimática, de acordo com a atividade de cada uma das enzimas e com o índice de acidez inicial da gordura. Pesou-se 5 g de amostra, previamente homogeneizada, para os frascos de reação. De seguida adicionou-se 0,8

ml (razão álcool:AGL de 1,6 m/m) de etanol absoluto e as quantidades de catalisador enzimático mencionadas na Tabela 7.

Tabela 7: Quantidade de cada enzima necessária para a reação de esterificação.

Enzima	Razão enzima:gordura (m/m)
Lipozyme RM IM	0,205
Lipozyme CALB L	0,011
Palatase 20000 L	0,003
Novozyme 435	0,006

Colocaram-se os frascos de reação (2 frascos/esterificação) num banho termostático com agitação e previamente aquecido a 45 °C. Retiraram-se os frascos a dois tempos de esterificação diferentes, 90 e 180 minutos. Depois procedeu-se à separação de fases por decantação. Transferiu-se o conteúdo de cada frasco de reação para funis de decantação e realizaram-se três lavagens com 100 ml de água desionizada quente (cerca de 80 °C), deixou-se decantar e descartou-se a fase aquosa (etanol, enzima e água). Recolheu-se a fase pesada (gordura esterificada) para dois matrizes de 250 ml e pesou-se, rigorosamente, a massa colocada em cada um. Por fim determinou-se o índice de acidez da gordura esterificada.

2.3.2 Variação dos parâmetros de reação

Planearam-se as experiências de forma a variar cinco parâmetros: a temperatura de reação, a razão mássica álcool:AGL, a razão mássica catalisador:gordura, o tempo de reação e o tipo de álcool (Tabela 8). As condições de base são as estabelecidas na experiência 1. Para cada série de experiências fixaram-se quatro parâmetros com os valores das condições de base, variando-se apenas o parâmetro em estudo.

Na Tabela 8, apresenta-se o planeamento das experiências para o estudo dos parâmetros da esterificação enzimática.

Tabela 8:Planeamento experimental para estudo dos parâmetros da reação.

Experiência	Temperatura (°C)	Razão álcool:AGL (m/m)	Razão enzima:gordura (m/m)	Tempo (min)	Tipo de álcool
1	45	1,5	0,012	180	Etanol
2	35	1,5	0,012	180	Etanol
3	55	1,5	0,012	180	Etanol
4	45	1,6	0,012	180	Etanol
5	45	3,1	0,012	180	Etanol
6	45	1,5	0,024	180	Etanol
7	45	1,5	0,012	300	Etanol
8	45	1,5	0,012	180	Butanol

A massa de amostra de gordura usada em cada uma das experiências foi 10 g. Para levar a cabo as reações de esterificação utilizou-se um banho termostático com agitação magnética. Após a reação procedeu-se à separação de fases por decantação, às lavagens e à determinação do índice de acidez, como descrito nos subcapítulos 2.1.1 e 2.2.

Na Figura 19 está representada a montagem experimental do reator e dos funis de decantação.



Figura 19: Montagem experimental do reator e dos funis de decantação.

2.4 Modelo cinético

2.4.1 Cinética de 1ª ordem

Aplicou-se o modelo cinético de 1ª ordem ao sistema reacional estudado. O mecanismo reacional deste modelo é dado pelas seguintes equações:



A velocidade da reação é dada pela Equação 8:

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kC_A \quad (8)$$

Onde C_A é a concentração de ácido oleico e ésteres e k é a constante cinética da reação.

Integrando a Equação 8, obtém-se (Levenspiel, 1999):

$$-\ln \frac{C_A}{C_{A0}} = kt \quad (9)$$

2.4.2 Cinética de 2ª ordem

Aplicou-se o modelo cinético de 2ª ordem ao sistema reacional estudado. O mecanismo reacional deste modelo é dado pelas seguintes equações:



A velocidade da reação é dada pela Equação 11:

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kC_A^2 \quad (11)$$

Onde C_A é a concentração de ácido oleico e a concentração de etanol. Quando $C_A=C_B$ integrando a Equação 11, obtem-se:

$$\frac{1}{C_A} - \frac{1}{C_{A0}} = kt \quad (12)$$

Onde C_{A0} é as concentrações iniciais de ácido oleico e etanol (Levenspiel, 1999).

2.4.3 Energia de ativação

De modo a estudar a influência da temperatura na velocidade da reação analisou-se a dependência da temperatura segundo a lei de Arrhenius (Equações 13 e 14).

$$k = Ae^{\left[\frac{-\Delta E}{RT}\right]} \quad (13)$$

$$\ln k = \frac{-\Delta E}{RT} + \ln A \quad (14)$$

Onde k é a constante de cinética da reação, E é a energia de activação, A é o fator pré-exponencial, R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura da reação (Levenspiel, 1999).

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização da gordura

Caracterizou-se a gordura de aves em termos do índice de acidez, do índice de iodo, da viscosidade cinemática, da densidade e do teor de água conforme descrito no subcapítulo 2.1. Os valores destas propriedades encontram-se nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Características da gordura de aves.

Parâmetro	Amostra		
	1	2	3
Índice de iodo ($\text{gI}_2/100\text{g}_{\text{amostra}}$)	109	73	87
Viscosidade cinemática (mm^2/s)	36,67	39,87	38,66
Densidade (g/cm^3)	0,9187	0,9185	0,9237
Teor de água (%)	0,19	0,20	0,36

Quanto ao índice de iodo, sendo este a medida da insaturação química da gordura, seria de esperar que as amostras analisadas tivessem um índice de iodo elevado, tal como se verificou. Segundo Mittelbach (2004) o índice de iodo médio da gordura de aves é $75 \text{ gI}_2/100\text{g}_{\text{amostra}}$, valor próximo dos resultados obtidos neste trabalho.

Os valores da viscosidade cinemática e da densidade das amostras são igualmente elevados, pois dependem da quantidade e da natureza das insaturações presentes na gordura, do teor de AGL e de impurezas resultantes do seu processo de obtenção.

Quanto ao teor de humidade verificaram-se valores baixos o que era de esperar pois uma das principais características das gorduras é serem hidrofóbicas. Para além disso, no decorrer do seu processo de obtenção é eliminada toda a água presente nos subprodutos.

Tabela 10: Valores do IA das amostras de gordura.

Amostra	Data	Índice de acidez ($\text{mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{amostra}}$)
1	16/10/2015	3,3
	18/11/2015	4,1
2	7/12/2015	5,7
	15/12/2015	6,3
	16/12/2015	6,1
3	17/12/2015	6,1
	18/12/2015	6,3

Verifica-se que o índice de acidez das amostras, principalmente da amostra recolhida no mês de setembro (amostra 3), é elevado tendo em conta que as gorduras resultaram de subprodutos que foram tratados com antioxidantes que impedem e inibem a formação de AGL. Além dos fatores inerentes ao processamento dos subprodutos de aves (temperatura, humidade e exposição à luz e ao oxigénio), também o tempo de armazenamento é um fator a ser considerado. Pela análise da Tabela 10 pode-se comprovar que o IA varia ao longo do tempo de armazenamento das amostras de gordura. Quanto mais tempo os subprodutos e as gorduras resultantes estiverem armazenados maior é a probabilidade de o índice de acidez aumentar.

3.2 Esterificação química

Realizou-se a esterificação ácida da amostra de gordura com menor índice de acidez ($3,3 \text{ mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{amostra}}$) com ácido sulfúrico e metanol, a 65°C . Os resultados da variação do índice de acidez da gordura ao longo do tempo de reação de 2 horas apresentam-se na Figura 20.

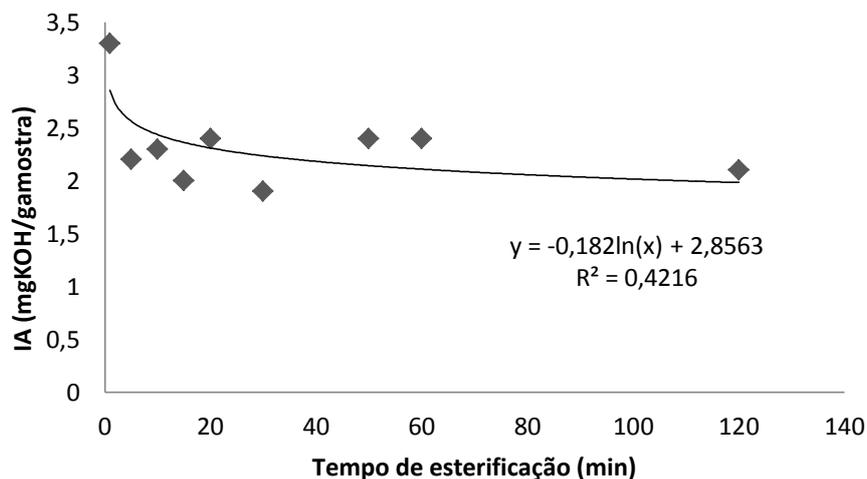


Figura 20: índice de acidez em função do tempo de reação.

A esterificação ácida da gordura de aves permitiu uma redução do índice de acidez da gordura de 36 %. Através da análise da Figura 20 verifica-se que a partir do tempo de esterificação de 30 minutos a variação do IA não é significativa. Tal pode ser explicado pela inibição da reação devido à formação de água durante a esterificação. Embora a reação de esterificação ácida seja rápida exige muitas lavagens finais para remoção de todo o metanol e ácido sulfúrico presentes na gordura esterificada. Caso estas lavagens não sejam eficientes os vestígios de ácido sulfúrico influenciam o IA dos ensaios.

3.3 Esterificação enzimática

3.3.1 Escolha do catalisador enzimático

Para a escolha da enzima mais eficiente na redução do índice de acidez da gordura de aves realizaram-se esterificações com quatro enzimas: Lipozyme RM IM, Novozyme 435, Palatase 20000 L e Lipozyme CALB L. As reações realizaram-se a 45 °C, com etanol absoluto (razão mássica álcool:AGL 1,5 m/m).

Na Figura 21, expõem-se os resultados da variação do índice de acidez ao longo do tempo de esterificação de 3 horas, para as quatro enzimas testadas.

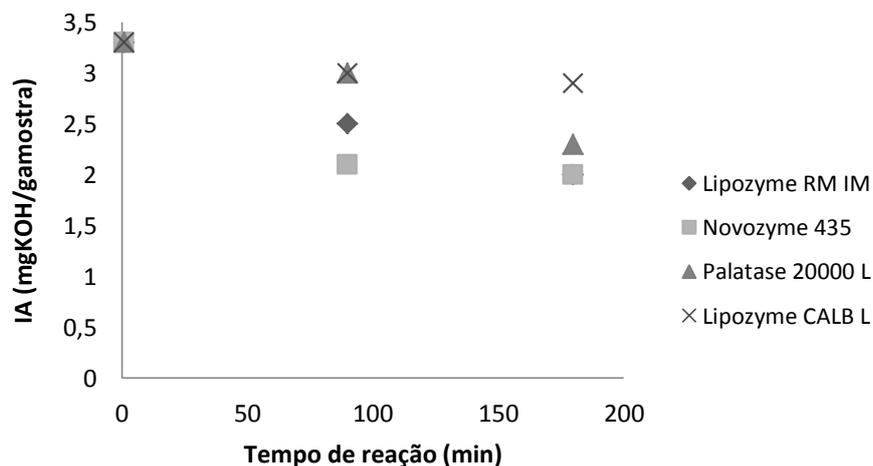


Figura 21: Índice de acidez em função do tempo de reação para diversas enzimas.

