UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

WERITON RENAN RODRIGUES FIDALGO

Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da
etanólise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e
operacionais

Lorena
2014

WERITON RENAN RODRIGUES FIDALGO

Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanólise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão original

Lorena
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Fidalgo, Weriton Renan Rodrigues

Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais. / Weriton Renan Rodrigues Fidalgo. – Versão original. - 2014.
158 p: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2014.

Orientadora: Heizir Ferreira de Castro.

1. Biodiesel 2. Reatores de leito fluidizado 3. Óleo de Babaçu 4. Etanol. I. Título. II. Castro, Heizir Ferreira de , orient.

662.756 - CDU

Dedicatória

*Às mulheres da minha vida: minha mãe Alayde e minha irmã Raiany,
pela presença terna e essencial ,
pelo amor que se permitem dar e receber,
por serem a justificativa e a motivação na realização de todo e qualquer trabalho*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Alayde e minha irmã Raiany, pela profundidade e simplicidade com que preenchem meu caminho e pensamentos. Obrigado por sempre estarem presentes e pela importância imensurável que possuem. Mãe, é com você com quem divido a conquista deste título, por toda educação fornecida, no sentido mais amplo que possa significar, e pelo apoio essencial em todas as etapas da minha vida.

À Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro, minha orientadora. Sou imensamente grato pela excelente orientação e pela oportunidade concedida de desenvolver este trabalho. Agradeço pela paciência, dedicação, conselhos, sugestões, disponibilidade e por ser um exemplo de profissionalismo e de vida. Obrigado pelo aprendizado nesses quatro anos, que serão guardados com carinho em minha memória, e pela importância que eles terão nas próximas etapas.

Ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos, pela ajuda essencial no início deste trabalho e pela disposição constata em contribuir sempre que solicitado. Obrigado pelos ensinamentos e pelo exemplo de caráter e profissional que você nos fornece na condução de sua vida.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira, pela ajuda e pelo convívio agradável. Obrigado por ter sido meu professor durante a graduação e por ter continuado sempre presente durante a execução deste trabalho. Agradeço, também, pelos deliciosos bolos feitos por sua mãe e que fizeram parte de alguns de nossos cafés da manhã e da tarde.

Aos professores que ministraram as disciplinas da pós-graduação, Durval, Marivone, Cortez, João Batista, Jayne, Pedro e Heizir, pelos ensinamentos e oportunidade dos trabalhos desenvolvidos. Agradeço, também a todos os professores que fizeram parte da minha graduação, em especial àqueles que me inspiraram a seguir na área acadêmica: Graziela, Cobianchi, Beth, Domingos, Susto, Marquinhos, Adilson, Priscila Benar, Amilton, Sodero, Mack.

A todos os funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que com carinho e dedicação tornaram possível a existência e funcionamento desta instituição. Em especial: Bia, Sandra, Cida, Gislene Malta, Joel, Regina Horta, José Mário, Sylvinho.

A todos os amigos do voleibol da EEL, pela amizade e alegria proporcionada. Vocês estarão sempre presente em minha memória.

Aos amigos de república, Ana Paula, Mateus, Deja (e Marcella), Leandro (e Priscila), que serão inesquecíveis. Obrigado pelo carinho e amizade.

A todos amigos que fizeram ou fazem parte do nosso grupo de trabalho, inclusive os que ficaram por pouco tempo: Karen, Natália, Gisanara, Ana Paula, Érika, Poliana, Adriano, André, Matheus B., Matheus C., Murillo, Tamires, Márcio G., Márcio S., José Roberto, Aline N., Aline S., Daniel E., Daniel G., Ana Letícia, Tomás, Eduardo, Manu, Kevin, Martim, Lucas M., Lucas R., Bruno, Lainy, Ângela, Heitor, Guilherme, Patrícia M., Juan, Renata, William. Obrigado pela amizade e convivência.

Às minhas queridas amigas que fizeram parte do grupo de trabalho e que deixaram o gostoso sabor de suas amizades: Grazi, Gisele, Ariela e Lívia. Obrigado pelo carinho trocado e por serem exatamente como são.

Às minhas queridas amigas que estão presente desde o começo do meu doutorado e pelas quais tenho imenso carinho e respeito: Larissa, Patrícia e Karine. Obrigado pelo auxílio constante, pelos cafés, almoços e risadas. Vocês são muito importantes para mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido e à Escola de Engenharia de Lorena pela infraestrutura.

Pela oportunidade concedida de viver todas as experiências neste lindo planeta e pelo privilégio de conhecer cada pessoa que dividiu comigo uma fração de tempo e caminho. Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado. Família e queridos amigos, vocês são os alicerces do meu encantamento pela vida. Meu sincero e profundo agradecimento.

*“ A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”*

Marcel Proust

*"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las.
Que tristes os caminhos,
se não fora a presença distante das estrelas!"*

Mário Quintana

RESUMO

FIDALGO, W. R. R. **Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais.** 2014. 158p. Tese (Doutorado em Ciências) — Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2014.

Recentemente, tem havido indícios de que o ser humano passou a compreender de forma mais profunda que o meio ambiente é o responsável pelo oferecimento das condições essenciais a sua sobrevivência e evolução, e a busca por alternativas energéticas mais adequadas a essa nova forma de pensar e viver tem sido parte integrante da solução para os problemas socioambientais que se mostram cada vez mais urgentes. A produção de biodiesel tem sido tema de pesquisas intensivas e o aumento no conhecimento sobre os efeitos danosos ao ambiente do uso de combustíveis fósseis como fonte de energia têm motivado a busca da viabilização do uso de biocombustíveis. O presente trabalho teve como objetivo aprimorar a tecnologia de síntese enzimática de biodiesel pela rota etílica. Utilizou-se como proposta a transesterificação do óleo de babaçu com etanol mediada pela enzima lipase em fluxo contínuo empregando reator de leito fluidizado, visando aumentar a produtividade do sistema, bem como obter biodiesel com propriedades adequadas à sua utilização como biocombustível. Todos os experimentos foram realizados na ausência de solventes a 50 °C, utilizando como catalisadores a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz de SiO₂-PVA e *Candida antarctica* adsorvida em resina de metil-metacrilato (Novozym[®] 435). O reator de leito fluidizado (coluna de vidro: 12 mm × 375 mm) com recirculação foi construído e as características hidrodinâmicas foram determinadas por meio da distribuição do tempo de residência (DTR) usando teste de traçador. Para ambos biocatalisadores foram investigados os efeitos da razão molar óleo e etanol (1:5 a 1:12), tempo espacial (6 a 14 h) e carregamento de lipase (3 a 23 gramas) no rendimento de transesterificação e produtividade. Grande excesso de etanol (razão molar 1:12) e a incorporação de uma coluna empacotada com Lewatit[®] GF202 para remover o glicerol formado como subproduto foram condições essenciais para manter uma operação estável do reator para ambos os biocatalisadores, apesar dos diferentes desempenhos obtidos. Empregando *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, a eficiência do reator foi limitada mesmo utilizando elevado carregamento de lipase (22,3 g). Valores máximos de rendimento de transesterificação $[(53,0 \pm 4,8)\%]$ e produtividade $[(9,3 \pm 0,8) \times 10^{-6} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}]$ foram alcançados no tempo espacial de 9,3 h, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de 18 dias. A viabilidade do FBR foi demonstrada usando Novozym[®] 435 e um desempenho superior foi alcançado com apenas 5 gramas de biocatalisador e tempo especial de 8 h, fornecendo rendimentos médios de transesterificação de $(98,1 \pm 2,4)\%$ e produtividade de $(9,9 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Nessas condições as propriedades da amostra de biodiesel foram: teor de éster de 97,1%; massa específica a 20 °C de 872 kg/m³; viscosidade cinemática a 40 °C de 4,86 mm²/s; 1,4% em massa de monoacilglicerol e 1,0% em massa de diacilglicerol. Outros parâmetros foram estimados por modelos empíricos, visando à predição da qualidade do biodiesel do óleo de babaçu: 64 para o número de cetano; 257 para o índice de saponificação; 17 gI₂/100g para o índice de iodo; e 8,5 °C negativos para o ponto de entupimento de filtro a frio. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios e contribuíram para o estabelecimento de condições reacionais e operacionais para a produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado, utilizando etanol e óleo de babaçu como materiais de partida em meio isento de solventes.

Palavras chave: Biodiesel. Reator de leito fluidizado. Óleo de babaçu. Etanol.

ABSTRACT

FIDALGO, W. R. R. **Enzymatic biodiesel production in fluidized bed reactor from the ethanolysis of babassu oil: establishment of reaction and operational conditions.** 2014. 158p. Thesis (Doctor of Science) — Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo/SP, 2014.

Recently there has been evidence that humans began to understand more deeply that the environment is responsible for providing the essential conditions to their survival and evolution, and the search for suitable energy alternatives to this new way of thinking and living has been an integral part of the solution to the environmental problems that are increasingly urgent. In this context, the production of biodiesel has been the subject of intensive research, because although the prospects of oil shortages have been postponed several times due to the discovery of new reserves, issues related to political and social instability of major producer countries and the increase in knowledge about the harmful effects to the environment from the use of fossil fuels as an energy source have motivated the search for the feasibility of the use of biofuels. The present study aimed at improving the enzymatic technology to produce biodiesel by ethanolysis. The transesterification of babassu oil with ethanol mediated by lipase in a fluidized bed reactor (FBR) under continuous run was used as a proposal to increase the productivity of the system as well as to obtain biodiesel having suitable properties to be used as a biofuel. All experiments were carried out in solvent-free system at 50°C and microbial lipases from *Burkholderia cepacia* immobilized on SiO₂-PVA hybrid matrix and *Candida antarctica* adsorbed on methyl-methacrylate resin (Novozym[®] 435) were used as biocatalysts. The FBR system (glass column: 12 mm × 375 mm) with recirculation was assembled and its hydrodynamic characteristics, such as the mean residence time and variance, were evaluated through the residence time distribution (RTD) employing a pulse input. For both biocatalysts the effects of oil-to-ethanol molar ratio (1:5 to 1:12), space time (6 to 14 h) and lipase loading (3 to 23 grams) in the transesterification yield and productivity were investigated. Great excess of ethanol (molar ratio oil-to-ethanol of 1:12) and the incorporation of a column packed with Lewatit[®] GF202 to remove the glycerol formed as a byproduct were found to be essential to maintain a stable reactor operation for both biocatalysts, although different performances were attained. Using *B. cepacia* lipase immobilized on SiO₂-PVA the reactor efficiency was limited even for high lipase loading (22.3 g). Maximum transesterification yield [(53.0 ± 4.8)%] and productivities [(9.3 ± 0.8) × 10⁻⁶ mol_{ester}/g_{cat}/min] were achieved at space time of 9.3 h, revealing a biocatalyst half-life of 18 days. The feasibility of the FBR was demonstrated using Novozym[®] 435 and enhanced performance was attained using only 5 grams of biocatalyst at 8 h space time, which provided transesterification yield of 98.1 % and productivity of (9.9 ± 0.2) × 10⁻⁵ mol_{ester}/g_{cat}/min. Under such conditions the biodiesel properties were as follows: ester content of 97.1%, density at 20 °C of 872 kg/m³, kinematic viscosity at 40 °C of 4.86 mm²/s, 1.4 wt% of monoacylglycerol and 1.0 wt% of diacylglycerol. Other parameters were estimated by empirical models in order to predict the quality of biodiesel from babassu oil: 64 for the cetane number; 257 for the index of saponification, 17 g I₂/100g for index iodine, and - 8.5 ° C for the cold filter plugging point. The results obtained were quite satisfactory and have contributed to the establishment of operating conditions for the enzymatic production of biodiesel in a fluidized bed reactor using ethanol and babassu oil as starting materials in a solvent-free reaction medium.

Key words: Biodiesel. Fluidized bed reactor. Babassu oil. Ethanol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Impactos ambientais do uso do biodiesel.....	26
Tabela 3.2. Comparação entre os principais métodos para a produção de biodiesel.....	31
Tabela 3.3. Aplicações industriais de lipases.....	44
Tabela 3.4. Classificação das lipases quanto à sua regioespecificidade.....	44
Tabela 3.5. Vantagens e desvantagens no uso de enzimas imobilizadas.....	46
Tabela 3.6. Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.....	48
Tabela 3.7. Tipos de reatores enzimáticos contínuos e suas características.....	55
Tabela 3.8. Processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzidos em regime contínuo.....	56
Tabela 4.1. Composição em ácidos graxos do óleo de babaçu.....	59
Tabela 4.2. Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fluidizado.....	60
Tabela 4.3. Equipamentos utilizados nas atividades experimentais.....	61
Tabela 4.4. Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos.....	74
Tabela 5.1. Altura do leito fluidizado em função da massa de biocatalisador e da vazão.....	79
Tabela 5.2. Porosidade do leito fluidizado em função da vazão e da massa de biocatalisador.....	80
Tabela 5.3. Principais parâmetros e informações referentes ao primeiro experimento de produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado.....	82
Tabela 5.4. Proporção entre os componentes da solução do corante lipossolúvel azul utilizada no teste de traçador.....	84
Tabela 5.5. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência da razão molar (Experimento 2).....	88
Tabela 5.6. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência do tempo espacial e da massa de biocatalisador (Experimento 3).....	90
Tabela 5.7. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência da razão molar para 27 h de tempo espacial.....	91
Tabela 5.8. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência do tempo espacial com razão molar 1:12.....	93
Tabela 5.9. Resumo dos principais resultados obtidos nos experimentos.....	95
Tabela 5.10. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento 6.....	96
Tabela 5.11. Altura do leito fluidizado em função da massa de Novozym [®] 435 e da vazão.....	99
Tabela 5.12. Porosidade do leito fluidizado em função da vazão e da massa de Novozym [®] 435.....	100
Tabela 5.13. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 7.....	106
Tabela 5.14. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 9).....	107
Tabela 5.15. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 8.....	108
Tabela 5.16. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 8).....	109
Tabela 5.17. Concentração, rendimento e produtividade (Experimentos 7 e 8).....	110
Tabela 5.18. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 9.....	111
Tabela 5.19. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 9).....	112
Tabela 5.20. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 10.....	113

Tabela 5.21. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 10).	114
Tabela 5.22. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 11.	115
Tabela 5.23. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 11).	116
Tabela 5.24. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 12.	117
Tabela 5.25. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 12).	118
Tabela 5.26. Resumo dos principais resultados obtidos nos experimentos com Novozym [®] 435.	120
Tabela 5.27. Parâmetros de qualidade do biodiesel estimados por modelos empíricos. ..	122
Tabela 5.28. Parâmetros de qualidade do biodiesel obtidos para amostras de biodiesel nas melhores condições reacionais.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Reações reversíveis envolvidas na transesterificação de um triacilglicerol com metanol.....	33
Figura 3.2. Processo tradicional de produção de biodiesel com etapa de pré-tratamento ácido seguida de catálise alcalina. (A) Reator; (B) Separação (centrífuga ou decantador); (D) Purificação do produto e recuperação do álcool.....	34
Figura 3.3. Hidrólise do triacilglicerol com formação de diacilglicerol e ácido graxo livre.	34
Figura 3.4. Exemplo de formação de sabão a partir de ácido oleico na transesterificação alcalina.....	35
Figura 3.5. Desenho de um processo ideal para produção enzimática de biodiesel. (A) Reator; (B) Separação (centrífuga ou decantador); (C) Filtro; (D) Separação do glicerol e recuperação do álcool.	36
Figura 3.6. Esquema das etapas reacionais envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO ₂ -PVA.....	51
Figura 3.7. Mecanismo de ativação de SiO ₂ -PVA e imobilização enzimática usando epícloridrina.....	52
Figura 3.8. Alguns modelos de reatores enzimáticos: reator agitado batelada, reator agitado contínuo, reator de membrana, reator de leito fixo e reator de leito fluidizado.....	54
Figura 4.1. Sistema reacional utilizado nos experimentos de produção de biodiesel em reator de leito fluidizado (1 – reator de leito fluidizado; 2 – tanque de alimentação; 3 – tanque de recirculação; 4 – tanque de coleta de produto; 5 e 6 – bombas peristálticas; 7 e 8 – condensadores de refluxo; 9 – aquecedor; 10 – banho termostaticado).	63
Figura 4.2. Detalhes do reator utilizado nos experimentos: a tela metálica é utilizada para evitar perda de enzima imobilizada e as esferas metálicas/discos de espumas funcionam como difusor.	64
Figura 5.1. Concepção mais trivial para um sistema de reator de leito fluidizado para produção de biodiesel.	78
Figura 5.2. Rendimento de transesterificação nos 29 dias de reação do primeiro experimento de produção de biodiesel em reator de leito fluidizado empregando lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	83
Figura 5.3. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e absorbância.	85
Figura 5.4. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e tempo.	85
Figura 5.5. Determinação do tempo médio de residência do reator por meio da área do gráfico de t.(E) versus tempo.....	86
Figura 5.6. Comparação entre as curvas de E(t) versus t para um CSTR ideal e para o FBR utilizado.	87
Figura 5.7. Sistema reacional utilizado nos dois primeiros experimentos de produção de biodiesel.....	88
Figura 5.8. Rendimento de transesterificação obtido durante os 22 dias de reação (Experimento 2).	89
Figura 5.9. Rendimentos de transesterificação durante os oito dias de reação (Experimento 3).	90
Figura 5.10. Sistema reacional empregando o reator com maior capacidade (Experimentos 3 e 4).	92

