



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA
DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

ROSANA OLIVEIRA HENRIQUES

**ASPECTOS OPERACIONAIS DA ETANÓLISE ENZIMÁTICA
DO ÓLEO DE PALMA EM REATOR DE LEITO FIXO**

**Florianópolis
2012**

ROSANA OLIVEIRA HENRIQUES

**ASPECTOS OPERACIONAIS DA ETANÓLISE ENZIMÁTICA
DO ÓLEO DE PALMA EM REATOR DE LEITO FIXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Co-orientadora: Dra. Gisanara Dors

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

H519a Henriques, Rosana Oliveira

Aspectos operacionais da etanolise enzimática do óleo de palma em reator de leito fixo [dissertação] / Rosana Oliveira Henriques ; orientador, Agenor Furigo Junior. - Florianópolis, SC, 2012.

92 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia química. 2. Álcool. 3. Óleos e gorduras. 4. Lipase. I. Furigo Junior, Agenor. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU 66.0

Aspectos operacionais da etanolise enzimática do óleo de palma em reator de leito fixo

Por

Rosana Oliveira Henriques

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
orientador

Prof^a. Dr^a. Gisanara Dors
co-orientadora

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Lanza

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Prof^a. Dr^a. Maria Manuela Camino Feltes

Florianópolis, 27 de março de 2012

RESUMO

O presente trabalho analisa o processo de produção de biodiesel etanólico de óleo de palma em reator de leito fixo, operando em modo contínuo. Para tal, foram realizados ensaios em um reator de vidro com diâmetro interno de 1,56 cm, comprimento de 10,5 cm e volume total de 20 mL. O leito foi empacotado com aproximadamente 4,5 g da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada comercialmente, Novozym[®]435. O substrato foi composto por etanol e óleo de palma nas razões molares de 9:1 e 12:1, com 30% (v/v) de *tert*-butanol como solvente, quando presente. O sistema foi mantido à temperatura de 50 °C. Neste trabalho avaliou-se o efeito do tempo espacial, do uso do solvente *tert*-butanol e do efeito da razão molar entre etanol e o óleo de palma, na conversão e produção de ésteres etílicos. Os ésteres etílicos foram determinados através de cromatografia gasosa e o teor de glicerol através de técnica utilizando periodato de sódio. Verificou-se através dos ensaios que dentro da faixa de tempos espaciais estudada (0,5-3 h), a produtividade em ésteres etílicos mostrou ser maior para menores valores de tempo espacial, sendo observado que a conversão em ésteres etílicos se manteve praticamente constante. Neste faixa de tempo espacial, os rendimentos em ésteres etílicos foram maiores que 79%. A presença do solvente *tert*-butanol na reação causou uma maior desativação da lipase Novozym[®]435, indicando que o uso do solvente pode ser danoso para o biocatalisador. O uso de um excesso de etanol em relação ao óleo de palma com razão molar superior a 9:1, não aumentou o rendimento em ésteres etílicos na reação biocatalisada, além de causar uma maior desativação no biocatalisador. Os resultados obtidos demonstraram que o sistema utilizado é adequado para a síntese de biodiesel em modo contínuo, sendo possível atingir um estado estacionário em todas as condições estudadas.

Palavras-chave: biodiesel, etanólise, óleo de palma, contínuo, leito fixo, lipase.

ABSTRACT

This work analyzes the production process from ethanolic biodiesel of palm oil in a packed bed reactor and operating in continuous mode. To do so, tests were conducted in a glass reactor with internal diameter of 1.56 cm, length of 10.5 cm and a total volume of 20 mL. The reactor was packed with approximately 4.5 g of *Candida antarctica* lipase, commercially immobilized, Novozym[®]435. The substrate was formed by ethanol and palm oil in molar ratios of 9:1 and 12:1, with 30% (v/v) of *tert*-butanol as solvent, when it is present. The system was maintained at 50° C. This study evaluated the effect on spatial time, use of *tert*-butanol solvent effect and molar ratio effect between palm oil and ethanol, in the conversion and production of ethylic esters. Ethylic esters were determined by gas chromatography and glycerol content through a technique using sodium periodate. It was verified through testing that within the range of spatial time studied (0.5-3 h), ethylic esters productivity proved to be higher for lower values of spatial time, even when it was observed a constant conversion on ethylic esters. In this range of spatial time studied, the yields of ethylic esters were higher than 79%. The presence of *tert*-butanol solvent in the reaction caused a greater deactivation of Novozym[®]435 lipase, indicating the use of solvent may be harmful to the biocatalyst. The use of ethanol in excess in relation to the palm oil with molar ratios greater than 9:1 did not increase the yield on ethylic esters in the biocatalyzed reaction, and it causes a higher deactivation in the biocatalyst. Results showed the system used is suitable for biodiesel synthesis in continuous mode, and it is possible to reach a steady state in all of the studied conditions.

Key words: biodiesel, ethanolysis, palm oil, continuous, packed bed reactor, lipase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Propriedades físicas do óleo de palma refinado.	47
Tabela 3.2- Composição de ácidos graxos presentes no óleo de palma refinado.	48
Tabela 3.3- Condições experimentais utilizadas em cada ensaio	50
Tabela 3.4- Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.....	53
Tabela 4.1- Comportamento dos experimentos 1, 2 e 3 durante o estado estacionário (EE) em relação ao tempo espacial empregado.	62
Tabela 4.2- Concentração mássica total de ésteres etílicos e produtividade dos experimentos 1, 2 e 3.....	63
Tabela 4.3- Concentração de ésteres etílicos e produção dos experimentos 1, 2 e 3.....	64
Tabela 4.4- Comparação da concentração, produtividade e rendimento da etanolise enzimática do óleo e palma entre dados da literatura e o experimento 5.....	71
Tabela 4.5- Valores do teor de glicerol contido nas amostras não purificadas de biodiesel.....	72
Tabela 4.6- Atividade hidrolítica das lipases sem tratamento e tratada com solvente.....	73
Tabela 4.7- Valores de atividade hidrolítica (AE) inicial e residual da lipase Novozym [®] 435 no início e fim de cada experimento.....	75
Tabela 4.8- Comparação dos resultados obtidos nos experimentos 1 a 5.	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1**– Evolução anual da produção, capacidade nominal autorizada pela ANP e demanda compulsória de biodiesel em território brasileiro..... 27
- Figura 2.2**- Principais culturas oleaginosas para produção de biodiesel, de acordo com a região de cultivo..... 29
- Figura 2.3**- Palmeira, cacho e fruto do dendê, da esquerda para a direita 31
- Figura 2.4**- Transesterificação de TAG com álcool. (a) Reação global e (b) reações consecutivas..... 34
- Figura 2.5**- Parâmetros que afetam a reação de transesterificação enzimática. 37
- Figura 3.1**- Aparato experimental utilizado nos experimentos de produção de biodiesel com o reator tipo leito fixo operando em modo contínuo. 1- Banho termostatzado, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4-Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator de leito fixo, 7- Saída de produto..... 50
- Figura 4.1**- Aparato experimental utilizado nos ensaios de produção de biodiesel etanólico de óleo de palma em modo contínuo..... 57
- Figura 4.2**- Experimento 1: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,0812 mL min⁻¹, tempo espacial de 3 h, temperatura 50° C, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador. 59
- Figura 4.3**- Experimento 2: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30 % (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,2349 mL min⁻¹ tempo espacial de 1 h, temperatura 50° C, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador. 60
- Figura 4.4**- Experimento 3: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo

de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,4782 mL min⁻¹, tempo espacial de 0,5 h, temperatura 50 °C, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador. 61

Figura 4.5- Produtividade em ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator do tipo leito fixo em modo contínuo. (a) em relação ao tempo de duração total de cada experimento (b) em relação ao número de tempos espaciais de duração de cada experimento. Condições: Exp. 1: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,0812 mL min⁻¹, tempo espacial de 3 h; Exp.2: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,2349 mL min⁻¹, tempo espacial de 1 h; Exp.3: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,4782 mL min⁻¹, tempo espacial de 0,5 h..... 65

Figura 4.6- Experimento 4: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, vazão 0,2290 mL min⁻¹, tempo espacial de 1 h, temperatura 50 °C, empregando a lipase Novozym[®]435 como catalisador. 67

Figura 4.7- Comparação entre o rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo dos experimentos 2 e 4. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, tempo espacial de 1 h, temperatura 50 °C, empregando a lipase Novozym[®]435 como catalisador. Exp. 2: vazão 0,2349 mL min⁻¹, adição de 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma; Exp. 4: vazão 0,2290 mL min⁻¹, ausência de solvente. 68

Figura 4.8- Comparação entre a produtividade de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo nos experimentos 2 e 4. Condições experimentais: Exp. 2: vazão 0,2349 mL min⁻¹, adição de 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma; Exp. 4: vazão 0,2290 mL min⁻¹, na ausência de solvente. Ambos com razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, tempo espacial de aproximadamente 1 h, temperatura 50 °C, empregando a lipase Novozym[®]435 como catalisador. 69

Figura 4.9- Experimento 5: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 12:1, vazão $0,0380 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 6 h, temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$, empregando a lipase Novozym[®]435 como catalisador. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Atividade enzimática
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácido graxo livre
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	American Oil Chemists' Society
B2	Biocombustível formado pela mistura de 2% de biodiesel e 98% de diesel
B5	Biocombustível formado pela mistura de 5% de biodiesel e 95% de diesel
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DAG	Diacilglicerol
EE	Estado estacionário
MAG	Monoacilglicerol
NC	Número de cetano
NOx	Óxido de nitrogênio
P	Coefficiente de partição
PBR	<i>Packed bed reactor</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PID	Controlador proporcional- Integral- Derivativo
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PVA	Álcool polivinílico
SUFRAMA	Superintendência da Zona Franca de Manaus
TAG	Triacilglicerol

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
2. Revisão bibliográfica.....	25
2.1 O biodiesel no cenário nacional	25
2.2 Aspectos técnicos	27
2.3 Principais matérias-primas para produção de biodiesel.....	28
2.3.1 Óleos e gorduras.....	28
2.3.1.1 O óleo de palma.....	30
2.3.2 Álcool.....	32
2.4 Produção de biodiesel por transesterificação.....	33
2.4.1 Lipases como catalisadores	36
2.4.2 Produção de biodiesel por transesterificação enzimática	36
2.5 Reatores de leito fixo para produção de biodiesel.....	40
3. Material e métodos.....	47
3.1 Materiais	47
3.1.1 Enzimas	47
3.1.2 Óleo vegetal	47
3.1.3 Reagentes	48
3.1.4 Equipamentos.....	48
3.2 Metodologia experimental	49
3.2.1 Síntese do biodiesel de óleo de palma em reator de leito fixo.....	49
3.2.2 Calibração da bomba peristáltica	50
3.3 Métodos de análise	51
3.3.1 Determinação da atividade hidrolítica da lipase.....	51
3.3.2 Determinação quantitativa do glicerol.....	52
3.3.3. Dosagem dos ésteres etílicos.....	52
3.3.4 Cálculo do tempo espacial.....	53
3.3.5 Rendimento em ésteres de etila	54
3.3.6 Produção.....	54
3.3.7 Produtividade	55
3.3.8 Tempo de meia-vida do biocatalisador.....	55
4. Resultados e discussão	57
4.1. Processo contínuo de etanólise enzimática do óleo de palma	57
4.2 Influência do tempo espacial na etanólise enzimática de óleo de palma	58
4.2.1 Influência do tempo espacial na produtividade em ésteres etílicos	63

4.3 Efeito da presença de solvente na etanólise enzimática de óleo de palma	66
4.3.1 Influência do solvente na produtividade em ésteres etílicos	68
4.4 Efeito da razão molar entre o etanol e o óleo de palma na reação de etanólise enzimática.....	69
4.5 Relação entre o glicerol e éster formado.....	71
4.6 Comportamento e estabilidade da lipase.....	73
4.6.1 Efeito da lavagem da lipase Novozym®435 com diferentes solventes.....	73
4.6.2 Determinação da constante de desativação e tempo de meia-vida da lipase Novozym®435.....	74
4.7 Considerações Finais.....	76
5. Conclusão.....	77
6. Perspectivas para trabalhos futuros.....	79
7. Referências Bibliográficas.....	81
8. Anexos.....	91

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por derivados de petróleo no setor industrial, o aumento significativo nas emissões de gases poluentes e a previsão de uma possível crise energética mundial para os próximos anos têm motivado cada vez mais o desenvolvimento de novas tecnologias na área de geração de energia. Nesse contexto, os biocombustíveis destacam-se como uma alternativa ao uso de combustíveis de origem fóssil, com a grande vantagem de serem obtidos a partir de fontes renováveis.

No cenário nacional, o biodiesel passou a despertar interesse por volta da década de 80. Porém, a consolidação na matriz energética brasileira só aconteceu efetivamente a partir de 2004, quando o Governo Federal lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). As diretrizes deste programa visam a introdução da técnica de produção e o desenvolvimento socioeconômico sustentável, destacando o uso do combustível como forma de inclusão social, incentivando a agricultura familiar, a diversificação da matéria-prima e o desenvolvimento regional das áreas mais pobres do país (PADULA et al., 2012).

Em 2005, as refinarias e distribuidoras foram autorizadas pela Lei 11.097/05 a adicionar 2% de biodiesel no diesel (mistura chamada de B2). Em 2008 esse percentual passou a ser obrigatório e, devido à rápida resposta de oferta de produto, o governo acabou por antecipar para 2010 a aplicação da mistura de 5% de biodiesel ao diesel (B5), prevista inicialmente para 2013 (PADULA et al., 2012).

Após a implementação do PNPB, entre 2005 e 2010 houve um aumento de 736 m³ para 2,39 milhões m³ no volume de biodiesel produzido no país, fazendo o Brasil tornar-se o segundo maior produtor mundial (PADULA et al., 2012)

O processo industrial mais utilizado para obtenção do biodiesel é a transesterificação de ácidos graxos de cadeia longa, presentes nos óleos e gorduras, juntamente com metanol. Os produtos obtidos majoritariamente nesta reação são os mono-alquil ésteres de ácidos graxos e a glicerina. Esse processo é realizado com o auxílio de catalisadores homogêneos alcalinos ou ácidos, sendo os alcalinos os mais empregados em processos industriais (DERMIBAS, 2008). Embora esta rota apresente um alto rendimento, o metanol é de origem

fóssil e a utilização de catalisadores homogêneos leva a um produto de difícil purificação, aumentando as etapas do processo de produção do biodiesel (KNOTHE et al., 2005). Por esse motivo, a utilização de etanol vem sendo investigada, principalmente no Brasil, que apresenta uma produção já consolidada, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, tornando o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo.

A catálise heterogênea tem se apresentado como uma boa opção em substituição à catálise homogênea. As reações que utilizam este tipo de catalisador geram produtos mais limpos, necessitando de poucas etapas no processo de purificação, além de oferecerem a vantagem de separação e reutilização do catalisador. Dentre os catalisadores mais empregados na produção de biodiesel via catálise heterogênea, podem-se citar as zeólitas básicas, óxidos, carbonatos de metais alcalinos terrosos e enzimas (NIGAM et al., 2011; CHOUHAN et al., 2011).

A produção de biodiesel via catálise enzimática tem atraído especial atenção de diversos grupos de pesquisa nos últimos anos (NIGAM et al., 2011), pois a possibilidade de se obter produtos através de processos menos agressivos, tanto para o homem quanto para o meio ambiente, é um dos grandes objetivos do desenvolvimento de novas tecnologias. Os catalisadores enzimáticos possibilitam a realização de reações mediante condições brandas, apresentam especificidade nas reações que catalisam e, devido ao seu caráter biológico, são biodegradáveis, auxiliando na redução do impacto ambiental (XU et al., 2000; ZHANG et al., 2010) e sendo, por estes motivos, adequados para o uso em processos mais limpos. Este tipo de catalisador tem sido utilizado especialmente em reatores de leito fixo, com resultados satisfatórios, principalmente no que se diz respeito a processos de operação em modo contínuo (DOSSAT et al., 1999; SHAW et al., 2008; HALIM et al., 2009)

Os reatores de leito fixo são tradicionalmente empregados na maioria dos processos biotecnológicos conduzidos em larga escala, oferecendo vantagens como a alta eficiência, facilidade de construção e operação. Esse tipo de configuração é adequado, principalmente, para o uso de lipases, pois a superfície de contato entre a reação e o catalisador torna-se maior, além de evitar danos na superfície da lipase, causados pela tensão de cisalhamento que reatores de tanque agitado causam (BALCAL et al., 1996; HALIM et al., 2009).

No entanto, por mais interessante que a produção de biodiesel via catálise enzimática se mostre, este tipo de processo ainda enfrenta

algumas barreiras relacionadas ao seu uso em larga escala (PENTEADO, 2005), necessitando de investimentos e esforços para torná-los possíveis de implantação.

Atualmente, muitos grupos de pesquisa brasileiros têm se empenhado no aprimoramento de técnicas e na busca de novas estratégias na produção de biodiesel via catálise enzimática (DA RÓS, 2010; SIMÕES, 2011). Dentre eles, o grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, que tem desenvolvido trabalhos na área de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais utilizando etanol e lipases como catalisador, em reatores operando em modo contínuo (DORS, 2011).