Na Tabela 11, apresentam-se os valores de redução do IA conseguidos, por esterificação, para cada uma das enzimas testadas.

Tabela 11: Redução do IA para cada uma das enzimas testadas.

Enzima	Redução IA-2h (%)	Redução IA-3h (%)
Lipozyme RM IM	24	39
Novozyme 435	36	39
Palatase 20000L	9	30
Lipozyme CALB L	9	12

A partir da análise da Figura 21 e da Tabela 11 conclui-se que as enzimas que permitem obter maior diminuição do índice de acidez da gordura de aves são a Lipozyme RM IM e a Novozyme 435. No entanto, analisando a redução do IA no tempo de esterificação de 90 minutos verifica-se que a enzima Novozyme 435 é a mais eficiente.

Com base nestes resultados escolheu-se a enzima Novozyme 435 para a realização dos ensaios de estudo dos parâmetros da esterificação enzimática. Os parâmetros estudados foram: a temperatura, a razão mássica álcool:gordura, a razão mássica enzima:gordura, o tempo de reação e o tipo de álcool.

3.3.2 Efeito da temperatura

Realizaram-se esterificações enzimáticas com a enzima Novozyme 435 e etanol absoluto a três temperaturas diferentes, dentro do intervalo de temperatura considerado ótimo para a enzima (30-60 °C).

Na Figura 22, apresentam-se os resultados da variação do índice de acidez ao longo do tempo de esterificação de 3 horas, razão mássica álcool:AGL de 1,5 m/m e razão mássica enzima:gordura de 0,012 m/m, às temperaturas de 35, 45 e 55 °C, respetivamente.

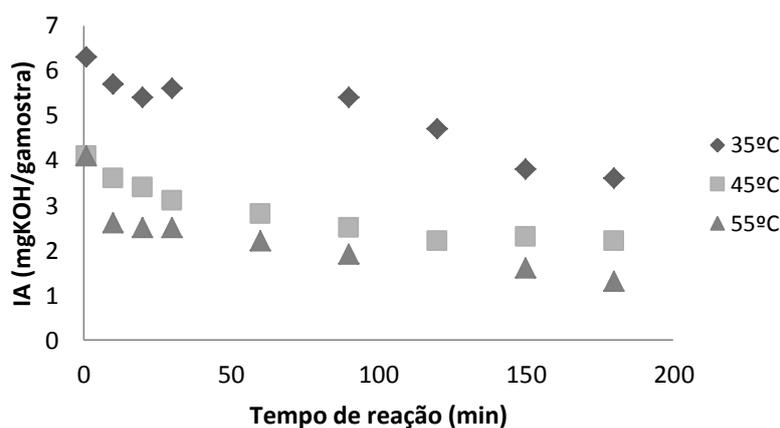


Figura 22:Variação do IA em função do tempo de reação.

Na Tabela 12, expõem-se os valores de redução do IA obtidos para cada uma das temperaturas estudadas.

Tabela 12:Redução do IA para cada uma das temperaturas estudadas.

Temperatura (°C)	Redução IA (%)
35	43
45	46
55	68

Verifica-se uma maior redução do IA para a esterificação enzimática realizada à temperatura de 55 °C. A esta temperatura não só a conversão de AGL em ésteres é mais eficiente como a velocidade desta conversão é superior. Portanto, até a um

determinado limite (60 °C), quanto mais elevada for a temperatura, maior é a quantidade de produto formado em menos tempo. Isto acontece porque o aumento da temperatura permite que as moléculas se movam mais rapidamente e com mais energia, causando mais colisões e, conseqüentemente, o aumento da velocidade da reação.

3.3.3 Efeito da razão mássica álcool:AGL

De modo a testar o efeito da razão mássica álcool:AGL efetuaram-se esterificações enzimáticas com a enzima Novozyme 435 à temperatura de 45 °C e razão mássica enzima:gordura de 0,012m/m. As razões mássicas álcool:AGL testadas foram: 1,5; 1,6 e 3,1 m/m.

Na Figura 23, estão representados os resultados da variação do índice de acidez ao longo do tempo de esterificação de 3 horas, com as razões mássicas álcool:AGL 1,5;1,6 e 3,1 m/m.

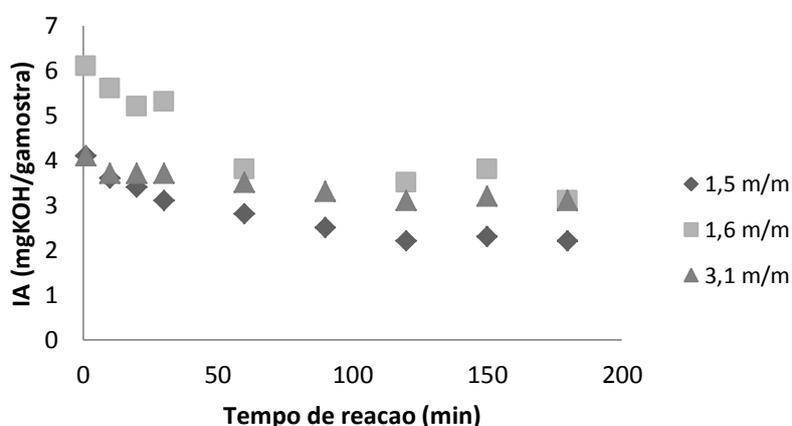


Figura 23: Variação do IA em função do tempo de reação.

Na Tabela 13, encontram-se os valores de redução do IA obtidos para cada uma das razões mássicas álcool:AGL estudadas.

Tabela 13: Redução do IA para cada uma das razões mássicas álcool:AGL estudadas.

Razão álcool:AGL (m/m)	Redução IA (%)
1,5	46
1,6	49
3,1	24

Analisando os resultados obtidos verifica-se que a redução da acidez no tempo é mais lenta para maiores quantidades de etanol. Pode constatar-se também que é para a razão mássica álcool:AGL de 1,6 m/m que a redução do IA da gordura é mais elevada. A reação de esterificação é muito sensível à quantidade de etanol tornando-se difícil encontrar uma razão molar ótima que permita obter elevadas conversões de AGL em ésteres.

3.3.4 Efeito da razão mássica enzima:gordura

De forma a testar o efeito da razão mássica enzima:gordura efetuaram-se esterificações enzimáticas com a enzima Novozyme 435, à temperatura de 45 °C e razão mássica álcool:AGL de 1,5 m/m. Foi testada a razão mássica enzima:gordura mínima necessária para a esterificação enzimática, 0,012 m/m, e o dobro desta razão (0,024 m/m).

Na Figura 24, são apresentados os resultados da variação do índice de acidez ao longo do tempo de esterificação de 3 horas, com as razões mássicas enzima:gordura 0,012 e 0,024 m/m.

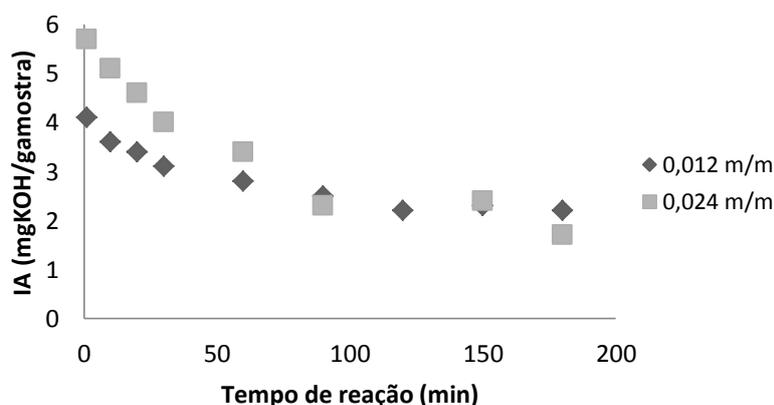


Figura 24: Variação do IA com o tempo de reação.

Na Tabela 14, apresentam-se os valores de redução do IA obtidos para cada uma das razões mássicas enzima:gordura estudadas.

Tabela 14: Redução do IA para cada uma das razões mássicas enzima:gordura estudadas.

Razão enzima:gordura (m/m)	Redução IA (%)
0,012	46
0,024	70

Das análises da Figura 24 e da Tabela 14 pode-se concluir que a razão mássica enzima:gordura que reduz mais o IA da gordura de aves é 0,024 m/m. Isto é, o dobro da razão mássica enzima:gordura mínima necessária para que a reação de esterificação ocorra, permite a obtenção de valores de IA mais baixos.

A razão mássica enzima:gordura foi o parâmetro que permitiu uma maior redução do IA.

3.3.5 Efeito do tempo de reação

De modo a testar o efeito do parâmetro tempo de reação realizaram-se ensaios de esterificação com a enzima Novozyme 435 durante o tempo de reação de 5 horas, razão mássica álcool:AGL de 1,5 m/m, razão mássica enzima:gordura de 0,012 m/m e a 45 °C.

Para o tempo de reação de 5 horas conseguiu-se uma redução do IA de 64 %. Este resultado é semelhante aos obtidos nas restantes esterificações realizadas com um tempo de reação de 3 horas. Em todos os ensaios de esterificação realizados verificou-se que a partir do tempo de esterificação de 2 horas a redução do IA não é significativa.

3.3.6 Efeito do tipo de álcool

Efetuarão-se ensaios experimentais com butanol, a 45 °C durante o tempo de esterificação de 3 h, com razão mássica álcool:AGL de 2,6 m/m e razão mássica enzima:gordura de 0,012 m/m. Na Figura 25 podem observar-se os resultados da

variação do IA em função do tempo de reação, para os dois álcoois testados nas mesmas condições de reação.

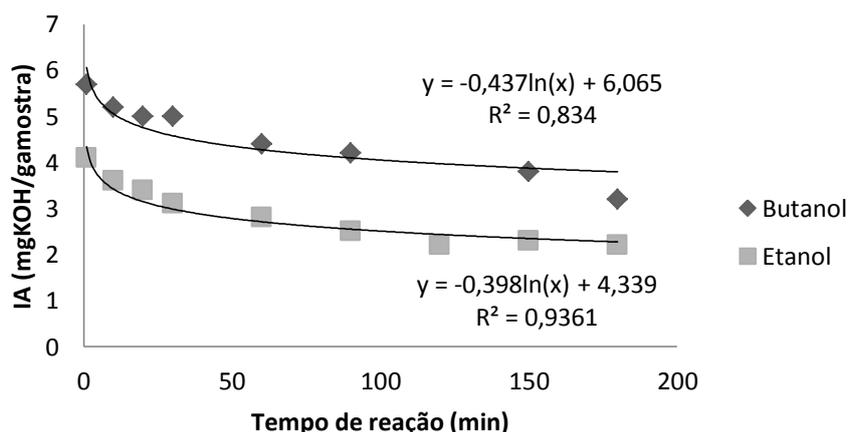


Figura 25: Variação do IA em função do tempo de reação.