Figura 5.11. Rendimento de transesterificação ao longo dos 12 dias de reação (Experimento 4).	92
Figura 5.12. Rendimento de transesterificação ao longo dos dez dias de reação (Experimento 5).	94
Figura 5.13. Sistema reacional utilizado nos experimentos com Novozym [®] 435 (1 – reator de leito fluidizado; 2 – tanque de alimentação; 3 – tanque de recirculação; 4 – tanque de coleta de produto; 5 e 6 – bombas peristálticas; 7 e 8 – condensadores de refluxo; 9 – aquecedor; 10 – banho termostatizado; 11 – coluna com Lewatit [®] GF202).	97
Figura 5.14. Rendimento de transesterificação e viscosidade cinemática durante 15 dias de reação, empregando Novozym [®] 435 como catalisador (Experimento 6).	97
Figura 5.15. Quadro comparativo do desempenho da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA e da Novozym [®] 435 na síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado com coluna extratora de glicerol.	98
Figura 5.16. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e absorbância no teste de traçador tipo pulso para o biocatalisador Novozym [®] 435.	101
Figura 5.17. Teste de traçador tipo pulso empregando corante lipossolúvel azul e Novozym [®] 435.	102
Figura 5.18. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e tempo no teste de traçador tipo pulso com Novozym [®] 435.	103
Figura 5.19. Determinação do tempo médio de residência do reator pela curva de $t.E(t)$ versus tempo.	104
Figura 5.20. $E(t)$ versus tempo para um CSTR ideal e o FBR utilizado empregando Novozym [®] 435.	105
Figura 5.21. Sistema reacional utilizado nos ensaios para verificar a influência do tempo espacial no rendimento e produtividade da síntese de biodiesel (Experimentos 7 e 8).	106
Figura 5.22. Rendimento de transesterificação para o Experimento 7 (região 1: estabilização das condições; região 2: tempo espacial de 10 h; região 3: transição de mudança de tempo espacial; região 4: tempo espacial de 5 h).	107
Figura 5.23. Rendimento de transesterificação para o experimento 8 (região 1: estabilização das condições; região 2: tempo espacial de 5 h; região 3: transição de mudança de tempo espacial; região 4: tempo espacial de 10 h).	109
Figura 5.24. Rendimento de transesterificação para o experimento 9 (região 1: tempo espacial de 10 h; região 2: tempo espacial de 5 h).	111
Figura 5.25. Rendimento de transesterificação para o experimento 10 (região 1: tempo espacial de 6 h; região 2: tempo espacial de 8 h; região 3: tempo espacial de 10 h; região 4: tempo espacial de 12 h; região 5: tempo espacial de 14 h).	114
Figura 5.26. Rendimento de transesterificação para o experimento 11 (região 1: tempo espacial de 6 h; região 2: tempo espacial de 8 h; região 3: tempo espacial de 10 h).	116
Figura 5.27. Rendimento de transesterificação para o experimento 12 (região 1: tempo espacial de 6 h; região 2: tempo espacial de 8 h; região 3: tempo espacial de 10 h).	118
Figura 5.28. Comparação dos valores de rendimento de transesterificação e produtividade para os melhores resultados obtidos nos experimentos com 3, 5 e 7 g de Novozym [®] 435.	121

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGL	Ácido graxo livre
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
ASTM	Sociedade Americana para Ensaios e Materiais
BHA	Butilato de hidroxianisole
BHT	Butilato de hidroxitolueno
BSTR	Reator de tanque agitado batelada
CALB	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CG	Cromatografia de fase gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CSTR	Reator de tanque agitado contínuo
EN	Norma Europeia
FAEE	Ésteres etílicos de ácidos graxos
FBR	Reator de leito fluidizado
FCC	Fator de comprimento da cadeia
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GI	Grau de instauração
IC	Índice de cetano
II	Índice de iodo
IPPC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
IS	Índice de saponificação
MR	Reator de membrana
MSFBR	Reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado

PBR	Reator de leito fixo
PEFF	Ponto de entupimento de filtro a frio
PEG	Polietilenoglicol
PHB	Polihidroxibutirato
PVA	Álcool polivinílico
SiO₂-PVA	Sílica-álcool polivinílico
STR	Reator de tanque agitado
TEOS	Tetraetilortossilicato
τ	Tempo espacial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. Biodiesel	25
3.2. Matérias-primas para produção de biodiesel	27
3.2.1. Óleo de babaçu.....	29
3.3. Processos de produção de biodiesel.....	30
3.3.1. Reações de transesterificação	32
3.3.2. Transesterificação enzimática.....	36
3.4. Qualidade do biodiesel.....	38
3.5. Lipases	43
3.6. Técnicas de imobilização de enzimas.....	45
3.6.1. Suportes para imobilização de enzimas visando à produção de biodiesel.....	48
3.6.2. Suporte híbrido de SiO ₂ -PVA.....	50
3.7. Biorreatores com lipases imobilizadas	53
3.7.1. Reatores de leito fluidizado	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1. Materiais	59
4.1.1. Catalisador	59
4.1.2. Reagentes utilizados na síntese de biodiesel.....	59
4.1.3. Sistema reacional	60
4.1.4. Outros materiais e equipamentos.....	60
4.2. Procedimento experimental	62
4.2.1. Síntese do suporte híbrido de SiO ₂ -PVA e imobilização da lipase por ligação covalente	62
4.2.2. Síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado	63
4.2.3. Purificação do biodiesel obtidos nos experimentos.....	65
4.2.4. Ativação e regeneração da resina Lewatit® GF 202	65
4.2.5. Caracterização hidrodinâmica do reator	65
4.2.5.1. Velocidade mínima de fluidização	65
4.2.5.2. Número de Reynolds e Froude	67
4.2.5.3. Distribuição de Tempo de Residência (DTR).....	68
4.3. Métodos de análise.....	70
4.3.1. Atividade da enzima imobilizada pela hidrólise do azeite de oliva emulsionado	70
4.3.2. Atividade da enzima imobilizada pela hidrólise do butirato de metila.....	70
4.3.3. Teor de umidade das enzimas imobilizadas	71
4.3.4. Densidade das enzimas imobilizadas.....	71
4.3.5. Tempo de meia-vida do biocatalisador	71
4.3.6. Tempo espacial do reator	72
4.3.7. Massa específica do biodiesel.....	72
4.3.8. Viscosidade cinemática do biodiesel	73
4.3.9. Quantificação de mono e diacilgliceróis.....	73
4.3.10. Quantificação dos ésteres etílicos produzidos	73
4.3.11. Rendimento de transesterificação	74
4.3.12. Produtividade em ésteres de etila.....	75
4.3.13. Determinação das propriedades do biodiesel por modelos empíricos.....	75

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
5.1. Teste de expansão do leite utilizando lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA	78
5.2. Produção enzimática de biodiesel em sistema de reator de leite fluidizado com recirculação (Experimento 1).....	82
5.3. Teste de traçador tipo pulso com lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA	84
5.3. Influência da razão molar entre os reagentes (Experimento 2)	88
5.4. Testes com nova configuração do sistema reacional	89
5.4.1. Influência da massa de biocatalisador e do tempo espacial (Experimento 3)	90
5.4.2. Influência da razão molar (Experimento 4)	91
5.4.3. Influência do tempo espacial e da coluna com Lewatit® GF202 para remoção de glicerol (Experimento 5).....	93
5.5. Análise global dos experimentos utilizando lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA	95
5.6. Produção de biodiesel em reator de leite fluidizado empregando a Novozym® 435 como biocatalisador (Experimento 6).....	96
5.7. Caracterização hidrodinâmica do leite utilizando Novozym® 435.....	99
5.7.1. Velocidade mínima de fluidização	99
5.7.2. Número de Reynolds e Froude	100
5.7.3. Distribuição de tempo de residência	101
5.8. Influência do tempo espacial utilizando Novozym® 435 (Experimentos 7 e 8).....	105
5.8.1. Influência do tempo espacial descendente (Experimento 7)	105
5.8.2. Influência do tempo espacial ascendente (Experimento 8)	108
5.9. Influência da razão molar utilizando Novozym® 435 (Experimento 9)	110
5.10. Influência da massa de Novozym® 435 e do tempo espacial	113
5.10.1. Influência do tempo espacial para 3,0 g de Novozym® 435 (Experimento 10).....	113
5.10.2. Influência do tempo espacial para 5,0 g de Novozym® 435 (Experimento 11).....	115
5.10.3. Influência do tempo espacial para 7,0 g de Novozym® 435 (Experimento 12).....	117
5.11. Análise global dos experimentos utilizando Novozym® 435	120
5.12. Qualidade do biodiesel.....	122
6. CONCLUSÕES.....	125
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	129
REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICES	141
ANEXOS.....	151

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o ser humano tem utilizado os recursos naturais do planeta de forma a comprometer os alicerces de sua própria sustentação e evolução. O atual modelo de desenvolvimento socioeconômico está vinculado a taxas de produção e consumo cada vez mais aceleradas, o que ocasiona maior pressão sobre os recursos naturais, contribuindo diretamente para a degradação ambiental em todas as suas formas. Atrelado a este modelo, está o processo de acelerada urbanização, que demanda maiores deslocamentos de pessoas e bens de consumo com a utilização de diferentes meios de transportes, cujas emissões gasosas devido ao uso de combustíveis fósseis desempenham um papel fundamental dentro do contexto ambiental, visto que essas emissões são prejudiciais tanto ao bem-estar do homem quanto ao meio ambiente.

Recentemente, tem havido indícios de que o ser humano passou a compreender de forma mais profunda que o meio ambiente é o responsável pelo oferecimento das condições essenciais a sua sobrevivência e evolução, e a busca por alternativas energéticas mais adequadas a essa nova forma de pensar e viver tem sido parte integrante da solução para os problemas socioambientais que se mostram cada vez mais urgentes.

Neste contexto, a produção de biodiesel tem sido tema de pesquisas intensivas, pois embora as perspectivas de escassez de petróleo tenham sido adiadas diversas vezes em função da descoberta de novas reservas, problemas relacionados à instabilidade política e social de importantes países produtores e o aumento no conhecimento sobre os efeitos danosos ao ambiente do uso de combustíveis fósseis como fonte de energia têm motivado a busca da viabilização do uso de biocombustíveis. A busca destas alternativas tem sido enfatizada ainda mais após um grande consenso da comunidade científica, publicado nos últimos relatórios do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPPC), sobre a relação entre as emissões de gás carbônico oriundas da queima de combustíveis derivados do petróleo e os efeitos atuais e futuros do aquecimento global devido ao efeito estufa.

A tecnologia estabelecida para a produção industrial de biodiesel é baseada na transformação química (alcoólise) de óleos vegetais com metanol, usando catalisadores homogêneos (ácidos ou básicos) para promover a clivagem das moléculas de triglicerídeos e gerar uma mistura de ésteres de ácidos graxos (PINTO et al., 2005; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Apesar do elevado rendimento obtido por esta via, o metanol constitui um produto também fóssil (obtido do petróleo) e o uso dos catalisadores

homogêneos gera problemas ao meio ambiente e requer inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (KNOTHE et al., 2006).

A substituição do metanol por etanol é uma estratégia incentivada pelo governo brasileiro em função da disponibilidade deste álcool no país, o qual é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, tornando o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo. Esta opção, quando associada ao uso de processos enzimáticos em substituição à via química tradicional, pode tornar a produção de biodiesel um processo totalmente inserido nos conceitos de rotas ambientalmente favoráveis (AKOH et al., 2007; ANTCZAK et al., 2009).

O uso de processos enzimáticos desponta como uma alternativa adequada para que sejam desenvolvidos processos eficientes de obtenção de produtos de interesse não agressivos do ponto de vista ecológico. O emprego de enzimas como biocatalisadores em processos industriais inclui benefícios como o uso de condições amenas de pressão e temperatura e a não geração de resíduos tóxicos (AKOH et al., 2007; ANTCZAK et al., 2009).

Em termos práticos, os processos que envolvem enzimas imobilizadas são preferivelmente operados de forma contínua. Este modo de operação, quando comparado com o processo em batelada, apresenta inúmeras vantagens técnicas, principalmente por possibilitar o controle automático, ser mais fácil de operar e favorecer o controle de qualidade do produto. Entre os diversos reatores para uso com sistema imobilizado, os de leito fluidizado apresentam vantagens, como a não formação de caminhos preferenciais (o que pode ocorrer em reatores de leito fixo), a possibilidade de variação nas condições de fluxo e maior eficiência nos processos de transferências de calor e massa intrínsecos à reação.

O presente trabalho teve como objetivo o aprimoramento da produção enzimática de biodiesel em processo contínuo, utilizando reator de leito fluidizado. Para tanto, foram testados dois biocatalisadores, num sistema cujo desempenho foi quantificado pelo rendimento da reação e pela produtividade em ésteres (biodiesel), e o produto obtido foi analisado com relação a alguns parâmetros de qualidade. O projeto incluiu, ainda, o uso de óleo de babaçu como matéria-prima, que apresenta um forte potencial para a produção de combustível, tanto por sua composição química, quanto por sua disponibilidade em localidades carentes de fontes de energia, o que estimula a realização de pesquisas nesta área por envolver aspectos ambientais, econômicos e sociais para o Brasil.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo o aprimoramento da tecnologia enzimática de transesterificação de óleos vegetais pela rota etílica, buscando a maximização do desempenho da síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado e viabilizando estudos futuros de produção em escala industrial. Para alcançar esse objetivo as seguintes etapas foram executadas:

1. Avaliação da estabilidade e operacionalidade de um sistema de produção enzimática de biodiesel empregando reator de leito fluidizado com recirculação em meio reacional composto por óleo de babaçu e etanol na ausência de solventes;
2. Estudo do desempenho do reator de leito fluidizado em sistema que incluiu uma coluna com a resina Lewatit® GF202 para remoção de glicerol, empregando como catalisador a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida (SiO₂-PVA) e a lipase B de *Candida antarctica* fisicamente adsorvida em resina de metil-metacrilato obtida comercialmente (Novozym® 435): estabelecimento de condições reacionais (tempo espacial, razão molar entre os reagentes e massa de biocatalisador) para obtenção de rendimentos satisfatórios e elevada produtividade;
3. Caracterização hidrodinâmica do sistema empregando reator de leito fluidizado pela quantificação dos seguintes parâmetros: velocidade mínima de fluidização, tempo médio de residência, variância, coeficiente de assimetria e número de tanques agitados em série correspondentes ao reator utilizado;
4. Avaliação do produto obtido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiesel

Nos últimos anos, o crescimento da preocupação mundial com os impactos ambientais associados com a exploração, refino e uso do petróleo e seus derivados, aliado à elevação e instabilidade dos preços desses produtos no mercado internacional, criou a necessidade da busca por fontes de energia de baixo custo e menos agressivas ao meio ambiente e a oportunidade do desenvolvimento de novas tecnologias para exploração dessas fontes alternativas (RIBEIRO; PEIXOTO; SOUZA, 2008).

Os produtos à base de petróleo são uma das principais causas do dióxido de carbono antropogênico na atmosfera. Hoje, o setor de transportes em todo o mundo é quase totalmente dependente dos combustíveis derivados do petróleo, sendo responsável por um quinto das emissões globais de CO₂, e representa cerca de 60% do consumo global deste insumo. Em todo o mundo, havia cerca de 800 milhões de carros e caminhões leves na estrada em 2007. Esse número, segundo projeções, pode aumentar para 1,3 bilhão em 2030 e para mais de 2 bilhões de veículos até 2050, o que afetará a estabilidade dos ecossistemas e do clima global, assim como as reservas mundiais de petróleo (BALAT; BALAT, 2010).

Diante dessas perspectivas, uma alternativa, particularmente favorável ao Brasil, está no desenvolvimento dos chamados biocombustíveis, em especial o etanol e o biodiesel, que apresentam aplicações em várias áreas e passaram a ser incentivados como uma oportunidade para atenuar os problemas apontados (RIBEIRO; PEIXOTO; SOUZA, 2008).

Biodiesel é o nome dado a ésteres alquílicos de ácidos graxos desde que atendam certos parâmetros de qualidade (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). É um combustível limpo, renovável e foi recentemente considerado o melhor candidato para a substituição do petrodiesel, pois pode ser utilizado em qualquer motor de ignição por compressão sem a necessidade de adaptações (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Apesar de apresentar vantagens, o biodiesel possui menor poder calorífico (cerca de 10% no caso do biodiesel puro), emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NO_x) e possui maior densidade que o petrodiesel em regiões de clima frio (MURUGESAN et al., 2009). Além disso, o preço de mercado é relativamente superior ao diesel comercial. Entretanto, se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos for otimizado, a produção de biodiesel pode ser obtida a um custo competitivo com relação ao preço comercial do óleo diesel (SUAREZ et al., 2009).

Na Tabela 3.1, são mostrados resumidamente alguns impactos, em forma de vantagens e desvantagens do ponto de vista ambiental, que podem ser quantificados, como por exemplo: o Efeito Estufa por meio das emissões de CO₂, efeitos de acidificação por meio das emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x) e a destruição da camada de ozônio devido às emissões de óxido nitroso (N₂O).

Tabela 3.1. Impactos ambientais do uso do biodiesel.

Impacto ambiental	Vantagens do Biodiesel	Desvantagens do biodiesel
Demanda por insumos	Preservação de recursos energéticos finitos	Consumo de recursos minerais
Efeito Estufa	Menores emissões de gases causadores do Efeito Estufa	-
Acidificação	-	Maior acidificação
Destruição da Camada de ozônio	-	Aumento das emissões de N ₂ O
Eutrofização	-	Maiores emissões de NO _x Risco: eutrofização de águas de superfície
Toxicidade humana e ecológica	Menores emissões de SO ₂ ; Menores emissões de materiais particulados em áreas urbanas; Menores índices de poluição dos oceanos devido à extração e transporte de óleo cru	Risco: poluição do corpo d'água por pesticidas
	Risco: menos poluição por derramamento de óleo após acidentes	Risco: poluição do lençol freático por nitratos
	Risco: menor toxicidade e melhor biodegradabilidade	

Fonte: RIBEIRO; PEIXOTO; SOUZA, 2008.

Apesar de apresentar algumas limitações de natureza econômica, técnica e ambiental, o grande número de vantagens apresentadas pelo biodiesel frente ao petrodiesel justifica os esforços para o aprimoramento de sua produção, consolidando-o, assim, como parte da solução para os problemas energético-ambientais enfrentados pela sociedade global dentro dos padrões de desenvolvimento sustentável que consensualmente têm sido buscados.

3.2. Matérias-primas para produção de biodiesel

As matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel podem ser classificadas em: óleos vegetais, gorduras animais, óleos e gorduras residuais e óleos microbianos. Na categoria de óleos vegetais, podem ser transformados em biodiesel os óleos obtidos de semente de soja, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, bagaço de mamona, semente de colza, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (RAMOS et al., 2003).