Os resultados obtidos até agora foram bastante satisfatórios, demonstrando o grande potencial que essa área de estudo possui, motivando a realização desta pesquisa. Buscando estabelecer um processo atrativo economicamente e que valorize os produtos nacionais, foram selecionadas como matérias-primas para este trabalho o etanol e o óleo de palma, que apresentam grande disponibilidade, além de possuírem um processo de produção e cultura agrícola já estabelecidos no país. Diante disto, o objetivo principal deste trabalho foi analisar o processo de obtenção de biodiesel a partir da reação entre etanol e óleo de palma catalisada pela lipase Novozym[®]435, em reator de leito fixo operando em modo contínuo.

Como objetivos específicos da pesquisa têm-se:

- Avaliar a influência do tempo espacial em relação à produtividade e rendimento experimental nas reações de etanolise enzimática de óleo de palma, catalisadas pela lipase Novozym[®]435, visando o aumento da eficácia da síntese de biodiesel;
- Realizar estudos preliminares sobre a influência da presença e ausência do solvente *tert*-butanol no sistema em relação à produção de ésteres etílicos e ao desempenho global da reação de transesterificação;
- Avaliar o efeito da razão molar entre o etanol e o óleo de palma, em relação à produção de ésteres etílicos;
- Relacionar a quantidade de glicerol formado ao desempenho da reação de síntese de biodiesel produzido nas diferentes condições testadas;
- Avaliar a influência do tempo espacial, da razão molar entre o

etanol e o óleo de palma e do solvente *tert*-butanol em meio reacional na atividade e estabilidade da lipase Novozym[®] 435.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os principais temas relacionados a este trabalho. Primeiramente será realizada uma abordagem sobre o atual cenário do biodiesel e a importância das fontes renováveis de energia, a seguir as principais matérias-primas e os processos empregados na produção de biodiesel. Um enfoque especial será dado aos processos de obtenção de biodiesel via catálise enzimática, as principais configurações de reatores utilizados e modos de operação e demais aspectos técnicos relacionados a este tipo de processo.

2.1 O biodiesel no cenário nacional

Nos últimos anos, a produção de biocombustíveis vem adquirindo forças no cenário mundial. Impulsionado por uma grande demanda energética decorrente do desenvolvimento tecnológico, pelos elevados índices de emissão de gases nocivos, aquecimento global e pela preocupação com um possível esgotamento das fontes de energia fóssil (carvão, petróleo e o gás natural) (FERRARI, et al., 2005; DEMIRBAS, 2005), o desenvolvimento de novas tecnologias a partir de fontes renováveis de carbono tem se intensificado, criando boas perspectivas para os biocombustíveis.

O biodiesel possui um grande potencial como alternativa ao uso de óleo diesel. Do ponto de vista ambiental, apresenta uma série de vantagens sobre o combustível convencional: a matéria-prima utilizada para sua produção tem origem nas fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e resíduos domésticos; a redução de emissões de gases como monóxido e dióxido de carbono, dióxido de enxofre e particulados, além de ser biodegradável, atóxico e de manuseio seguro (LUKOVIĆ et al., 2011; APOSTOLAKOU et al., 2011; ATABANI et al., 2012). Porém, o alto custo do biodiesel em relação ao diesel mineral ainda é um empecilho para sua comercialização, sendo que o maior custo no processo está relacionado com o preço da matéria-prima (óleos e gorduras), podendo chegar a um percentual de 70 a 95% do custo total de produção (YUSUF et al., 2011; DEMIRBAS et al., 2011).

Atualmente, existe uma preocupação de diversos países e blocos econômicos pela inserção do biodiesel em suas matrizes energéticas. As bases desta inserção se apoiam em um tripé, composto por: 1) ambiente:

melhoria das condições climáticas por redução das emissões e utilização de CO₂ pela matéria-prima; 2) social: desenvolvimento rural associado à produção de matéria-prima e 3) energia: independência de consumidores produzindo sua própria energia (QUINTELA et al., 2009). No Brasil, o biodiesel passou a fazer parte da matriz energética a partir de janeiro 2005, quando entrou em vigor a Lei n° 11.097 (BRASIL, 2005). Segundo relatórios mensais disponibilizados pela ANP, no ano de 2011 a matriz nacional já contava com 65 plantas autorizadas para produção de biodiesel, correspondendo a uma capacidade total de 18.727,95 m³ dia⁻¹. Destas 65 plantas, 60 possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido. Existem, ainda, 10 novas plantas de biodiesel autorizadas para construção e 8 para ampliação da capacidade, aumentando a capacidade total em 4.877,79 m³ dia⁻¹ (ANP, 2011).

Desde 1° de janeiro de 2010, todo o óleo diesel comercializado em território nacional passou a apresentar 5% (v/v) de biodiesel em sua composição, chamado de biodiesel B5. Esta norma foi estabelecida através da Resolução n°6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE, 2009), sendo esta composição a aplicada em boa parte dos países da União Europeia (NIGAM et al., 2011). Tendo como objetivo aumentar esta porcentagem, muitos países têm investido na ampliação de suas plantas. O Brasil, já está trabalhando a favor deste crescimento, aumentando ano após ano a capacidade produtiva. A Figura 1.1 apresenta a evolução da produção anual de biodiesel em território brasileiro, juntamente com a capacidade nominal acumulada autorizada pela ANP e a demanda compulsória de biodiesel (ANP, 2011).

O Brasil possui um potencial imenso para continuar expandido o seu mercado de energias renováveis. Suas condições climáticas, sua localização geográfica e sua disponibilidade de energia solar e de tecnologia são vantagens que contribuem para consolidar o país como líder no setor de bioenergia, especialmente no mercado de bioetanol e biodiesel (Queiroz et al., 2012). A grande biodiversidade existente no país propicia inúmeras alternativas de matéria-prima para produção de biodiesel, que estimulam os avanços em pesquisa e desenvolvimento nesta área.

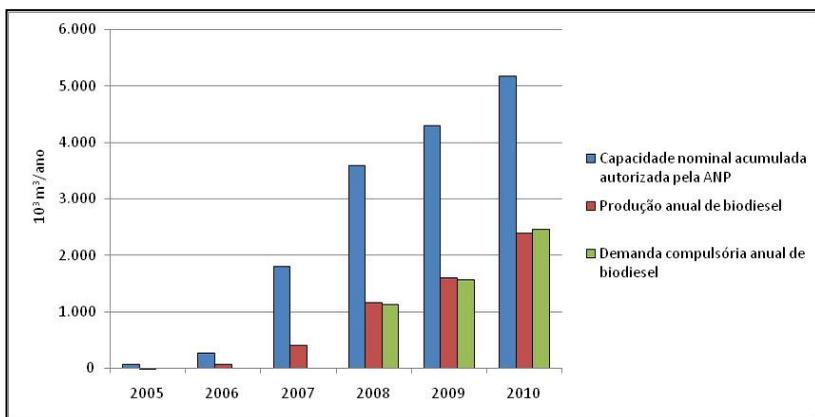


Figura 0.1– Evolução anual da produção, capacidade nominal autorizada pela ANP e demanda compulsória de biodiesel em território brasileiro.

Fonte: ANP (2011).

2.2 Aspectos técnicos

Há muitos anos os óleos vegetais têm sido alvo de pesquisa no setor de geração de energia. Embora possuam um elevado poder calorífero e alto índice de cetano, a utilização destes óleos in natura diretamente nos motores projetados para funcionar a óleo diesel, pode acarretar uma série de problemas, tais como carbonização e depósitos nos bicos injetores. A alta viscosidade dos óleos vegetais é a principal causa destes problemas, com valores aproximadamente dez vezes maiores que a viscosidade do óleo diesel (SCHWAB et al., 1987; COSTA, 2005; FRANCO et al, 2011). Outras características como a baixa volatilidade e reatividade das cadeias de hidrocarbonetos insaturados também são pontos negativos em relação à utilização dos óleos vegetais como líquidos combustíveis (DEMIRBAS, 2005).

Os ácidos graxos esterificados juntamente com o glicerol utilizados possuem uma cadeia carbônica de tamanho entre 10 e 18 átomos de carbono (com ou sem insaturação). A composição química dos óleos vegetais se reflete em propriedades como densidade, faixa de destilação, poder calorífero, viscosidade, ponto de fluidez e número de cetano. O poder calorífero determina a potência máxima a ser atingida pelo motor em operação. Já o índice de cetano define o poder de autoinflamação e combustão do óleo, definindo o desempenho global do

motor, determinado pela partida a frio, ruído e gradiente de pressão (COSTA NETO et al., 2000). O ponto de névoa relaciona-se com a temperatura inicial de cristalização do óleo e com a viscosidade interna de escoamento de um líquido (KNOTHE, 2005; ROBLES-MEDINA et al., 2009).

Os valores relativos a essas propriedades assemelham-se, em sua grande maioria, aos valores do óleo mineral. No entanto, o ponto de névoa e a viscosidade dos óleos vegetais são muito superiores. Para corrigir estes parâmetros, transformações químicas podem ser realizadas nos óleos vegetais, gerando um produto com propriedades fluidodinâmicas semelhantes às do óleo diesel mineral. Este produto obtido é totalmente miscível ao óleo mineral, podendo ser utilizado em motores que operam a diesel, sem necessidade de alteração de projeto (ROBLES-MEDINA et al., 2009; YUSUF et al., 2011). Dentre as técnicas mais conhecidas para modificação dos óleos vegetais, destacam-se a microemulsificação, diluição, pirólise e a transesterificação (ATABANI et al., 2012).

Das técnicas listadas, o método mais empregado para a transformação de óleos e gorduras é a transesterificação dos ácidos graxos com um álcool, que pode ser metanol ou etanol. Os produtos obtidos desta reação são o mono-álquil éster de ácido graxo, popularmente conhecido como biodiesel e a glicerina.

2.3 Principais matérias-primas para produção de biodiesel

2.3.1 Óleos e gorduras

Os óleos vegetais e gorduras animais são constituídos, majoritariamente, por triacilgliceróis (TAG, também chamados de triglicerídeos). Os TAG são ésteres de ácidos graxos com glicerol (1,2,3-propanotriol, também conhecido como glicerina). Os TAG de óleos vegetais e gorduras animais contêm diferentes tipos de ácidos graxos (AG). Os diferentes AG contidos nos TAG revelam o perfil de AG (ou composição de AG) de óleos vegetais e gorduras animais. Como cada AG apresenta propriedades químicas distintas, o perfil de AG é, provavelmente, o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais de onde se originam (KNOTHE, 2005).

Nos últimos anos, a utilização de óleos vegetais como matéria-prima para a produção de biocombustíveis tornou-se bastante atrativa.

Esse interesse tem por base algumas vantagens como, por exemplo: sua origem renovável, sua disponibilidade, seu baixo teor de enxofre e a presença de compostos aromáticos em sua composição, sua biodegradabilidade e fácil portabilidade, minimizando riscos de explosões.

O Brasil possui em seu território uma extensa diversidade de matéria-prima oleaginosa. Estima-se que o país possua na sua extensão territorial aproximadamente 200 espécies de oleaginosas com potencial para produção de biodiesel (PENTEADO, 2005; CARRAMENHA, 2007). A Figura 2.2 mostra as principais culturas utilizadas para produção de biodiesel em cada região do país.



Figura 0.2- Principais culturas oleaginosas para produção de biodiesel, de acordo com a região de cultivo.
Fonte: BIODIESELBR, (2012).

A escolha da matéria-prima para produção de biodiesel deve atender a fatores como: o teor de óleo vegetal e o processo de extração; a produtividade por área; o equilíbrio agrônomico; a atenção a diferentes sistemas produtivos; o ciclo de vida da planta; a adaptação territorial e o

impacto socioambiental de seu desenvolvimento (ATABANI et al., 2012).

Além dos óleos vegetais, outras fontes lipídicas podem ser empregadas na síntese de biodiesel, tais como: gorduras animais resultantes do abate de gado, aves e suínos; óleo de fritura, provenientes de cozinhas domésticas e industriais; e, mais recentemente, óleos obtidos a partir de microalgas (SUAREZ et al., 2009).

2.3.1.1 O óleo de palma

Atualmente, a palma, mais conhecida como Dendê, é considerada a oleaginosa com maior potencial para produção de biodiesel. O óleo de palma possui vantagens no que diz respeito ao seu uso com fins energéticos, tais como: 1) possui propriedades físico-químicas similares ao óleo diesel; 2) alta produtividade e potencial para produção em larga escala; 3) possui produção ao longo do ano todo e 4) o Brasil já possui tecnologia apropriada para aumentar a área plantada desta cultura (FURLAN et al., 2004).

A produtividade da palma é de cinco a dez vezes maior do que a produtividade de qualquer outro cultivo comercial de óleo vegetal. Por apresentar um rendimento anual em óleo de aproximadamente 3700 kg ha⁻¹, considerado alto quando comparado com rendimentos de 389 kg ha⁻¹ para o óleo de soja e de 857 kg ha⁻¹ para o óleo de amendoim (BIODIESELBR, 2012), a palma apresenta uma grande viabilidade e potencial para ser a fonte do óleo do biodiesel nacional. Mesmo com esta alta produtividade, o Brasil ainda explora muito pouco o óleo de palma, devido ao fato de necessitar de vários anos de investimento e com retorno a longo prazo, pois a palmeira só começa a dar frutos após quatro anos de seu plantio (TORRES, 2000).

Percebendo esse potencial e visando estimular a exploração consciente da palma, o Ministério da Agricultura, em parceria com o Ministério do Meio Ambiente e com a Casa Civil, lançou, em maio de 2010, o Programa de Produção Sustentável da Palma de Óleo no Brasil. O objetivo deste programa é incentivar o desenvolvimento, garantindo que a produção do óleo de palma não prejudique a Floresta Amazônica, região onde se encontra a maior parte da palma brasileira. O Programa abrange os Estados da Amazônia Legal e, adicionalmente, os estados que possuem potencial para a produção, devido as suas condições climáticas: Bahia, Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Espírito Santo e Rio de Janeiro. O programa selecionou uma área de 31 milhões de hectares

que já sofreram desmatamento e degradação que poderiam utilizar a palma para reflorestamento, fazendo seu cultivo sustentável. Os produtores garantirão através do programa a obtenção de crédito, treinamento e acesso às novas tecnologias (SILVEIRA, 2010).

O cultivo do dendê acontece em regiões tropicais, onde a temperatura média anual é de 25°C, índices pluviométricos anuais superiores a 2500 mm e insolação de mais de 1500 h/ano. As áreas de cultivo devem possuir boa drenagem solo espesso e plano. O ciclo de vida do dendê é longo, podendo atingir entre 25 a 30 anos (PENTEADO, 2005; CARRAMENHA, 2007, QUEIROZ et al., 2012). A Figura 2.3 mostra a palmeira, o cacho e o fruto do dendê.



Figura 0.3- Palmeira, cacho e fruto do dendê, da esquerda para a direita
Fonte: PANORAMIO (2012), BAHIA FLÂNEUR (2010) E BIBLIOTECA DA CAPOEIRA (2011).

O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: o óleo de dendê ou palma, extraído da parte externa do fruto (mesocarpo) e o óleo de palmiste, extraído das sementes (CARRAMENHA, 2007). Os dois tipos de óleo são extraídos através de processos diferentes.

O óleo extraído do fruto da palma possui aplicações em inúmeros setores. Na indústria alimentícia é utilizado em substituição para gorduras *trans* em produtos como margarinas, biscoitos, tortas e sorvetes. Na indústria de higiene e limpeza é utilizado em cosméticos, sabões, sabonetes e detergentes. Na indústria química produtos como lubrificantes, óleos, glicerina e vários tipos de ácidos possuem o óleo de palma em sua composição. O seu uso mais recente está direcionado ao setor de biocombustíveis. Diante desta grande versatilidade, o óleo de palma é atualmente o mais comercializado no mundo (SUFRAMA, 2003; TUPINAMBÁ, 2012).

2.3.2 Álcool

Os alcoóis mais empregados na síntese de biodiesel são os de baixa massa molecular e cadeia curta, como metanol e etanol. Alcoóis secundários e superiores como propanol, butanol e álcool isoamílico também podem ser utilizados como agente acilante na síntese de biodiesel, gerando produtos com um maior ponto de fluidez. No entanto, o alto custo destas substâncias, em relação ao metanol e ao etanol, tornam sua utilização impraticável em escala industrial (STAMENKOVIĆ et al., 2011).

O metanol é o álcool mais aplicado na síntese de biodiesel na reação de transesterificação. Além de apresentar um valor de mercado relativamente baixo, este álcool apresenta uma alta reatividade, fruto da sua cadeia carbônica curta e alta polaridade, gerando um alto rendimento em ésteres em pouco tempo de reação. Porém, o metanol é um álcool tóxico, venenoso e de origem fóssil (derivado do petróleo), características que são desfavoráveis ao processo (ROMERO et al., 2011; FELTES et al., 2011).

O etanol obtido a partir da cana-de-açúcar, por sua vez, representa uma alternativa ao uso do metanol, principalmente no Brasil. Sendo o país o maior produtor mundial de etanol e considerando que, aproximadamente, 50% do metanol consumido é importado (PETROBRÁS, 2011), a rota etílica representa uma diminuição nas custas do processo. Outras características como a baixa toxicidade do etanol e a produção a partir de fontes renováveis através do processo de fermentação, somam pontos extras para sua aplicação (ROBLES-MEDINA et al., 2009; YUSUF et al., 2011).