Os ensaios realizados com butanol permitiram uma redução do IA da gordura de aves de 44 %. Como esperado o etanol é mais eficiente na redução do IA da gordura (46 %) do que o butanol. Tal pode ser explicado pelo facto de o butanol ter uma cadeia carbónica mais comprida que o etanol. Sabe-se que a atividade do álcool diminui com o aumento da cadeia carbónica, devido à diminuição da polaridade, o que reduz a atividade da molécula e a conversão de AGL em ésteres. Além disso, o etanol apresenta a vantagem de ser menos tóxico para a enzima que o butanol.

3.3.7 Ensaio nas melhores condições

Após a análise dos resultados obtidos de cada uma das variações dos parâmetros de reação, realizaram-se ensaios de esterificação tendo em conta os melhores resultados obtidos em cada uma das variações. Consideraram-se como melhores condições de reação os valores presentes na Tabela 15.

Tabela 15: Melhores condições de reação.

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	55
Razão álcool:AGL (m/m)	1,6
Razão enzima:gordura (m/m)	0,024
Tempo de reação (min)	120
Tipo de álcool	Etanol

Na Figura 26, podem observar-se os resultados da variação do IA em função do tempo de esterificação.

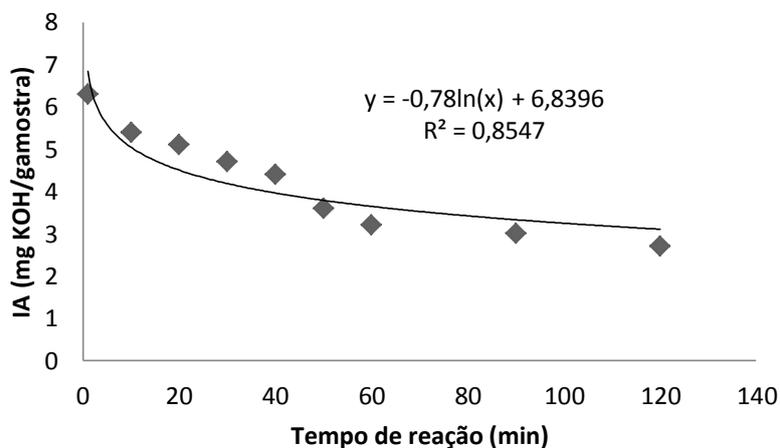


Figura 26:Variação do IA em função do tempo de reação.

Com os ensaios de esterificação realizados para as melhores condições consideradas reduziu-se o IA em 57 %. Este valor é inferior aos resultados obtidos nos ensaios realizados para a variação da temperatura a 55 °C (68 %) e para a variação da razão enzima:gordura 0,024 m/m (70 %). Tal pode ser justificado pelo facto de a amostra utilizada para testar os parâmetros nas melhores condições obtidas (amostra 3 da Tabela 5) ter mais impurezas que a amostra usada nos ensaios realizados para as variações dos parâmetros de reação (amostra 2 da Tabela 5).

3.4 Validação do modelo cinético

Tendo sido utilizadas enzimas como catalisador da reação de esterificação, testou-se a cinética de Michaelis-Menten simples mas, esta não representou bem os resultados conseguidos. Assim, aplicaram-se as cinéticas de ordem 1 e 2 aos resultados obtidos das variações dos parâmetros da reação e aos ensaios realizados nas melhores condições (Anexo 2).

Na Figura 27, apresentam-se os resultados da cinética de 1ª ordem para o ensaio nas melhores condições.

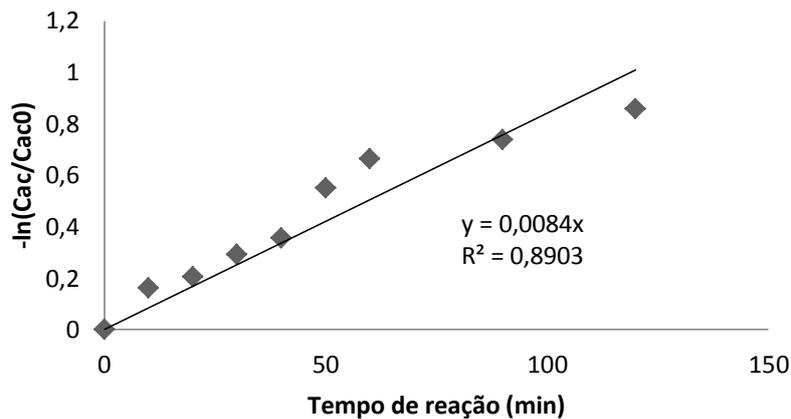


Figura 27: Cinética de 1ª ordem para o ensaio nas melhores condições.

Na Figura 28, podem observar-se os resultados da cinética de 2ª ordem para o ensaio nas melhores condições.

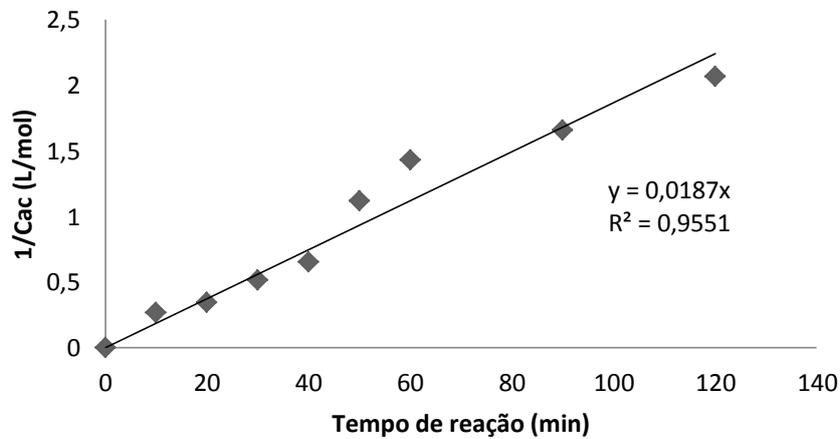


Figura 28: Cinética de 2ª ordem para o ensaio nas melhores condições.

Analisando as Figuras 27 e 28 verifica-se que a cinética que melhor representa os resultados experimentais obtidos é a cinética de 2ª ordem. Realizou-se a análise estatística de modo a confirmar estes resultados, e obteve-se um F de significância de 3×10^{-5} para o modelo cinético de 1ª ordem, e de 4×10^{-6} para o modelo cinético de 2ª ordem. Quanto menor é o F de significância melhor é o ajuste linear dos resultados (Anexo 3).

Na Tabela 16 encontram-se os valores das constantes cinéticas obtidas a partir dos modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem.

Tabela 16: Valores de k para cinética de 1ª e 2ª ordem.

Experiência	$k_{1^{\text{ª}} \text{ ordem}} (\text{min}^{-1})$	$k_{2^{\text{ª}} \text{ ordem}} (\text{L/mol.min})$
1	0,0050	0,0990
2	0,0107	0,0274
3	0,0062	0,1412
4	0,0037	0,0076
5	0,0018	0,0063
6	0,0068	0,0127
8	0,0032	0,0061
Melhores condições	0,0082	0,0182

3.5 Determinação da energia de ativação da reação

Determinou-se a energia de ativação da reação (E) considerando que a reação é de 2ª ordem.

Na Figura 29, estão representados graficamente os valores experimentais e teóricos de $\ln(k)$ em função de $1/T$.

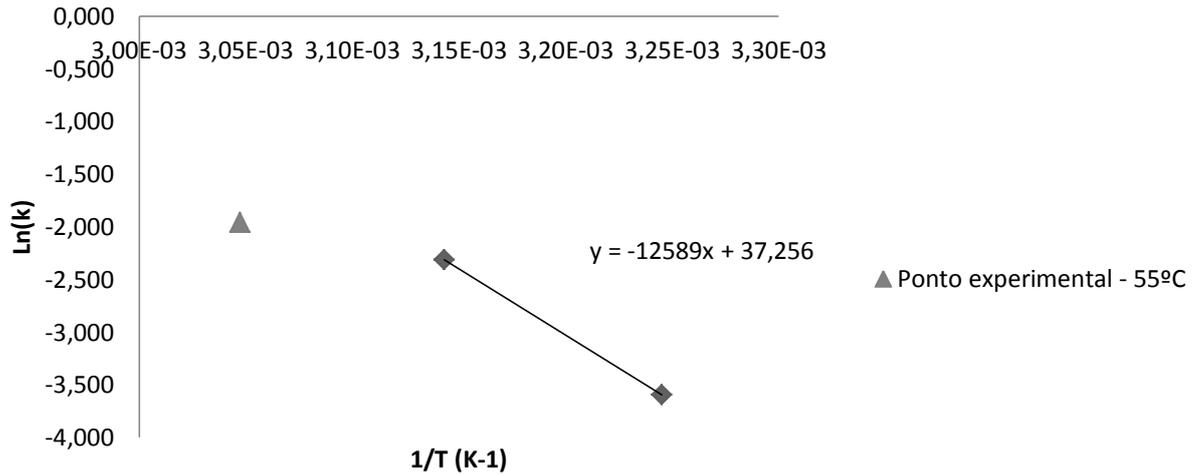


Figura 29: Valores experimentais e ajuste de $\ln(k)$ em função de $1/T$.

Da análise da Figura 29 verifica-se que o valor previsto para a temperatura de 55 °C é superior ao obtido experimentalmente. Tal pode ser justificado pela ocorrência de erros experimentais ou ser um efeito da perda de eficácia da enzima (desnaturação). Esta perda de eficácia da enzima não foi notada nos ensaios da experiência 3 (onde se variou apenas a temperatura da reação), pois foi à temperatura de 55 °C que se verificou a maior redução do IA. O facto de a enzima ser imobilizada num suporte físico, que a impede de mudar de conformação, torna menos evidente a sua desnaturação. Já nos ensaios realizados nas melhores condições obteve-se uma redução do IA de 57 % ,valor inferior ao obtido nos ensaios realizados à temperatura a 55 °C (68 %) e com a razão mássica enzima:gordura de 0,024 m/m (70 %) o que indica que 55 °C poderá não ser a melhor temperatura da reação. Da análise dos resultados obtidos para o valor de k e da sua relação com a temperatura patentes na Figura 29, conclui-se que a temperatura ótima da reação deverá estar entre 45 e 55 °C.

Determinou-se a energia de ativação (E) e o fator pré-exponencial (A) da reação a partir das regressões lineares representadas na Figura 29. Os valores de E e A experimentais foram obtidos considerando-se apenas as duas temperaturas mais baixas (35 e 45 °C), de modo a não contabilizar o efeito da temperatura numa enzima, possivelmente, parcialmente desnaturada.

Na Tabela 17 encontram-se os valores experimentais e teóricos da E e do A .