Mais de 95% da matéria-prima lipídica empregada para a produção de biodiesel provêm de óleos vegetais comestíveis devido à grande produção mundial e à composição química destes óleos, que resulta na produção de um biodiesel de alta qualidade (GUI; LEE; BHATIA, 2008). Entretanto, a utilização de óleos comestíveis apresenta algumas limitações, tais como a competição com a cadeia de produção de alimentos, resultando na elevação tanto do preço do biocombustível como do óleo comestível (KANSEDO; LEE; BHATIA, 2009). Para contornar tais limitações, pesquisas têm sido direcionadas para uso de óleos não comestíveis, os quais não são aptos para a alimentação humana devido ao elevado teor de ácido graxo saturado (considerados prejudiciais à saúde) ou à presença de componentes tóxicos, como os contidos nos óleos de mamona e colza (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

O Brasil possui grandes vantagens para produção de biocombustíveis, pois apresenta geografia favorável, situa-se em uma região tropical, com luminosidade e temperaturas médias anuais elevadas. Esses fatores, associados à disponibilidade hídrica e à regularidade de chuvas, tornam o país o de maior potencial para produção de energia renovável. Diferentemente de outros países, a política brasileira de incentivo à produção de biodiesel é baseada na produção regional, utilizando as técnicas e matérias-primas mais apropriadas em cada região (OLIVEIRA et al., 2009).

O Brasil possui, também, grande diversidade de opções para produção de biodiesel, tais como a palma e o babaçu no norte, a soja, o girassol e o amendoim nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, e a mamona e o pinhão manso, que, além de serem uma opção do semiárido nordestino, apresentam-se também como alternativa para as demais regiões do país. Atualmente, a maior parte do biodiesel brasileiro produzido é proveniente do óleo de soja por ser relativamente barato e já existir uma infraestrutura de produção bem estabelecida (SUAREZ; MENENGHITTI, 2007).

É geralmente aceito que as matérias-primas usadas para a produção de biodiesel podem incluir qualquer óleo vegetal disponível (refinados, semirrefinados, degomados, crus

e até alguns não comestíveis), óleos produzidos por micróbios, óleos oriundos de frituras, gorduras naturais ou artificialmente hidrogenadas, sebo bovino, banha, gordura de frango e óleos de peixes (ANTCZAK et al., 2009).

Porém, é de fundamental importância relacionar a estrutura química e os teores de cada uma das substâncias presentes na matéria-prima, pois estas refletirão não só nas propriedades físico-químicas do biocombustível, mas poderão afetar a queima no motor, a formação de depósitos no sistema de injeção e, ainda, o tipo e a quantidade de substâncias ou gases poluentes emitidos (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

As matérias-primas alcoólicas que podem ser usadas no processo de produção de biodiesel incluem metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico. Dentre estes, metanol e etanol são os alcoóis mais frequentemente usados. O metanol é especialmente usado devido ao seu baixo custo e vantagens físicas e químicas, pois pode reagir com triglicerídeos rapidamente, além de dissolver facilmente catalisadores alcalinos. Entretanto, devido ao seu baixo ponto de ebulição, há grande risco de explosões relativo aos seus vapores, que são incolores e inodoros, tornando-se um material extremamente perigoso e que deve ser manipulado cuidadosamente (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

A substituição do metanol por etanol é uma estratégia incentivada pelo governo brasileiro em função da disponibilidade deste álcool no país, o qual é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, tornando o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo, promovendo, desta forma, a produção de combustível completamente por meio de fontes renováveis. Esta opção, quando associada ao uso de processos enzimáticos em substituição à via química tradicional pode tornar a produção de biodiesel um processo totalmente inserido nos conceitos de rotas ambientalmente favoráveis (AKOH et al., 2007; ANTCZAK et al., 2009).

Neste trabalho, utilizaram-se como matérias-primas o etanol, devido às vantagens apresentadas anteriormente, e o óleo de babaçu em função do baixo impacto no setor alimentício e de sua composição química, que gera um biodiesel de qualidade.

3.2.1. Óleo de babaçu

Babaçu é o nome genérico dado às palmeiras oleaginosas pertencentes à família *Palmae* e integrantes dos gêneros *Orbignya* e *Attalea*. O primeiro gênero inclui espécies predominantemente nativas da região norte do Brasil (Maranhão, Piauí, Pará e Tocantins), tais como: *Orbignya phalerata* Mart. (babaçu verdadeiro), *Orbignya eichleri* Drude (piaçava), *Orbignya teixeirana* Bondar (perinão) e *Orbignya microcarpa* Martius. O segundo gênero abrange espécies encontradas principalmente nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia, dentre as quais se destacam: *Attalea oleifera* Barb. Rodr. (catolé-de-pernambuco) e *Attalea pindobassu* Bondar (pindobaçu). *Orbignya phalerata* é a espécie de maior distribuição, de maior variação morfológica e de maior importância econômica. Esta espécie ocupa regiões extensivas no Brasil, na Bolívia e no Suriname (ALBIERO et al., 2007).

O Nordeste brasileiro possui uma área de cerca de 12 milhões de hectares plantados com babaçu, sendo que a maior parte está concentrada no estado do Maranhão. Mensalmente, são extraídas em torno de 140.000 toneladas de amêndoas destes babaçuais. Contudo, o potencial do babaçu continua inexplorado, sendo possível o aproveitamento econômico para produção de carvão, óleo combustível, gás, lubrificante e óleo comestível (LIMA et al., 2007).

Apesar dessa potencialidade, medida pela dimensão de ocorrência e valor econômico das várias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu é ainda realizada, em grande parte do nordeste, de forma muito artesanal (PARENTE, 2003). Desta forma, a prática do aproveitamento integral do coco, partindo da quebra mecanizada, poderia ser uma excelente oportunidade de geração de renda na coleta do coco, bem como na industrialização dos constituintes, produzindo riquezas oportunas para os Estados detentores de babaçu. Neste cenário, o óleo de babaçu poderia ingressar no mercado energético com quantidades substantivas e preços competitivos (PARENTE, 2003).

No que tange à produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes para produção de biodiesel devido a sua composição ser predominantemente láurica (ácidos graxos de doze carbonos). Esta característica facilita a reação de transesterificação, pois os ácidos láuricos são compostos de cadeias relativamente curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente transesterificante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas (LIMA et al., 2007).

Uma palmeira de babaçu, que se mantém viva por até por duzentos anos, começa a produzir castanhas aos oito anos de idade. Cada árvore produz em média quatro cachos por ano, possuindo entre 200 e 600 frutos, cada qual contendo entre três a cinco amêndoas, com até 60% de óleo em sua composição (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007).

De fora para dentro, o coco (fruto) divide-se nas seguintes partes:

a) *Epicarpo (12 a 18%)* - vulgarmente chamado ouriço - é um material fibroso, ligno-celulósico, podendo ser utilizado como combustível industrial.

b) *Mesocarpo (17 a 22%)* - de composição amilácea, contendo tanino e amido, presta-se como energético na produção de rações ou para a produção de etanol.

c) *Endocarpo (52 a 60%)* - altamente resistente, tendo em sua composição: sílica, fósforo, ferro, magnésio e metais alcalinos. O lignito pode ser utilizado na produção de peças aglomeradas, possíveis de serem empregadas como substituto de madeiras, na indústria de móveis e nas construções civis.

d) *Amêndoa oleaginosa (6 a 8%)* - com a seguinte composição: 7,25% de proteína, 66,00% de óleo, 18,00% de carboidratos e 7,80% de materiais minerais. Da extração do óleo, resulta torta utilizável para ração de animais (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007).

Considerando os 17 milhões de hectares de floresta onde predominam a palmeira do babaçu e as possibilidades de aproveitamento integral do coco, o babaçu constitui, potencialmente, uma extraordinária fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel, e, além disso, as demais partes da palmeira podem ser utilizadas para outros propósitos (FREITAS et al., 2009).

3.3. Processos de produção de biodiesel

A redução da viscosidade de óleos e gorduras para sua utilização como combustível pode ser realizada empregando-se diferentes métodos, tais como: uso direto e/ou misturas de matérias-primas com óleo diesel, microemulsão, craqueamento térmico (pirólise) e transesterificação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Na Tabela 3.2, estão apresentadas as definições, vantagens e desvantagens dos principais métodos de produção de biodiesel.

Tabela 3.2. Comparação entre os principais métodos para a produção de biodiesel.

Métodos	Definição	Vantagens	Desvantagens
Uso direto e blends	Uso direto dos óleos como combustível ou numa mistura com óleo diesel	<ul style="list-style-type: none"> - Renovável - Prontamente disponível - Alto conteúdo energético (~ 80% do combustível diesel) - Renovabilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta viscosidade - Baixa volatilidade - Estabilidade por curto prazo - Formação de goma
Microemulsão	Sistemas termodinamicamente estáveis e isotrópicos, formados pela mistura de dois líquidos imiscíveis	<ul style="list-style-type: none"> - Menor viscosidade - Melhores padrões de spray durante a combustão 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor número de cetano - Menor conteúdo de energia
Craqueamento térmico (Pirólise)	Consiste na quebra das moléculas de triglicerídeos por efeito térmico, formando uma mistura de compostos constituída principalmente de hidrocarbonetos	<ul style="list-style-type: none"> - Similaridade química entre os compostos oriundos da reação e os derivados do petróleo (gasolina e óleo diesel) 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo e consumo de energia elevados - Teor de enxofre semelhante ao encontrado na gasolina (menos favorável ecologicamente)
Trans-esterificação	Reação entre moléculas de triglicerídeos e alcoóis de cadeia curta na presença de catalisador, resultando na formação de ésteres alquílicos e glicerol	<ul style="list-style-type: none"> - Renovabilidade - Maior número de cetano - Maior eficiência de combustão - Menor emissão 	<ul style="list-style-type: none"> - Formação de subprodutos (glicerol e água residual)

Fonte: Adaptada de LEUNG; WU; LEUNG, 2010 e BALAT; BALAT, 2010.

A produção de biodiesel é acompanhada pela formação de glicerol que não requer nenhum processo adicional de recuperação, exceto purificação. Aplicações clássicas do glicerol incluem produtos para cuidados pessoais (sabonetes, cosméticos, produtos para cabelo, creme dental), produtos farmacêuticos e adoçante para doces e bolos. Parece improvável que o glicerol adicional relativo à produção de biodiesel possa encontrar aplicação nestes domínios, fazendo-se necessária a busca por outras aplicações. Estas aplicações incluem ésteres e éteres de glicerol, acetais e cetais, epóxidos, aldeídos, cetonas, produtos de oxidação e desidratação, bem como 1,2 - e 1,3-propanodiol. Em alguns casos, o uso de glicerol simplificaria o processo de obtenção de produtos químicos úteis, como dióis e epiclorigrina, apresentando diversas vantagens técnicas em comparação com o processo petroquímico (KNOTHE, 2010).

Para se ter uma produção eficiente de biodiesel, há uma grande necessidade por estabelecer desenhos de processos e parâmetros operacionais que permitam (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009):

1) Utilizar qualquer matéria-prima, independentemente da sua origem (gorduras animais ou óleos de qualquer grão ou fruto) por meio da: 1.1) padronização da matéria-prima para empregar o catalisador escolhido de forma eficiente e satisfatória; 1.2) opção pela catálise ácida homogênea ou sólidos ácidos como catalisadores heterogêneos, caso a matéria-prima seja constituída essencialmente ou na sua maioria por ácidos graxos, independentemente da origem dos lipídeos; 1.3) opção pela combinação da esterificação seguida da transesterificação ou até mesmo utilizando a sequência oposta destas reações, iniciando-se pela transesterificação e posterior esterificação, caso o conteúdo de ácidos graxos no óleo ou gordura esteja acima de 2%. Alternativamente, pode-se optar pelo pré-tratamento do óleo, seja ele realizado por refino físico ou químico.

2) Evitar a formação de subprodutos ou a permanência de intermediários indesejados, como mono e diacilgliceróis, no produto final.

3) Minimizar ou eliminar totalmente a produção de efluentes.

O método tradicional de produção de combustíveis a partir de óleos e gorduras é a transesterificação com alcoóis de cadeia curta, e o produto obtido, uma mistura de monoalquil ésteres, é denominado biodiesel (AKOH et al., 2007; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; VASUDESAN; BRIGGS, 2008; ANTCZAK et al., 2009). Além dos óleos vegetais, o biodiesel também pode ser produzido a partir de outras fontes como gordura animal (sebo bovino, banha de porco), resíduos de óleos das indústrias de extração e restaurantes e óleo de microalga (VASUDESAN; BRIGGS, 2008; ANTCZAK et al., 2009).

3.3.1. Reações de transesterificação

A transesterificação é um processo de troca de grupos acila entre moléculas de ésteres e ácidos (acidólise), entre ésteres e outros ésteres (interesterificação) ou entre ésteres e alcoóis (alcoólise) (PINTO et al., 2005).

Na transesterificação de diferentes óleos e gorduras, os triacilgliceróis reagem com moléculas de álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, e produzem ésteres e glicerina. Essa reação pode ser catalisada por diferentes tipos de catalisadores, a saber:

catalisadores homogêneos (ácidos ou bases fortes) ou heterogêneos (químicos ou bioquímicos) (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998).

Na literatura, são reportados também processos de transesterificação que não utilizam catalisador, sendo realizados com metanol sob condições supercríticas (temperatura e pressão em condições supercríticas). Essas condições utilizadas para a síntese do biodiesel com metanol supercrítico são responsáveis pela grande desvantagem desse processo, pois é requerido um elevado teor de metanol, os equipamentos necessários são de elevadíssimo custo devido à alta pressão e temperatura empregadas, além do elevado consumo energético pelo qual não é viável para aplicação industrial (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

A reação de transesterificação ocorre numa sequência consecutiva e reversível de três etapas reacionais, como é mostrado no exemplo da Figura 3.1 usando metanol.

Figura 3.1. Reações reversíveis envolvidas na transesterificação de um triacilglicerol com metanol.

A primeira etapa envolve a formação de diacilgliceróis a partir dos triacilgliceróis. Na segunda, os diacilgliceróis são convertidos em monoacilgliceróis e na última, estes são convertidos em glicerol. Em todas essas etapas, são produzidos ésteres de cadeia carbônica longa. Embora a relação estequiométrica molar da reação seja de 1:3 (óleo:álcool), normalmente é empregado um excesso de álcool para favorecer a formação do produto final e facilitar a recuperação da glicerol (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

Atualmente, o processo de produção de biodiesel mais utilizado industrialmente é a transesterificação alcalina, em que uma matéria-prima com um alto teor de água e ácidos graxos livres (AGLs) necessita de um pré-tratamento com um catalisador ácido para que os AGLs sejam esterificados, como é mostrado na Figura 3.2 (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

O pré-tratamento é necessário para reduzir a formação de sabões durante a reação e facilitar a separação do biodiesel e glicerol junto com a remoção da água residual e do catalisador alcalinos. A quantidade de água residual de uma planta tradicional de biodiesel é cerca de 20% em massa do biodiesel produzido. Portanto, o tratamento da água residual e a eventual necessidade de sua reutilização são um sério problema dos pontos de vista energético e ambiental (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Figura 3.2. Processo tradicional de produção de biodiesel com etapa de pré-tratamento ácido seguida de catálise alcalina. (A) Reator; (B) Separação (centrífuga ou decantador); (D) Purificação do produto e recuperação do álcool.

Água e ácidos graxos livres em óleos e gorduras podem resultar em um grande problema durante a transesterificação. Quando a água está presente, especialmente sob elevadas temperaturas, o triglicerídeo pode ser hidrolisado a diglicerídeo e formar um ácido graxo livre como é mostrado na Figura 3.3 (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011).

Figura 3.3. Hidrólise do triacilglicerol com formação de diacilglicerol e ácido graxo livre.

No entanto, a presença de água a temperaturas médias leva à formação excessiva de sabão. Quando um catalisador alcalino como hidróxido de sódio ou de potássio está presente, o ácido graxo livre reage formando um produto saponificado como mostra o exemplo da Figura 3.4 para o caso do ácido oleico e hidróxido de potássio (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011).

Figura 3.4. Exemplo de formação de sabão a partir de ácido oleico na transesterificação alcalina.

Sendo assim somente óleos que contém no máximo 0,5% de ácidos graxos livres e álcoois anidros podem ser utilizados como matérias-primas na transesterificação alcalina. Esse requerimento limita a utilização de matérias-primas de baixo custo, como os óleos residuais (SUAREZ et al., 2009; LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Nos processos de catálise ácida, a transesterificação é catalisada por um ácido forte, preferencialmente o ácido sulfônico ou sulfúrico. O rendimento obtido é muito elevado (99%), mas a reação é mais lenta quando comparada à catálise alcalina, sendo necessário o emprego de temperaturas elevadas (> 100°C) e tempos reacionais de 3 h para alcançar o referido rendimento (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

Entre os catalisadores potenciais para a produção de biodiesel, a reação de transesterificação catalisada por biocatalisadores (lipases) tem encontrado interesse atual, por se tratar de uma via eficiente, quanto à recuperação do produto, condições da reação e rendimento reacional. Em função das vantagens oferecidas, a via enzimática tem sido a mais empregada em trabalhos de pesquisa nos últimos anos. Isso é comprovado pelo número de artigos e patentes referentes ao uso de lipase na produção de biodiesel que, de acordo com estimativa recentemente publicada, supera numericamente a soma dos artigos e patentes referentes à obtenção desse combustível por todos os outros processos (QUINTELLA et al., 2009).

3.3.2. Transesterificação enzimática

A rota enzimática para a produção de biodiesel é atrativa devido às seguintes características das lipases (SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007; FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2009; PARAWIRA, 2009; ANTCZAK et al., 2009):

1. São biodegradáveis e atendem aos apelos atuais da Química Verde.
2. Apresentam maior compatibilidade com as variações de qualidade das matérias-primas, uma vez que toleram maiores teores de ácidos graxos livres e de água presentes no meio reacional.
3. São capazes de conduzir a produção do biodiesel em menor número de etapas e em condições reacionais brandas, levando à redução do consumo energético e da quantidade de água residual gerada no processo.
4. Possuem alta especificidade, conferindo maior facilidade de separação do produto e aumento da qualidade do glicerol.
5. Podem ser reutilizadas quando na forma imobilizada.
6. Podem ser empregadas na produção de biodiesel por processo contínuo.