Embora ainda não seja aplicada industrialmente, a produção de biodiesel pela rota etílica tem sido alvo de pesquisa e desenvolvimento de diversos trabalhos (HSU et al., 2004; TONGBORIBOON et al., 2010; STAMENKOVIĆ et al., 2011). Em termos reacionais, a reação etílica é mais complexa do que a metílica, exigindo um ajuste reacional. Entretanto, adequando as quantidades estequiométricas entre óleo e o álcool, além das condições operacionais como temperatura, agitação e tempo espacial, pode-se obter um biodiesel com qualidade semelhante em ambas as rotas (CARRAMENHA, 2007).

Comparativamente, os ésteres de etila apresentam uma maior viscosidade, menor ponto de névoa e menor ponto de fluidez em relação aos ésteres metílicos. O carbono extra, adicionado ao esqueleto do éster etílico proveniente do etanol, confere um maior poder calorífero e índice

de cetano em relação aos ésteres metílicos. Adicionalmente, a queima destes ésteres promove uma redução nas emissões de NO_x, causando um impacto ambiental que os ésteres metílicos (DA RÓS et al., 2009).

2.4 Produção de biodiesel por transesterificação

O processo industrial mais utilizado para obtenção do biodiesel é a transesterificação de ácidos graxos de cadeia longa, presentes nos óleos e gorduras utilizadas como matéria-prima, juntamente com metanol. Os produtos obtidos majoritariamente nesta reação são os mono-álquil ésteres de ácidos graxos e a glicerina. Esse processo é realizado com o auxílio de catalisadores alcalinos, ácidos ou enzimáticos (DEMIRBAS, 2008). A Figura 2.4a mostra a reação geral de transesterificação de TAG com um álcool, formando ésteres alquílicos e glicerol. A Figura 2.4b descreve as reações consecutivas e reversíveis que sofrem os TAG durante a reação.

Os índices R₁, R₂ e R₃, na Figura 2.4, representam os hidrocarbonetos de cadeias alquílicas longas cuja composição varia de acordo com o óleo vegetal ou gordura animal utilizada, e o R' representa o tipo de álcool utilizado. A reação apresentada descreve a formação de ésteres e glicerol em uma reação que ocorre em três etapas consecutivas. Na primeira, ocorre a conversão do TAG em diacilglicerol (DAG), logo após o DAG é convertido em monoacilglicerol (MAG) e, finalmente, o MAG passa para glicerol, fornecendo uma molécula de éster em cada etapa. No final da reação, têm-se no total, uma molécula de glicerol e três moléculas de éster. Os MAG e DAG são produtos intermediários da reação (KOMERS et al., 2001; KNOTHE et al., 2005).

A reação de transesterificação é reversível. Porém a presença do glicerol, que é insolúvel no produto formado, leva à formação de um sistema bifásico, fazendo com que reação reversa não ocorra ou possa ser considerada negligenciável. Apesar disto, um excesso alcoólico costuma ser utilizado a fim de forçar a reação a ocorrer no sentido direto (KNOTHE et al., 2006, ROMERO et al., 2011).

Entre os fatores que devem ser considerados na reação de transesterificação estão: o efeito da razão molar entre o álcool e o óleo; o teor de ácidos graxos livres (AGL) na composição do óleo; a quantidade de água presente no óleo; o tempo de reação e a temperatura. O tipo de catalisador selecionado também altera o processo em termos

de eficiência e na qualidade dos produtos e coprodutos obtidos (NIGAM et al., 2011; ATABANI et al., 2012)

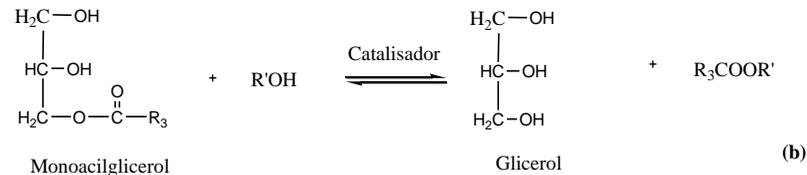
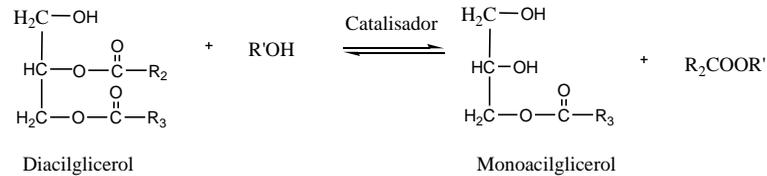
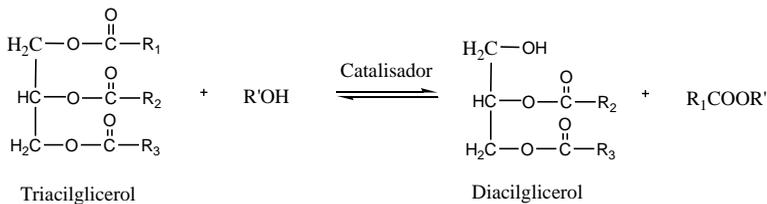
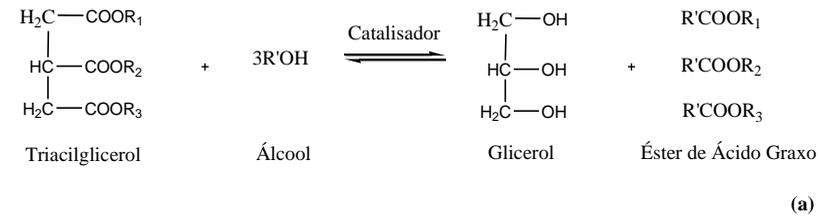


Figura 0.4- Transesterificação de TAG com álcool. (a) Reação global e (b) reações consecutivas

Fonte: Adaptado Fukuda et al. (2001)

A catálise alcalina é a rota mais utilizada na produção de biodiesel, sendo que os processos industriais, em sua quase totalidade, são conduzidos por esta rota. Este processo catalítico fornece um alto rendimento em ésteres em um baixo tempo reacional, sendo mais indicadas para óleos com baixo teor de AGL. Um alto índice de AGL na

presença de um catalisador alcalino pode levar a formação de sabões, que dificulta a separação do biodiesel e glicerol. Neste caso, quando se tem um elevado índice de AGL, a catálise ácida é mais eficiente (NIGAM et al., 2011). Geralmente, a catálise ácida resulta em uma taxa de conversão de TAG inferior à catálise alcalina, requerendo quantidades maiores de catalisador e relações entre álcool e óleo. Adicionalmente, os tempos de reação são mais longos, além de possuírem um consumo energético maior (SOUZA, 2006; STAMENKOVIĆ et al., 2011). Estes catalisadores atuam em um meio homogêneo, condição que acarreta problemas na etapa de separação e purificação dos produtos e coprodutos, necessitando um número maior de etapas e gerando mais resíduos (SAKAI et al., 2009; CHOUHAN et al., 2011).

Os catalisadores heterogêneos vêm sendo largamente estudados. Esta rota catalítica apresenta algumas vantagens como permitir a fácil separação do catalisador do meio reacional e sua consequente reutilização. Dentre os catalisadores heterogêneos mais investigados destacam-se as zeólitas básicas, os óxidos e os carbonatos de metais alcalinos terrosos e as enzimas, especialmente as lipases (NIGAM et al.; 2011).

Como uma alternativa para contornar os problemas relacionados aos catalisadores convencionais, a aplicação da catálise enzimática vem sendo amplamente investigada. A abordagem enzimática para a modificação de óleos e gorduras se beneficia da especificidade de algumas lipases, gerando produtos com um alto grau de pureza, reduzindo os custos relativos às etapas de purificação do produto. Em geral, as enzimas atuam na faixa de temperatura entre 40-60 °C, e devido a estas condições brandas de operação, problemas como a oxidação do óleo são evitados, além de se ter uma economia energética no processo. Além do mais, os produtos obtidos por catálise enzimática apresentam um alto grau de pureza, diminuindo as etapas de purificação e tratamento de resíduos (FELTES et al., 2011; GOG et al. 2012).

No entanto, a utilização da catálise enzimática em processos industriais ainda enfrenta uma série de dificuldades, principalmente na indústria de biodiesel. A maior barreira é sem dúvida o alto custo das enzimas frente aos catalisadores inorgânicos. A baixa estabilidade de algumas enzimas em relação aos alcoóis de cadeia curta e da presença

do glicerol também é observada (SÉVERAC et al. 2011; FELTES et al. 2011).

Em função do potencial dos catalisadores enzimáticos em processos biotecnológicos, novas propostas têm sido pesquisadas com o objetivo de viabilizar o seu uso, aperfeiçoando os sistemas operacionais a fim de buscar soluções para minimizar os aspectos desfavoráveis relacionados à sua utilização.

2.4.1 Lipases como catalisadores

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas encontradas em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias.

As lipases atuam sobre ligações éster presentes em TAG gerando moléculas de MAG, DAG, AGL de cadeias longas e glicerol. Além do mais, são a única classe de enzimas capazes de agir na interface água/óleo (SHARMA et al., 2001; SALIHU et al. 2012). Por possuírem a capacidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise, tiotransesterificação, em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade (FABER, 1997; VOET et al., 2000), as lipases oferecem uma grande possibilidade de aplicação em diversos setores como na indústria alimentícia, farmacêutica, química fina, tratamento de águas e bioenergia, especialmente na produção de biodiesel (SALIHU et al., 2012).

Sua utilização torna-se favorável nestas áreas de pesquisa por não requerem cofatores, atuarem em uma faixa de pH relativamente grande, serem muito estáveis neste meio e apresentarem especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (SHAH et al., 2009).

2.4.2 Produção de biodiesel por transesterificação enzimática

Nos processos enzimáticos de produção de biodiesel, alguns fatores são considerados essenciais para se atingir uma boa produtividade e viabilidade econômica, conforme demonstrado na Figura 2.5. O primeiro passo deve considerar a seleção da matéria-prima e a preparação de lipase. Segue-se com a seleção de um solvente orgânico, a determinação da razão molar entre o álcool e o óleo, a

temperatura, o teor de água, o pH do microambiente da lipase e a concentração de glicerol (ANTCZAK et al., 2009).

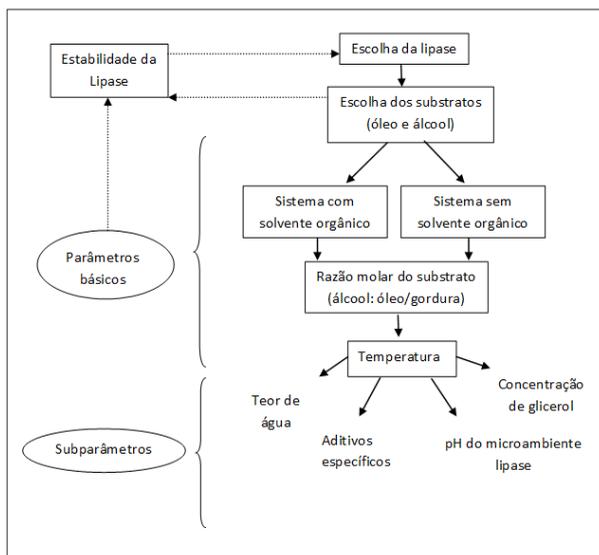


Figura 0.5- Parâmetros que afetam a reação de transesterificação enzimática. Fonte: adaptado de Antczak et al. (2009).

- **Seleção da lipase:** Para serem adequadas ao uso na síntese de biodiesel, as lipases devem apresentar algumas características tais como: capacidade de utilizar os MAG, DAG e TAG, assim como os AGL presentes na reação; baixa inibição frente ao substrato e componentes presentes no meio reacional; alta atividade e altos rendimentos em meios não aquosos; curto tempo de reação, possibilidade de reutilização da enzima imobilizada e resistência à temperatura (BAJAJ et al., 2010).

Lipases de diferentes fontes demonstram especificidade para diferentes substratos. A especificidade das lipases utilizadas na síntese de biodiesel refere-se a sua regioespecificidade e especificidade em relação ao tamanho da cadeia de hidrocarbonetos de ácidos graxos. A maioria das lipases pode ser classificada em dois grupos: 1) Específicas: sn-1,3- específica, que hidrolisa a ligação éster nas posições R_1 e R_3 do TAG e Sn-2- específica que hidrolisa a ligação éster nas posições R_2 e

2) Não específicas: não fazem a distinção entre as posições do éster (ANTCKZAC et al., 2009; TONGBORIBOON et al., 2010).

- Solventes: A adição de solventes no meio reacional auxilia de forma positiva a reação de transesterificação. O solvente atua diminuindo a viscosidade do óleo vegetal e auxiliando a solubilização do álcool com os TAG, evitando que ocorra a separação de fases (TAN et al., 2010; XU et al, 2000; ZHANG et al. 2010).

Entre os solventes mais utilizados, destacam-se o hexano, o heptano, o *terc*-butanol e o isopropanol. Laane et al. (1987) descreveu a influência da polaridade e hidrofobicidade dos solventes orgânicos na catálise enzimática em relação ao seu coeficiente de partição no sistema octanol/água, o log P. Segundo o autor, o melhor solvente orgânico garante aos substratos uma boa solubilidade e mantém a atividade enzimática. Solventes com um log P menor apresentam uma maior polaridade e uma maior solubilidade diante do substrato, o que auxilia na transferência de massa na reação. Em muitos casos, uma mistura de diferentes solventes pode ser empregada (ANTCKZAC et al., 2009; CHATTOPADYUAY et al., 2011).

Li et al.(2010) observaram este efeito ao estudar a metanólise do óleo da espécie *stillingia* catalisada pelas lipases Novozym[®] 435 e Lipozyme TL IM (*Thermomices lacuginosus*) na presença de solventes orgânicos com diferentes polaridades. O autor relata que, embora solventes com log P inferior a 2,0 sejam inadequados para síntese orgânica, os melhores resultados foram obtidos com solvente cujo log P encontra-se na faixa entre 1,4-1,52, como o *terc*-butanol, acetonitrila, *terc*-pentanol, tetrahidrofurano e 1-4-dioxano. Rendimentos menores foram observados em solventes mais hidrofóbicos, com log P superiores a 2,0, como o n-hexano e n-heptano. Estes resultados mostraram que solventes mais polares, como o *terc*-butanol, dissolveram melhor o metanol, evitando que este álcool não dissolvido causasse a desativação da lipase.

Dos solventes citados, o *terc*-butanol tem sido reportado como o que apresenta melhores resultados na grande maioria dos óleos vegetais e em uma grande gama de lipases (ROYON et al., 2007; CHEN et al. 2011). Devido sua cadeia ramificada composta por três grupos metil, este álcool apresenta um impedimento estérico, evitando a formação de ésteres *terc*-butílicos. Além disso, este solvente apresenta uma grande habilidade em solubilizar os TAG, o óleo e o glicerol, tornando-o bastante atrativo para as reações de síntese de biodiesel.

Todavia, além do *tert*-butanol apresentar um elevado preço, o processo para remoção do solvente do produto final também aumenta os custos de produção, além de introduzir outros problemas operacionais, como a diminuição da capacidade volumétrica do reator e problemas ambientais decorrentes da toxicidade e emissões. Assim, devem-se considerar tanto os aspectos negativos quanto os positivos ao se avaliar os benefícios do uso de solventes (SIMÕES, 2011).

- Razão molar: A relação estequiométrica entre o álcool e o óleo vegetal nas reações de alcoólise é de 3:1 (álcool: óleo). Costuma-se, no entanto, adicionar um excesso alcoólico a fim de deslocar o equilíbrio no sentido de formação dos produtos, aumentando o rendimento em ésteres.

A adição de solventes orgânicos auxilia a solubilização dos TAG hidrofóbicos e álcoois hidrofílicos. Além disso, o solvente ajuda a proteger a enzima do contato com o álcool (ANTCZAK et al. 2009; RAITA et al., 2010).

As razões molares entre o óleo e o álcool mais utilizadas variam entre 3:1 até 15:1, dependendo do álcool utilizado (CHATTOPADYUAY et al., 2011). Porém, segundo alguns autores, um excesso alcoólico elevado pode levar a um envenenamento do biocatalisador (ANTCZAK et al. 2009; RANGANATHAN et al., 2008; ZANGH et al., 2010). Este efeito ocorre, pois um aumento na concentração alcoólica acima do ideal pode diminuir a solubilidade do álcool. O álcool não solubilizado forma uma fase orgânica polar composta pelo álcool e o glicerol e que ao entrar em contato com a lipase, causa a sua desativação (RAITA et al., 2010). Este aumento da solubilidade afeta, também, a separação do glicerol, que dirige o equilíbrio no sentido contrário à formação dos produtos, diminuindo o rendimento da reação (MEHER et al., 2006).

A determinação da quantidade de álcool utilizada para cada sistema deve ser avaliada considerando separadamente a relação álcool-óleo-lipase. Sistemas que utilizam solventes necessitam de um excesso alcoólico menor para aumentar a solubilidade do meio. Para sistemas isentos de solvente, um excesso maior de álcool se faz necessário, no entanto, essa adição deve ser realizada em sucessivas e pequenas porções (ANTCZAK et al. 2009).