Tabela 17: Valores da energia de activação, E , e do fator pré-exponencial, A , experimentais e teóricos.

	E (cal/mol)	A (L/mol.min)
Experimental	25014	$1,5 \times 10^{16}$
Teórico	25696	$1,2 \times 10^{16}$

Embora pela análise dos valores da E se verifique que os valores experimentais são próximos dos teóricos, o erro associado à determinação da energia de ativação considerando apenas duas temperaturas é potencialmente elevado.

4. Conclusões

Após a concretização do trabalho sobre a redução da acidez de gorduras provenientes da transformação de subprodutos de aves chegou-se às seguintes conclusões:

- A esterificação enzimática é um método eficaz para a redução da acidez da gordura de aves, pois é menos sensível à presença de água na gordura do que a esterificação química. Além disso, são utilizadas temperaturas mais baixas, o que permite manter as propriedades nutricionais da gordura e reduzir os custos do seu processo de purificação.
- A enzima Novozyme 435 é um catalisador eficiente na redução da acidez da gordura de aves, tendo a vantagem de ser uma enzima imobilizada o que potencialmente permite a sua reutilização (5-10 vezes), sem perda de atividade.
- A reação de esterificação é muito sensível à razão álcool:AGL, em particular até ao valor 1,6 m/m.
- Da gama de valores para os parâmetros estudados as melhores condições para a reação de esterificação enzimática com a enzima Novozyme 435 são uma temperatura entre 45 °C e 55 °C, razão álcool:AGL de 1,6 m/m, razão enzima:gordura de 0,024 m/m, tempo de reação de 2 horas e tipo de álcool o etanol. Com estas condições consegue-se uma redução do IA mínima de 57 %.
- O modelo cinético que melhor se ajusta aos resultados obtidos é o de 2^a ordem, que para além disso é mais simples do que o modelo cinético de Michaelis-Menten.
- A energia de ativação obtida para a reação de esterificação com cinética de 2^a ordem foi 25014 cal/mol.

Considerações a ter em conta em trabalhos futuros:

- Realização de ensaios de esterificação enzimática com a enzima Novozyme 435, a temperaturas compreendidas entre 45 e 55 °C, de forma a determinar a temperatura ótima da reação.
- Estudo do efeito de inibição da água (produto secundário) na reação de esterificação enzimática.
- Otimização das razões álcool:AGL e enzima:gordura.
- Teste de outras lípases, não testadas neste trabalho.
- Utilização de outro álcool, como por exemplo o álcool isopropílico ou um co-solvente.
- Estudo do mecanismo e possibilidade de reutilização da enzima.
- Teste das condições ótimas da reação de esterificação à escala piloto industrial.
- Estudo e teste de outros métodos de redução de acidez, nomeadamente a neutralização com uma base (p.ex. NaOH e KOH), extração de AGL com álcool e filtração por membranas.

5. Referências bibliográficas

Alves, A.A., Talita, B. & Pacheco, G. Síntese do biodiesel a partir de óleo residual através da esterificação homogênea dos ácidos graxos livres e transesterificação alcalina. Trabalho de conclusão de curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil, 2014.

Anônimo, A rancidez oxidativa em alimentos. *Aditivos e Ingredientes*, 72, pp.31-37, Agosto 2010. Acedido em 7/12/2015 em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/209.pdf.

Aranda, D.A.G., Santos, R.T.P., Tapanes, N.C.O., Ramos, A.L.D., & Antunes, O.A.C. Acid-catalyzed homogeneous esterification reaction for biodiesel production from palm fatty acids. *Catalysis Letters*, 122(1), 20-25, 2008.

Bellaver, C. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos proteicos de origem animal, Conferência APINCO, Santos-SP, Brasil, 2004.

Bradesco. Carne Avícola. Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos-DEPEC, Novembro 2012.

O'Brien, R.D. *Fats and oils - Formulating and processing for applications*. 2nd ed. CRC Press LLC, Florida, 2004.

Canakci, M., & Gerpen, J. Van. Biodiesel production via acid catalysis. *Transactions of the ASAE (American Society of Agricultural Engineers)*, 42(5), 1203-1210, 1999.

Ciftci, O.N., Ciftci, D. & Jenab, E. Potential applications of green technologies in olive oil industry. Universidade de Alberta, Canada, 2011.

Hayes, D. G. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(12), 1077-1103, 2004.

I.N.E. Boletim Mensal da Agricultura e Pescas. ISSN-1647-1040, Agosto 2015.

Leão, L.S. Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido níobico. p.97. Tese de mestrado. Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, 2009.

Lewandowski, C.M. *Advances in food and nutrition research*. Volume 33. Academic Press, INC, New York, 1989.

Levenspiel, O. *Chemical Reaction Engineering*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Estados Unidos da América, 1999.

Makasci, K., Arisoy, K., & Telefoncu, A. Deacidification of high acid olive oil by immobilised lipase. *Turkish Journal of Chemistry*, 20(3), 258-264, 1996.

Misra, G. & Nandi, S. Enzymatic deacidification of rice bran oil containing high free fatty acids with recycling, *Che Sci Rev Lett.*, 2(5), 376-381, 2014.

Mittelbach, M.; Remschmidt, C. *Biodiesel: the comprehensive handbook*. Martin

Mittelbach, 1º ed.,Graz, 2004.

Moreira, A.L.V. Produção de biodiesel a partir de gordura de frango. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto-FEUP, Março 2009.

Moura, A. do P. Identificação e rastreabilidade de produtos de origem animal ao longo da cadeia alimentar. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciência Abel Salazar-ICBAS, Porto, 2010.

Novozymes Biopharma. Enzymes for Biocatalysis, 2016.

Peng, B.-X., Shu, Q., Wang, J.-F., Wang, G.-R., Wang, D.-Z., & Han, M.-H. Biodiesel production from waste oil feedstocks by solid acid catalysis. *Process Safety and Environmental Protection*, 86(6), 441-447, 2008.

Pupa, J. M. R. Óleos e gorduras na alimentação de aves e suínos. *Revista Eletrônica Nutritime*, 1(1), 69-73, 2004.

Ramalho, H. F. & Suarez, P. A. Z. The Chemistry of Oils and Fats and their Extraction and Refining Processes. *Revista Virtual de Química*, 5 (1), 2-15, 2013.

Ramos, L. P., Silva, F. R., Mangrich, A. S., & Cordeiro, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Revista Virtual de Química*, 3(5), 385-405, 2011.

Richetti, A. Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Março 2009.

Rohman, A., Triyana, K., Sismindari, & Erwanto, Y. Differentiation of lard and other animal fats based on triacylglycerols composition and principal component analysis. *International Food Research Journal*, 19(2): 475-479, 2012.

Rosset,I. Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação. Dissertação de Mestrado em Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Scrimgeour, C. Chemistry of Fatty Acids. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 1-43. Sixth edition. 2005.

Silva, F. A M., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. *Quimica Nova*, vol.22, n.1, pp. 94-103. ISSN 1678-7064, 1999.

Skrbic, B., Predojevic, Z. & Urisic-Mladenovic, N. Esterification of sludge palm oil as a pretreatment step for biodiesel production. *Waste Management & Research*, 33(8), 723-729, 2015.

Soumanoo, M. M.; Bornscheuer, U.T.; Improvement in lipase-catalyzed synthesis of

fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microbiology Technology*, v.33, n.1, 97-103, 2003.

Torres, P. M. F. Utilização de resíduos do sector avícola para a produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado em Energia e Bioenergia. Faculdade de Ciências e Tecnologias-FCT, Lisboa, 2011.

Venturini, K., Sarcinelli, M. & SILVA, L. Características da carne de frango. *Boletim técnico*, 1, p.7. Universidade Federal de Espírito Santo-UFES, Brasil, 2007.

Vilela, L. Valorização de Óleos de Peixe para a Produção de Biodiesel. Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2010.

Anexo 1

Esterificação química

Calcularam-se as quantidades de H_2SO_4 e CH_3OH necessárias para a reação de esterificação ácida, conforme o índice de acidez inicial da gordura.

Determinação da quantidade de metanol:

A razão metanol:AGL usada foi 2,25 gmetanol/gAGL (Vilela, 2010).

$$\% \text{ Acidez} = \frac{IA}{1,99} \leftrightarrow \% \text{ Acidez} = \frac{3,3}{1,99} \leftrightarrow \% \text{ Acidez} = 1,6\%$$

$$m_{MeOH} = 2,25 \times \frac{m_{amostra} \times \% \text{ Acidez}}{m_{gordura}} \leftrightarrow m_{MeOH} = 2,25 \times \frac{10 \times 1,6}{100} \leftrightarrow m_{MeOH} = 0,36g$$

$$V_{MeOH} = \frac{m_{MeOH}}{\rho_{MeOH}} \leftrightarrow V_{MeOH} = \frac{0,36}{0,790} \leftrightarrow V_{MeOH} = 0,5ml$$

Determinação da razão metanol:AGL:

$$\text{Razão MeOH: AGL} = \frac{m_{MeOH} \times \frac{100}{10}}{IA} \leftrightarrow \text{Razão MeOH: AGL} = \frac{0,36 \times \frac{100}{10}}{3,3}$$

$$\leftrightarrow \text{Razão MeOH: AGL} = 1,1 \text{ m/m}$$

Determinação da quantidade de ácido sulfúrico:

A razão metanol:AGL usada foi 0,05 g H_2SO_4 /gAGL (Vilela, 2010).

$$m_{H_2SO_4} = 0,05 \times \frac{m_{amostra} \times \% \text{ Acidez}}{m_{gordura}} \leftrightarrow m_{H_2SO_4} = 0,05 \times \frac{10 \times 1,6}{100} \leftrightarrow m_{H_2SO_4}$$

$$= 8 \times 10^{-3}g$$

$$V_{H_2SO_4} = \frac{m_{H_2SO_4}}{\rho_{H_2SO_4}} \leftrightarrow V_{H_2SO_4} = \frac{8 \times 10^{-3}}{1,84} \leftrightarrow V_{H_2SO_4} = 4,35 \times 10^{-3}ml$$

Para todos os ensaios de esterificação realizados calculou-se a percentagem de redução do índice de acidez.

Exemplo de cálculo da percentagem de redução do IA:

$$\% \text{ Redução IA} = \frac{(IA_0 - IA)}{IA_0} \times 100$$

$$\% \text{ Redução IA} = \frac{(3,3 - 2,1)}{3,3} \times 100 \leftrightarrow \% \text{ Redução IA} = 36\%$$

Escolha do catalisador enzimático

Calculou-se a quantidade de etanol necessária para a reação de esterificação enzimática, conforme o índice de acidez inicial da gordura estudada.