Na produção de biodiesel catalisada por enzimas, especificamente lipases, algumas das desvantagens apresentadas pelo processo de transesterificação alcalina ou ácida podem ser eliminadas e, portanto, processos enzimáticos são uma promissora alternativa à rota química. Um esquema de um processo enzimático ideal para a produção de biodiesel é mostrado na Figura 3.5 (FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2009).

Figura 3.5. Desenho de um processo ideal para produção enzimática de biodiesel. (A) Reator; (B) Separação (centrífuga ou decantador); (C) Filtro; (D) Separação do glicerol e recuperação do álcool.

As lipases utilizadas nesses processos podem ser obtidas de diferentes fontes, porém as lipase microbianas são mais empregadas devido aos baixos custos de produção e à

possibilidade de modificação das propriedades (DE CASTRO et al., 2004). A síntese enzimática de biodiesel ocorre geralmente em temperaturas amenas, na faixa de 20 a 60 °C (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Após o final do processo, a fase inferior (glicerol) é simplesmente separada da fase superior (biocombustível) por simples decantação (no caso do metanol) e a desodorização e neutralização do produto final não é necessária (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Um pequeno excesso de álcool proporciona altos rendimentos na síntese do biodiesel e o biocatalisador pode ser usado várias vezes, especialmente na forma imobilizada. A transesterificação catalisada por lipases é aplicável aos óleos vegetais refinados e brutos contendo ácidos graxos livres, resíduos de gorduras de fritura, sebo e outros resíduos de gorduras, e a diversos alcoóis, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol. Além disso, não há a necessidade de o álcool usado ser anidro, pois uma mínima concentração de água no meio reacional pode ter um impacto positivo sobre a produtividade de biodiesel, uma vez que a camada de hidratação necessária à atividade enzimática é mantida (SALIS et al., 2008; DIZGE et al., 2009).

A concentração de AGLs no óleo pode ser muito maior do que na rota química catalisada por álcalis (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Gorduras contendo triglicerídeos e AGLs são facilmente convertidos em biodiesel porque a enzima catalisa as reações de transesterificação e esterificação (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

Para assegurar a viabilidade econômica desta rota, devem ser escolhidas apropriadas matérias-primas e preparações enzimáticas. O biocatalisador pode ser modificado para aumentar a sua estabilidade e reatividade. As demais etapas são seguidas pela seleção do solvente (opcional), otimização da razão molar óleo/álcool, temperatura, atividade de água, pH do microambiente da enzima e determinação da concentração máxima possível de glicerol para evitar a inibição da enzima (ANTCZAK et al., 2009).

Em sistemas isentos de solventes, o álcool pode ser adicionado em várias pequenas porções para manter a sua concentração em níveis mais baixos para evitar a inativação da enzima (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Esta estratégia é amplamente empregada quando se utiliza metanol como doador de grupo acila, o que não é observado para os outros tipos de alcoóis (LU et al., 2007; QIN et al., 2008; WINAYANUWATTIKUN et al., 2008; DIZGE et al., 2009). Porém, em meios isentos de solventes orgânicos, a adição de todo álcool requerido no início da reação é também utilizada (MOREIRA, 2007; PAULA et al., 2007). Reações de biotransformação catalisadas em meios

isentos de solventes são mais utilizadas em síntese de biodiesel, pois a elevada toxicidade, inflamabilidade e recuperação final do solvente são as suas principais desvantagens (MOREIRA et al., 2007).

Embora atualmente a rota enzimática não possa competir com a transesterificação química, todos os esforços de otimização das condições reacionais (solvente, temperatura, pH, fonte de enzima, entre outros), visando estabelecer as características operacionais para futuras aplicações industriais são de extrema importância devido à necessidade atual de processos industriais menos agressivos ambientalmente.

3.4. Qualidade do biodiesel

As propriedades dos ésteres graxos que constituem o biodiesel determinam as propriedades finais do combustível. Estas propriedades são determinadas pelas características estruturais das moléculas de ácidos graxos e do agente acilante (álcool) que geram o éster. Algumas das características estruturais que influenciam nas propriedades do biocombustível são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE et al., 2003). Sendo assim, para um bom funcionamento nos motores, é necessário analisar e conhecer as propriedades físicas e químicas do biodiesel. A padronização do biodiesel é estabelecida por normas, dentre as quais se destacam e são mais utilizadas: ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials - Estados Unidos), EN 14214 (European Norm - Europa) e ANP 255 (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - Brasil) (KNOTHE et al., 2006).

A análise destas características são fatores determinantes para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, sendo que as análises químicas e físicas são conduzidas por metodologias variadas, de modo a verificar a qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano, calor de combustão, viscosidade, ponto de névoa, ponto de fluidez, entre outras (KNOTHE et al., 2006).

No Brasil, por meio da Portaria 255 de 15/09/03, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabeleceu as especificações iniciais para o biodiesel puro a ser adicionado no óleo diesel automotivo para testes em frotas cativas ou para uso em processo industrial específico nos termos da Portaria 240 de 25/08/03. Posteriormente, a especificação definitiva para o biodiesel foi publicada na Portaria 42 (KNOTHE et al., 2006).

Em 2010 foi promulgada a resolução ANP nº 4, de 2 de fevereiro de 2010, que alterou o parágrafo único do art. 1º, o item 2.1 Métodos ABNT e a tabela do Regulamento Técnico

ANP nº 1/2008, todos dispositivos da Resolução ANP nº 7/08, que dispõe sobre a especificação do biodiesel. Em 2012 foi promulgada a resolução ANP nº 14, de 11 de maio de 2012, na qual está atualizado o Regulamento Técnico nº 4/2012 (ANEXO A) de acordo com a nova especificação do biodiesel (ANP, 2013).

A especificação brasileira é similar à europeia e americana, com alguma flexibilização para atender às características de matérias-primas nacionais, sendo que, para alguns itens, a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo de referência. Por outro lado, algumas propriedades são mais criteriosas, como a viscosidade (a mistura B20 deve atender à viscosidade especificada para diesel) e o índice de iodo (indicador de ligações duplas, ou seja, do nível de insaturação do biodiesel). Isso visa não criar obstáculos à utilização de algumas matérias-primas como a mamona (alta viscosidade) ou a soja e o girassol (alto teor de ácido linoleico, poli-insaturado e, portanto com alto índice de iodo).

Número de cetano: é um indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel. Esta propriedade é similar à octanagem, termo mais conhecido e usado para a gasolina e álcool. Um combustível com alta octanagem tende a ter baixo número de cetano; em outras palavras, a octanagem, por definição, indica a dificuldade de explosão, enquanto a cetanagem indica a facilidade dela. O combustível de referência de alta qualidade para determinar o número de cetano é o hexadecano ($C_{16}H_{34}$), um hidrocarboneto longo de cadeia linear. O número de cetano de um combustível diesel é determinado pelo tempo de retardamento da ignição, isto é, pelo tempo que se passa entre a injeção do combustível nos cilindros e a ocorrência da ignição. Valores fora de uma faixa adequada para combustíveis diesel ocasionam problemas no bom funcionamento do motor. Quando se usa combustíveis com alto número de cetano, a combustão pode ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados, resultando na emissão de fumaça e uma combustão incompleta. Valores de número de cetano muito baixos podem ocasionar trepidações no motor, falhas no funcionamento, aumento excessivo na temperatura do ar e aquecimento lento do motor na partida fria (1ª partida do dia) (KNOTHE et al., 2003; KNOTHE et al., 2006).

É importante ressaltar que nem sempre é possível realizar testes para determinar o número de cetano devido ao alto custo do combustível de referência e também por se tratar de uma análise que necessita de uma grande quantidade de amostra (o que dificulta pesquisas em nível laboratorial). Assim, alguns autores têm proposto métodos alternativos, visando estimar o número de cetano do biodiesel, a partir da mistura de ésteres alquílicos, tomando por base a utilização de equações empíricas (RAMOS et al., 2009). Sabe-se que o índice de

cetano do biodiesel depende da matéria-prima utilizada para a sua produção. Quanto maior as cadeias carbônicas de ácidos graxos e mais saturadas, maior será o número de cetano. É evidente que o número de cetano se encaixa de forma linear com o grau de insaturação. Portanto, existe uma faixa para o número de cetano de acordo com cada norma, que é recomendada para atender às especificações. Segundo a norma europeia, o número de cetano deve ser no mínimo 51. Portanto, matérias-primas com elevado grau de insaturação não são capazes de atender o padrão europeu para o índice de cetano. Índices de cetano baixos estão associados com os componentes altamente insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). De acordo com Knothe et al. (2003), números de cetano elevados foram encontrados para os ésteres de ácidos graxos saturados, tais como: ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), como é o caso do biodiesel de óleo de palma (matéria-prima rica nestes ácidos graxos). Resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores, que observaram um aumento do número de cetano com o aumento da percentagem de palmitato de metila em uma mistura (RAMOS et al., 2009).

A escala de cetano esclarece o porquê dos triglicerídeos encontrados nos óleos e gorduras serem adequados como alternativa ao diesel convencional. A cadeia longa, linear e não ramificada dos ácidos graxos, similar às existentes em *n*-alcanos dos combustíveis diesel tradicionais de boa qualidade, remetem a um alto número de cetano.

Índice de iodo: é uma medida da insaturação total dentro de uma mistura de ácidos graxos. É expressa em gramas de iodo que reagem com 100 g da respectiva amostra, refletindo na adição de iodo nas duplas ligações. O índice de iodo de um óleo vegetal ou gordura animal é quase idêntica à dos ésteres alquílicos correspondentes (KNOTHE, 2005). De acordo com a norma europeia (EN 14214), o índice de iodo é limitado a 120 g I₂/100g. Esse limite exigido pelos padrões europeus exclui o biodiesel de várias fontes promissoras, tais como: soja e girassol. Na Espanha, o Real Decreto 61/2006 exige a inclusão da norma europeia para biodiesel, com exceção do valor de índice de iodo, que muda de 120 para 140. De acordo com este Real Decreto Espanhol, todos os óleos vegetais apresentam limites satisfatórios para o índice de iodo. A limitação de ácidos graxos insaturados é necessária devido ao fato de que aquecimentos elevados desses ácidos graxos resultam em polimerização dos triglicerídeos. Isto pode levar à formação de depósitos ou à deterioração do lubrificante no motor. A correlação entre o índice de iodo e do grau de insaturação (GI) resulta em um aumento linear, conforme o esperado: quanto maior a insaturação presente no óleo, maior será o índice de iodo. Segundo a norma europeia, a quantidade máxima de ácido linolênico (C18:3) que deve conter a matéria-prima lipídica é 12,0%, visando atender às

especificações para o índice de iodo. Acima desse valor, a matéria-prima pode apresentar maior grau de insaturação e, conseqüentemente, ficar fora da faixa estabelecida pela norma. Por outro lado, óleo de palma, rico em ésteres de ácidos graxos saturados, tais como palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), apresenta índice de iodo inferior (RAMOS et al., 2009).

Estabilidade à oxidação: é outro parâmetro importante para determinar por quanto tempo as características do produto final serão preservadas sob condições de armazenagem, calor, umidade, presença de traços de metais e a natureza do tanque de armazenamento. As razões para auto-oxidação do biodiesel estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias de várias substâncias graxas. Estas reações de oxidação ocorrem em diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das duplas ligações (FREEDMAN; BAGBY, 1989). Estudos comprovaram que altas temperaturas, presença de metais, luz e ar facilitam o processo de oxidação, sendo a estrutura do ácido graxo o fator mais influente sobre a propriedade oxidativa do biodiesel.

Quanto maior o conteúdo de ésteres alquílicos poli-insaturados nas amostras de biodiesel, mais susceptível esta fica à oxidação (KNOTHE, 2005). Uma solução viável para a resistência do biodiesel contra a auto-oxidação é seu tratamento com inibidores de oxidação (antioxidantes). As posições das duplas ligações nos ácidos graxos linoleico e linolênico são mais susceptíveis à auto-oxidação. As taxas relativas de oxidação apresentadas na literatura são: 1 para oleato de metila, 41 para linoleato de metila e 98 para linolenato de metila (KNOTHE, 2005; KNOTHE et al., 2006). Assim, matérias-primas ricas nos ácidos linoleico e linolênico, tais como soja e girassol, tendem a apresentar baixa estabilidade à oxidação, enquanto que matérias-primas com baixo teor desses ácidos graxos, tais como palma, azeite e óleo de amêndoas, geralmente apresentam melhor estabilidade (RAMOS et al., 2009).

Para melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, alguns autores investigaram a influência de antioxidantes como o alfa-tocoferol, o butilato de hidroxianisole (BHA) e o butilato de hidroxitolueno (BHT). Os resultados obtidos revelaram que o biodiesel produzido a partir de diferentes tipos de matérias-primas apresentam diferentes níveis de estabilidade oxidativa. Reportaram, também, que a ação do antioxidante aumenta em função de sua concentração. Além disso, o local reservado para armazenagem do biodiesel é de crucial importância na manutenção das suas propriedades combustíveis por um maior período de tempo (TANG et al., 2008). Para a análise desta propriedade, existem vários métodos que remetem à qualidade do material. O índice de acidez apresenta uma boa alternativa para o

acompanhamento da qualidade do combustível durante a armazenagem. Este índice revela o grau de oxidação do material e é expresso em miligramas de hidróxido de potássio necessários para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de amostra. O índice de peróxido e o índice de iodo também estão relacionados com a estabilidade oxidativa do biodiesel.

Ponto de entupimento de filtro a frio: biocombustíveis destilados tipicamente são capazes de desenvolver problemas de operabilidade, tais como sedimentação de cera e entupimento de filtros e linhas de combustível, quando submetido a baixas temperaturas (-10 a -15 °C). Cada país pode especificar certos limites de temperatura para diferentes épocas do ano, dependendo das condições climáticas (KNOTHE et al., 2006). Os ésteres metílicos de ácido esteárico e palmítico são os primeiros a precipitar e causar entupimento; portanto, um biodiesel que apresenta quantidades elevadas desses constituintes são desfavoráveis para esta propriedade. O biodiesel de palma, por exemplo, rico nesses compostos, apresenta uma das mais elevadas temperaturas de PEF (ponto de entupimento de filtro a frio). O biodiesel de amendoim é rico em ésteres derivados de ácidos graxos saturados de cadeia longa como C22:0 e C24:0, o que resulta em valor ainda mais elevado de PEF (17°C), ou seja, abaixo dessa temperatura pode causar problemas de entupimento e obstrução no motor. Quanto maior as cadeias carbônicas presentes no biodiesel, pior as propriedades a baixas temperaturas. Neste sentido, o PEF das amostras de biodiesel está diretamente relacionado com a quantidade dos ésteres de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Os ésteres insaturados não estão incluídos neste parâmetro porque os pontos de fusão destes compostos são muito mais baixos em comparação aos dos saturados (RAMOS et al., 2009).

Viscosidade: pode ser definida como a resistência à vazão, associada à fricção ou atrito interno de uma parte do fluido que escoa sobre a outra, afetando com isso o funcionamento do motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência de ocasionar tais problemas. Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, o uso de óleos *in natura* como alternativa aos combustíveis foi relativamente abandonada, principalmente devido ao problema da alta viscosidade dos óleos. Estudos efetuados em diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas destes problemas foram atribuídas à polimerização dos triacilgliceróis por meio de suas duplas ligações, que conduzem à formação de depósitos, da mesma forma que baixa volatilidade e elevada viscosidade dos óleos vegetais geram problemas na atomização do combustível. Assim, surge o processo de

transesterificação, que reduz essa viscosidade, tornando o óleo ou gordura transesterificados uma alternativa viável para a utilização em motores do ciclo diesel (COSTA NETO; ROSSI, 2000; RAMOS et al., 2003; KNOTHE, 2005).

3.5. Lipases

As lipases são enzimas importantes na natureza, pois são responsáveis pelo metabolismo de lipídeos, além de catalisar reações hidrolíticas e de síntese (BAJAJ et al., 2010). Elas estão entre os biocatalisadores mais importantes utilizados em reações químicas, tanto em meio aquoso como não-aquoso, devido à sua habilidade de atuar sobre diversos substratos, sua alta estabilidade entre extremos de temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua químio, régio e enantioseletividade (SAXENA et al., 2003).

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) fazem parte da classe das hidrolases que atuam na cadeia éster carboxílica e não requerem nenhum cofator. A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triglicerídeos; entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases é capaz de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação, entre outras (FREIRE; CASTILHO, 2000). Essa versatilidade faz da lipase a enzima preferencial para aplicações em indústrias de alimento, detergentes, farmacêuticas, couro, têxtil, cosméticos e papel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A Tabela 3.3 resume suas principais aplicações industriais.

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas. As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento e por serem mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as de outras fontes. Estas enzimas não requerem cofatores, são regioespecíficas, atuam em larga faixa de pH e apresentam a capacidade única de atuar na interface óleo-água. (REIS et al., 2009; LOTTI; ALBERGHINA, 2007; SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007).

Dependendo de sua origem, as lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa e atuar numa ampla faixa de pH (4 - 9) e de temperatura (25 - 70°C) (DE CASTRO et al., 2004). Com relação à sua regioespecificidade, ou seja, a posição de quebra das ligações ésteres, as lipases têm sido divididas em três tipos de acordo com a Tabela 3.4 (ANTCKAZ et al., 2009).

Tabela 3.3. Aplicações industriais de lipases.

Setor	Aplicação
Óleos e gorduras	Modificação de óleos e gorduras
Polímeros	Produção de poliésteres biodegradáveis
Têxtil	Remoção de lubrificantes (fibras melhores para o tingimento)
Detergentes	Remoção de manchas de gorduras
Fármacos, agroquímicos	Resolução de misturas racêmicas
Processamento de alimentos	Melhora da qualidade de alimentos e modificação de aromas
Medicina	Ferramentas de diagnóstico, auxiliando a indicação da presença de infecções ou doenças
Cosméticos	Obtenção de produtos altamente puros
Processamento de chás	Melhoramento de aromas
Couro	Remoção de gorduras do couro
Tratamento de efluentes	Utilizada em lodo ativado para a remoção de camadas de gordura
Biodegradação de óleos	Tratamento de hidrocarbonetos e polímeros orgânicos
Polpa e papel	Eliminação de <i>pitch</i> , melhorando do processo de branqueamento
Combustível	Produção de biodiesel

Fonte: HASAN; SHAH; HAMEED, 2006.