- Temperatura: As reações enzimáticas são fortemente dependentes da temperatura (CHATTOPADYUAY et al., 2011). Melhores rendimentos em ésteres são encontrados conforme se aumenta

a temperatura da reação até um determinado ponto. Acima deste limite, pode ocorrer a desnaturação da enzima. Em geral, a temperatura ótima para alicólise de óleos vegetais com metanol, etanol, isopropanol e isobutanol na presença de hexano varia entre 30 e 50 °C, dependendo da enzima utilizada (HAAS et al., 2002; ANTCZAK et al., 2009).

- Teor de água: A presença de uma baixa concentração de água na fase oleosa do substrato desempenha um papel crucial na manutenção da atividade catalítica das lipases (DALLA-VECCHIA et al., 2004; CHATTOPADYUAY et al., 2011). Um equilíbrio entre o teor de água e o substrato se faz necessário, pois sabe-se que uma pequena quantidade pode acarretar a inativação da enzima, ao passo que um volume elevado pode promover a hidrólise dos substratos.

- Glicerol: A presença de glicerol afeta diretamente a eficiência da reação via catálise enzimática, uma vez que o glicerol formado pode ficar aderido na superfície da enzima formando uma camada hidrofílica e dificultando a transferência de massa de substratos hidrofóbicos, podendo levar a uma queda no rendimento (DOSSAT et al., 1999; CHATTOPADYUAY et al., 2011). Quando a reação de transesterificação não ocorre de forma completa, os AGL presentes no produto também precisam ser eliminados.

Algumas abordagens são propostas para minimizar o efeito negativo do glicerol no meio reacional, por exemplo, a adição de outra substância hidrofílica como acetona ou sílica gel na reação (DOSSAT et al., 1999).

A adição de solventes como o terc-butanol e 2-propanol também são reportados como uma ação positiva, preservando a lipase do contato com o glicerol (LI et al., 2006; RAITA et al. 2010). Lavagens com álcool iso-propílico após a remoção do glicerol aderido ao catalisador também foram reportados como uma eficiente medida de recuperação da lipase (DU et al., 2003).

2.5 Reatores de leito fixo para produção de biodiesel

Reatores de leito fixo (PBR) têm sido investigados por diversos pesquisadores para o uso industrial. Este modelo de reator é um dos mais empregados para sistemas sólido-fluido em catálise heterogênea por: 1) permitir a reutilização de enzimas sem necessidade de separação prévia; 2) permitir manipular substratos com baixa solubilidade usando grandes volumes a baixas concentrações; 3) é adequado para a produção em longo prazo e em escala industrial, diferentemente de reator do tipo

tanque agitado, onde a enzima pode ficar suscetível à quebra e ao stress devido ao cisalhamento mecânico; 4) é mais econômico que operações em batelada e 5) a razão molar entre o substrato e a enzima é muito menor em um reator de leito fixo do que em reatores batelada, resultando em uma melhor performance (HALIM et al., 2009).

Este tipo de reator costuma ser empregado na área de biotecnologia com bastante eficiência (HAMA et al., 2011). Diversos autores têm estudado esta configuração de reator aplicado à catálise enzimática em reações de modificação de lipídios, através de preparações comerciais de diferentes tipos de lipases (XU et al., 2000; HSU et al., 2004; ROYON et al., 2007; DORS, 2011). O uso de reatores de leito fixo em reações catalisadas por lipases pode ser uma forma de diminuir os custos relacionados ao alto valor destes catalisadores, principalmente ao utilizar um sistema de operação contínuo (SÉVERAC et al., 2011).

A Tabela 2.1 apresenta um histórico de trabalhos publicados referentes à síntese enzimática de biodiesel a partir de óleos vegetais em PBR.

Shimada et al. (2002) estudaram a metanólise enzimática de óleos vegetais e resíduos de óleos comestíveis utilizando a lipase Novozym[®]435. Os autores descreveram que um baixo rendimento na metanólise dos óleos estudados conduzida em reatores do tipo batelada estava relacionado à inativação da lipase pelo contato com o metanol insolúvel. Baseado nestes resultados foi desenvolvido uma configuração de reatores composto por três colunas de 15 mm x 80 mm, empacotadas com a lipase imobilizada. O experimento foi conduzido a 30°C com uma vazão de 6 mL h⁻¹, onde metanol foi adicionado em etapas. A adição de metanol realizada em duas etapas, sendo 1/3 de equivalente molar de metanol adicionado na primeira etapa e 2/3 na segunda, foi a mais eficiente. A conversão do substrato em biodiesel foi superior a 90% e a lipase pode ser utilizada por mais de 100 dias, sem perdas de atividade.

Hsu et al. (2004) estudaram a etanolise de óleo residual de fritura catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia*, em modo contínuo. O aparato experimental foi composto por um PBR com 135 mm x 25 mm de diâmetro interno, empacotado com 10 g da lipase. Os melhores rendimentos em ésteres etílicos, superiores a 96%, foram obtidos ao trabalhar com uma vazão de 30 mL min⁻¹, temperatura de 50° C e razão molar entre o etanol e óleo de 4:1 e tempo de reação de 48 h.

Tabela 0.1- Trabalhos publicados referentes à síntese enzimática de biodiesel em PBR.

Lipase	Óleo	Agente Acilante	Meio	Referência
Novozym [®] 435	Óleo residual	MeOH	Isento de solvente	SHIMADA et al., 2002
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo residual	EtOH	Isento de solvente	HSU et al., 2004
Novozym [®] 435	Óleo de semente de algodão	MeOH	<i>terc</i> -butanol	ROYON et al., 2007
Novozym [®] 435	Óleo de soja	MeOH	<i>terc</i> -butanol	SHAW et al., 2008
Novozym [®] 435	Óleo de palma residual	MeOH	<i>terc</i> -butanol	HALIM et al., 2009
Novozym [®] 435	Óleo de soja	Isopropanol	Isento de solventes	CHANG et al., 2009
Lipase AK Lipase AY	Óleo de palma	EtOH	Isento de solventes	TONGBORIBOON et al., 2010
Novozym [®] 435	Óleo de soja	MeOH	<i>terc</i> -butanol	CHEN et al., 2011
Lipase AK imobilizada em SiO ₂ - PVA e Novozym [®] 435	Óleo de palma	EtOH	<i>terc</i> -butanol	DORS, 2011
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de babaçu	EtOH	Isento de solventes	SIMÕES, 2011

Royon et al. (2007) estudou a metanólise do óleo de semente de algodão mediada pela lipase Novozym[®]435. A estabilidade da lipase foi testada em no meio reacional composto pelo substrato (metanol: óleo de semente de algodão) na razão molar 6:1, adição de 32,5% de solvente *terc*-butanol. Foi observado no processo conduzido em batelada o solvente contribuiu para eliminar a inibição enzimática causada pelo

metanol insolúvel. O rendimento em ésteres metílicos na presença de solvente atingiu 97% após 24 h de reação, a 50° C. Ao utilizar um PBR com vazão de 9,6 mL h⁻¹ g enzima⁻¹ foram atingidos rendimentos de 95% e o sistema operou por mais de 500 h sem apresentar uma diminuições significativas rendimento dos ésteres.

Shaw et al. (2008) desenvolveram uma abordagem estatística a fim de compreender melhor como as variáveis de uma reação enzimática de produção de biodiesel em sistema contínuo se relacionam. Para tal, foi estudada a metanólise do óleo de soja catalisada pela lipase Novozym[®]435, utilizando como cossolvente uma mistura de n-hexano e *terc*-butanol na razão molar de 9:1 (v/v). A mistura reacional foi bombeada de um tanque de alimentação para um reator de leito fixo construído com um tubo de aço inoxidável de 25 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,25 cm, empacotado com 1,0 g de enzima. As condições experimentais foram definidas através de um planejamento experimental. Dentre as condições estudadas, a que apresentou melhores resultados foi: 55 °C, vazão de 0,1 mL min⁻¹ e razão molar (metanol: óleo de soja) de 5:1; alcançando 74% de rendimento em ésteres metílicos. Os menores rendimentos foram obtidos nas condições de 45 °C, 0,5 mL min⁻¹ e razão molar (metanol: óleo de soja) de 4:1; com valor de 17,3%. Segundo os autores, os parâmetros que exerceram uma maior influência no desempenho global do reator em relação à conversão em ésteres metílicos foram a temperatura e a vazão de alimentação.

Halim et al.(2009) utilizaram uma configuração de reatores de leito fixo constituídos por duas colunas de vidro com diâmetro interno de 1 cm e 18 cm de comprimento, com sistema equipado com controlador de temperatura tipo PID. Este aparato experimental foi utilizado para estudar a metanólise enzimática do óleo de palma residual, na razão molar (metanol: óleo de palma) de 4:1, na presença de *terc*-butanol como cossolvente (1:1 *terc*-butanol: óleo de palma v/v) e temperatura de 40 °C. Os autores avaliaram a influência da altura do leito empacotado com a lipase Novozym[®]435 e o efeito causado pela vazão de alimentação na reação de síntese de biodiesel. O melhor rendimento em ésteres etílicos foi alcançado com leito de 12 cm de altura e vazão de 0,55 mL min⁻¹, atingindo 80% de conversão. Foi observado que um aumento da vazão superior a 0,6 mL min⁻¹ causou um decréscimo no rendimento de ésteres. Este comportamento poderia ser explicado através do fato de que vazões elevadas (entre 0,9 e

1,2 mL min⁻¹) podem fazer o substrato passar muito rapidamente pela enzima, ligando-se fracamente ao seu sítio catalítico e reduzindo a formação de ésteres. Uma diminuição na conversão em ésteres também foi observada ao aplicar vazões mais baixas, que provocam uma resistência da transferência de massa pela camada líquida do filme. Em relação à altura do leito, os resultados reportados pelos autores demonstraram que aumentos superiores a 9 cm não proporcionaram melhores conversões em ésteres. Isto ocorre, possivelmente, porque as moléculas de enzima presente no excesso não estariam disponíveis ao substrato, não contribuindo significativamente para a reação. A configuração ideal do sistema foi definida como 10,53 cm de altura do leito, vazão de 0,57 mL min⁻¹, atingindo 80,3% de rendimento em ésteres metílicos.

Chang et al. (2009) estudaram a síntese de biodiesel a partir de óleo de soja e isopropanol, utilizando a lipase Novozym[®] 435 em PBR. O meio reacional foi composto pelo substrato em uma razão molar de 4,14:1 (álcool:óleo:), 1,7 g de lipase, vazão de 0,10 mL min⁻¹ e temperatura de 51,5 °C. O éster isopropílico foi obtido com uma conversão de 75%, com a lipase apresentando uma alta estabilidade, operando durante 7 dias sem diminuir a produção em ésteres. Segundo os autores, o álcool isopropílico é um subproduto da indústria eletrônica e sua utilização reduziria os custos do processo de produção de biodiesel.

A síntese contínua de biodiesel utilizando um PBR também foi estudada por Tongboriboon et al. (2010). Os autores utilizaram óleo de palma e etanol em meio isento de solventes, utilizando como catalisador uma mistura de lipases imobilizadas em Accurel EP-100 (Lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* e Lipase AY de *Candida rugosa*). O reator foi constituído por duas colunas empacotadas, sendo que na primeira as duas enzimas estavam totalmente misturadas, e na segunda coluna a Lipase AY estava no fundo e a Lipase AK no topo. O sistema foi conduzido na temperatura de 45 °C e vazão de 0,25 mL min⁻¹. Os rendimentos médios em ésteres etílicos foram de 14% na coluna empacotada com as lipases separadas e 22% na coluna com as lipases misturadas. A baixa conversão do substrato em ésteres etílicos observados na primeira coluna pode ser explicada pelo efeito inibitório do etanol sobre a atividade da Lipase AY. Como uma alternativa para solucionar o problema das baixas conversões em ésteres, os autores propuseram aumentar o comprimento da coluna de reação. Através desta medida, as o teor de biodiesel obtido na coluna com as lipases separadas

aumentou para 67% em 8h de reação, diminuindo para 59% e 49% após 12 e 22 h, respectivamente.

Chen et al. (2011) investigou através de um planejamento experimental as afinidades entre as variáveis e reação (temperatura de reação, vazão) e resposta (razão molar do substrato) de síntese de biodiesel metílico de óleo de soja. A reação foi realizada em PBR utilizando a lipase Novozym[®]435 e *terc*-butanol como cossolvente (32,5% em relação à massa de óleo). A condição ótima de operação do PBR ocorreu com uma vazão de 0,1 mL min⁻¹, 52,1 °C e a uma razão molar de 4:1 (álcool: óleo). Nestas condições, o PBR foi capaz de operar por mais de 30 dias sem apresentar uma perda significativa na eficiência do processo, chegando a atingir uma conversão molar máxima de 83,31%.

Dors (2011) realizou uma investigação bastante completa a respeito da produção de biodiesel etanólico de óleo de palma em sistema contínuo, utilizando as lipases de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxina- álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) e de *Candida antarctica* (Novozym[®]435). Os experimentos foram conduzidos em reatores do tipo tanque agitado com cesta e em PBR. Para o reator com cesta foram os maiores rendimentos em ésteres etílicos foram de 48%, com um tempo espacial de 13h, na presença de 30% de *terc*-butanol em relação ao óleo de palma. No entanto, os maiores rendimentos foram obtidos com o uso do PBR, atingindo 88% de rendimento ao utilizar a enzima AK SiO₂-PVA, tempo espacial de 6 h na presença de *terc*-butanol.

A síntese de biodiesel a partir de óleo de babaçu pela rota etílica foi estudada por Simões (2011). Neste estudo foi utilizado um reator de leito fixo de diâmetro interno de 0,15 cm e altura de 21 cm empacotado com a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida de sílica-PVA. Os experimentos foram conduzidos em meio isento de solvente sob 50 °C, aplicando tempos espaciais entre 7 e 13 h e razões molares entre etanol e óleo de babaçu variando de 7:1 e 12:1. A razão molar exerceu forte influência no alcance de conversões elevadas de ésteres etílicos, sendo que rendimentos de 95% e produtividade de 54,8 mg éster g_{total}⁻¹ h⁻¹ foram alcançados na composição de 12:1 (etanol: óleo de babaçu). A autora salienta que para processos em larga escala, a utilização de óleos vegetais com um menor teor de ácidos graxos saturados seriam mais adequados ao processo, por resultarem em menores problemas operacionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

Para este trabalho foi selecionada a lipase comercial Novozym[®]435 produzida pela Novozymes Latin América (Araucária, Paraná).

A Novozym[®]435 é preparada a partir da lipase de *Candida antarctica* por meio de fermentação de cultura submersa de uma linhagem de *Aspergillus* geneticamente modificada e imobilizada em resina aniônica macroporosa (Lewatit VP OC 1600, Bayer) através de adsorção. A área superficial deste suporte (BET) é de 130 m² g⁻¹, com poros de diâmetro médio de 150 Å e volume médio de 0,5 cm³ g⁻¹ (DALLA ROSA, 2009). A massa específica da lipase Novozym[®]435 é de 0,69 g mL⁻¹ (DORS, 2011). Esta preparação é listada como não específica e termoestável, podendo ser utilizada em temperaturas na faixa de 30 a 70 °C. Porém, recomenda-se trabalhar em temperaturas na faixa de 50 a 60 °C a fim de estender sua estabilidade operacional (NOVOZYMES, 2007).

3.1.2 Óleo vegetal

O óleo de palma refinado utilizado como substrato em todos os experimentos foi fornecido pela Agropalma (Pará, Brasil). Conforme os dados técnicos fornecidos pela empresa, a amostra empregada no desenvolvimento deste projeto apresenta as características mostradas na Tabela 3.1.

Tabela 0.1 - Propriedades físicas do Óleo de Palma refinado.

Propriedades	Agropalma	Limites (AOCS)^a
Acidez (% ácido palmítico)	0,034	≤0,05
Cor (Lovibond Red 51/4)	1,6	≤4,0
Índice de Iodo (Wiijs)	52,82	51-55
Índice de Peróxidos (mEq Kg ⁻¹)	0	≤1,0
Ponto de Fusão (°C)	34,6	36 ± 2

^a AOCS - America Oil Chemists´ Society

Fonte: Agropalma (2007)

A Tabela 3.2 apresenta a composição de ácidos graxos presentes no óleo de palma refinado.

Tabela 0.2 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo de palma refinado.

Ácidos Graxos	Óleo de palma (%)	Massa Molar dos ácidos graxos ($\text{g g}_{\text{mol}}^{-1}$)	Massa Molar dos ésteres de etila ($\text{g g}_{\text{mol}}^{-1}$)
Láurico – C12	0,1	200,32	228,32
Mirístico - C14	1,2	228,37	256,37
Palmítico - C16	46,8	256,42	284,42
Esteárico – C18	3,8	284,47	312,47
Oleico - C18:1	37,6	280,44	310,46
Linoléico - C18:2	10,0	280,44	308,44

Fonte: Dors (2011)

3.1.3 Reagentes

Outros reagentes utilizados foram:

- Solventes: etanol 99% (Nuclear), hexano (Nuclear), acetona (Synth) e *terc*-butanol (Dinâmica);
- Hidróxido de potássio (Merck), fenolftaleína (Coleman), butirato de metila (Aldrich), metaperiodato de sódio (Vetec), ácido sulfúrico (Nuclear), etileno glicol (Vetec) e hidróxido de sódio (Vetec);
- Padrões cromatográficos: laurato de etila, miristato de etila 99%, oleato de etila 98% (Aldrich), palmitato de etila > 99%, estearato de etila 99% e linoleato de etila > 99% (Sigma).