Determinação da quantidade de etanol:

A razão etanol:AGL usada foi 2,25 g etanol/gAGL (Vilela, 2010)

$$m_{EtOH} = 2,25 \times \frac{M_{EtOH}}{M_{MeOH}} \times \frac{m_{amostra} \times \% \text{ Acidez}}{m_{gordura}} \leftrightarrow m_{EtOH} = 2,25 \times \frac{46,06}{32,04} \times \frac{10 \times 2,1}{100}$$

$$\leftrightarrow m_{EtOH} = 0,67g$$

$$V_{EtOH} = \frac{m_{EtOH}}{\rho_{EtOH}} \leftrightarrow V_{H_2SO_4} = \frac{0,67}{0,789} \leftrightarrow V_{H_2SO_4} = 0,8ml$$

Determinação da razão etanol:AGL:

$$\text{Razão EtOH:AGL} = \frac{m_{EtOH} \times \frac{100}{10}}{IA} \leftrightarrow \text{Razão EtOH:AGL} = \frac{0,67 \times \frac{100}{10}}{4,1}$$

$$\leftrightarrow \text{Razão EtOH:AGL} = 1,5 \text{ m/m}$$

Esterificação enzimática

Na experiência 1 pretendeu-se estudar o efeito da temperatura de 45 °C na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, razão etanol:AGL de 1,5 m/m e razão enzima:gordura de 0,012 m/m. Na Figura 30 apresentam-se os resultados obtidos para a temperatura de 45 °C.

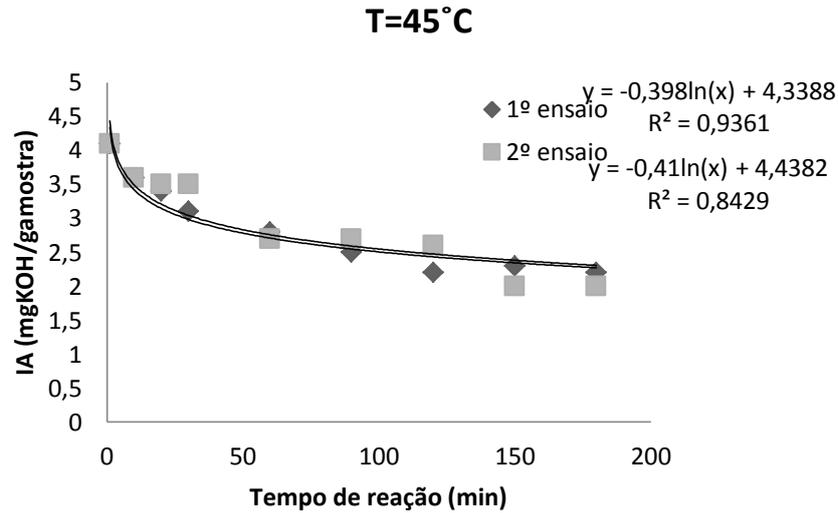


Figura 30: IA em função do tempo de reação (experiência 1).

Na experiência 2 pretendeu-se estudar o efeito da temperatura de 35 °C na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, razão etanol:AGL de 1,5 m/m e razão enzima:gordura de 0,012 m/m. Na Figura 31 apresentam-se os resultados obtidos para a temperatura de 35 °C.

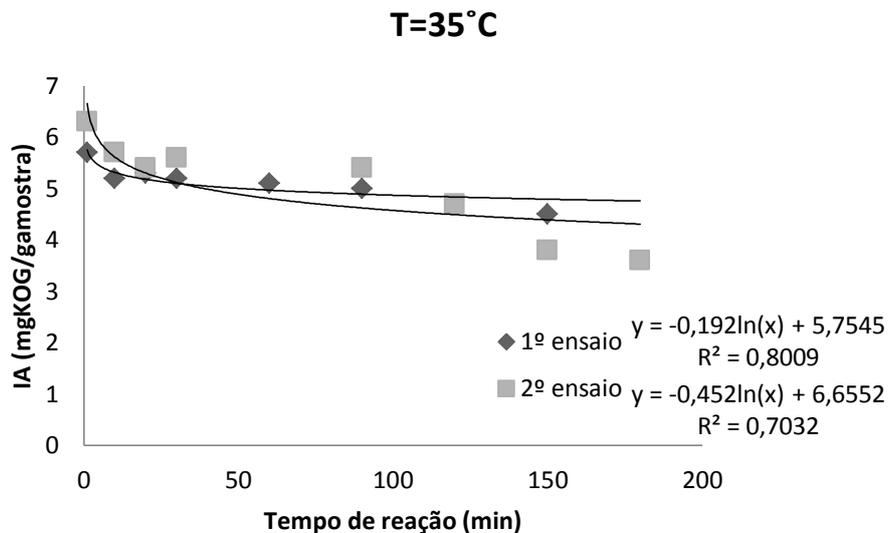


Figura 31: IA em função do tempo de reação (experiência 2).

Na experiência 3 pretendeu-se estudar o efeito da temperatura de 55 °C na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, razão etanol:AGL de 1,5 m/m e

razão enzima:gordura de 0,012 m/m. Na Figura 32 apresentam-se os resultados obtidos para a temperatura de 55 °C.

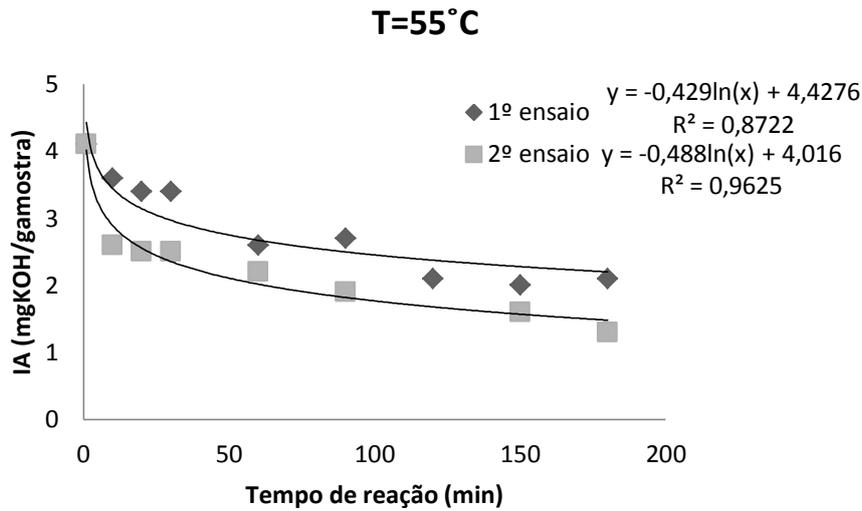


Figura 32: IA em função do tempo de reação (experiência 3).

Com a experiência 4 pretendeu-se estudar o efeito da razão álcool:AGL de 1,6 m/m na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, com a razão enzima:gordura de 0,012 m/m e à temperatura de 45 °C. Na Figura 33 apresentam-se os resultados obtidos para a razão álcool:AGL de 1,6 m/m.

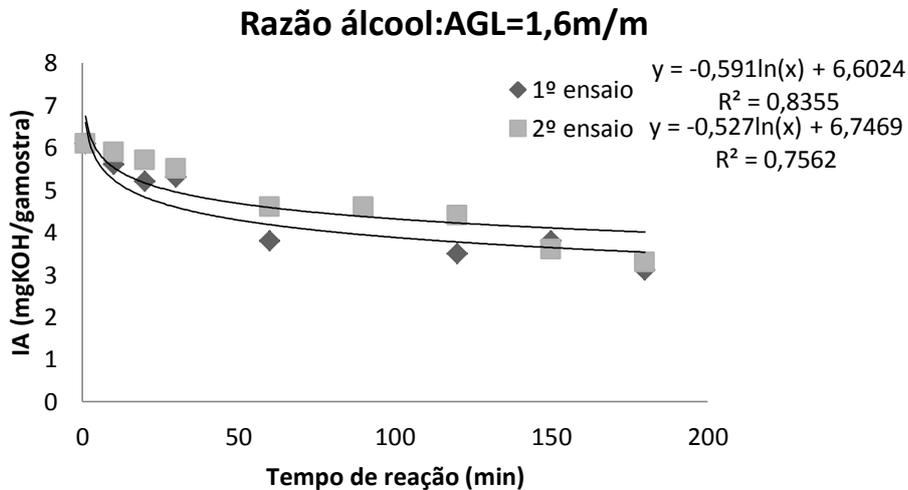


Figura 33: IA em função do tempo de reação (experiência 4).

Com a experiência 5 pretendeu-se estudar o efeito da razão álcool:AGL de 3,1 m/m na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, com a razão enzima:gordura de 0,012 m/m e à temperatura de 45 °C. Na Figura 34 apresentam-se os resultados obtidos para a razão álcool:AGL de 3,1 m/m.

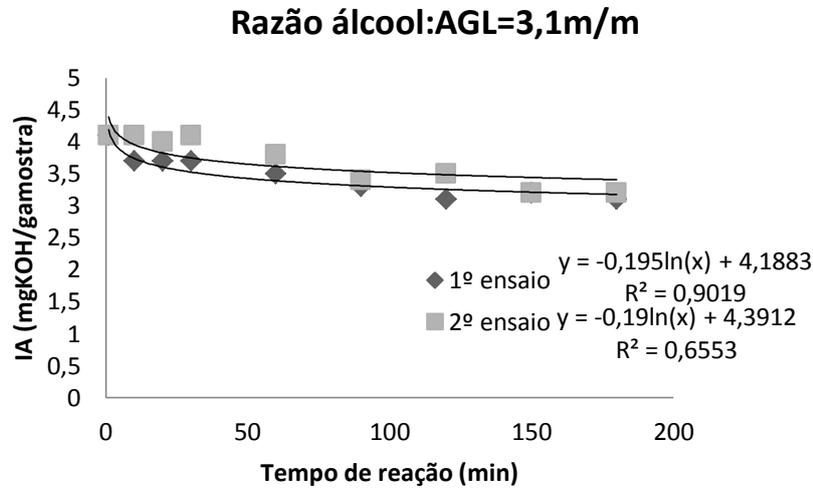


Figura 34: IA em função do tempo de reação (experiência 5).

Na experiência 6 pretendeu-se estudar o efeito da razão enzima:gordura de 0,024 m/m na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, com a razão etanol:AGL de 1,5 m/m e à temperatura de 45 °C. Na Figura 35 apresentam-se os resultados obtidos para a razão enzima:gordura de 0,024 m/m.

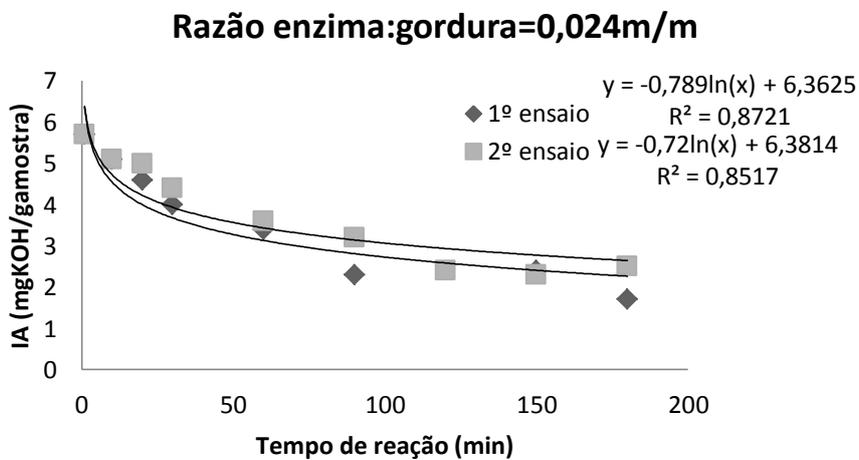


Figura 35: IA em função do tempo de reação (experiência 6).