Tabela 3.4. Classificação das lipases quanto à sua regioespecificidade.

Tipo	Característica
sn-1,3-específica	realiza a hidrólise das ligações ésteres nas posições R1 ou R3 do triacilglicerol
sn-2-específica	realiza a hidrólise da ligação éster na posição R2 do triacilglicerol
não específica	não distingue a posição das ligações ésteres para realizar a clivagem

As lipases estão entre as enzimas mais atrativas e promissoras para aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e oleoquímicas. No entanto, a aplicação industrial destas é limitada pelo alto custo e pela estabilidade nas condições reacionais. A fim de minimizar esses inconvenientes e aumentar a vida útil do biocatalisador, são empregadas algumas técnicas, como a modificação química da enzima, a imobilização enzimática e a engenharia proteica e genética (MACARIO et al., 2009).

Nas reações de transesterificação de óleos e gorduras, as lipases são empregadas preferencialmente na forma imobilizada, pois permitem a reutilização do biocatalisador e reduz o efeito de inativação da enzima na presença de alcoóis de cadeia curta, o que pode baratear o processo. Neste caso, a produção de biocatalisadores na forma imobilizada com elevada atividade catalítica e estabilidade térmica podem tornar o processo enzimático viável técnica e economicamente em comparação aos processos químicos.

3.6. Técnicas de imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem seu contato com o substrato no meio de reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio. Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte (DE CASTRO et al., 2008).

A tecnologia de imobilização enzimática envolve basicamente a escolha do suporte e do método de imobilização. Um bom suporte deve ser resistente à contaminação, ter boa resistência mecânica, ser estável termicamente e estar disponível comercialmente por um custo razoável (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

Além disso, muitas vezes o processo de imobilização pode alterar as propriedades enzimáticas, produzindo biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um catalisador enzimático imobilizado variam de acordo com a aplicação, sendo que em alguns casos o custo da imobilização pode ser compensado pela longa vida do biocatalisador. As principais vantagens e desvantagens no uso de enzimas imobilizadas encontram-se descritas na Tabela 3.5.

Diversos procedimentos para a imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos, objetivando-se a redução da perda de atividade biocatalítica durante o processo de imobilização e, conseqüentemente, a diminuição do custo extra da imobilização pelo uso mais efetivo da atividade catalítica retida na matriz de imobilização. Para minimizar essas desvantagens, torna-se necessário um conhecimento integrado dos seguintes parâmetros (DE CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009):

1. Propriedades do suporte (porosidade, natureza química, hidrofobicidade, estabilidade química e mecânica, carga da superfície, tamanho da partícula);
2. Natureza da enzima (tamanho da molécula, flexibilidade conformacional necessária à catálise, ponto isoeletrico, presença de regiões hidrofóbicas ou hidrofílicas, densidade de carga na superfície, estabilidade nas condições de imobilização);
3. Fatores específicos relativos ao sistema (meio reacional, limitações difusionais, inibição enzimática, precipitação de produtos, viscosidade da mistura, termodinâmica reacional).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas estas enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte numa enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (ZANIN; MORAES, 2004).

Tabela 3.5. Vantagens e desvantagens no uso de enzimas imobilizadas.

Vantagens	Desvantagens
Desenvolvimento de sistemas contínuos	Custo adicional de suportes, reagentes e da etapa de imobilização
Maior estabilidade enzimática a pH e temperatura	Perdas de atividade durante a imobilização
Uso mais eficiente do catalisador por meio de reutilizações	Possíveis exigências adicionais de purificação do catalisador
Flexibilidade no projeto de reatores	Técnica pouco adequada a substratos insolúveis ou de alto peso molecular
Efluentes livres de catalisadores	Maiores riscos de contaminação na operação contínua de reatores
Maior versatilidade na etapa de separação	Restrições difusionais e impedimento estérico
Menor custo de mão-de-obra	
Facilidade de automação e controle	

Fonte: COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008.

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos utilizados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. Na Tabela 3.6 é apresentado um resumo das restrições de cada método de imobilização que serve como orientação para a sua seleção (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009). Além desses métodos básicos de imobilização, a literatura contém numerosas combinações e modificações de métodos. A meta principal na combinação de métodos é explorar as vantagens que cada um oferece. Na maioria das vezes, o objetivo é a produção de enzimas imobilizadas com as maiores atividades específicas e estabilidades operacionais possíveis.

Quando a imobilização da enzima envolve uma reação química (ligação cruzada e ligação covalente), as condições de imobilização devem ser suaves para evitar a inativação da enzima durante a reação química com o suporte. Porém, se a imobilização com ligação química for bem sucedida, obtém-se uma enzima imobilizada com alta estabilidade devido à forte ligação resultante. A ligação cruzada intermolecular, geralmente, não é adequada para aplicações industriais, devido à baixa estabilidade mecânica, enquanto que a enzima ligada covalentemente em suportes orgânicos raramente pode ser regenerada e, portanto, é pouco atrativa para uso em grande escala (GUISAN, 2006).

Vários trabalhos são encontrados na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso ou não-aquoso (SCHMID et al., 2002; PEREZ et al., 2007; MENDES et al., 2007; PAULA; URIOSTE; SANTOS, 2005; FREITAS et al., 2009; SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007; MOREIRA et al., 2007; FRANCISCO; GOUCH; DEY, 2007; PAULA et al., 2009; ANTCZAK et al., 2009). Entretanto, as mais recentes tecnologias de imobilização de enzimas requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos (orgânico-inorgânico) constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. Independentemente da estratégia utilizada para preparar uma matriz híbrida, o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado. (REETZ, 2006; JOSÉ; PRADO, 2005; PAULA et al., 2008; SMITHA et al., 2008; XIE; YU; SHI, 2009; SHCHIPUNOV, 2003; INGERSOLL; BRIGHT, 1997).

Tabela 3.6. Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
<p>Adsorção</p>	Baixo custo; Simples; Não ocorre modificação química da enzima; Possível regeneração do suporte.	Imobilização superficial; Dessorção da enzima.
<p>Ligação covalente</p>	Não é afetado pelo pH, força iônica do meio ou concentração do substrato	Não é possível regenerar o suporte; Custo elevado.
<p>Encapsulação</p>	Não ocorre modificação química da enzima.	Limitação de difusão; Não é efetiva para substratos de alta massa molar; Susceptível à inativação da enzima; Perda contínua de atividade devido ao tamanho dos poros.
<p>Ligação Cruzada</p>	Enzimas fortemente ligadas, portanto de difícil perda	Perda de atividade enzimática durante a preparação; Baixa resistência mecânica e Alto custo.

Fonte: DE CASTRO et al., 2008.

3.6.1. Suportes para imobilização de enzimas visando à produção de biodiesel

A lipase mais comumente utilizada é a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), fisicamente adsorvida em resina de metil-metacrilato (Lewatit VP OC 1600), também conhecida comercialmente como Novozym[®] 435. Este biocatalisador, desenvolvido pela Novozymes, Dinamarca, apresenta aplicações em inúmeros processos industriais, tais como na síntese de compostos oticamente ativos na indústria farmacêutica, na síntese de polímeros, na síntese de ésteres utilizados na indústria de aromas ou na produção de FAEE (ésteres etílicos de ácidos graxos) para a indústria de biodiesel (SÉVERAC et al., 2011). A enzima tem sido desenvolvida para a síntese de produtos de alto valor agregado, em que o elevado custo do catalisador tem um impacto pequeno sobre a relação custo-benefício.

Entretanto, em muitas aplicações, o alto custo da lipase representa a primeira limitação, especialmente na indústria de biodiesel em que a baixa estabilidade deste biocatalisador devido à presença de metanol (SHIMADA et al., 2002) ou adsorção do glicerol formado como subproduto tem sido relatada (OGNJANOVIC; BEZBRADICA; KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009).

O desenvolvimento de enzimas imobilizadas com custos menores permitiria que novos processos pudessem ser realizados mediante a utilização destes biocatalisadores. Outra forma de diminuir o custo pelo uso da enzima seria aumentar a estabilidade operacional do biocatalisador, que é fundamental para sua aplicabilidade industrial, pois influencia diretamente o custo da enzima por quilograma de produto (SLOTTEMA et al., 2003).

A utilização de lipase imobilizada em reatores contínuos reduz significativamente a incidência do custo adicional do catalisador no produto. Reatores tubulares de leito fixo (PBRs), por exemplo, apresentam melhor desempenho do que reatores de tanque agitado, além de evitarem o atrito do suporte enzimático (ROYON et al., 2007; CHANG et al., 2007). No entanto, para desenvolver um processo economicamente relevante, a estabilidade operacional da enzima deve manter-se muito elevada por várias semanas ou mesmo meses, sem perda significativa de atividade. Neste campo da catálise heterogênea, o ponto crucial está relacionado com a capacidade de se controlar a partição dos compostos polares produzidos (água/glicerol) entre o meio reacional e o suporte enzimático (OGNJANOVIC; BEZBRADICA; KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009; DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999). A adsorção destes compostos polares no suporte enzimático leva a um impedimento hidrofílico em torno da enzima, resultando em limitações difusionais dos substratos hidrofóbicos com relação à migração destes da fase líquida para o sítio ativo da enzima. Como demonstrado por Marty, Dossat e Condoret (1997), a adsorção de água ou de glicerol tem um efeito extremamente negativo no que diz respeito à atividade da enzima, na esterificação ou em reações de transesterificação. A partição dos reagentes depende tanto da polaridade do meio reacional como do suporte enzimático. Um solvente com moderada polaridade, tal como o 2-metil-2-butanol ou o terc-butanol, é capaz de solubilizar eficientemente todos os reagentes (SLOTTEMA et al., 2003). Por outro lado, a polaridade do suporte enzimático tem de ser escolhida de modo a evitar a adsorção de compostos hidrofílicos. Bastida et al. (1998) sugeriram que suportes hidrofóbicos imitam a interface criada pelos substratos naturais das lipases, fixando a forma aberta destas enzimas. Isso conduz, em geral, para uma hiperativação da lipase. Portanto, todas essas questões devem ser analisadas na escolha de

um suporte de imobilização da lipase, a fim de que o impacto econômico da utilização de enzimas no processo seja o menor possível, o que seria obtido pela obtenção de um biocatalisador de baixo custo relativo, alta estabilidade operacional e elevada atividade de síntese.

3.6.2. Suporte híbrido de SiO₂-PVA

Em estudos desenvolvidos no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL-USP), foi testada com sucesso uma matriz híbrida, obtida pela técnica sol-gel, a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA). O suporte resultante, polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA), é um composto que combina atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (BRUNO et al., 2005).

O processo de sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois refere-se a qualquer rota de síntese de materiais em que, num determinado momento, ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O termo sol é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo gel pode ser compreendido como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios (ALFAYA; KUBOTA, 2002). A reação de polimerização sol-gel para a formação da matriz de SiO₂-PVA pode ser dividida em três etapas como mostra a Figura 3.6 (SANTOS et al., 2008b).

A forte interação entre a enzima e o suporte pode ocasionar perda da atividade enzimática causada por modificações na estrutura cataliticamente ativa. Somente poucos suportes contêm grupos reativos para interação direta com as enzimas; a maior parte deles possui grupos hidroxil, amino, amido ou carboxil, os quais requerem uma etapa de ativação antecedente à de imobilização (KENNEDY; MELO; JUMEL, 1990).

De fato, além do suporte, as diferentes estratégias empregadas durante o processo de imobilização da enzima podem resultar em melhoria das propriedades do biocatalisador obtido. Agentes de ativação do suporte, por exemplo, podem resultar em maior estabilidade.

Os agentes de ativação são compostos que alteram a afinidade da enzima pelo suporte, modificando, assim, as características do derivado imobilizado obtido. Quando convenientemente escolhidos e empregados, resultam em sistemas mais estáveis frente às condições reacionais e operacionais. Além disso, podem interferir também em propriedades físicas do suporte, como diâmetro da partícula, tamanho e volume de poro (SANTOS et al., 2008a; DE CASTRO et al., 2008).

Dos muitos agentes de ativação para matrizes de imobilização de proteínas disponíveis comercialmente, o glutaraldeído (GA) é sem dúvida o reagente mais usado em várias aplicações, fornecendo geralmente elevados rendimentos na imobilização de enzimas em suportes sólidos (WALT; AGAYN, 1994). Podem ser mencionados ainda outros agentes, como glicidol e epícloridrina (GUISAN, 1988; SANTOS et al., 2008b).

A Figura 3.7 mostra as reações envolvidas no processo de ativação e imobilização da enzima no suporte ativado, usando a matriz de SiO₂-PVA como suporte e epícloridrina como agente de ativação (SANTOS et al., 2008b).

Figura 3.7. Mecanismo de ativação de SiO₂-PVA e imobilização enzimática usando epícloridrina.

A matriz híbrida de SiO₂-PVA ativada tem sido utilizada na imobilização por ligação covalente de diferentes fontes de lipases, incluindo: pancreática (PAULA; BARBOZA; CASTRO, 2005), *Mucor miehei* (BRUNO et al., 2005), *Pseudomonas fluorescens* (SANTOS et al., 2008b), *Candida rugosa* (PAULA et al., 2008), *Burkholderia cepacia* (FREITAS et al., 2009), *Rhizopus oryzae* (PAULA et al., 2010) e *Penicillium camembertii* (FREITAS et al., 2010). A versatilidade dos suportes híbridos obtidos pela técnica sol-gel é uma característica importante destes sistemas, uma vez que podem ser modificados de diferentes formas, conforme a aplicação desejada.

3.7. Biorreatores com lipases imobilizadas

Entre todas as possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante e o emprego desses biocatalisadores em processos industriais tem sido realizado em diferentes configurações de reatores. Nesse sentido, o reator ou biorreator, pode ser definido como equipamento no qual as enzimas imobilizadas são colocadas em contato com a solução de substrato. Embora haja uma grande variedade de biorreatores, os mesmos princípios básicos são aplicados em todos os casos (KENNEDY; CABRAL, 1983; KENNEDY; ROIG, 1995; ZANIN; MORAES, 2004).

Diversos são os tipos de reatores que têm sido relatados para uso com enzimas imobilizadas. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de prever qual o melhor biorreator para um dado processo. A seleção do reator mais apropriado para um determinado bioprocessamento depende das características da bioconversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Os biorreatores podem ser classificados em reatores para sistemas particulados, reatores tipo placas e reatores lineares, podendo operar em modo batelada ou contínuo. Os reatores para sistemas particulados compreendem os tipos (Figura 3.8): tanque agitado em batelada (BSTR), tanque agitado contínuo (CSTR), membrana (MR), leito fixo (PBR) e leito fluidizado (FBR) (ZANIN; MORAES, 2004).

No reator de tanque agitado (STR), as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato, sendo a agitação promovida por agitadores mecânicos ou por agitadores orbitais. Nos reatores de leito fixo e fluidizado, o biocatalisador é mantido no interior do reator enquanto o fluido é passado através do leito. Estes são os tipos de reatores preferidos para as aplicações em larga escala.

Biorreatores de tanque agitado têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases. Estes sistemas apresentam, entretanto, algumas desvantagens para uso em escala industrial, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e são susceptíveis à quebra devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (ZANIN; MORAES, 2004; WATANABE et al., 2004; SANTOS et al., 2003).

Figura 3.8. Alguns modelos de reatores enzimáticos: reator agitado batelada, reator agitado contínuo, reator de membrana, reator de leito fixo e reator de leito fluidizado.

Deve-se destacar, também, que os reatores de tanque agitado (STR) podem ser operados em modo contínuo (CSTR) ou em batelada (BSTR), apresentando, este último, a desvantagem da imposição de tempos mortos de operação, relativos à carga, descarga e limpeza do sistema (BALCÃO et al., 1996; ZANIN; MOARES, 2004).

Uma opção que poderia ser usada em processos em escala industrial seria o biorreator de leito empacotado. Embora em escala de laboratório os reatores STR sejam bastante comuns, o leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação. Ele requer um mínimo de equipamentos auxiliares e é muito eficiente. Neste caso, as tensões de cisalhamento impostas ao sistema imobilizado seriam menores e, segundo Zanin (1989), um reator ideal deste tipo operaria, ao contrário do STR, como um reator tubular. Isto, mesmo em reatores não ideais, resulta em altas taxas de conversão no reator. Estes reatores apresentam ainda baixo custo e facilidade de construção,

manutenção e operação (BALCÃO et al., 1996). Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e fluxos de calor e massa ineficientes (ZANIN; MORAES, 2004).

Outra opção que permitiria melhorar as características de mistura do sistema quando comparado ao leito fixo, evitando a formação de caminhos preferenciais, é o reator de leito fluidizado. Sob o aspecto hidrodinâmico, este biorreator é um intermediário entre a mistura completa do CSTR ideal e o reator tubular do leito fixo ideal (BALCÃO et al., 1996). Conforme se aumenta a velocidade ascendente do fluido reacional, atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito torna-se equivalente ao peso deste por unidade de superfície, fazendo com que as partículas percam o contato entre si e movimentem-se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização), acima do qual as partículas são arrastadas para fora do reator (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996). Na Tabela 3.7 são apresentadas, resumidamente, as características de alguns tipos de reatores enzimáticos para processos contínuos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Tabela 3.7. Tipos de reatores enzimáticos contínuos e suas características.

Tipo de reator	Regime de fluxo	Eficiência de conversão	Razão enzima/volume do reator	Controle de parâmetros	Características hidro-dinâmicas	Custo
Tanque Agitado Contínuo	Mistura perfeita	Menor que em coluna*	Baixa	Fácil	Boas	Baixo
Coluna Empacotada	Pistão	Maior que em tanque agitado*	Alta	Difícil	Regular (problemas de compactação e caminhos preferenciais)	Médio
Reator Contínuo de Ultrafiltração	Mistura perfeita	Menor que em coluna*	Média	Fácil	Regular (problemas de concentração na membrana)	Alto
Reator de Leito Fluidizado	Intermediário	Intermediário entre o tanque agitado e a coluna	Média	Tipo de reator	Boas	Alto
Módulo Fibrilar	Pistão	Maior que em tanque agitado*	Alta	Difícil	Regular (problemas de concentração na membrana)	Alto

* Exceto para casos de inibição

A Tabela 3.8 contém alguns exemplos de processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzidos em regime contínuo. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura empregando reator de leito fluidizado, tendo sido relatado neste trabalho, no entanto, baixo rendimento em ésteres (3%).