3.1.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Agitador magnético (Modelo DI-03, Dist);
- Aquecedor portátil (Modelo AQC408, Cadence);
- Balanças analíticas (Digimed KN500 e Bel Engineering);
- Banho termostático com controle microprocessado (Modelo DI-911, Dist);
- Bomba peristáltica (Modelo SJ-1211, ATTO)
- Bomba peristáltica (Modelo 323S, Watson-Marlon)
- Cromatógrafo a gás (Modelo GC-2010AF, Shimadzu)
- Resistência flexível (Resistência flexível 25 W, KW)

- Resistências Elétricas);
- Potênciometro (Analion 2000).

3.2 Metodologia experimental

3.2.1 Síntese do biodiesel de óleo de palma em reator de leito fixo

Todos os experimentos de produção de biodiesel realizados neste trabalho utilizaram um reator de leito fixo operando em modo contínuo. O aparato experimental utilizado foi constituído de um reator de vidro encamisado com volume total de 20 mL (diâmetro interno de 1,56 cm e comprimento de 10,5 cm) e um tanque de alimentação de vidro encamisado com volume total de 500 mL. Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 50 °C controlada por meio de um banho termostatzado. A coluna foi empacotada com uma suspensão da lipase em uma pequena quantidade do meio reacional (aproximadamente 2 mL) e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna em fluxo ascendente, de modo a eliminar as bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna.

A quantidade do catalisador Novozym[®]435 utilizado em todos os experimentos foi de aproximadamente 4,5 g, resultando em um volume útil do reator de 13,25 mL. O substrato foi composto por óleo de palma, etanol e o solvente *terc*-butanol (quando presente). Este substrato foi mantido no tanque de alimentação sob agitação magnética, temperatura controlada e com condensador acoplado; sendo bombeado até o reator de leito fixo com auxílio de uma bomba peristáltica na vazão ajustada. A Figura 3.1 apresenta o esquema do aparato experimental e as condições reacionais utilizadas em cada ensaio são descritas na Tabela 3.3.

As condições utilizadas nos ensaios propostos na Tabela 3.3 foram baseadas em condições estabelecidas em trabalhos realizados anteriormente por Dors (2011). A autora obteve os melhores resultados utilizando a razão molar entre etanol e o óleo de palma de 9:1, 30% (v/v) do solvente *terc*-butanol e tempo espacial de 6h. A partir destes dados, foi estudada uma nova faixa de tempos espaciais e composição do meio reacional. Em todos os experimentos, a alimentação do biorreator foi iniciada no tempo 0 h e foram coletadas amostras diárias, primeiramente a cada período correspondente a um tempo espacial e após atingir o estado estacionário a cada 24 h. As amostras foram

estocadas a -2°C até a realização das análises cromatográficas para quantificação dos ésteres de etila e não sofreram evaporação do solvente ou passaram por etapas de purificação.

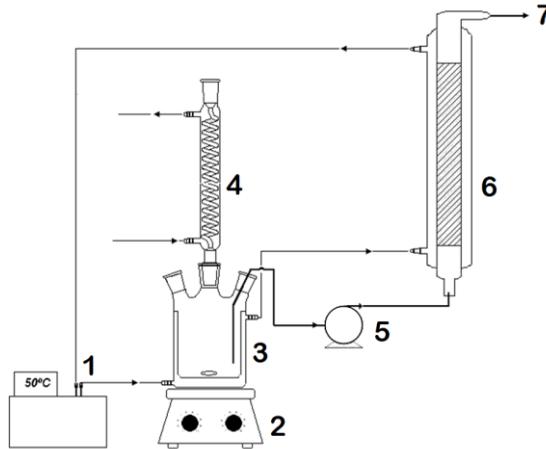


Figura 0.1- Aparato experimental utilizado nos experimentos de produção de biodiesel com o reator tipo leito fixo operando em modo contínuo. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator de leito fixo, 7- Saída de produto.

Tabela 0.3- Condições experimentais utilizadas em cada ensaio

Experimento	Tempo Espacial (h)	Razão Molar (etanol: óleo)	Solvente (% v/v) ^a
1	3,0	9:1	30
2	1,0	9:1	30
3	0,5	9:1	30
4	1,0	9:1	-
5	6,0	12:1	-

^a Percentual de *tert*-butanol em relação ao volume de óleo de palma

3.2.2 Calibração da bomba peristáltica

A calibração da bomba peristáltica foi realizada utilizando o aparato experimental e nas mesmas condições aplicadas nos ensaios de produção de biodiesel (Tabela 3.3). A mangueira utilizada era de marprene de 1,6 mm x 0,5 mm (Watson – 913.AJ05.016). O ajuste da vazão foi realizado inicialmente considerando as condições de

calibração do fabricante, que utiliza água para traçar a curva de calibração. Após a obtenção deste dado, foi realizado um ajuste na bomba para alcançar os valores de vazão utilizada em cada experimento. Estes ajustes foram realizados a partir da coleta de 1 mL do meio reacional, acompanhando o tempo decorrido com o auxílio de um cronômetro.

3.3 Métodos de análise

3.3.1 Determinação da atividade hidrolítica da lipase

Para a determinação da atividade enzimática da lipase Novozym[®]435 foi utilizada a metodologia adaptada de Bastida et al. (1998). O substrato foi preparado a partir de uma solução 1% de butirato de metila diluída em tampão fosfato pH 7,0 (20 mM). Em frascos de Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 10 mL de substrato e 0,02 g do catalisador contendo lipase. Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostatzado com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,01 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade hidrolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de ensaio. As atividades foram determinadas pela equação 3.1 e expressas em $U \text{ g}_{\text{catalisador}}^{-1}$.

$$A_H = \frac{(V_a - V_b)C_{KOH} \times 10^6}{t \times m_A} \quad (3.1)$$

Onde:

A_H = atividade hidrolítica da lipase ($\mu\text{mol g}_{\text{catalisador}}^{-1} \text{ min}^{-1}$),

V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra (L),

V_b = volume de KOH gasto na titulação do branco (L),

C_{KOH} = concentração da solução de KOH (mol L^{-1}),

t = tempo da reação (min),

m_A = massa da amostra de catalisador (g).

3.3.2 Determinação quantitativa do glicerol

O glicerol total presente nas amostras foi determinado através do método do periodato de sódio proposto por Cocks et al. (1966). A metodologia consiste na reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio (NaIO_4) em solução aquosa ácida, produzindo formaldeído e ácido fórmico, este último utilizado como medida do glicerol. A concentração de glicerol contido na amostra foi determinada pela equação 3.2.

$$G = \frac{\mu_{\text{NaOH}}(V_A - V_B)M_G}{m_A} \quad (3.2)$$

Onde:

G = teor de glicerol presente na amostra ($\text{g}_{\text{glicerol}} \text{g}_{\text{total}}^{-1}$),

μ_{NaOH} = molaridade da solução de NaOH (mol L^{-1}),

V_A = volume da solução de NaOH gasto na amostra (L),

V_B = volume da solução de NaOH gasto no branco (L),

m_A = massa da amostra utilizada (g_{total}).

M_G = massa molar do glicerol ($\text{g}_{\text{glicerol}} \text{mol}^{-1}$),

3.3.3. Dosagem dos ésteres etílicos

A dosagem dos ésteres etílicos foi realizada a partir da metodologia adaptada de Chen, et al. (2009). Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2010AF, equipado com um detector por ionização de chama, um sistema de injeção split e uma coluna capilar (RTX-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Restek). O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão de 30 mL min^{-1} . As temperaturas do detector e injetor foram de 310 e 290 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A temperatura da coluna, inicialmente, foi mantida a 150 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min e, em seguida, aquecida a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 205 $^{\circ}\text{C}$ (3 min), a 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 225 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) e a 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 275 $^{\circ}\text{C}$. O tempo total da análise foi de 23,5 min. As condições para determinação dos ésteres de etila estão apresentadas na Tabela 3.4. Exemplos de cromatogramas são apresentados no Anexo A.

Tabela 0.4- Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.

Padrão Interno (PI)	Salicitato de Metila (20 g L ⁻¹)
Programa de Temperatura da Coluna	150 °C (2 min), a 10° C min ⁻¹ até 205° C (3 min), a 2° C min ⁻¹ até 225° (1 min) e a 25° C até 275 °C.
Gás de Arraste	Nitrogênio
Preparação da Amostra	1:3 (amostra: hexano),
Preparação para Injeção	1:1 (amostra: padrão interno)
Tempo de Retenção para os Monoésteres de Etila (min)	PI 3,47 C12 EtOH 6,97 C14 EtOH 9,55 C16 EtOH 13,43 C18 EtOH 18,59 C18:1 EtOH 18,06 C18:2 EtOH 17, 82

3.3.4 Cálculo do tempo espacial

O tempo espacial para o reator de leito fixo é definido como o volume útil do reator dividido pela vazão volumétrica na entrada do reator, conforme a Equação 3.3 (FOGLER, 2002).

$$\tau = \frac{V}{v} \quad (3.3)$$

Onde:

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (3.4)$$

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{m}{\rho_s} \quad (3.5)$$

Sendo:

τ = tempo espacial (h),

V = volume útil do reator (mL),

v = vazão volumétrica na entrada do reator (mL h⁻¹),

V_{reator} = volume total do reator (mL),

$V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no reator (mL),

m = massa de catalisador (g),

ρ_s = massa específica do catalisador (g mL^{-1}).

3.3.5 Rendimento em ésteres de etila

O rendimento das reações estudadas foi definido como o valor que expressa a massa de ésteres de etila obtida em relação à massa teórica de ésteres de etila, considerando conversão total (Equação 3.6). A massa de ésteres de etila teórica foi determinada a partir da massa inicial de ácidos graxos presente no óleo de palma, da massa molar dos ácidos graxos presente no óleo e dos ésteres de etila. Os dados utilizados para o cálculo da massa teórica de ésteres se encontram na Tabela 3.2.

$$R_{EE} = \frac{m_{EE_0}}{m_{EE_t}} \quad (3.6)$$

$$m_{EE_t} = \frac{m_{AG} \cdot M_{EE}}{M_{AG}} \quad (3.7)$$

$$m_{AG} = m_{\text{óleo}} \cdot C_{AG} \quad (3.8)$$

Onde:

R_{EE} = rendimento ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}} \text{g}_{\text{ésteres teórica}}^{-1}$),

m_{EE_0} = massa de ésteres de etila obtida ($\text{g}_{\text{ésteres etílicos}}$),

m_{EE_t} = massa de ésteres de etila estequiométrica teórica ($\text{g}_{\text{ésteres etila}}$),

m_{AG} = massa de ácido graxo contido no TAG inicial ($\text{g}_{\text{ácidos graxos inicial}}$),

M_{EE} = massa molar média do éster de etila formado ($\text{g}_{\text{éster etílico}} \text{gmol}^{-1}$);

M_{AG} = massa molar média do ácido graxo contido no TAG ($\text{g}_{\text{ácidos graxos}} \text{gmol}^{-1}$);

$m_{\text{óleo}}$ = massa de óleo de palma inicial ($\text{g}_{\text{óleo inicial}}$),

C_{AG} = concentração mássica de ácido graxo no óleo de palma ($\text{g}_{\text{ácido graxo}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$).

3.3.6 Produção

A produção de ésteres etílicos, considerando que a vazão volumétrica é constante no reator, foi definida e calculada conforme a Equação 3.9

$$P_e = F C_e^S \quad (3.9)$$

Onde:

P_e = produção de ésteres etílicos ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{h}^{-1}$),

F = vazão volumétrica de alimentação (mL h^{-1}),

C_e^S = concentração de ésteres etílicos à saída do reator ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{mL}^{-1}$)

3.3.7 Produtividade

A produtividade de ésteres etílicos foi definida e calculada conforme a Equação 3.10.

$$p_e = \frac{P_e}{V} = \frac{C_e^S}{\tau} \quad (3.10)$$

Onde:

p_e = produtividade ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$),

P_e = produção de ésteres etílicos ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{h}^{-1}$)

C_e^S = concentração de ésteres etílicos à saída do reator ($\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{mL}^{-1}$),

τ = tempo espacial (h).

3.3.8 Tempo de meia-vida do biocatalisador

A constante de desativação e tempo de meia-vida da lipase Novozym[®]435 foram calculados considerando um decaimento exponencial da atividade do catalisador. Os dados utilizados foram coletados a partir do início do ensaio ($t=0$) até o começo do estado estacionário, considerando que a partir deste ponto a atividade enzimática não alterou significativamente. Os cálculos foram realizados pelas equações 3.11 e 3.12 respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-K_d \cdot t} \quad (3.11)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (3.12)$$

Onde:

A_0 = atividade hidrolítica inicial do biocatalisador ($U\ g_{\text{catalisador}}^{-1}$),
 A = atividade hidrolítica residual do biocatalisador ($U\ g_{\text{catalisador}}^{-1}$),
 K_d = constante de desativação (h^{-1}),
 t = tempo de reação até o início do estado estacionário (h)
 $t_{1/2}$ = tempo de meia vida (h^{-1}).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processo contínuo de etanólise enzimática do óleo de palma

Neste trabalho foram realizados cinco experimentos para produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo operado em modo contínuo. Este tipo de reator é frequentemente citado na literatura pelo seu bom desempenho na produção de biodiesel, apresentando vantagens como alta eficiência em reações catalisadas por lipases, baixo custo de produção e facilidade de operação em modo contínuo (HALIM et al., 2009). Por estes motivos, este modelo de reator foi o escolhido para a execução deste trabalho.

A lipase Novozym[®]435 foi selecionada como o biocatalisador devido às suas características favoráveis em reações de transesterificação de óleos vegetais, ao alto desempenho em reatores de leito fixo e ao elevado poder catalítico (SÉVERAC et al. 2011; EISENMENGER et al., 2009).

Os experimentos foram montados no interior de uma capela adaptada, para minimizar a troca de calor do sistema com o ambiente, evitando, assim, a solidificação do óleo de palma. Foram utilizados, também, uma resistência elétrica flexível em torno da mangueira de alimentação e um termoaquecedor portátil, este último, somente quando a temperatura ambiente estava abaixo de 25°C. A Figura 4.1 mostra o aparato utilizado nos experimentos.



Figura 0.1- Aparato experimental utilizado nos ensaios de produção de biodiesel etanólico de óleo de palma em modo contínuo.

4.2 Influência do tempo espacial na etanólise enzimática de óleo de palma

Inicialmente foi avaliada a influência de diferentes tempos espaciais na etanólise enzimática do óleo de palma.

O tempo espacial, determinado pela Equação 3.3, é a razão entre o volume útil do reator (Equação 3.4) e a vazão volumétrica na entrada do reator de leito fixo, definindo, assim, o tempo médio que o substrato leva para percorrer o caminho da entrada até a saída do reator e, conseqüentemente, o tempo em que ficará em contato com o biocatalisador, não considerando a variação da massa específica da mistura reacional.

O objetivo deste estudo foi definir um tempo espacial ideal para a reação de etanólise enzimática de óleo de palma, catalisada pela lipase Novozym[®]435, visando à eficiência da síntese de biodiesel. Para atingir este objetivo, foram realizados três experimentos com diferentes tempos espaciais. Dors (2011) já estudou a etanólise enzimática de óleo de palma em sistema contínuo em condições experimentais semelhantes ao presente trabalho, porém aplicando um tempo espacial único de 6 h.

O experimento 1 foi realizado sob vazão de $0,0812 \text{ mL min}^{-1}$, correspondendo a um tempo espacial de 2,72 h, ou nominalmente de 3 h. A razão molar entre etanol e óleo de palma foi de 9:1, o solvente terc-butanol foi adicionado na proporção de 30% (v/v) em relação ao óleo de palma e todo o sistema reacional foi mantido à temperatura constante de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A duração do experimento foi de 240 h. Considerando o tempo espacial de 3 h aplicado no experimento, a duração total do experimento em horas foi equivalente a 80 tempos espaciais contínuos.

A Figura 4.2 apresenta o rendimento de ésteres etílicos obtidos como produto da reação, calculado por meio da Equação 3.6. Nesta figura, nota-se que o experimento atingiu o estágio estacionário em 48 h (16 tempos espaciais contínuos), permanecendo com este comportamento até 144 h (48 tempos espaciais contínuos). Após este período, houve um decréscimo no rendimento do produto.

O rendimento encontrado em 36 h foi de 125%, valor que pode ser explicado pela ocorrência de uma pausa na reação, causada pela solidificação do óleo no interior da mangueira, levando a crer que houve um acúmulo de ésteres no interior do reator, os quais foram retirados e quantificados juntamente com o ponto de amostragem seguinte ao restabelecimento do sistema. O rendimento médio encontrado no estado

estacionário foi de 77%.