Calculou-se a quantidade de butanol necessária para a reação de esterificação enzimática, conforme o índice de acidez inicial da gordura estudada.

Determinação da quantidade de butanol:

A razão butanol:AGL usada foi 2,25 gmetanol/gAGL (Vilela, 2010).

$$\% \text{ Acidez} = \frac{IA}{1,99} \leftrightarrow \% \text{ Acidez} = \frac{5,7}{1,99} \leftrightarrow \% \text{ Acidez} = 2,9\%$$

$$m_{butanol} = 2,25 \times \frac{M_{butanol}}{M_{MeOH}} \times \frac{m_{amostra} \times \% \text{ Acidez}}{m_{gordura}} \leftrightarrow m_{butanol}$$

$$= 2,25 \times \frac{74,12}{32,04} \times \frac{10 \times 2,9}{100} \leftrightarrow m_{butanol} = 1,5g$$

$$V_{butanol} = \frac{m_{butanol}}{\rho_{butanol}} \leftrightarrow V_{butanol} = \frac{1,5}{0,810} \leftrightarrow V_{butanol} = 1,8ml$$

Determinação da razão butanol:AGL:

$$\text{Razão butanol: AGL} = \frac{m_{butanol} \times \frac{100}{10}}{IA} \leftrightarrow \text{Razão butanol: AGL} = \frac{1,5 \times \frac{100}{10}}{5,7}$$

$$\leftrightarrow \text{Razão butanol: AGL} = 2,6wt/wt$$

Na experiência 8 pretendeu-se estudar o efeito da álcool butanol (razão butanol:AGL de 2,6 m/m) na reação de esterificação catalisada pela enzima Novozyme 435, com a razão enzima:gordura de 0,012 m/m a e à temperatura de 45 °C. Na Figura 36, apresentam-se os resultados obtidos para ensaio realizado com butanol.

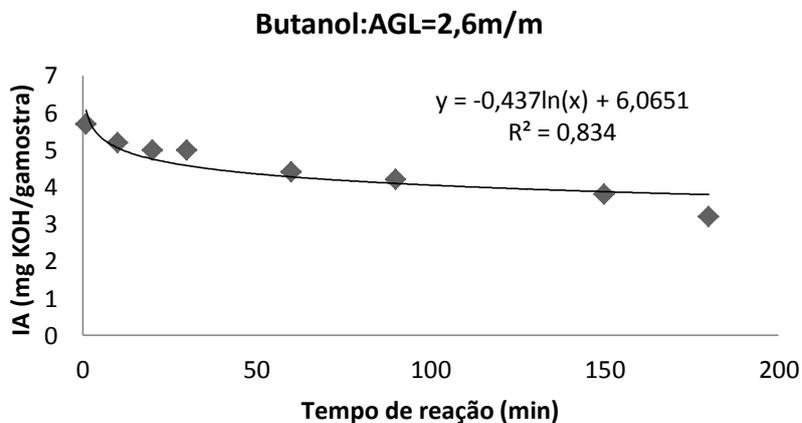


Figura 36: IA em função do tempo de reação (experiência 8).

Realizaram-se ensaios de esterificação tendo em conta os melhores resultados obtidos em cada um dos efeitos estudados. Consideraram-se como melhores condições de reação: temperatura de 55 °C, razão álcool:AGL de 1,6 m/m, razão enzima:gordura de 0,024 m/m, tempo de esterificação de 2 horas e tipo de álcool o etanol. Na Figura 37, apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios realizados nas melhores condições.

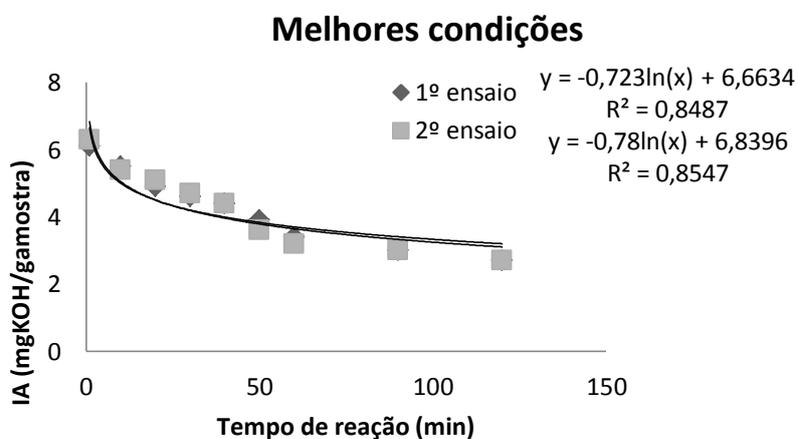


Figura 37: IA em função do tempo de reação (experiência nas melhores condições).

Anexo 2

Cinética de 1ª e 2ª ordem

Aplicaram-se os modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem a todos os ensaios das variações dos parâmetros da reação.

Exemplo de cálculo da concentração de ácido oleico:

$$V_{amostra} = \frac{m_{amostra}}{\rho_{amostra}} \leftrightarrow V_{amostra} = \frac{10}{0,9228} \leftrightarrow V_{amostra} = 10,8ml$$

$$C_{ac} = \frac{\% Acidez}{M_{ac}} \times \frac{10}{100} \times 1000 \leftrightarrow C_{ac} = \frac{2,1}{282,42} \times \frac{0,1}{10,8} \times 1000 \leftrightarrow C_{ac} = 0,068mol/L$$

Na Figura 38, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 1.

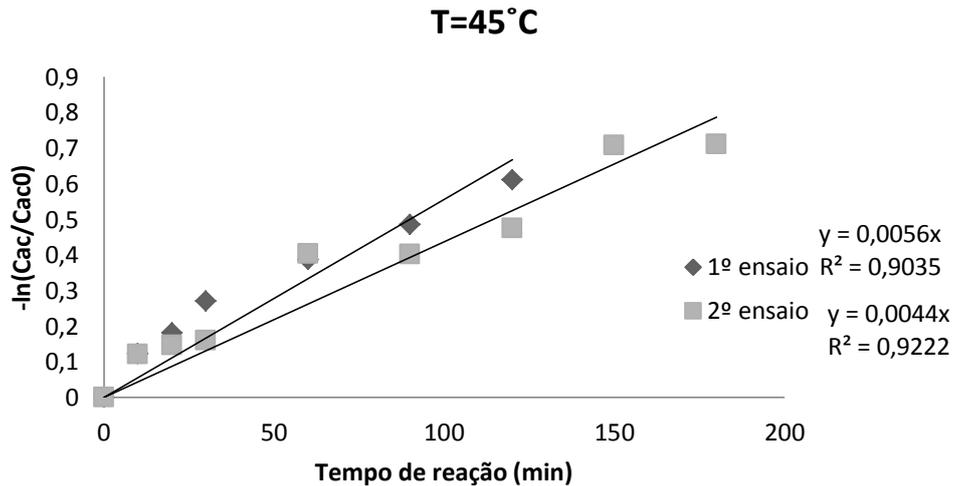


Figura 38: Cinética de 1ª ordem (experiência 1).

Na Figura 39, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 1.

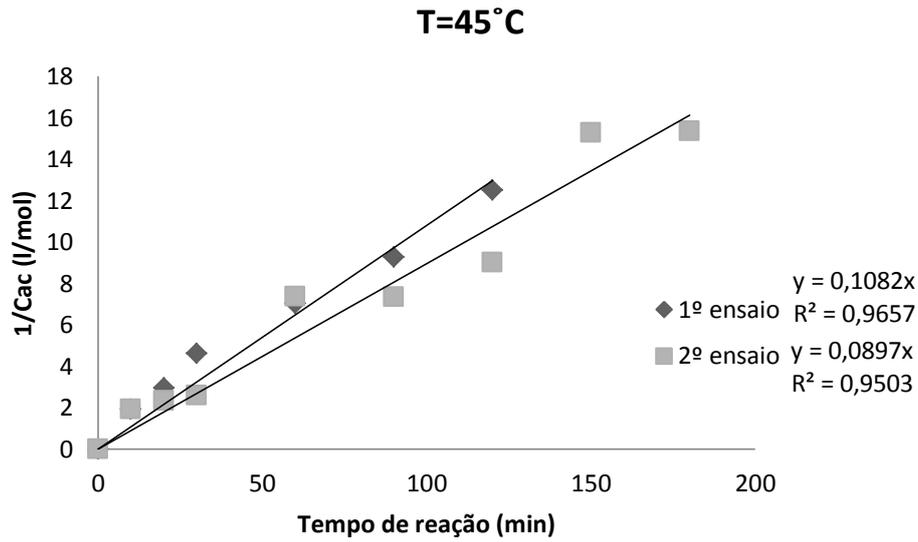


Figura 39: Cinética de 2ª ordem (experiência 1).

Na Figura 40, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 2.

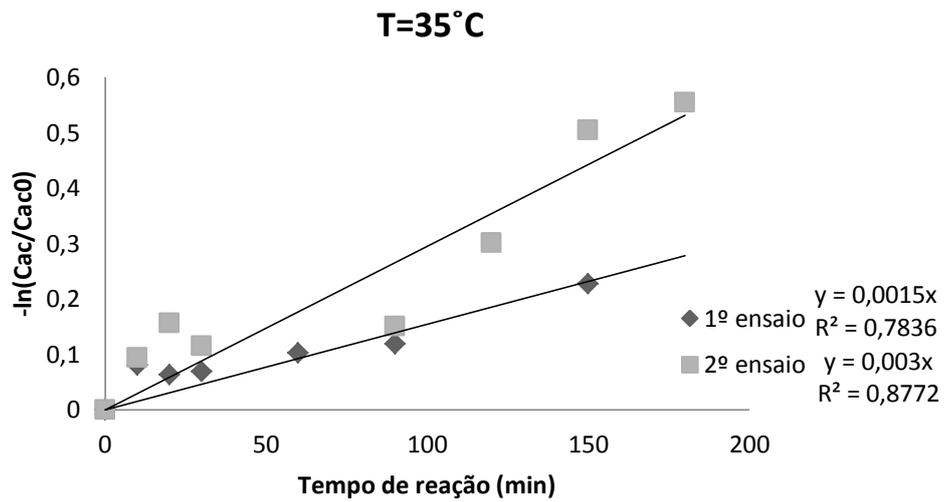


Figura 40: Cinética de 1ª ordem (experiência 2).

Na Figura 41, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 2.