Tabela 3.8. Processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzidos em regime contínuo.

Lipase	Óleo	Doador de grupo acila	Meio	Tipo de reator	Referência
Novozym® 435	Óleo residual	Metanol	Isento de solventes	Leito fixo	Shimada; Watanabe; Sugihara (2002)
<i>Burkholderia cepacia</i> (IM-BS-30)	Óleo residual	Etanol	Isento de solventes	Leito fixo	Hsu; Jones; Foglia (2004).
<i>Candida</i> sp. 99-125 imobilizada em membrana de algodão	Óleo vegetal Óleo residual	Metanol	Éter de petróleo/ Água	Leito fixo	Nie; Xie; Wang (2006)
Novozym® 435	Óleo de semente de algodão	Metanol	<i>t</i> -butanol	Leito fixo	Royon et al. (2007)
Novozym® 435	Óleo de soja	Metanol	<i>n</i> -hexano <i>t</i> -butanol	Leito fixo	Shaw; Chang; Lin (2008)
Novozym® 435	Óleo de palma residual	Metanol	<i>t</i> -butanol	Leito fixo	Halim; Kamaruddin; Fernando (2009)
Lipozyme®	Óleo de casca de oliva	Etanol	Isento de solventes	Leito fluidizado	Ricca et al. (2009)

3.7.1. Reatores de leito fluidizado

Um reator de leito fluidizado (FBR) é um tipo de reator que pode ser empregado para executar uma variedade de reações químicas multifásicas. Neste tipo de reator, um fluido (gás ou líquido) é passado através de um material sólido granulado (geralmente um catalisador, possivelmente em forma de minúsculas esferas) com velocidade suficiente para suspender o material sólido e fazer com que ele se comporte como se fosse um fluido. Esse processo, conhecido como fluidização, oferece muitas vantagens importantes.

Em menores velocidades, os sólidos permanecem no local enquanto o fluido passa através dos espaços vazios no material. Isso é conhecido como um leito fixo do reator. Quando a velocidade do fluido é aumentada, o reator atingirá um estágio em que força do fluido sobre os sólidos é suficientemente grande para equilibrar o peso do material sólido. Esta etapa é conhecida como fluidização incipiente e ocorre na velocidade de mínima fluidização. Uma vez que esta velocidade mínima é ultrapassada, o conteúdo do seu leito começa a se expandir e a comportar-se como um tanque agitado com água fervente. O reator, então, torna-se um reator de leito fluidizado e, dependendo das condições operacionais e das propriedades de fase sólida, variados regimes de fluxo podem ser observados neste equipamento.

Leitos fluidizados têm sido usados em processos químicos há muitos anos e mais recentemente têm sido aplicados em bioprocessos empregando enzimas ou células imobilizadas em suportes sólidos. A base da fluidização é o equilíbrio de forças que existem quando um fluido atravessa um leito de partículas, criando uma força de arraste oposta à força gravitacional. Na maioria dos casos, há uma diferença de densidade positiva entre o sólido e as fases líquidas, e a fluidização é conseguida pela ascensão do fluido através do leito. Se as partículas são magneticamente susceptíveis e um campo magnético é aplicado no leito, então é possível aproveitar esta força adicional para se conseguir um maior grau de liberdade no controle da fluidização. Tais leitos são denominados como sendo magneticamente estabilizados (WEBB et al., 1996).

Reatores de leito fluidizado magneticamente estabilizados (MSFBR) oferecem um número de potenciais vantagens sobre o reator de leito fluidizado convencional, tais como a possibilidade de operação com taxas de fluxo maiores e também em contracorrente (TERRANOVA; BURNS, 1991; WEBB et al., 1996; LIU; WANG; OU-YANG, 2009). Se um campo magnético é aplicado em um reator de leito fluidizado formado por partículas magnéticas, estas serão afetadas pelo campo e as propriedades hidrodinâmicas do leito mudarão de acordo com a intensidade do campo magnético e as propriedades da partícula.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Catalisador

Os experimentos foram realizados empregando a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) manufaturada pela Amano Pharmaceuticals (Nagoya-Japão), adquirida na forma solúvel e posteriormente imobilizada em suporte de SiO₂-PVA, e a lipase de *Candida antarctica* manufaturada pela Novozymes na forma imobilizada em suporte acrílico (Novozym[®] 435) adquirida da Sigma-Aldrich. Algumas informações referentes a Novozym[®] 435 e à lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA encontram-se nos ANEXOS B e C, respectivamente.

4.1.2. Reagentes utilizados na síntese de biodiesel

Nas reações de transesterificação para produção de biodiesel, como matéria-prima lipídica foi utilizado óleo de babaçu adquirido do Mundo dos Óleos (São Paulo – SP) e como agente acilante utilizou-se etanol anidro (99%, Cromoline). A composição mássica em ácidos graxos do óleo de babaçu é mostrada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição em ácidos graxos do óleo de babaçu.

Símbolo	Nome	% em massa
C8:0	Ácido octanoico	3,18
C10:0	Ácido cáprico	3,21
C12:0	Ácido láurico	45,35
C14:0	Ácido mirístico	15,14
C16:0	Ácido palmítico	8,37
C18:0	Ácido esteárico	2,39
C18:1	Ácido oleico	16,35
C18:2	Ácido linoleico	4,94

4.1.3. Sistema reacional

Para a construção do sistema reacional de leito fluidizado para a produção do biodiesel, foram adquiridos colunas de vidro, bombas peristálticas, placa de agitação, tubulações de silicone e marprene®, banho termostatzado e aquecedor. As especificações dos equipamentos utilizados estão descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fluidizado.

Equipamento	Descrição	Origem
Bombas peristálticas	Pump SJ-1211	Atto
	Sci-Q 400	Watson Marlow
Banho termostatzado	Modelo Te 2005	Tecnal
Reatores de vidro de coluna encamisado	Diâmetro= 14 mm Altura = 210 mm Volume = 32 mL	Construídos em oficina especializada
	Diâmetro= 12 mm Altura = 375 mm Volume = 42 mL	
Agitador magnético	Modelo 752 A	Fisatom
Aquecedor	Modelo A-03 (2000W)	Mondial

4.1.4. Outros materiais e equipamentos

O suporte foi preparado pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (98%, Sigma-Aldrich), álcool polivinílico (88%, Acros Organics), álcool etílico (95%, Reagen) e ácido clorídrico (mín. 36%, Isofar). Lewatit® GF202, uma resina macroporosa de troca iônica, foi utilizada para remoção de glicerol formado durante a produção de biodiesel (ANEXO D). Um corante lipossolúvel azul (pigmento orgânico sintético manufaturado por Glitter Ind. Com. Imp. Exp. Ltd., Carapicuíba – SP) foi adquirido em mercado local e usado como traçador. As outras substâncias utilizadas foram: hexano (Cromoline), polietilenoglicol (MM 1500, Synth), goma arábica em pó pura (Synth), epiclorigrina (99%, Sigma-Aldrich), fosfato de sódio bibásico (mín. 99%, Montedison Farm., fosfato de sódio monobásico anidro (mín. 99%,

Synth), hidróxido de sódio (mín. 97%, Isofar), hidróxido de potássio (mín. 85%, Cromoline), acetona (mín. 99,5%, Cinética) e iso-octano (99,0%, Synth). Azeite de oliva com baixa acidez (Carbonel, adquirido em mercado local) e butirato de metila (99%, Sigma-Aldrich) foram utilizados para determinação da atividade hidrolítica. Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

Outros equipamentos utilizados no decorrer das atividades experimentais estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Equipamentos utilizados nas atividades experimentais.

Equipamento	Especificação
Balança analítica	Modelo ID 50, Marte [®]
Balança analítica acoplada com IV	Modelo ID 50, Marte [®]
Banho de ultrassom	Unique
Banho Maria Dudnoff	Marconi
Bomba de vácuo	Modelo RV3, BOC Edwards
Bureta digital	Modelo G4094, Digrat
Centrífuga	Modelo 206 BL, Excelsa [®] II
Cromatógrafo de fase gasosa	Modelo GC-3800, Varian
Densímetro digital	Modelo DMA 35N EX, Anton Paar
Espectrofotômetro UV-Visível	Modelo Cary 50 Conc, Varian
Cromatógrafo de fase líquida (CLAE)	Modelo Agilent 1200, Agilent Technologies
Estufa de secagem e esterilização	Modelo TE-393/2, Tecnal
Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal
Rotaevaporador	Modelo 801, Fisatom
Viscosímetro	Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Síntese do suporte híbrido de SiO₂-PVA e imobilização da lipase por ligação covalente

O composto híbrido constituído de polissiloxano e álcool polivinílico (PVA) foi sintetizado pela mistura de 50,0 mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 50,0 mL de etanol 95% e 60,0 mL de solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v) em água destilada. Essa mistura foi aquecida a 60 °C, sob agitação, com adição 1,00 mL de HCl concentrado (PAULA et al, 2009). Após um período de 40 minutos, a preparação foi mantida a 25 °C por 48 h até a completa solidificação. O composto foi triturado e classificado em peneiras de análises granulométricas (Bronzinox), sendo recolhida a porção retida entre as peneiras de 42 e 60 mesh. O suporte triturado e classificado foi embebido no agente de ativação, uma solução de epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L e pH 7,5), na proporção de 1 g de suporte para 10 mL de solução. Após homogeneização, a mistura foi mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente e em seguida submetida à filtração a vácuo em um funil de Buchner revestido com papel de filtro (diâmetro 28 µm) para retirar o excesso de umidade. Durante a filtração, o suporte foi lavado repetidas vezes com água destilada e solução-tampão de fosfato de sódio, e em seguida levado à estufa (60 °C) por 24 h.

O suporte ativado obtido foi embebido em hexano numa relação sólido (g): líquido (mL) de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase PS na sua forma livre, empregando como agente estabilizante da enzima 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL polietilenoglicol (MM 1500).

As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob agitação a 30 °C por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos derivados imobilizados para valores próximos a 10%.

4.2.2. Síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado

As reações de transesterificação para a síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado foram conduzidas num aparato experimental apresentado no esquema da Figura 4.1. Como catalisador, foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* (PS) imobilizada em matriz híbrida de polissiloxano e álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) preparada pela técnica sol-gel e também a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em suporte acrílico (Novozym[®] 435). Como reator, foram usadas duas colunas de vidro encamisadas: uma com 32 mL de capacidade nos dois primeiros experimentos com lipase imobilizada em SiO_2 -PVA e outra com 42 mL nos três experimentos seguintes com SiO_2 -PVA e em todos os ensaios com Novozym[®] 435.

Figura 4.1. Sistema reacional utilizado nos experimentos de produção de biodiesel em reator de leito fluidizado (1 – reator de leito fluidizado; 2 – tanque de alimentação; 3 – tanque de recirculação; 4 – tanque de coleta de produto; 5 e 6 – bombas peristálticas; 7 e 8 – condensadores de refluxo; 9 – aquecedor; 10 – banho termostático).

Para a montagem do reator, foi colocada uma tela metálica na parte inferior da coluna e/ou discos de espuma para diminuir a perda de lipase imobilizada e, em seguida, esferas metálicas para permitir uma ascensão mais homogênea e distribuída do meio reacional através do reator (difusor), conforme ilustra a Figura 4.2.

Figura 4.2. Detalhes do reator utilizado nos experimentos: a tela metálica é utilizada para evitar perda de enzima imobilizada e as esferas metálicas/discos de espumas funcionam como difusor.

O meio reacional consistiu na mistura de óleo de babaçu e etanol em proporções molares que variaram de 1:5 a 1:12. A temperatura nos tanques e reator encamisados foi mantida a 50 °C por meio de um banho termostatizado. A vazão da bomba 1 (alimentação com reagentes e coleta de produtos) e da bomba 2 (recirculação) foi ajustada para valores adequados a cada experimento. Os tanques de alimentação e recirculação operaram sob agitação magnética e toda a vizinhança do sistema foi mantida a 40 °C por meio de um aquecedor. Em todos experimentos com Novozym® 435 e no último empregando lipase imobilizada em SiO₂-PVA, foi utilizada uma coluna empacotada contendo a resina de troca catiônica Lewatit® GF202, situada entre a saída do reator (1) e o tanque de recirculação (3) para remoção de glicerol (Figura 4.1).

O sistema foi operado continuamente por períodos que variaram de 8 a 29 dias com reabastecimento diário do tanque de alimentação com meio reacional, e os ésteres de etila coletados no tanque de produtos foram quantificados por cromatografia de fase gasosa (GC Varian 3800) de acordo com metodologia previamente estabelecida (URIESTE et al., 2008).

4.2.3. Purificação do biodiesel obtidos nos experimentos

Para a separação da glicerina formada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a lavagens sucessivas com água destilada. Em cada lavagem, foi utilizado aproximadamente o mesmo volume de água em relação ao volume de amostra. A mistura foi transferida para um funil de decantação, agitada e deixada em repouso por pelo menos 30 min para a separação das fases.

A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior, por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à centrifugação (1569g /15 min) e posteriormente à evaporação em rota-evaporador (70 °C por 30 min) para a retirada de traços de etanol e água remanescentes. Para finalizar a etapa de secagem, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro e o biodiesel foi armazenado em frascos de vidro para as análises posteriores. Nos experimentos em que foi utilizada a resina Lewatit® GF202 para remoção de glicerol, as amostras não passaram pelos procedimentos iniciais descritos neste item, sendo levadas diretamente à evaporação em rota-evaporador após serem coletadas.

4.2.4. Ativação e regeneração da resina Lewatit® GF 202

A resina de troca iônica foi ativada por lavagem com metanol e, então, secada à temperatura ambiente. Cada litro de resina é capaz de absorver até 250 g de glicerol e sua regeneração é realizada com metanol de acordo com informações fornecidas pela Lenntech (ANEXO D) e que se encontram disponíveis em sua página na internet (<http://www.lenntech.com/Data-sheets/Lewatit-GF-202-L.pdf>).

4.2.5. Caracterização hidrodinâmica do reator

4.2.5.1. Velocidade mínima de fluidização

Os ensaios de expansão do leito em função da vazão ascendente de fluido foram conduzidos para a determinação da velocidade mínima de fluidização com quantidades variadas de ambos os catalisadores. O teste foi conduzido colocando-se certa quantidade de enzima imobilizada no reator e medindo-se a altura do leito em função da vazão utilizada,

que foi gradativamente aumentada. Em cada vazão, esperava-se cinco minutos para garantir completa estabilização do leito e, após, media-se sua altura.

Para cada nível de massa de enzima imobilizada, foi calculado o tempo espacial (τ) para as diferentes condições de vazão (Q) de acordo com as Equações 4.1 e 4.2.

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad (4.1)$$

$$V_{\text{útil}} = \pi R^2 \cdot h - \frac{m}{\rho} \quad (4.2)$$

Em que:

R = raio do reator (cm); h = altura do leito (cm); m = massa de enzima imobilizada (g); ρ = massa específica da enzima imobilizada (g/cm³).

A porosidade (ε) do leito foi calculada pela Equação 4.3.

$$\varepsilon = \frac{(Vt - Vs)}{Vt} = 1 - \frac{Ms}{\rho_s \cdot A \cdot h} \quad (4.3)$$

Em que:

ε = porosidade do leito; h = altura do leito de partículas (cm); A = área da seção transversal do reator (cm²); Vt = volume total do reator ($Vt = A \cdot h$) (cm³); Vs = volume ocupado pelas partículas (cm³); ρ_s = densidade do sólido (g/cm³); Ms = massa de sólido (g).

Utilizando as Equações 4.4 e 4.5, propostas por Richardson e Zaki (1954) e obtidas para a expansão de leitos com partículas esféricas de diâmetro uniforme, foi calculada a velocidade mínima de fluidização.

$$\frac{u}{u_{tc}} = \varepsilon^n \quad (4.4)$$

$$\log u_{tc} = \log u_t - \frac{d_p}{d_i} \quad (4.5)$$

Em que:

u = velocidade superficial do fluido ($u = Q/A$); u_{tc} = velocidade terminal da partícula corrigida pelo efeito da parede da coluna; n = coeficiente de expansão; u_t = velocidade terminal da partícula; d_i = diâmetro interno do reator; d_p = diâmetro da partícula sólida.

A linearização da equação 4.4 fornece a seguinte relação expressa pela Equação 4.6:

$$\ln(u) = n \cdot \ln(\varepsilon) + \ln(u_{tc}) \quad (4.6)$$

Desta forma, construindo-se gráficos de $\ln(u)$ versus $\ln(\varepsilon)$, os coeficientes angular e linear da reta obtida corresponderão, respectivamente, ao coeficiente de expansão, n , e ao logaritmo neperiano da velocidade terminal da partícula corrigida, u_{tc} .

4.2.5.2. Número de Reynolds e Froude

Para caracterizar o escoamento no reator, o número de Reynolds foi calculado pela Equação 4.7 (YE; VAN DER HOEF; KUIPERS, 2005).

$$Re = \frac{\rho \cdot u \cdot D_p}{\mu} \quad (4.7)$$

Em que: ρ = massa específica do fluido; u = velocidade superficial do fluido; D_p = diâmetro da partícula e μ = viscosidade absoluta do fluido.

Para caracterizar a fluidização, utilizou-se o número adimensional de Froude, Fr , que foi calculado pela Equação 4.8 (YE; VAN DER HOEF; KUIPERS, 2005).

$$Fr = \frac{u^2}{D_p \cdot g} \quad (4.8)$$

Em que: u = velocidade superficial do fluido; D_p = diâmetro da partícula e g = aceleração gravitacional. Para esse número, tem-se que:

$Fr < 1$: fluidização particulada e homogênea

$Fr > 1$: fluidização particulada agregativa (coesiva) ou heterogênea

4.2.5.3. Distribuição de Tempo de Residência (DTR)

Para a caracterização da mistura no reator de leito fluidizado, foi realizado um teste de traçador tipo pulso. Primeiramente, preparou-se uma solução 15% (m/m) de corante azul lipossolúvel em meio reacional, que foi diluída 500 vezes em terc-butanol, e, então, foi realizada uma varredura no espectro UV-Visível para determinação do comprimento de onda no qual a absorbância era máxima. Este valor foi utilizado nas etapas posteriores do teste para as leituras de absorbância.