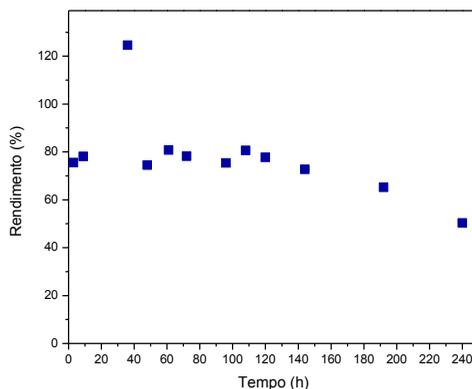


Figura 0.2- Experimento 1: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,0812 mL min⁻¹, tempo espacial de 3 h, temperatura 50° C, empregando a lipase Novozym®435 como catalisador.

Embora o ensaio tenha apresentado conversões em ésteres etílicos elevadas durante a maior parte do tempo, houve dificuldade em manter o estado estacionário. Os frequentes entupimentos na mangueira de alimentação do reator de leito fixo provavelmente impediram a manutenção deste estado. Mesmo com o auxílio do aquecedor portátil e da resistência elétrica flexível em torno da mangueira, a temperatura ambiente, na faixa entre 5 a 10° C, foi um obstáculo, ocasionando inúmeros entupimentos, uma vez que o óleo de palma possui ponto de fusão em torno de 37° C.

O experimento 2 foi realizado sob vazão de 0,2349 mL min⁻¹, correspondendo a um tempo espacial de 0,94 h, nominalmente de 1 h. A razão molar entre etanol e óleo de palma foi de 9:1, o solvente *tert*-butanol foi adicionado na proporção de 30% (v/v) em relação ao óleo de palma e todo o sistema reacional foi mantido à temperatura constante de 50° C. A duração do experimento foi de 91 h, valor correspondente a 91 tempos espaciais contínuos.

A Figura 4.3 apresenta o rendimento em ésteres etílicos formados

obtidos como produto na reação.

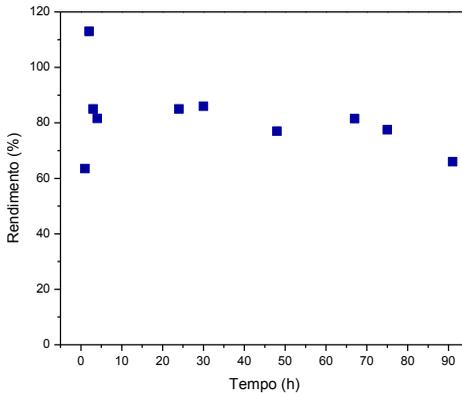


Figura 0.3- Experimento 2: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30 % (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,2349 mL min⁻¹ tempo espacial de 1 h, temperatura 50° C, empregando a lipase Novozym[®]435 como catalisador.

O rendimento em ésteres etílicos obtido no experimento 2 foi de 82% no estado estacionário, atingido em 4 h de reação (4 tempos espaciais contínuos), e permanecendo neste estado até 75h (75 tempos espaciais contínuos).

O experimento 3 foi realizado sob vazão de 0,4782 mL min⁻¹, correspondendo a um tempo espacial de 0,46 h, nominalmente 0,5 h. A razão molar entre etanol e óleo de palma foi de 9:1, o solvente *tert*-butanol foi adicionado na proporção de 30% (v/v) em relação ao óleo de palma e todo o sistema reacional foi mantido à temperatura constante de 50 °C. A duração do experimento foi de 54 h, tempo correspondente a 108 tempos espaciais contínuos. A Figura 4.4 apresenta o rendimento em ésteres etílicos formados no decorrer da reação.

O rendimento médio atingido no estado estacionário foi de 79%, iniciado após 4,0 h de reação (8 tempos espaciais contínuos). O estado estacionário permaneceu até 50 h de reação (100 tempos espaciais contínuos).

Os problemas relativos à manutenção da temperatura enfrentados durante a realização do experimento 1 foram minimizados durante os experimentos 2 e 3. Desta forma, o sistema operou de forma mais

estável durante todo o período de duração dos ensaios. Não foram observados problemas de entupimentos na mangueira de alimentação durante a maior parte do tempo e nem solidificação do óleo no reator de leito fixo.

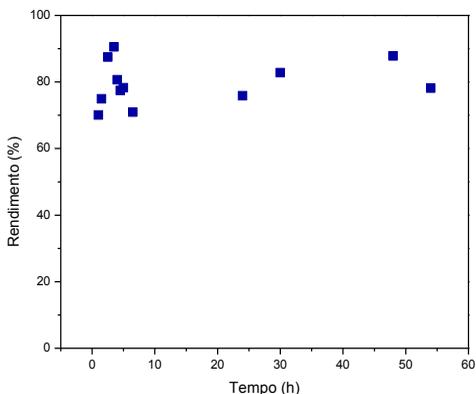


Figura 0.4- Experimento 3: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *terc*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão $0,4782 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 0,5 h, temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador.

Na Tabela 4.1, pode-se visualizar os resultados obtidos nos experimentos 1, 2 e 3, relacionando o tempo espacial com o comportamento de cada ensaio durante o estado estacionário (EE).

Os resultados apresentados demonstram que, ao aumentar a vazão até $0,2345 \text{ mL min}^{-1}$, correspondente ao tempo espacial de 1 h (experimento 2), aumentou, também, o rendimento em ésteres etílicos, obtendo-se um rendimento médio de 82% no estado estacionário. No entanto, aumentando a vazão para $0,4782 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 0,5 h (experimento 3), o rendimento em ésteres etílicos caiu para 79% durante o estado estacionário.

O experimento 2 atingiu o estado estacionário, aproximadamente, quatro vezes mais rapidamente que o experimento 1 e duas vezes mais rapidamente que o experimento 3, embora o estado estacionário deste último tenha permanecido constante por mais tempo.

Tabela 0.1- Comportamento dos experimentos 1, 2 e 3 durante o estado estacionário (EE) em relação ao tempo espacial empregado.

Experimento ^a	Tempo Espacial (h)	Início do EE ^b	Duração do EE ^b	Duração total ^b	Rendimento no EE (%)
1	3	16	32	80	77
2	1	4	71	91	82
3	0,5	8	92	108	79

^a Condições experimentais: razão molar 9:1 (etanol:óleo de palma), 30% (v/v) de *tert*-butanol e 50 °C

^b Número de tempos espaciais contínuos.

A partir desta análise, percebe-se a importância de conhecer os limites de operação do reator de leito fixo aplicado à produção de biodiesel, podendo assim ter um maior aproveitamento tanto do substrato, quanto do biocatalisador, aumentando a eficiência do processo.

Dors (2011) estudou a etanólise do óleo de palma utilizando a lipase Novozym[®] 435, razão molar 9:1 com adição de 30% (v/v) de *tert*-butanol com 6 h de tempo espacial, obtendo um rendimento em ésteres etílicos de 57%. Estes resultados ajudam a confirmar que, quando se utiliza uma vazão mais alta, o contato entre os reagentes se faz mais efetivo, evitando a separação de fases no substrato. Além disso, o uso de vazões mais altas nos experimentos auxilia, também, na remoção do glicerol do interior do reator de leito fixo (TONGBORIBOON et al., 2010; HAMA et al., 2011). O glicerol formado como subproduto da etanólise possui uma alta viscosidade, tendendo a ficar depositado na parte inferior dos reatores de leito fixo, dificultando a difusão dos substratos para a lipase e diminuindo a eficiência da reação (WATANABE et al. 2000). Um fluxo mais intenso pode auxiliar a carregar o glicerol formado para fora do leito, evitando o seu acúmulo excessivo (HAMA et al. 2011). Esta remoção do glicerol é benéfica para a manutenção da atividade da enzima, pois sendo o glicerol hidrofílico e insolúvel em óleos, acaba sendo facilmente adsorvido na superfície das enzimas reduzindo a atividade catalítica (DOSSAT et al.,1999; LI et al, 2010).

Porém, é importante salientar que um aumento de vazão só possui resultados favoráveis até um determinado ponto. Halim et al. (2009) descreveram um comportamento semelhante ao estudar a metanólise de óleo de palma residual de cozinha catalisada pela Novozym[®] 435, obtendo rendimentos em ésteres metílicos de cerca de 80%, utilizando

um leito com altura de 10,53 cm, 3,3 g da lipase Novozym[®] 435 e vazões de trabalho de 0,57 mL min⁻¹. Quando aplicado vazões na faixa de 0,6-0,9 mL min⁻¹, os rendimentos começaram a diminuir. Os autores explicam que vazões de trabalho mais intensas, conseguem melhorar a transferência de massa no interior do reator de leito fixo, pois encontram uma menor resistência da camada líquida do substrato. Entretanto, quando se aumenta a vazão de trabalho além de um determinado ponto, o substrato passa diretamente pela enzima sem ocorrer interações, impedindo que ele se ligue ao sítio ativo, diminuindo a conversão em ésteres.

Desta forma, neste trabalho, percebe-se que o aumento da vazão de trabalho nos experimentos 1, 2 e 3 não aumentou significativamente o rendimento em ésteres etílicos. Porém, foi possível diminuir o tempo espacial sem a ocorrência de perdas na conversão em ésteres etílicos.

4.2.1 Influência do tempo espacial na produtividade em ésteres etílicos

A produtividade é um parâmetro de grande importância para avaliar a viabilidade de um processo. Um sistema considerado ideal deve, na prática, alcançar bons índices de produtividade aliados a uma pequena perda de matéria-prima.

Neste trabalho, calculou-se a produtividade do sistema com o auxílio da Equação 3.10, que relaciona a concentração de ésteres etílicos à saída do reator e o tempo espacial.

Na Tabela 4.2 são apresentados os dados referentes a estas três variáveis para os experimentos 1, 2 e 3, considerando apenas o estado estacionário.

Tabela 0.2- Concentração mássica total de ésteres etílicos e produtividade dos experimentos 1, 2 e 3.

Experimento ^a	Tempo Espacial (h)	Concentração de Ésteres (mg _{ésteres etílicos} mL ⁻¹)	Produtividade (mg _{ésteres etílicos} mL ⁻¹ h ⁻¹)
1	3	423	141
2	1	515	515
3	0,5	469	938

^a Condições experimentais: razão molar 9:1 (etanol:óleo de palma), 30% (v/v) de *tert*-butanol e 50 °C

O experimento 3, com o menor tempo espacial, 0,5 h, foi o que apresentou a maior produtividade em ésteres etílicos, apesar da concentração em ésteres para o tempo espacial de 1 h ter sido superior. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 4.5, que apresenta o perfil da produtividade obtida nos experimentos em relação ao tempo de duração em horas (a) e em número total de tempos espaciais contínuos (b).

Outro parâmetro que pode ser determinado é a produção em ésteres etílicos no estado estacionário, que está ligado à produtividade, conforme Equação 3.10. Na Tabela 4.3 estão demonstrados os valores de concentração de ésteres etílicos obtidos no estado estacionário, a vazão volumétrica utilizada e a produção em ésteres para cada um dos três experimentos considerando apenas o estado estacionário (EE).

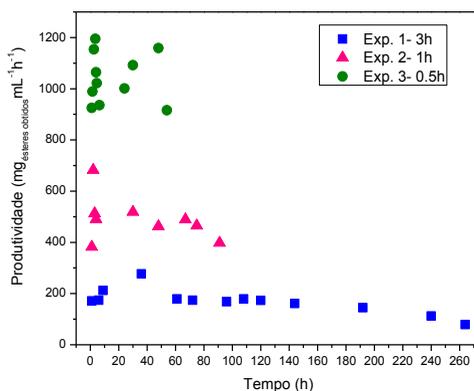
Tabela 0.3- Concentração de ésteres etílicos e produção dos experimentos 1, 2 e 3 no EE.

Experimento ^a	Vazão (mL h ⁻¹)	Concentração de Ésteres (mg _{ésteres etílicos} mL ⁻¹)	Produção (mg _{ésteres etílicos} h ⁻¹)
1	4,9	423	2072
2	14,0	515	7258
3	28,7	469	13460

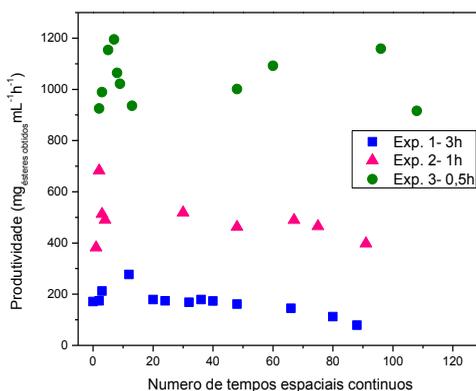
^a Condições experimentais: razão molar 9:1 (etanol:óleo de palma), 30% (v/v) de *tert*-butanol e 50 °C

Percebe-se através dos resultados da Tabela 4.3 que a produção aumenta em função da vazão de alimentação. Desta forma, analisando os valores de produção, tem-se que o experimento 3 foi o que gerou uma maior produção, mesmo sendo a concentração em ésteres etílicos maior no experimento 2.

Analisando conjuntamente as Tabelas 4.2 e 4.3 nota-se que um a diminuição no tempo espacial, aliado a um aumento nos índices de produtividade e produção de biodiesel torna o sistema bastante atrativo economicamente.



(a)



(b)

Figura 0.5- Produtividade em ésteres etílicos obtidos na etanolise enzimática de óleo de palma em reator do tipo leito fixo em modo contínuo. (a) em relação ao tempo de duração total de cada experimento (b) em relação ao número de tempos espaciais de duração de cada experimento. Condições: Exp. 1: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,0812 mL min⁻¹, tempo espacial de 3 h; Exp.2: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,2349 mL min⁻¹, tempo espacial de 1 h; Exp.3: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma, vazão 0,4782 mL min⁻¹, tempo espacial de 0,5 h.

4.3 Efeito da presença de solvente na etanólise enzimática de óleo de palma

Para melhorar a eficiência das reações de produção de biodiesel, catalisadas por lipases, algumas estratégias experimentais costumam ser aplicadas.

Dentre elas, a adição de solventes ou cossolventes, pode ser utilizada com o objetivo de melhorar o contato entre os componentes do substrato, formando uma solução menos viscosa, aumentar a solubilidade entre as fases e também preservar o catalisador, sendo que alcoóis superiores (C2-C5) costumam ser usados para estes fins (FERRÃO-GONZALEZ et al. 2011). Neste trabalho o *terc*-butanol foi utilizado como solvente, com base no grande número de trabalhos que reportam sua eficácia em relação à melhora do desempenho reacional na produção de biodiesel (CARVALHO, 2008; ROYON et al. 2007).

Para avaliar a influência do *terc*-butanol na etanólise do óleo de palma, foi realizado o experimento 4 utilizando a vazão de 0,2290 mL min⁻¹, correspondente a um tempo espacial de 1 h. A razão molar entre o etanol e o óleo de palma foi de 9:1 e todo o sistema foi mantido à temperatura constante de 50° C. Este experimento foi realizado na ausência de solvente e teve duração de 93 h (93 tempos espaciais contínuos). A Figura 4.6 demonstra o comportamento do rendimento em ésteres etílicos obtidos no experimento 4.

Em 1 h de ensaio o rendimento encontrado foi superior a 100%, sendo que no período anterior ao início do experimento já havia substrato no interior do leito, em função do processo de empacotamento do reator com a enzima. Isto leva a crer que houve um acúmulo de ésteres etílicos retirados na primeira amostra após 1 h de experimento. O estado estacionário foi atingido em 4 h de reação (4 tempos espaciais contínuos), permanecendo neste estado até 78 h (78 tempos espaciais contínuos). No estado estacionário, o rendimento em ésteres etílicos obtido foi de 79%.

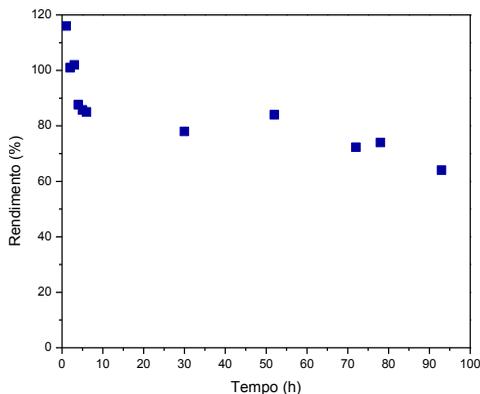


Figura 0.6- Experimento 4: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, vazão $0,2290 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 1 h, temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador.

A Figura 4.7 compara os resultados de rendimento em ésteres etílicos obtidos nos experimentos 2 e 4, realizados com o mesmo tempo espacial, sendo o primeiro na presença de solvente e o segundo na ausência.

Percebe-se pela comparação dos experimentos 2 e 4 que a presença do solvente terc-butanol não promoveu uma melhora significativa no rendimento em ésteres etílicos no ensaio 2, que foi de 82%, em quanto no experimento 4 foi de 79%. Mesmo tendo um aumento de 3% em ésteres etílicos no experimento 2, o perfil de rendimento em produto foi bastante similar em ambos os ensaios.