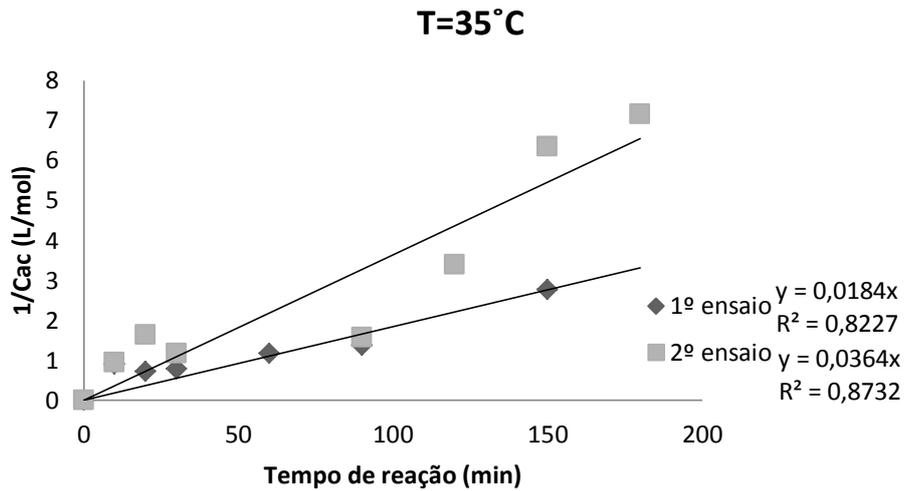


Figura 41: Cinética de 2ª ordem (experiência 2).

Na Figura 42, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 3.

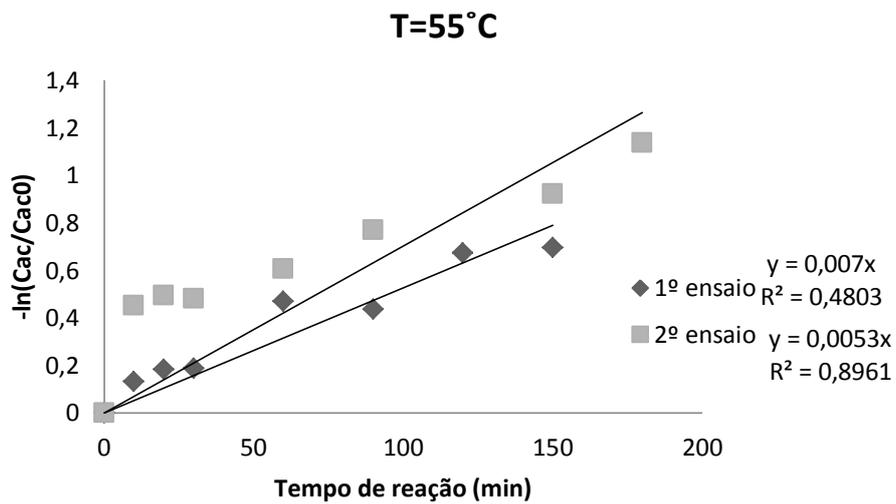


Figura 42: Cinética de 1ª ordem (experiência 3).

Na Figura 43, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 3.

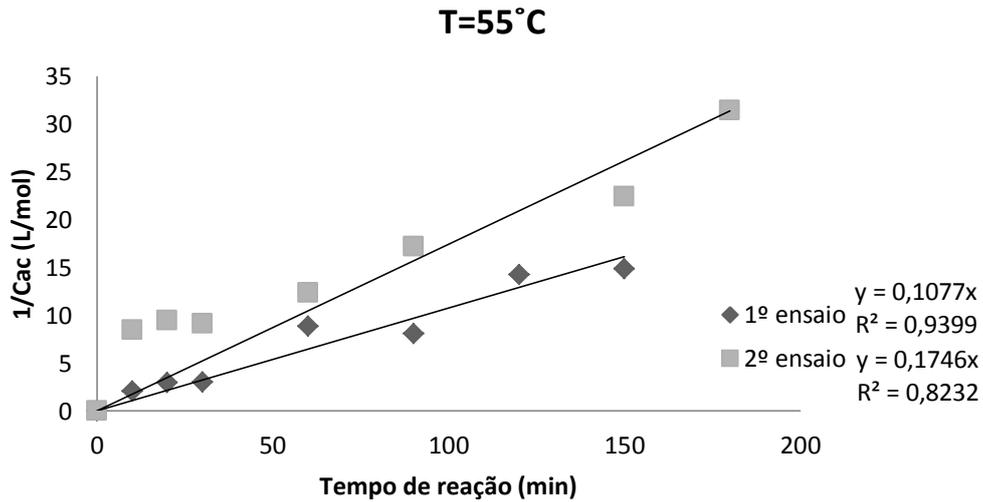


Figura 43: Cinética de 2ª ordem (experiência 3).

Na Figura 44, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 4.

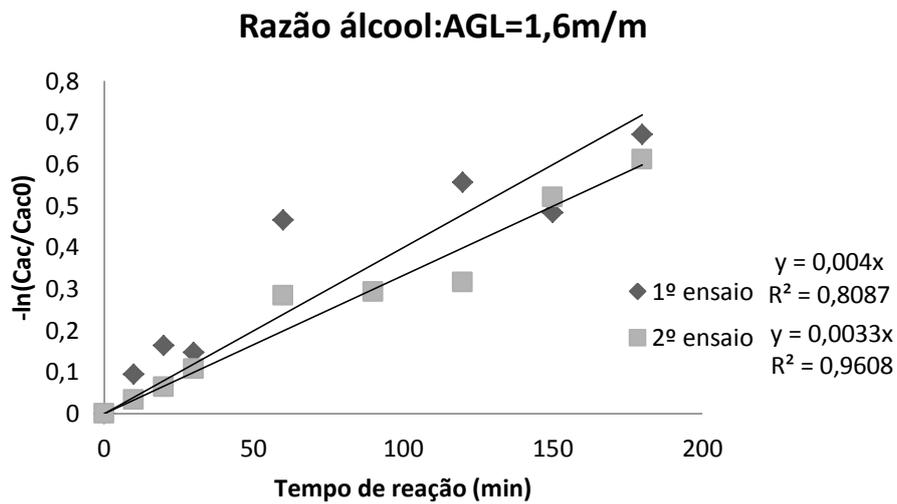


Figura 44: Cinética de 1ª ordem (experiência 4).

Na Figura 45, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 4.

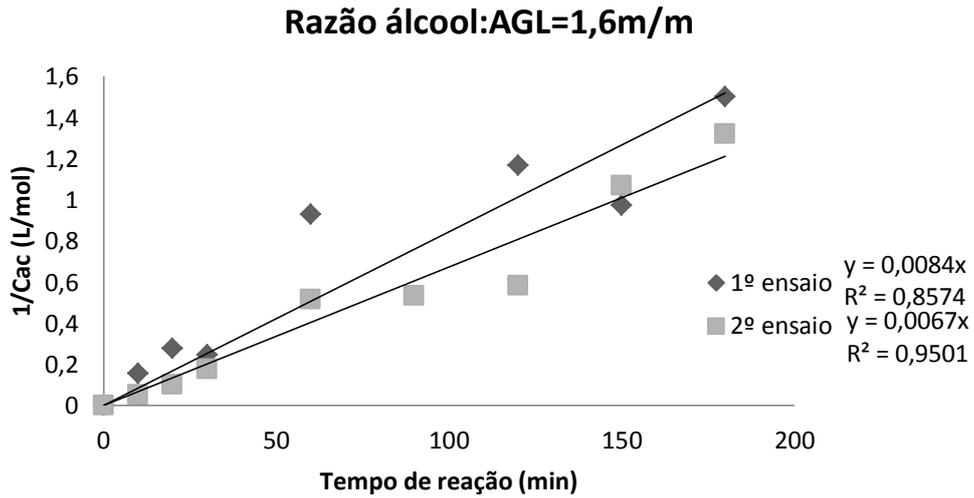


Figura 45: Cinética de 2ª ordem (experiência 4).

Na Figura 46, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 5.

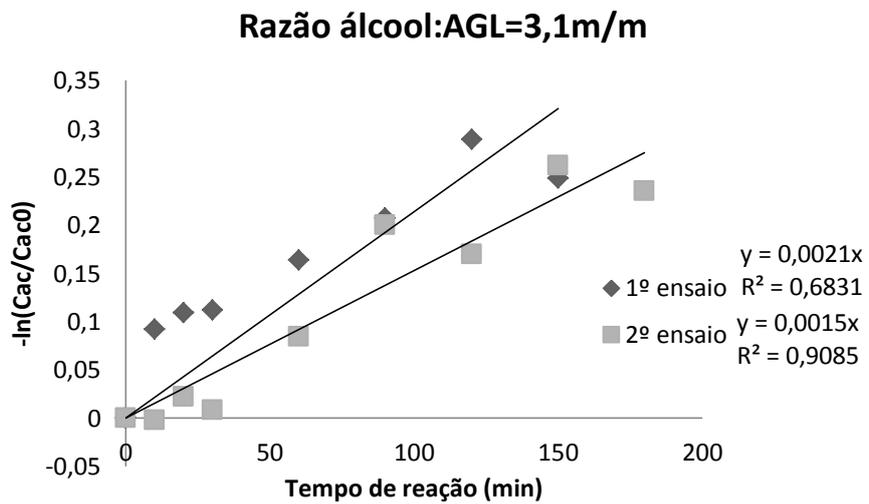


Figura 46: Cinética de 1ª ordem (experiência 5)

Na Figura 47, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 5.

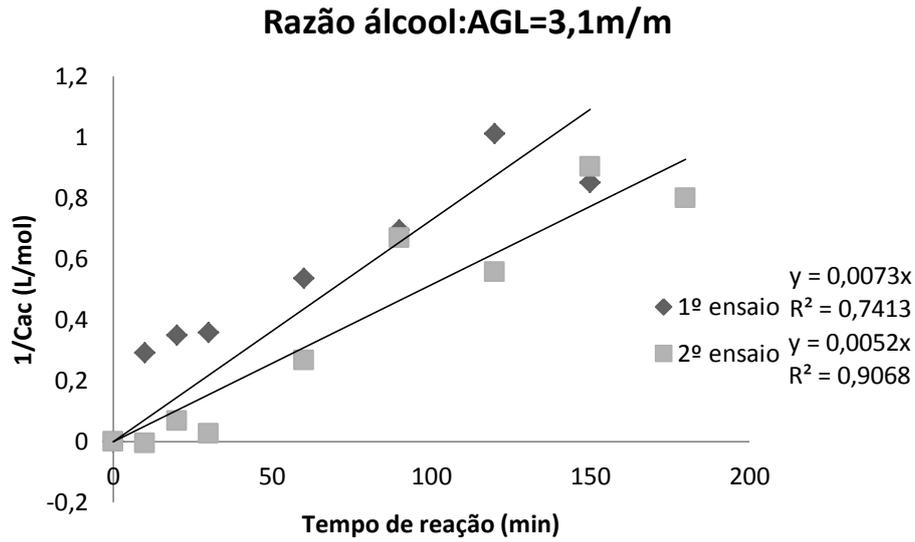


Figura 47: Cinética de 2ª ordem (experiência 5).

Na Figura 48, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 6.