Para a construção da curva de calibração, a solução de corante 15% foi diluída 100 vezes em meio reacional e diluições subsequentes com terc-butanol foram realizadas.

Após as etapas iniciais de preparação da solução de corante e construção da curva de calibração, o teste de traçador tipo pulso foi realizado no mesmo sistema reacional empregando na reação de produção de biodiesel, tendo como objetivo a determinação do tempo médio de residência, variância, coeficiente de variação, coeficiente de assimetria, e a determinação do parâmetro n (número de CSTRs em série que corresponde ao reator utilizado). A enzima imobilizada foi inativada para ser utilizada no teste.

A função de distribuição do tempo de residência (DTR), foi determinada experimentalmente injetando-se a solução de corante lipossolúvel azul (15%) em meio reacional contendo óleo de babaçu e etanol no tempo $t = 0$ e, então, medindo-se a concentração, C , do traçador no efluente do reator em função do tempo. As medidas de concentração do corante foram realizadas no espectrofotômetro UV-Visível Varian modelo Cary 50 Conc em 646 nm.

Como a vazão volumétrica utilizada foi constante, a função da DTR, $E(t)$, pôde ser calculada pela Equação 4.9.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (4.9)$$

Em que: $C(t)$ é a concentração (g/mL) do corante no tempo t (h).

Para a determinação do valor do denominador Equação 4.9, foi construído um gráfico de $C(t)$ *versus* t até um tempo a partir do qual a concentração de corante é praticamente nula, não havendo a necessidade de tempos maiores para a resolução gráfica da integral em questão. Assim, para cada valor de tempo, a função da DTR, $E(t)$, foi determinada e,

finalmente, o tempo médio de residência, t_m , que corresponde ao tempo espacial, τ , foi, então, calculado pela Equação 4.10.

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt \quad (4.10)$$

Além do tempo médio de residência, outros momentos da DTR são usados para comprar distribuições. O segundo momento comumente usado é relacionado à média e é chamado de variância (ou quadrado do desvio-padrão), σ^2 , sendo definido pela Equação 4.11.

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - t_m)^2 \cdot E(t) dt \quad (4.11)$$

A magnitude desse momento é um indicativo do alargamento da distribuição de forma que quanto maior seu valor maior será o alargamento da distribuição. O terceiro momento é também tomado em torno da média e é chamado coeficiente de assimetria, sendo definindo pela Equação 4.12.

$$s^3 = \frac{1}{\sigma^{3/2}} \int_0^{\infty} (t - t_m)^3 \cdot E(t) dt \quad (4.12)$$

A magnitude desse momento mede a extensão em que a distribuição é assimétrica em uma ou outra direção em relação à média (FOGLER, 2009).

Há, também, combinações dos momentos que são comumente usadas para descrever distribuições de probabilidade. O coeficiente de variação, C_V , que fornece uma medida da variação relativa (ou espalhamento) de uma distribuição, é definido pela Equação 4.13. (HARRIS; DAVIDSON; THORPE, 2003).

$$C_V = \frac{\sigma}{t_m} \quad (4.13)$$

Pode-se, ainda, analisar a DTR para determinar o número de tanques ideais, n , em série que corresponde aproximadamente à mesma DTR do reator não ideal utilizado.

A função de distribuição do tempo de residência, $E(t)$, para n CSTRs em série é dada pela Equação 4.14.

$$E(t) = \frac{n^n}{t_m^n} \cdot \frac{t^{n-1}}{(n-1)!} \cdot e^{-\frac{n \cdot t}{t_m}} \quad (4.14)$$

De posse dos dois primeiros momentos da DTR, pode-se determinar o parâmetro n pela Equação 4.15.

$$n = \frac{\tau^2}{\sigma^2} \quad (4.15)$$

4.3. Métodos de análise

4.3.1. Atividade da enzima imobilizada pela hidrólise do azeite de oliva emulsionado

A atividade enzimática da lipase imobilizada em SiO₂-PVA foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH (0,02 mol/L) utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos da atividade hidrolítica foram realizados pela Equação 4.16 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima imobilizada que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em μmol/g/min (U).

$$Atividade = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (4.16)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL), M = concentração da solução de KOH (mol/L), t = tempo de reação (min), m = massa de enzima imobilizada (g).

4.3.2. Atividade da enzima imobilizada pela hidrólise do butirato de metila

A reação de hidrólise do butirato de metila catalisada pela lipase imobilizada Novozym® 435 ocorreu em solução-tampão fosfato 25 mmol/L – pH 7,0, sob agitação de

200 rpm a 25 °C. Inicialmente, foram adicionados 300 µL de butirato de metila em 30 mL de tampão fosfato e, em seguida, adicionou-se 0,05 g de lipase imobilizada. Após 10 minutos de reação nas condições citadas, adicionaram-se 10 mL de solução acetona:etanol comercial 1:1 (v/v) e, então, a mistura foi titulada com solução de KOH 0,05 mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 4.16 do item anterior.

4.3.3. Teor de umidade das enzimas imobilizadas

A determinação do teor de umidade das enzimas imobilizadas foi feita medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (0,1 g) em balança analítica acoplada com infravermelho durante 15 min a 100 °C.

4.3.4. Densidade das enzimas imobilizadas

A densidade do sólido foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com água à temperatura ambiente. Colocou-se uma massa conhecida de partículas no interior do balão e as mesmas foram imersas em água destilada em banho de ultrassom, a fim de se eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi completado com água, sendo o volume ocupado pelo sólido obtido por diferença após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (ZANIN, 1989).

4.3.5. Tempo de meia-vida do biocatalisador

A constante de desativação do biocatalisador (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram determinados por meio das Equações 4.17 e 4.18, respectivamente.

$$C = C_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (4.17)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4.18)$$

Em que: C_0 = concentração inicial de ésteres de etila; C = concentração de ésteres de etila num dado tempo t .

A construção de um gráfico de $\ln(C_0/C)$ *versus* tempo (linearização da Equação 4.17) permite calcular a constante de desativação (k_d), que corresponde ao coeficiente angular da reta de ajuste dos pontos obtidos. O tempo de meia-vida é calculado pela Equação 4.18 após a obtenção do valor de k_d .

4.3.6. Tempo espacial do reator

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 4.19, 4.20 e 4.21.

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad (4.19)$$

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisado}} \quad (4.20)$$

$$V_{\text{catalisado } r} = \frac{m}{\rho} \quad (4.21)$$

Em que: τ = tempo espacial (min); $V_{\text{útil}}$ = volume útil do reator (mL); Q = vazão volumétrica sobre a seção da coluna ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$); V_{reator} = volume total do reator (mL); $V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator (mL); m = massa do catalisador seco (g) e ρ = densidade do biocatalisador seco ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.3.7. Massa específica do biodiesel

Os valores de massa específica foram determinados utilizando um densímetro digital modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram feitas a 20 °C, empregando-se 2,0 mL de amostra.

4.3.8. Viscosidade cinemática do biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40 °C, com a utilização de 1 mL de amostra. A viscosidade cinemática (mm²/s) foi obtida pela razão entre a viscosidade absoluta (cP) e a massa específica do biodiesel (g/mL).

4.3.9. Quantificação de mono e diacilgliceróis

Mono e diacilgliceróis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Inc. SP, Brasil), com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Fenomenex Gemini C18 110 A (150 x 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 40 °C e do detector de 70 °C.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (J. T. Baker). As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila (A) e metanol (B) numa proporção de 80% A e 20% B por 35 min. A taxa de fluxo de 1 mL/min foi mantida durante os seis primeiros minutos; 1,5 mL/min durante os 24 minutos seguintes e 3,0 mL/min durante os cinco minutos restantes. Todas as amostras foram dissolvidas em acetato de etila-hexano (1:1, v/v) e o volume de injeção foi de 10 µL. Os padrões utilizados foram a monolaurina, monomiristina, monopalmitina, monoestearina, mono-oleína, dilaurina, dipalmitina, dimiristina, diestearina, dioleína.

Os teores de mono e diacilgliceróis foram calculados nas amostras de biodiesel purificadas complementando as análises dos ésteres alquílicos presentes nas amostras analisadas por CG.

4.3.10. Quantificação dos ésteres etílicos produzidos

Para quantificar os ésteres de etila formados, empregou-se cromatografia de fase gasosa (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de chama ionizante e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80-100 mesh 6 ft 2.0 mm ID e 1/8" OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil). Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 25 mL/min. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 90 °C (3 min),

120 °C (10 min) e 170 °C (15 min), a uma taxa de aquecimento de 25 °C/min. A coleta de dados foi realizada utilizando o software Galaxie Chromatography Data System versão 1.9. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL em hexano e padrão interno e a quantificação foi realizada pela calibração interna apresentadas na Tabela 4.4 conforme estabelecido por URIOSTE et al. (2008).

Tabela 4.4. Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos.

Padrão Interno (PI):	Hexanol	
Programa de Temperatura	90 °C/ 3 min, 120 °C/ 10 min e 170 °C/ 15 min	
Taxa de aquecimento	25 °C/ min	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Atenuação do cromatógrafo	A, B, C = 16	
Preparo da amostra	0,1g de amostrar em 0,3g de hexano	
Amostra para injeção	1:1 (amostra: padrão interno)	
	Ésteres etílicos	Minutos
Tempos de retenção dos ésteres etílicos	C8	3,28
	C10	5,26
	C12	8,56
	C14	12,06
	C16	13,96
	C18	17,10
	C18:1	17,81
	C18:2	19,26

4.3.11. Rendimento de transesterificação

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel por via enzimática foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (Mt) em relação à massa total teórica esperada para uma conversão de 100% dos triglicerídeos presentes no óleo (ΣMe). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial da matéria-prima lipídica (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MMA) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela equação 4.22 (a), em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (Ca), com a massa

inicial de óleo utilizada (M_i) equação 4.22 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (M_t) pela massa total teórica de ésteres de etila (M_e), conforme mostrado na equação 4.22 (c).

$$(a) M_e = \frac{(M_o \cdot MMe)}{MMa} \quad (b) M_o = Ca \cdot M_i \quad (c) R = \frac{M_t}{\sum M_e} \times 100 \quad (4.22)$$

4.3.12. Produtividade em ésteres de etila

A produtividade, expressa em quantidade de éster (biodiesel) por massa de biocatalisador e por tempo, foi definida e calculada de acordo com a Equação 4.23.

$$P = \frac{C \cdot Q \cdot \rho}{MM_{éster} \cdot m_{cat}} \quad (4.23)$$

Em que: P = produtividade ($\text{mol}_{éster}/\text{g}_{cat}/\text{min}$); C = concentração de ésteres etílicos à saída do reator ($\text{g}_{éster}/\text{g}_{meio}$); Q = vazão de coleta de produto (mL/min); ρ = densidade do meio de saída do reator ($\text{g}_{meio}/\text{mL}$); $MM_{éster}$ = massa molar média dos ésteres formados ($\text{g}_{éster}/\text{mol}$); m_{cat} = massa de catalisador (g_{cat}).

4.3.13. Determinação das propriedades do biodiesel por modelos empíricos

Os índices de cetano (IC), saponificação (IS) e iodo (II) foram determinados por meio de equações empíricas (RAMOS et al., 2009), tomando por base as equações propostas por Krisnangkura (1986). O número de cetano do biodiesel foi estimado pela Equação 4.24, em que os índices de saponificação e iodo foram determinados pelas Equações 4.25 e 4.26, respectivamente.

$$IC = 46,3 + \frac{5458}{IS} - 0,225 \cdot II \quad (4.24)$$

$$IS = \Sigma \frac{(560 \cdot N)}{M} \quad (4.25)$$

$$II = \Sigma \frac{(254 \cdot D \cdot N)}{M} \quad (4.26)$$

Em que, para cada ácido graxo: N = porcentagem mássica; M = massa molar (g/mol); D = número de duplas ligações.

O parâmetro grau de insaturação foi calculado a partir da Equação 4.27, na qual se considera a soma da quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados contidos nos componentes do biodiesel (RAMOS et al., 2009).

$$GI = (\% \text{ monoinsaturados}) + 2 \cdot (\% \text{ poli} - \text{insaturados}) \quad (4.27)$$

Em que: GI = grau de insaturação do biodiesel (%).

O fator do comprimento da cadeia (FCC) foi calculado a partir da Equação 4.28, utilizando a composição dos ácidos graxos saturados de cadeia longa que constituem o biodiesel. Este parâmetro está correlacionado com o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) descrito pela Equação 4.29 (RAMOS et al., 2009).

$$FCC = 0,1 \cdot C16 + 0,5 \cdot C18 + C20 + 1,5 \cdot C22 + 2 \cdot C24 \quad (4.28)$$

$$PEFF = 3,1417 \cdot FCC - 16,477 \quad (4.29)$$

Em que: FCC = fator do comprimento da cadeia; PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de estabelecer as condições reacionais e operacionais que fornecessem o melhor desempenho para um sistema de reator de leito fluidizado na produção enzimática de biodiesel, inicialmente foi conduzido um teste no reator para a determinação da velocidade mínima de fluidização. Após a análise dos dados obtidos, e de acordo com os recursos, equipamentos disponíveis e conhecimento adquirido pelo Grupo de Biocatálise da EEL-USP na produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo (SIMÕES, 2011), adotou-se um sistema com recirculação para a síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol na ausência de solventes a 50 °C.

Os primeiros experimentos consistiram na utilização da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida de SiO₂-PVA como catalisador. A influência de variáveis como massa de enzima imobilizada, tempo espacial e razão molar entre os reagentes sobre o rendimento de transesterificação, produtividade em ésteres e tempo de meia-vida do biocatalisador foi estudada. No último experimento desta série, foi avaliada, ainda, a utilização de uma coluna contendo a resina Lewatit® GF202 para remoção do glicerol formado durante a reação de transesterificação.

Nos ensaios seguintes, utilizou-se como catalisador a lipase de *Candida antarctica* manufaturada pela Novozymes na forma imobilizada em suporte acrílico (Novozym® 435). Em todos os experimentos, foi empregada a coluna com Lewatit® GF202 e a influência das mesmas variáveis estudadas para o outro biocatalisador sobre o rendimento e a produtividade foi investigada.

Para ambos os catalisadores, foi realizada a caracterização hidrodinâmica do reator por meio do teste de traçador, o que permitiu a obtenção dos seguintes parâmetros: tempo médio de residência (t_m); variância (σ^2); coeficiente de assimetria (s^3); e número de tanques agitados em série (n) correspondentes ao reator utilizado.

Por fim, amostras de biodiesel resultantes da melhor condição obtida foram caracterizadas com relação a alguns parâmetros de qualidade: teor de éster; massa específica a 20 °C; viscosidade cinemática a 40 °C; e teor de mono e diacilglicerol. Outros parâmetros, tais como número de cetano, índice de saponificação, índice de iodo e ponto de entupimento de filtro a frio, foram estimados por modelos empíricos, visando à predição da qualidade do biodiesel obtido do óleo de babaçu.

A principal motivação no desenvolvimento deste trabalho foi a existência, até então, de apenas um trabalho na literatura para a síntese enzimática de biodiesel empregando reator

de leito fluidizado, referente à transesterificação de óleo de casca de oliva com etanol na ausência de solventes (RICCA et al., 2009). Neste referido trabalho, utilizou-se a Lipozyme[®] como biocatalisador (lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica macroporosa) e foram reportados rendimentos máximos de transesterificação de apenas 3%.

Desta forma, os esforços foram voltados para a obtenção de um sistema capaz de fornecer elevados rendimentos de transesterificação, uma vez que as normas para biodiesel exigem um teor mínimo de éster de 96,5 % em massa, com a maior produtividade possível. Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento dos ensaios realizados são descritos e discutidos a seguir.

5.1. Teste de expansão do leito utilizando lipase imobilizada em SiO₂-PVA

A concepção mais trivial para um sistema com reator de leito fluidizado seria a utilização de um tanque de alimentação, que armazenaria os reagentes (etanol e óleo de babaçu), e de um reator de coluna contendo o biocatalisador. Os reagentes atravessariam ascendentemente o leito do reator por meio de uma bomba peristáltica e o produto seria coletado à saída da coluna, como ilustra a Figura 5.1.

Figura 5.1. Concepção mais trivial para um sistema de reator de leito fluidizado para produção de biodiesel.

Para a determinação da altura mínima que um reator de leito fluidizado precisaria possuir num sistema como o apresentado na Figura 5.1, realizou-se, então, o teste de expansão do leito.

O ensaio foi conduzido em um reator de coluna de vidro de 375 mm de altura, 12 mm de diâmetro interno e um volume útil de 42,4 mL com quantidades variadas de lipase imobilizada em SiO_2 -PVA inativada (1h em estufa a 100 °C) com granulometria de 42 a 60 mesh. O meio usado foi óleo de babaçu:etanol na razão molar 1:7. Primeiramente, foi medida a altura do leito em função da vazão empregada e da quantidade de enzima imobilizada utilizada, conforme mostrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Altura do leito fluidizado em função da massa de biocatalisador e da vazão.

Vazão (mL/min)	Altura do leito (cm)			
	5 g	7,5 g	10 g	15 g
0,00	6,0	9,0	12,0	17,5
0,49	6,0	9,0	12,0	17,5
1,49	6,9	10,0	13,4	20,0
2,32	7,7	11,3	15,5	23,0
3,59	8,5	12,5	17,0	25,4
4,11	9,3	13,5	18,5	28,9
5,70	10,3	14,5	20,0	31,0
6,73	11,3	15,8	21,5	37,5*
7,77	12,0	16,7	23,0	37,5*
9,23	13,0	18,2	25,0	37,5*
9,84	14,5	19,3	26,5	37,5*

*altura máxima da coluna

A porosidade inicial do leito (ϵ_0), que é aquela na qual não há fluidização, independe da massa de partículas utilizada, pois um aumento de massa implica um aumento proporcional na altura do leito, de forma que a relação M_s/h permanece constante (Equação 4.4). Assim, conhecida a porosidade do leito sem fluidização, é possível estimar a velocidade mínima de fluidização do reator em questão, independentemente da massa de enzima imobilizada a ser utilizada, desde que as partículas possuam as mesmas características utilizadas em cada condição. Pelos resultados dos experimentos realizados, obtiveram-se os

seguintes valores médios para o coeficiente de expansão e velocidade terminal da partícula corrigida: $n = 8,9$ e $u_{tc} = 52,9$ cm/min.