Estudos anteriores realizados por Dors (2011), utilizando o mesmo substrato e modelo de aparato experimental, avaliaram este efeito na reação de etanólise do óleo de palma na razão molar 9:1, vazão de $0,025 \text{ mL min}^{-1}$ (tempo espacial de 6 h), na presença e ausência de terc-butanol (30% (v/v) em relação ao óleo de palma), catalisadas pela enzima Novozym[®] 435, sob temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados apresentados pela autora descrevem aumentos de cerca de 34% na conversão do substrato em ésteres etílicos na reação com solvente

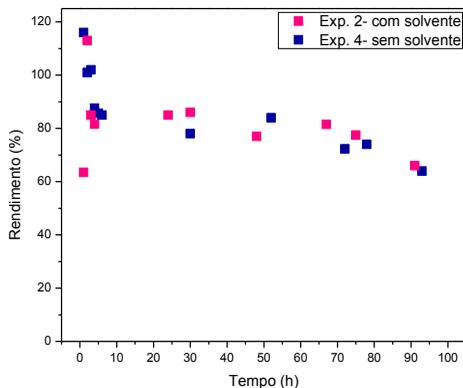


Figura 0.7- Comparação entre o rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanolise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo dos experimentos 2 e 4. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, tempo espacial de 1 h, temperatura 50 °C, empregando a lipase Novozym[®]435 como catalisador. Exp. 2: vazão 0,2349 mL min⁻¹, adição de 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma; Exp. 4: vazão 0,2290 mL min⁻¹, ausência de solvente.

Analisando os resultados obtidos nos experimentos 2 e 4 e os obtidos por Dors (2011), percebe-se que a influência da presença do solvente no meio reacional torna-se menor conforme diminui-se o tempo espacial, e, conseqüentemente, aumenta-se a velocidade dentro do leito. Estes resultados demonstraram a importância em determinar o tempo espacial capaz de promover um melhor desempenho hidrodinâmico do reator, pois desta forma, é possível operar em um sistema isento de solventes.

4.3.1 Influência do solvente na produtividade em ésteres etílicos

A produtividade do experimento 4, assim como o rendimento, seguiu proporcionalmente o resultado atingido no experimento 2. A concentração em ésteres etílicos atingida no estado estacionário foi de 499 mg ésteres etílicos mL⁻¹, resultando em uma produtividade de 499 mg ésteres etílicos mL⁻¹ h⁻¹, com produção de 6939 mg ésteres etílicos h⁻¹. A Figura 4.8 apresenta o perfil da produtividade em ésteres etílicos obtida no experimento 4, em comparação com o experimento 2. Os resultados indicam que não há diferenças notáveis entre os resultados de produção

de ésteres etílicos com ou sem solvente, quando se trabalha em um tempo espacial baixo.

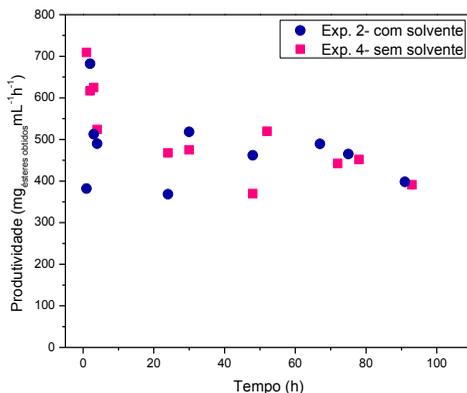


Figura 0.8- Comparação entre a produtividade de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo nos experimentos 2 e 4. Condições experimentais: Exp. 2: vazão $0,2349 \text{ mL min}^{-1}$, adição de 30% (v/v) de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma; Exp. 4: vazão $0,2290 \text{ mL min}^{-1}$, na ausência de solvente. Ambos com razão molar (etanol: óleo de palma) 9:1, tempo espacial de aproximadamente 1 h, temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador.

4.4 Efeito da razão molar entre o etanol e o óleo de palma na reação de etanólise enzimática.

Outra estratégia aplicada nas reações de transesterificação é a utilização de um excesso alcoólico para deslocar o equilíbrio químico no sentido reacional da formação de ésteres. Porém, o excesso alcoólico também pode desativar a enzima, principalmente quando o álcool é insolúvel na mistura reacional (ANTCZAK et al., 2009).

A fim de avaliar o efeito da razão molar entre etanol e o óleo de palma na formação de ésteres etílicos, foi realizado um experimento na ausência de solvente aumentando a razão molar (etanol: óleo de palma) de 9:1 para 12:1. A vazão foi de $0,0380 \text{ mL min}^{-1}$, correspondente a um tempo espacial de 6 h. A Figura 4.9 mostra o perfil de rendimento em ésteres etílicos obtidos no experimento 5.

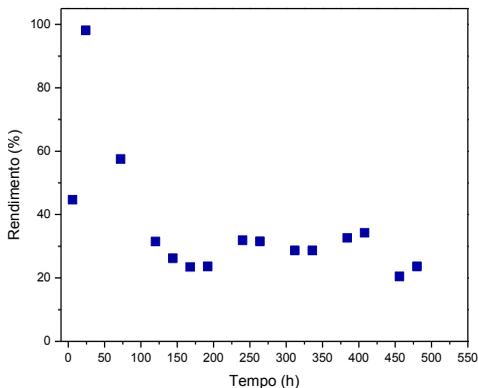


Figura 0.9- Experimento 5: Rendimento de ésteres etílicos obtidos na etanólise enzimática de óleo de palma em reator de leito fixo operando em modo contínuo. Condições experimentais: razão molar (etanol: óleo de palma) 12:1, vazão $0,0380 \text{ mL min}^{-1}$, tempo espacial de 6 h, temperatura $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, empregando a lipase Novozym[®] 435 como catalisador.

O experimento 5 apresentou um rendimento máximo de 98% em ésteres etílicos em 24 h de reação. Após este período, o rendimento caiu drasticamente para 28%, permanecendo com este comportamento durante o estado estacionário, atingido em 144 h (24 tempos espaciais contínuos). A duração do estado estacionário foi de 336 h (56 tempos espaciais contínuos), atingindo uma produtividade média de $27 \text{ mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e produção de $367 \text{ mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{ h}^{-1}$.

Estes resultados podem ser comparados com o trabalho realizado por Dors (2011). A autora produziu biodiesel utilizando etanol e óleo de palma na razão molar de 9:1, vazão de $0,0614 \text{ mL min}^{-1}$ (tempo espacial de 6 h), na ausência do solvente, em um reator de leito fixo operando continuamente. Verificou-se que um aumento no excesso de etanol de 9:1 para 12:1 não influenciou os resultados de forma considerável. A comparação dos resultados de concentração, produtividade e rendimento em ésteres de etila, obtidos no experimento 5, com os resultados de Dors (2011), são apresentados na Tabela 4.4.

Analisando os resultados referentes à concentração, produtividade e rendimento de ésteres etílicos entre o experimento 5 e os dados da literatura, nota-se que o excesso de etanol adicionado no experimento 5 não melhorou o desempenho da reação.

Tabela 0.4- Comparação da concentração, produtividade e rendimento da etanolise enzimática do óleo de palma entre dados da literatura e o experimento 5.

Condições Reacionais	Resultados	
Experimento	Literatura ^a	Exp. 5
Razão Molar	9:1	12:1
Tempo espacial (h)	6	6
Concentração de ésteres etílicos (mg ésteres etílicos mL ⁻¹)	228	185
Produtividade (mg ésteres etílicos mL ⁻¹ h ⁻¹)	32,6	30,4
Rendimento em ésteres (%)	23	28

^aDors (2011)

Segundo Antczak et al. (2009) e Ranganathan et al.(2008), um excesso muito elevado de etanol no sistema reacional poder causar efeitos de envenenamento do biocatalisador, além de interferir na separação do glicerol devido ao aumento da solubilidade do meio. Desta forma, obtendo-se rendimentos similares ao se operar com a razão molar entre o etanol e óleo de palma de 9:1 e 12:1, deve-se optar por utilizar o menor excesso alcoólico, a fim de evitar danos ao biocatalisador.

4.5 Relação entre o glicerol e éster formado

A determinação do teor glicerol contido nas amostras foi realizado através do método do periodato de sódio, conforme descrito no capítulo 3. Por tratar-se de uma metodologia de alto custo e bastante laboriosa, foi selecionado um ponto do estado estacionário de cada experimento, que variou conforme a disponibilidade de volume de amostra.

O objetivo desta análise foi avaliar se a quantidade de glicerol formada durante a produção de biodiesel nos experimentos realizados neste trabalho é condizente com a quantidade de glicerol que deve ser produzida neste processo, de acordo com os valores teóricos apresentados pela literatura. Assim, pode ser verificado se está ocorrendo acúmulo de glicerol no interior do reator de leito fixo e, também, realizar um acompanhamento reacional para saber se a reação atingiu seu máximo de rendimento.

De acordo com a reação de formação de etil ésteres, para cada 3 mols de etil ésteres formados, tem-se 1 mol de glicerol formado. Através

do peso molecular de cada um dos componentes, chega-se a um resultado de $0,11 \text{ g}_{\text{glicerol}} \text{ g}^{-1}_{\text{éster}}$ como sendo a quantidade máxima teórica de glicerol formado na reação completa do óleo de palma com etanol.

A Tabela 4.5 apresenta os valores de teor de glicerol encontrados nas análises realizadas em triplicata, antes da purificação das amostras, calculados com auxílio da Equação 3.2.

Os resultados demonstram que a formação de glicerol na reação de transesterificação entre o óleo de palma e etanol acompanhou proporcionalmente, porém de maneira diferenciada, a concentração de ésteres etílicos em cada amostra para os resultados com utilização de solvente e sem solvente. Nota-se que ao utilizar o solvente no meio reacional, a quantidade de glicerol formada foi superior à obtida no meio isento de solvente.

Nos experimentos 2 e 4, operados com o mesmo tempo espacial (1 h), este efeito provocado pelo *tert*-butanol é mais facilmente percebido. Mesmo obtendo o mesmo rendimento experimental em ésteres etílicos, a quantidade de glicerol formado no experimento 2 (com solvente), foi superior à do experimento 4 (sem solvente). Isto indica que quando o solvente não é utilizado, a reação do TAG pode estar acontecendo de forma incompleta, resultando numa maior concentração de MAG e DAG. Além do mais, o solvente pode estar auxiliando a remoção do glicerol do leito fixo, evitando o seu acúmulo no interior do mesmo.

Tabela 0.5- Valores do teor de glicerol contido nas amostras não purificadas de biodiesel.

Parâmetro	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
Amostra (h)	108	30	24	52	264
Tempo espacial (h)	3	1	0,5	1	6
Razão molar (etanol: óleo)	9:1	9:1	9:1	9:1	12:1
Solvente (% v/v) ^a	30	30	30	0	0
Rendimento ^b (%)	80,5	86	76	86	31,5
Concentração de glicerol (%)	4,00	4,66	3,75	2,65	1,00
Concentração de éster (%)	50,6	53,9	47,3	53,0	22,3
Glicerol/Éster ($\text{g}_{\text{glicerol}} \text{ g}^{-1}_{\text{éster}}$)	0,079	0,086	0,079	0,05	0,05
Glicerol _{total} /Glicerol _{teórico} (%)	71,8	78,2	71,8	45,4	45,4

^a Porcentagem de *tert*-butanol em relação ao óleo de palma

^b Correspondente ao tempo de amostragem

4.6 Comportamento e estabilidade da lipase

4.6.1 Efeito da lavagem da lipase Novozym® 435 com diferentes solventes.

Com o intuito de determinar se os reagentes utilizados na síntese de biodiesel afetam a estabilidade da enzima, foram realizados alguns ensaios onde amostras da lipase Novozym® 435 antes de qualquer utilização em meio reacional foram lavadas com aproximadamente 10 mL de etanol, hexano ou *terc*-butanol. Após cerca de 15 min em contato com os solventes, as amostras foram filtradas e aguardou-se até a evaporação do solvente. O hexano, embora não utilizado no sistema reacional, foi testado para verificar se possuía características favoráveis para a etapa de remoção de resíduos reacionais retidos na superfície das enzimas, ao final dos experimentos. Para quantificar esta variável, foi realizada a medida da atividade hidrolítica (AE) pelo do método da hidrólise do butirato de metila. A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos para as amostras de enzima tratadas com hexano, etanol e *terc*-butanol, e sem tratamento.

Tabela 0.6- Atividade hidrolítica das lipases sem tratamento e tratada com solvente.

Reagente	AE (U g _{catalisador} ⁻¹)	AE ^a (%)
Sem tratamento	1823	100
Hexano	1787	98
Etanol	1568	86
<i>Terc</i> -butanol	1408	77

^a Atividade hidrolítica em relação a lipase sem tratamento.

Os testes realizados demonstraram que as amostras de enzima lavadas com hexano apresentaram uma atividade hidrolítica superior às lavadas com *terc*-butanol. Esta diferença entre os dois solventes pode ser explicada através dos valores do log P (coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água) dos reagentes. Segundo Laane et al. (1987), solventes com $\log P \leq 2,00$ são hidrofílicos, sendo menos adequados à síntese orgânica, por perturbarem a interação água/biocatalisador, extremamente necessária para a manutenção da atividade catalítica. Solventes com $\log P \geq 4,00$ são hidrofóbicos e não alteram estas interações. O hexano e o *terc*-butanol apresentam um valor

de log P de 4,00 e 1,43 respectivamente. Mesmo o glicerol sendo mais solúvel em *tert*-butanol, o uso do reagente na etapa de lavagem da lipase após o uso no sistema reacional pode prejudicar a enzima, diminuindo sua atividade hidrolítica.

Os resultados obtidos com as lipases lavadas antes da utilização na reação de transesterificação se confirmaram através de testes realizados com amostras do catalisador após a utilização. Amostras de lipase utilizadas na reação de transesterificação foram lavadas com *tert*-butanol e hexano separadamente. As amostras tratadas com *tert*-butanol apresentaram uma atividade hidrolítica inferior às tratadas com hexano. Os valores encontrados foram de 375 e 428 U g_{catalisador}⁻¹ respectivamente, corroborando com os resultados obtidos.

Assim, o hexano foi selecionado para esta etapa de tratamento anterior à determinação da atividade hidrolítica final da lipase.

A lipase ainda não utilizada, ao ser lavada com etanol, apresentou uma diminuição na sua atividade. Este resultado condiz com dados da literatura que afirmam que um uso excessivo do álcool na reação de transesterificação catalisada por lipases pode ocasionar um envenenamento do biocatalisador (ANTCZAK et al., 2009).

4.6.2 Determinação da constante de desativação e tempo de meia-vida da lipase Novozym[®] 435.

Ao início e ao final de cada experimento, foram realizados ensaios para quantificação da atividade hidrolítica da lipase, através da hidrólise do butirato de metila.

As lipases retiradas do reator após o término de cada experimento foram lavadas com hexano para remoção dos resíduos reacionais. A Tabela 4.7 apresenta os valores da atividade hidrolítica inicial e final (quantificada após o término do experimento) para cada experimento, calculada pela Equação 3.1, assim como os valores da constante de desativação (K_d) e o tempo de meia vida, definidos pelas Equações 3.11 e 3.12, respectivamente.

Tabela 0.7- Valores de atividade hidrolítica (AE) inicial e residual da lipase Novozym[®] 435 no início e fim de cada experimento.

Exp.	Tempo Espacial (h)	AE _{inicial} (U g _{catalisador} ⁻¹)	AE _{final} (U g _{catalisador} ⁻¹)	K _d (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Duração do Experimento (h)
1	3	1991	437	0,03	22	240
2	1	1823	357	0,40	1,7	91
3	0,5	1833	327	0,43	1,6	54
4	1	1823	466	0,34	2	93
5	6	2521	228	0,05	13,9	480

Apesar da alta estabilidade apresentada pela lipase Novozym[®] 435, a atividade enzimática caiu significativamente entre o início e o final dos experimentos. Porém, analisando os gráficos de rendimentos em ésteres etílicos, a atividade decaiu nas primeiras horas de experimento até atingir o estado estacionário, o que indica que a atividade se mantém estável durante a maior parte do tempo. Esta queda inicial ocorre logo após a lipase entrar em contato com o meio reacional, podendo estar relacionada com a inibição causada pelo etanol ou ainda pela presença do *terc*-butanol (quando presente), conforme os dados apresentados na Tabela 4.6, que demonstram a perda de atividade após a lavagem da lipase com os dois reagentes. Percebe-se, também, que o experimento que apresentou uma perda de atividade catalítica mais intensa foi o experimento 5, que além de ser o que teve uma maior duração, também foi o que utilizou o maior excesso alcoólico na reação (etanol:óleo de palma na razão molar de 12:1). Desta forma, esta perda de atividade enzimática mais acentuada no experimento 5 pode estar relacionada tanto ao excesso do etanol, quanto ao contato prolongado do biocatalisador com o meio reacional.

Comparando os experimentos 2 e 4, realizados nas mesmas condições experimentais, na presença e ausência de solvente, respectivamente, observa-se uma atividade hidrolítica e tempo de meia-vida menor e um K_d maior no ensaio 2. Este resultado sugere que o *terc*-butanol, de fato, pode causar uma desativação na lipase. Sendo assim, em relação à manutenção da atividade catalítica, o ideal seria a não utilização do solvente na reação.

Relacionando a constante de desativação das lipases com a duração total do estado estacionário, percebe-se que quanto maior foi a constante de desativação da lipase, maior foi a duração do estado

estacionário de cada experimento. Em relação ao tempo espacial, os experimentos que apresentaram um estado estacionário mais duradouro foram os que utilizaram um menor tempo espacial.

4.7 Considerações Finais

A Tabela 4.8 apresenta uma comparação dos resultados obtidos nos experimentos 1 a 5.