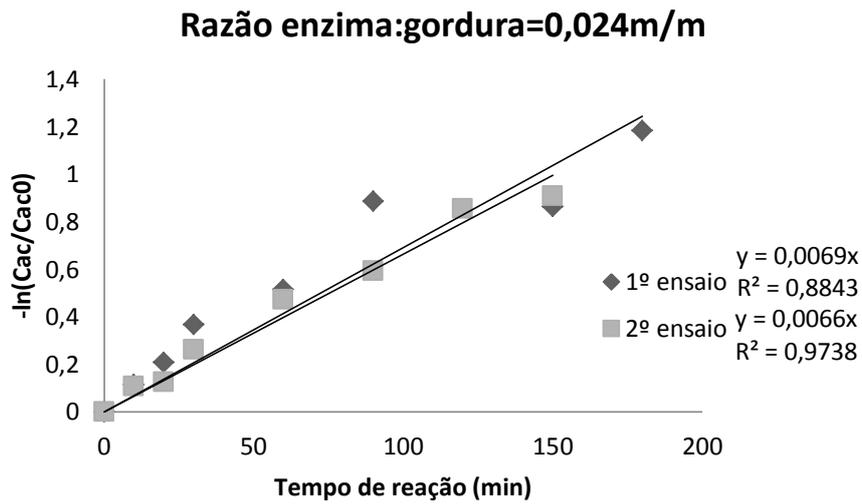


Figura 48: Cinética de 1ª ordem (experiência 6).

Na Figura 49, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 6.

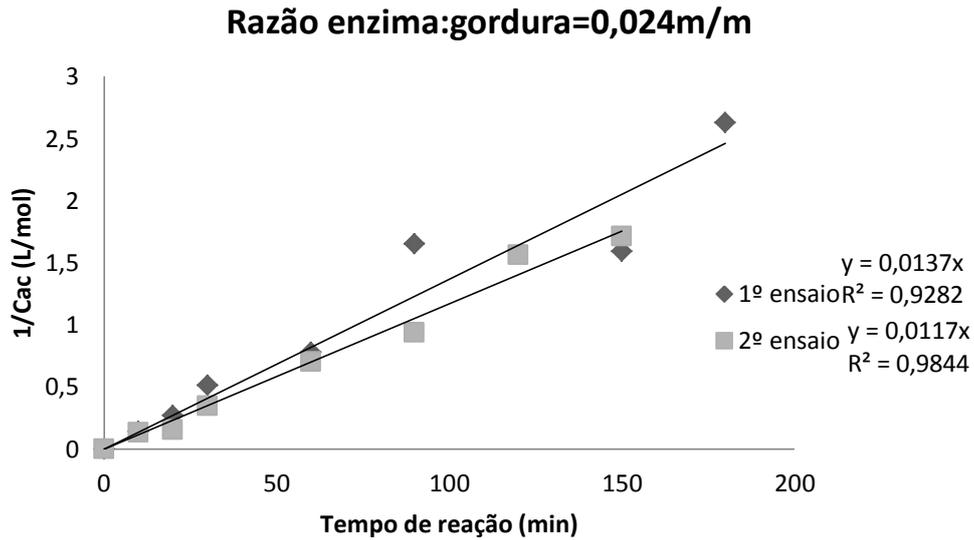


Figura 49: Cinética de 2ª ordem (experiencia 6).

Na Figura 50, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência 8.

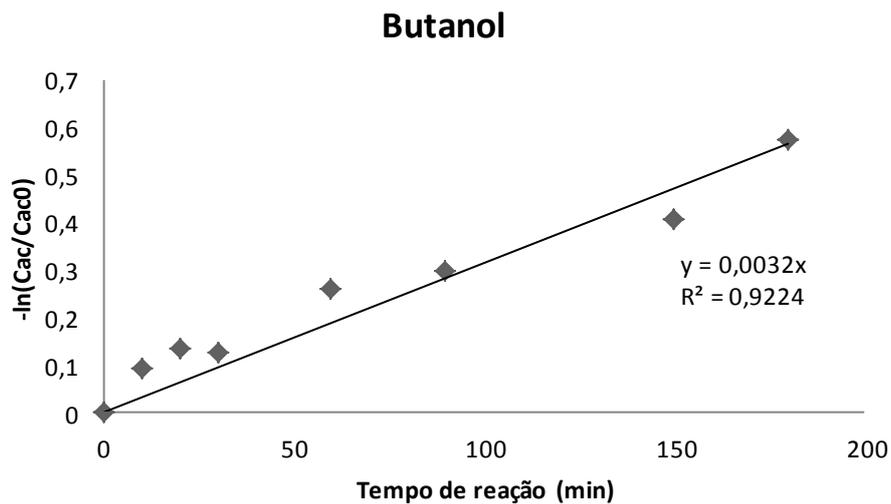


Figura 50: Cinética de 1ª ordem (experiencia 8).

Na Figura 51, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência 8.

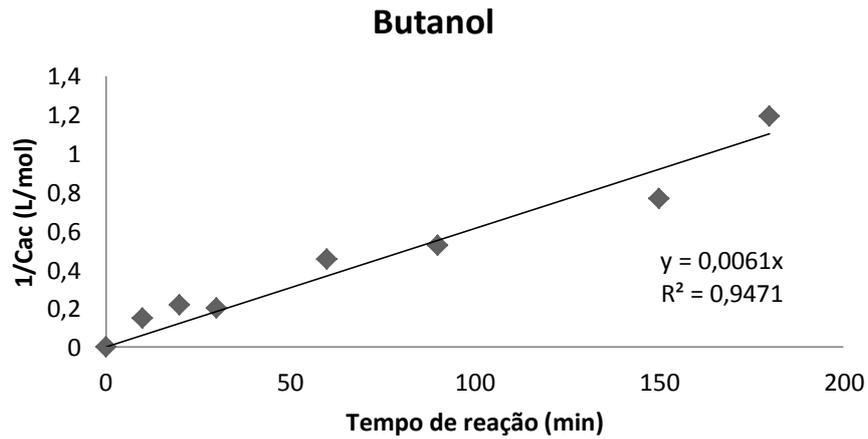


Figura 51: Cinética de 2ª ordem (experiencia 8).

Na Figura 52, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 1ª ordem da experiência nas melhores condições.

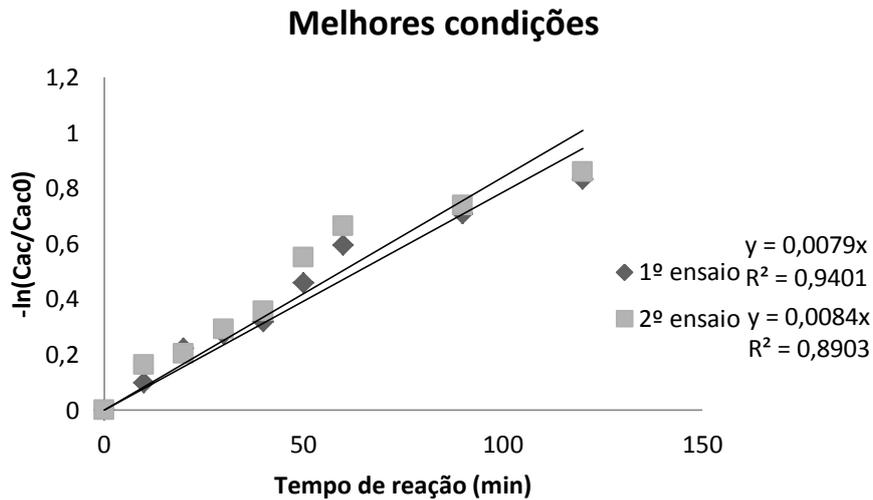


Figura 52: Cinética de 1ª ordem (experiencia nas melhores condições).

Na Figura 53, apresentam-se os resultados obtidos da cinética de 2ª ordem da experiência nas melhores condições.

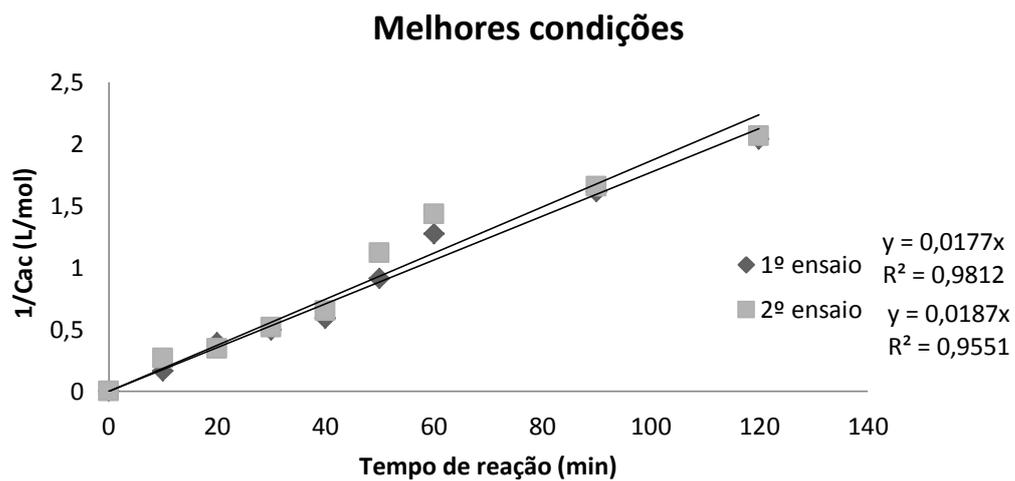


Figura 53: Cinética de 2ª ordem (experiencia nas melhores condições).

Anexo 3

Análise estatística

Cinética de 1ª ordem

SUMÁRIO DOS RESULTADOS								
<i>Estadística de regressão</i>								
R múltiplo	0,963315603							
Quadrado de R	0,927976952							
Quadrado de R ajustado	0,917687945							
Erro-padrão	0,083636911							
Observações	9							
<i>ANOVA</i>								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>			
Regressão	1	0,630898798	0,630899	90,19111	3,00352E-05			
Residual	7	0,04896593	0,006995					
Total	8	0,679864728						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	0,08658313	0,045240735	1,913831	0,097208	-0,020394208	0,193560468	-0,020394208	0,193560468
Variável X 1	0,007250855	0,000763497	9,4969	3E-05	0,005445471	0,009056239	0,005445471	0,009056239

Cinética de 2ª ordem

SUMÁRIO DOS RESULTADOS								
<i>Estadística de regressão</i>								
R múltiplo	0,978897348							
Quadrado de R	0,958240017							
Quadrado de R ajustado	0,952274305							
Erro-padrão	0,154431056							
Observações	9							
<i>ANOVA</i>								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>			
Regressão	1	3,830727987	3,830728	160,6246	4,40324E-06			
Residual	7	0,166942658	0,023849					
Total	8	3,997670645						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	0,060773233	0,083534582	0,727522	0,490518	-0,136754666	0,258301132	-0,136754666	0,258301132
Variável X 1	0,017866934	0,001409756	12,67378	4,4E-06	0,01453339	0,021200478	0,01453339	0,021200478