Observa-se que, das condições testadas, as que apresentaram o melhor desempenho na síntese de biodiesel foram as aplicadas nos experimentos 2 e 4, utilizando um tempo espacial de 1 h, razão molar entre etanol e óleo de palma de 9:1. O experimento 2 foi realizado em meio contendo 30% (v/v) de terc-butanol e o experimento 4 na ausência de solvente. No tempo espacial de 1 h, além de se obter os melhores resultados, foi possível operar o sistema em meio isento de solvente com o mesmo rendimento, produção e produtividade em ésteres etílicos. No entanto, o experimento 4 resultou em uma reação incompleta do TAG, levando a uma maior concentração de MAG e DAG.

Tabela 0.8- Comparação dos resultados obtidos nos experimentos 1 a 5.

Parâmetro	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
Condições Operacionais					
Razão molar (etanol: óleo)	9:1	9:1	9:1	9:1	12:1
Solvente (% v/v)	30	30	30	0	0
Tempo Espacial (h)	3	1	0,5	1	6
Duração dos Exp. (h)	240	91	54	93	480
Duração dos Exp. (N°_{TEC}) ^a	80	91	108	93	80
Resultados^b					
Rendimento da transesterificação (%)	77	82	79	79	28
Concentração de Ésteres de etila ^c	423	515	469	499	159
Produtividade ^d	141	515	938	499	27
Produção ^e	2072	7258	13460	6939	367

^a Duração em número de tempos espaciais contínuos

^b Resultados obtidos durante o estado estacionário

^c Concentração em $\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{mL}^{-1}$

^d Produtividade em $\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$

^e Produção em $\text{mg}_{\text{ésteres etílicos}} \text{h}^{-1}$.

5. CONCLUSÃO

O objetivo principal desta pesquisa foi analisar o processo de obtenção de biodiesel etanólico de óleo de palma, através da reação catalisada pela lipase Novozym[®]435 em reator de leito fixo, operando em modo contínuo. Da análise e discussão dos resultados obtidos, pode-se concluir:

- Na operação contínua do reator de leito existe uma faixa de tempo espacial onde conversão dos triacilgliceróis em ésteres etílicos (biodiesel) se mantém constante.
- Dentro da faixa de tempos espaciais estudada, a produtividade em ésteres etílicos mostrou ser maior para menores valores de tempo espacial;
- A influência positiva da presença do solvente *terc*-butanol para a conversão de triacilgliceróis em ésteres etílicos só é sentida para altos valores de tempo espacial.
- A quantidade de glicerol determinada nas amostras de biodiesel foi maior para a reação na presença de *terc*-butanol, sugerindo que o solvente pode auxiliar a reação completa de TAG, além de evitar o acúmulo de glicerol no reator de leito fixo.
- A presença do solvente *terc*-butanol na reação causou uma maior desativação da lipase Novozym[®]435, indicando que o uso do solvente, é danoso para o biocatalisador.
- Um grande excesso de etanol em relação ao óleo de palma, para razão molar acima de 9:1, não aumenta o rendimento em ésteres etílicos na reação biocatalisada. Além do mais, verificou-se que quantidades muito elevadas de etanol no sistema causam uma maior desativação no biocatalisar.
- O sistema utilizado demonstrou ser adequado para a síntese de biodiesel em modo contínuo, sendo possível atingir um estado estacionário em todas as condições estudadas.

6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um estudo em relação ao uso de solventes orgânicos na síntese de biodiesel, a fim de definir a quantidade de solvente que resultará em um melhor desempenho reacional.
- Acompanhar a reação de formação do biodiesel em relação a formação do glicerol através do monitoramento das quantidades de MAG e DAG formados;
- Estudar o efeito do uso de solventes orgânicos em relação ao acúmulo de glicerol no interior do reator de leito fixo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROPALMA, **Ficha técnica de produto- Óleo de palma refinado**, 2007.

ANP- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO. **Boletim Mensal de Biodiesel**, 2011.

ANP- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. O biodiesel obrigatório. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1331781921054>>. Acesso em: 15/03/2012.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis- Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

APOSTOLAKOU, A. A; KOOKOS, I. K; MARAZIOTI, C.; ANGELOPOULOS, K. C.; Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetable oils. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.1023-1031, 2009.

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as alternative energy resources and its characteristics. **Renewable and Sustainable Review**, v. 16, p. 2070-2093, 2012.

BAHIA FLÂNEUR. Disponível em: <<http://www.bahiaflaneur.net/blog2/2010/06/huile-de-palme-non-dende.html>>, acesso em: 18/03/2012.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic**, v. 39, n. 1, p. 9-14, 2010.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BASTIDA, A.; SABUGUILLO, P.; ARMISEN, P. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. Single step purification, immobilization and hyper activation of lipases via interfacial adsorption

on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.

BIBLIOTECA DA CAPOEIRA. Disponível em: <<http://bibliotecadacapoeira.blogspot.com.br/2011/04/tem-dende-tem-axe-etnografia-o.html>>, acesso em: 18/03/2012.

BIODIESEL BR <<http://www.biodieselbr.com/plantas/palma/palma.htm>>, acesso em: 8/03/2012.

BIODIESEL BR <<http://www.biodieselbr.com/i/biodiesel/biodiesel-brasil-potencial.jpg>>, acesso em 15/03/2012.

BRASIL- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Viabilidade de extração do óleo de dendê no estado do Pará. Viçosa-MG, 2007.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, e dá outras providências. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm, acesso em 15/03/2012.

CARRAMENHA, F. **Estudo da viabilidade técnica e econômica da produção de biodiesel em escala industrial no Brasil**. 2007. (Mestrado). Processos Industriais, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo.

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, n. 8, p. 4031-4039, 2010.

CHATTOPADHUAY, S.; KAREMORE, A.; DAS, S.; DEYSARKAS, A.; SEN, R. Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. **Applied Energy**, v. 88, p. 1251- 1256, 2011.

CHEN, Y. M.; XIAU, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P. M.; WANG, X. W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v.50, n.3, p. 668- 673, 2009.

CHOUHAN, S. A. P.; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4378- 4399, 2011.

COCKS, L.V.; VAN REDE, C. **Laboratory Handbook of Oil and Fat Analysts**. Londres: Academic Press, p. 419, 1966.

CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA – CNPE – Resolução nº 6, de 16.09.2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Disponível em: nxt.anp.gov.br acesso em 15.03.2012

COSTA, L. R. **Biodiesel: estratégias para produção e uso no Brasil**. Relatório Técnico apresentado à Promon Engenharia, 2005.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustíveis alternativos ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras, **Química Nova**, v. 23, n.4, p.532-537, 2000.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, M. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstock's. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5508- 5516 ,2010.

DALLA ROSA, C. **Produção de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. 2009 Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC , 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.D.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n.4, p.623-630, 2004.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.31, n. 5-6, p. 466-487, 2005.

DEMIRBAS, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. **Energy Conversion and Management**, v.49, n.1, p.125-130, 2008.

DEMIRBAS, M.F.; BALAT, M.; BALAT, H. Biowastes-to-Biofuel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 1815-1828, 2011.

DORS, G. **Etanolise enzimática de óleo de palma visando a produção de biodiesel em sistema contínuo**. 2011 Tese (Doutorado)– Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC, 2011.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999.

DU, W.; XU, Y.Y.; LIU, D. H. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.38, p. 103-106, 2003.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J.I.; Enzyme pressure enhancement of enzymes: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45. p. 331-347, 2009.

FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry: A Textbook**. 3ed. Berlin: Spriger Verlag, 1997.

FELTES, M.M.C; OLIVEIRA, D.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, J. V. An overview of enzyme-catalyzed reactions and alternative feedstock for biodiesel production. **Alternative Fuel**, Croácia: InTech, Cap. 2, p. 21-46, 2011.

FERRÃO-GONZALES, A. D.; VÉRAS, I.C.; SILVA, F.A.L.; ALVAREZ, H.M.; MOREAU, V.H. Thermodynamic analysis of the kinetics reaction of the production of FAME and FAEE using Novozym435 as catalyst. **Fuel Processing Technology**, v.92, n.5, p. 1007-1011, 2011.

FERRARI, R.A; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja– Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p. 19-23, 2005.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**, 3^a ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, Cap. 13, 2002.

FRANCO, Z.; NGUYEN Q.D. Flow properties of vegetable oil–diesel fuel blends. **Fuel**, v. 90, p. 838-849, 2011.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v.92, n.5, p.405-426, 2001.

FURLAN, J.; KALTNER, F. J.; ALVES, S. M.; BARCELOS, E. A utilização de óleo de palma como componente do biodiesel na Amazônia. **Comunicado Técnico**, **103**. Belém- PA, 2004.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOÇA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification: Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v.30, n. 1, p. 10-16, 2012.

HAAS, M.; PIAZZA, G.; FOGLIA, T. Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels. In: KUO, T. M. and GARDNER, H. W. (Ed.). **Lipid Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 2002. Cap 29, p.587-598

HALIM, S.F.A; KAMARUDDIM, A.H.; FERNANDO, W. I. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresources Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol- separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 66-71, 2011.

HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, n. 8, p. 749-752, 2004.

KNOTHE, G.; **The Biodiesel Handbook**, AOCs press, 2005.

KOMERS, K.; STLOUKAL, T.; MACHEK, J.; SKOPAL, F. Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH 3. Analysis of composition of actual reaction mixture. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 6, p. 363-371, 2001.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic-solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n.1, p. 81-87, 1987.

LI, Q.; ZHENG, J.; YAN, Y. Biodiesel preparation catalyzed by compound- lipase in co-solvent. **Fuel**, v.91, p. 1229-1234, 2010.

LUKOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ; BEZBRADICA, D. Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: Recent trends challenges and future perspectives. **Environmental Science**, Croácia: InTech, Cap. 3, p. 47-72, 2011.

MEHER, L. C.; DHARMAGADDA, V. S. S.; NAIK, S. N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of Pongamia pinnata oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 97, n.12, p. 1392-1397, 2006.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

NOVOZYMES. **Ficha de informação do produto** 2007.

PADULA, A. D.; SANTOS, M. S.; FERREIRA, L.; BORENSTEIN, D. The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects. **Energy Policy**, article in press.

PANORAMIO. Disponível em:
<<http://www.panoramio.com/photo/46362908>>, acesso em 18/03/2012.

PENTEADO, M. C. P. S. **Identificação de gargalos e estabelecimento de um plano de ação para o sucesso do programa brasileiro de biodiesel**. Dissertação (Mestrado)- Engenharia Automotiva, Universidade de São Paulo- Escola Politécnica, São Paulo- SP. 2005.

PETROBRÁS, 2011. Disponível em
<<http://fatosedados.blogspotrobras.com.br/2011/08/10/presidente-petrobras-participa-da-xiv-reuniao-do-comite-de-cooperacao-economica-brasil-japao/>>. Acesso em 18/03/2012.

QUEIROZ, A. G.; FRANÇA, L.; PONTE, M. X. The life cycle assessment of biodiesel from palm oil (dendê) in the Amazon. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 50-59, 2012.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; NETO, P. R. C.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. Biodiesel chain from the lab bench to the industry: An overview with technology assessment R&D&I opportunities and tasks. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

- RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N.; Biocatalytic ethanolsis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in *tert*-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p.829-834, 2010.
- RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p.3975-3981, 2008.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398-408, 2009.
- ROMERO, R.; MARTINEZ, S. L.; NATIVIDAD, R. Biodiesel production by using heterogeneous catalysts. **Environmental Science**, Croácia: InTech, Cap. 1, 2011.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.
- SAKAY, T.; KAWASHIMA, A.; KOSHIKAWA, T. Economic assessment of batch biodiesel production processes using homogeneous and heterogeneous alkali catalysts. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3268-3276, 2009.
- SALIHU, A.; ALAM, MD. Z.; ABDUKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production> an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resource, conservation and recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.
- SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. **Fuels**, v. 66, n. 10, p. 1372-1378, 1987.
- SHAW, J. F.; CHANG, S. W.; LIN, S. C.; WU, T. T.; JU, H. Y.; AKOH, C. C.; CHANG, R. H.; SHIEH, C. J. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy & Fuels**,v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008.
- SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C.A.; CONDORET, J.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification. **Enzyme Microbial Technology**, v.48, p.61-70, 2011.

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

SILVEIRA, A. M. **Óleo de palma: o queridinho dos biocombustíveis**. Jornal Zero Hora. Caderno Nosso Mundo Sustentável, v. 43. Porto Alegre, p. 1 e 4, 20 dez 2010.

SIMÕES, A. S. **Síntese enzimática de biodiesel a partir do óleo de babaçu pela rota etílica em reator de leito fixo: estabelecimento das condições operacionais em meio isento de solvente**. 2011 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena.

SOUZA, C. A. Sistemas catalíticos na produção de biodiesel por meio de óleo de palma residual. In: 6 ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 2006, Campinas. **Proceedings Online...** Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?pid=MSC000000022006000200041&script=sci_abstract&tlng=es>, acessado em: 16/03/2012.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141-3155, 2011.

SUAREZ, P. A. Z; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Oils and fats based biofuels: Technological challenges. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SUFRAMA: **Potencialidades regionais- Estudo de viabilidade econômica**, v.5, 2003.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.74, n. 1-2, p. 52-59, 2010.

TORRES, E. A. Avaliação de um motor do ciclo diesel operando com óleo de dendê para suprimento energético em comunidades rurais. **Proceedings Online...** In 3: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 2000. Disponível em: http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022000000200049&lng=en&nrm=iso, acessado em 16/03/2012.

TUPINAMBÁ, M. J. Programa de produção sustentável do dendê estabelece regras para expansão da cultura. Disponível em: <<http://www.cpaa.embrapa.br/agroenergia/programa-de-producao-sustentavel-do-dende-estabelece-regras-para-expansao-da-cultura?searchterm=dend%C3%AA>> acesso em: 8/03/2012.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**, cap.4, Porto Alegre: Artes Médicas, **2000**.

XU, X.; FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed-bed bioreactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 3-10, 2000

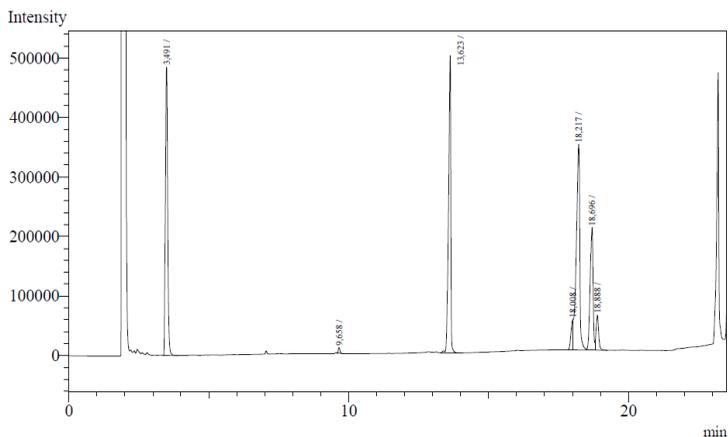
YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p.334-338, 2011.

ZHANG, L.; SUN, S.; XIN, Z.; SHENG, B.; LIU, Q. Synthesis and component confirmation of biodiesel from palm oil and dimethyl carbonate catalyzed by immobilized- lipase in solvent-free system. **Fuel**, v.89, p. 3960-3965, 2010.

8. ANEXOS

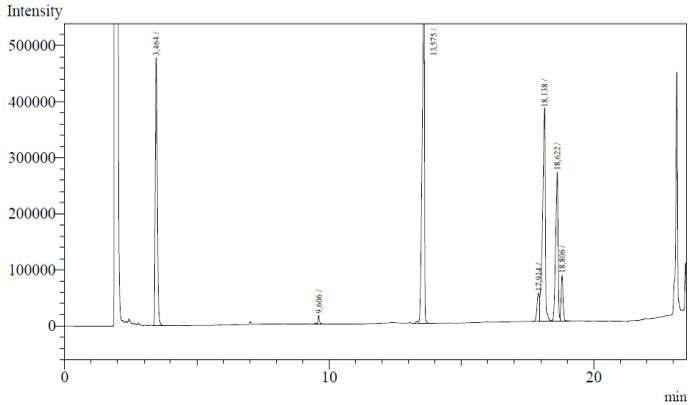
Anexo A – Cromatogramas dos ensaios realizados.

- a) **Experimento 1-** Tempo espacial de 3 h, razão molar 9:1 entre etanol e óleo de palma e 30% (v/v) de *terc*-butanol. Amostra de 108 h.



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	3.491	2650915	472259	0.000			
2	9.658	31425	9091	0.000			
3	13.623	2831011	484923	0.000			
4	18.008	214763	48411	0.000			
5	18.217	2991962	340683	0.000	V		
6	18.696	1495055	197008	0.000	V		
7	18.888	354595	57253	0.000	V		
Total		10569726	1609628				

b) Experimento 3- Tempo espacial de 0,5 h, razão molar 9:1 e 30% (v/v) de *terc*-butanol. Amostra de 30 h.



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark ID#	Cmpd Name
1	3.464	2518224	466716	0.000			
2	9.606	66180	14505	0.000			
3	13.575	3754116	616111	0.000			
4	17.914	320851	49384	0.000			
5	18.138	2834214	375312	0.000	V		
6	18.622	1692005	248045	0.000	V		
7	18.806	429653	80100	0.000	V		
Total		11615243	1850173				