Utilizando o valor médio de porosidade mínima de fluidização, $\varepsilon_{min} = 0,60$, $n = 8,9$ e $u_{tc} = 52,9$ cm/min na Equação 4.4, a velocidade mínima de fluidização, u_{min} , estimada foi de 0,58 cm/min ($9,65 \cdot 10^{-5}$ m/s), que corresponde a uma vazão mínima de fluidização, Q_{min} , de 0,65 mL/min ($3,93 \cdot 10^{-5}$ m³/h).

A Tabela 5.2 mostra a variação da porosidade do leito em função da vazão e da massa de enzima imobilizada empregadas.

Tabela 5.2. Porosidade do leito fluidizado em função da vazão e da massa de biocatalisador.

Vazão (mL/min)	Porosidade do leito			
	5 g	7,5 g	10 g	15 g
0,00	0,6049	0,6049	0,6049	0,5936
0,49	0,6049	0,6049	0,6049	0,5936
1,49	0,6564	0,6444	0,6462	0,6444
2,32	0,6921	0,6853	0,6941	0,6908
3,59	0,7211	0,7155	0,7211	0,7200
4,11	0,7451	0,7366	0,7437	0,7539
5,70	0,7698	0,7548	0,7629	0,7706
6,73	0,7902	0,7749	0,7795	0,8190
7,77	0,8025	0,7871	0,7939	0,8327
9,23	0,8176	0,8046	0,8104	0,8327
9,84	0,8365	0,8158	0,8211	0,8327

Pelos resultados, pôde-se observar que a porosidade do leito é praticamente função exclusiva da vazão, não dependendo da massa de enzima imobilizada empregada no teste.

Desta forma, para se determinar a altura mínima que o reator de leito fluidizado com passagem única de reagentes (sem sistema de recirculação) deve possuir (utilizando lipase imobilizada em SiO₂-PVA como biocatalisador e reator com sessão circular), pode-se empregar a Equação 5.1, que foi obtida a partir da combinação das Equações 4.1, 4.2 e 4.3.

$$h_{min} = \frac{4}{\pi} \frac{\tau \cdot Q_{min}}{D^2 \cdot \varepsilon_{min}} \quad (5.1)$$

De posse dos valores de ϵ_{min} (0,602) e Q_{min} ($3,93 \cdot 10^{-5}$ m³/h), e mantendo a razão altura/diâmetro do reator em 30, a altura mínima do reator de leito fluidizado para um tempo espacial de 11 h, tempo obtido em reator de leito fixo por Simões (2011) e suficiente para rendimentos em torno 95%, é de aproximadamente 90 cm (com diâmetro de 3,0 cm). Nessas condições, o volume total do reator é de 636 mL e seria necessário o uso de 470 g de lipase imobilizada para obter os valores esperados de rendimento dentro das condições mínimas de vazão estimadas, tornando inviável devido à elevada quantidade de biocatalisador, num primeiro momento, o uso de um reator com as dimensões mínimas estimadas neste teste.

O problema enfrentado ao adotar-se a concepção de sistema apresentada anteriormente, sem a utilização de quantidade elevada de biocatalisador, está relacionado com a relação entre a vazão utilizada para bombear os reagentes através da coluna e o tempo em que estes estarão em contato com o biocatalisador no leito reacional. Se uma vazão pequena é utilizada, de modo a permitir contato com tempo suficiente entre os reagentes e o biocatalisador para que a reação ocorra, não é observada a fluidização do leito e o reator comporta-se como um de leito fixo. No caso oposto, quando é utilizada a vazão de alimentação mínima necessária, ocorre a fluidização, mas não há tempo hábil para que os reagentes sejam convertidos em produto. Para superar estes obstáculos, foi proposta a utilização de um tanque de recirculação, de modo que a maior parte do efluente do reator seja redirecionada à entrada inferior da coluna (o que aumenta o tempo de contato entre os reagentes e o biocatalisador) a uma vazão suficientemente grande para que ocorra a fluidização. Desta forma, o sistema para a síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado foi concebido de acordo com o esquema mostrado na Figura 4.1 (Materiais e métodos).

5.2. Produção enzimática de biodiesel em sistema de reator de leito fluidizado com recirculação (Experimento 1)

O reator utilizado consistiu em uma coluna de vidro encamisada com 210 mm de altura, 14 mm de diâmetro interno e 32,3 mL de volume útil. Como catalisador, foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida de sílica e álcool polivinílico (SiO₂-PVA). Neste ensaio, foram utilizados 10 g de enzima imobilizada com 8,3% de umidade e 1880 ± 128 U/g (massa seca), resultando em uma atividade hidrolítica total no leito de 17247 U. O meio reacional consistiu na mistura de óleo de babaçu e etanol na proporção molar de 1:7, respectivamente. A temperatura nos tanques e nos reatores encamisados foi mantida a 50 °C por meio da recirculação de água de um banho termostatzado. A vazão da bomba 1 (B1) foi ajustada para 0,067 mL/min e a da bomba 2 (B2), para 8,5 mL/min. Os tanques de alimentação e recirculação operaram sob agitação magnética e toda a vizinhança do sistema foi mantida em torno de 40 °C por meio de um aquecedor para evitar a solidificação do óleo nas conexões. Com exceção da vazão da bomba 2 (recirculação), que foi ajustada experimentalmente, os valores dos outros parâmetros foram selecionados com base no conhecimento adquirido pelo grupo de pesquisa em trabalhos anteriores com reator de leito fixo empregando este mesmo biocatalisador. A Tabela 5.3 resume as principais condições utilizadas neste experimento.

Tabela 5.3. Principais parâmetros e informações referentes ao primeiro experimento de produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:7 (mol/mol)
<i>Catalisador</i>	Lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA
<i>Volume do reator</i>	32 mL
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	9,2 g (massa seca)
<i>Carregamento catalítico</i>	0,31 g/mL
<i>Atividade da enzima imobilizada</i>	1880 ± 128 U/g (massa seca)
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,067 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	8,5 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	14,8 h

O sistema foi operado continuamente por 29 dias com reabastecimento diário do tanque de alimentação com meio reacional e os ésteres de etila, coletados no tanque de produtos, foram quantificados por cromatografia de fase gasosa de acordo com metodologia descrita no item 4.3.10.

Os valores de concentração de ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, de rendimentos de transesterificação e de produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se no APÊNDICE A, e a Figura 5.2 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação.

Figura 5.2. Rendimento de transesterificação nos 29 dias de reação do primeiro experimento de produção de biodiesel em reator de leito fluidizado empregando lipase imobilizada em SiO₂-PVA.

Durante os 29 dias de operação contínua, os rendimentos de transesterificação, a partir do estado estacionário (96 h), variaram entre 31,7 e 49,9%, com um rendimento médio de $38,6 \pm 6,0$ %, e a produtividade média obtida foi de $(6,97 \pm 1,08) \cdot 10^{-6}$ moléster/g_{cat}/min. A atividade hidrolítica da enzima imobilizada no fim do experimento foi de $1226,2 \pm 94,0$ U/g. O tempo de meia-vida calculado foi de 47 dias, valor próximo ao encontrado por Simões (2011) para a Novozym[®] 435 na etanolise enzimática de óleo de babaçu em reator de leito fixo, que foi de 45 dias.

Desta forma, os resultados indicaram que o sistema proposto foi capaz de conduzir de forma estável a transesterificação do óleo de babaçu com valores de rendimentos satisfatórios quando comparados ao único trabalho semelhante (produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado) encontrado na literatura (RICCA et al., 2009), que reporta rendimentos de transesterificação de apenas 3%.

Ainda assim, modificações no sistema e nas condições de operação do biorreator foram propostas a fim de que melhores resultados com relação ao rendimento de transesterificação, produtividade e estabilidade operacional do biocatalisador fossem alcançados. Essas modificações, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritas a partir do item 5.4. Antes, foi realizado um teste de traçador tipo pulso para caracterização de alguns parâmetros do reator.

5.3. Teste de traçador tipo pulso com lipase imobilizada em SiO₂-PVA

Para a determinação experimental do tempo médio de residência dos reagentes no sistema utilizado no primeiro experimento, bem como para a caracterização da mistura no leito reacional, foi realizado um teste de traçador tipo pulso. Primeiramente, preparou-se uma solução 15% (m/m) do corante azul lipossolúvel (traçador) em meio reacional de acordo com as quantidades mostradas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Proporção entre os componentes da solução do corante lipossolúvel azul utilizada no teste de traçador.

<i>Proporção</i>	<i>Constituintes</i>	<i>Massas</i>
15%	Corante azul	1,500 g
85%	óleo de babaçu	5,848 g
	etanol	2,652 g

Esta solução foi diluída 500 vezes em terc-butanol e, então, foi realizada uma varredura no espectro UV-Visível, obtendo-se um valor de 646 nm para o comprimento de onda com absorbância máxima. Para a construção da curva de calibração, a solução de corante 15% foi diluída 100 vezes em meio reacional (óleo de babaçu:etanol - 1:7 molar) e diluições subsequentes com terc-butanol foram realizadas, obtendo-se os valores de absorbância e concentração de corante correspondentes que se encontram no APÊNDICE B. Por meio desses valores, construiu-se o gráfico da Figura 5.3.

Após as etapas iniciais de preparação da solução de corante e construção da curva de calibração, o teste de traçador tipo pulso foi realizado, tendo como objetivo a determinação dos principais momentos da DTR e a análise do comportamento hidrodinâmico do reator.

A função de distribuição do tempo de residência foi determinada experimentalmente injetando-se a solução de corante lipossolúvel azul (15%) em meio reacional óleo de babaçu:etanol na proporção molar de 1:7 no tempo $t = 0$ e, então, medindo-se a concentração, C , do traçador no efluente do reator em função do tempo. As medidas de concentração do corante foram realizadas no espectrofotômetro UV-Visível Varian modelo Cary 50 Conc em 646 nm.

Figura 5.3. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e absorbância.

O experimento foi realizado por 31 horas, com retirada de amostra a cada hora. Os valores de absorbância e concentração se encontram no APÊNDICE C, sendo que cada amostra foi diluída 6 vezes com terc-butanol (400 μ L de amostra e 2 mL de terc-butanol) para a realização da leitura de absorbância. Os valores de concentração do corante foram calculados segundo o modelo matemático obtido na curva de calibração e, por meio de tais valores, foi plotado um gráfico de concentração *versus* tempo e um modelo matemático exponencial foi ajustado aos pontos obtidos (Figura 5.4).

Figura 5.4. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e tempo.

Como a vazão volumétrica utilizada foi constante, a função da DTR, $E(t)$, pôde ser calculada pela Equação 4.9. Para a determinação do valor do denominador da referida equação, foi construído um gráfico de $C(t)$ *versus* t até um tempo de 200 h, pois a partir deste tempo a concentração de corante era praticamente nula, não havendo a necessidade de tempos maiores para a resolução gráfica da integral.

Por meio do software OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724), foi determinado que:

$$\int_0^{\infty} C(t)dt = 0,003313 \text{ g.h/mL}$$

Assim, para cada valor de tempo, $E(t)$ foi determinada e, finalmente, o tempo médio de residência, t_m , que corresponde ao tempo espacial, τ , foi calculado pela Equação 4.10. Novamente, foi utilizado o software OriginPro 8 para a determinação da área do gráfico de $t.E(t)$ *versus* t para um tempo de 0 a 200 h (Figura 5.5).

Figura 5.5. Determinação do tempo médio de residência do reator por meio da área do gráfico de $t.E(t)$ *versus* tempo.

Desta forma, foi determinado que $\tau = t_m = 13,2$ h. O valor obtido foi semelhante ao tempo espacial calculado pela razão entre o volume útil do reator e a vazão volumétrica sobre a seção da coluna, que foi de 14,8 h. A relativa similaridade entre os tempos espaciais pode ser considerada um indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou zona mortas no reator, demonstrando qualitativamente uma boa mistura e dinâmica adequada dos reagentes no leito catalítico.

Outros momentos da DTR também foram calculados. O valor determinado experimentalmente para a variância, σ^2 , foi de 165,65 h², correspondendo a um desvio-padrão de 12,87 h. Para o coeficiente de assimetria, s^3 , o valor obtido foi de 92,24 h^{3/2}. O coeficiente de variação, C_V , calculado pela razão entre o desvio-padrão da distribuição e o valor do tempo médio de residência, foi de 98%. A análise da DTR para determinar o número de CSTR ideais, n , em série que corresponde aproximadamente à mesma DTR do reator não ideal utilizado, resultou em $n = 1,04$, demonstrando que o comportamento do fluxo no sistema reacional utilizado corresponde ao de um reator CSTR.

Além da determinação do tempo médio de residência, variância e coeficiente de assimetria, o teste de traçador permitiu uma análise do comportamento hidrodinâmico do reator de leito fluidizado por meio da comparação das curvas de $E(t)$ versus t para um reator de mistura completa (CSTR) e o reator em questão (FBR). A função $E(t)$ para um CSTR é obtida da Equação 4.14 do item 4.2.6, quando se faz $n = 1$. Foi observado um comportamento semelhante do sistema em estudo em relação a um CSTR ideal como é mostrado na Figura 5.6.

Figura 5.6. Comparação entre as curvas de $E(t)$ versus t para um CSTR ideal e para o FBR utilizado.

A similaridade na função de distribuição de tempo de residência do reator em estudo com um CSTR ideal, que também foi confirmada pelo valor de n , indica uma mistura homogênea de reagentes e produtos formados em toda a coluna reacional e esta observação pode estar relacionada com a utilização do tanque de recirculação, que se comporta basicamente como um CSTR, e com a vazão relativamente elevada com a qual ocorre a fluidização. O item seguinte dá continuidade aos ensaios de produção de biodiesel.

5.3. Influência da razão molar entre os reagentes (Experimento 2)

Visando à obtenção de valores de rendimento mais elevados do que aqueles alcançados no primeiro experimento ($38,6 \pm 6,0\%$), diferentes razões molares entre óleo de babaçu e etanol foram empregadas para se avaliar, sobretudo, uma possível limitação da quantidade de etanol disponível no meio reacional. As razões molares óleo de babaçu:etanol analisadas foram de 1:12, 1:9 e 1:5 nesta ordem e sem troca do biocatalisador, correspondendo a um total de 22 dias de reação. A Figura 5.8 mostra o sistema utilizado neste experimento e as principais condições empregadas são apresentadas na Tabela 5.7.

Figura 5.7. Sistema reacional utilizado nos dois primeiros experimentos de produção de biodiesel.

Tabela 5.5. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência da razão molar (Experimento 2).

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu e etanol (1:12 - 1:9 - 1:5)
<i>Catalisador</i>	Lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA
<i>Volume do reator</i>	32 mL
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	9,10 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,3125 g/mL
<i>Atividade da enzima imobilizada</i>	2243,6 $\pm$ 28,8 U/g (massa seca)
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,067 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	17,0 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	12,5 h

Os valores de concentração de ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, de rendimentos de transesterificação e de produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se no APÊNDICE D, e a Figura 5.8 mostra uma visão geral do progresso da

reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 22 dias contínuos de reação.

Figura 5.8. Rendimento de transesterificação obtido durante os 22 dias de reação (Experimento 2).

No primeiro experimento realizado (item 5.2), em que não houve mudança na razão molar entre os reagentes, a queda de rendimento foi de aproximadamente 20% durante os 29 dias de reação. Os resultados obtidos no segundo experimento mostraram uma queda de rendimento de 25,6% com o passar do tempo e com as mudanças das razões molares, indicando que, possivelmente, o rendimento foi mais influenciado pela perda de atividade da enzima ao longo do tempo do que pelas mudanças na razão molar do meio reacional. Os valores médios de rendimento obtidos para as razões molares de 1:12, 1:9 e 1:5 foram 25,8%, 23,0% e 19,2%, respectivamente. O tempo de meia-vida do biocatalisador obtido foi de 39,5 dias. Como não foram obtidos rendimentos de transesterificação satisfatórios, optou-se pela mudança no reator, conforme detalhado no item a seguir.

5.4. Testes com nova configuração do sistema reacional

Nesta série de experimentos, foi proposta a utilização de um reator com maiores dimensões para verificar a influência de maior quantidade de enzima no leito catalítico. O novo reator consistiu numa coluna de vidro encamisada com 375 mm de altura, 12 mm de diâmetro interno e um volume total de 42,4 mL.

5.4.1. Influência da massa de biocatalisador e do tempo espacial (Experimento 3)

Com o intuito de aumentar os rendimentos obtidos até então, a massa de biocatalisador e o tempo espacial foram praticamente dobrados em relação aos dois experimentos anteriores. Foi utilizado um tempo espacial de 27 h e cerca de 21 g de biocatalisador. A razão molar óleo de babaçu:etanol empregada foi de 1:7.

As principais informações referentes ao ensaio são mostradas na Tabela 5.6. Os valores de concentração dos ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, de rendimentos de transesterificação e de produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se no APÊNDICE E, e a Figura 5.9 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os oito dias de reação.

Tabela 5.6. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência do tempo espacial e da massa de biocatalisador (Experimento 3).

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:7 (mol/mol)
<i>Catalisador</i>	Lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	20,8 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,49 g/mL
<i>Atividade da enzima imobilizada</i>	1912 ± 56 U/g (massa seca)
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,067 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	2,3 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	27,0 h

Figura 5.9. Rendimentos de transesterificação durante os oito dias de reação (Experimento 3).

Foi observado um comportamento estável do reator durante os oito dias de operação, com queda de rendimento no decorrer do tempo. O tempo de meia-vida obtido para o biocatalisador foi de 12 dias e a atividade hidrolítica residual foi de $922,84 \pm 37,20$ U/g.

O valor médio de rendimento obtido foi de $56,7 \pm 7,7$ %, correspondendo a um aumento de 47% com relação aos resultados obtidos no primeiro ensaio (tempo espacial de 14,8 h). A produtividade apresentou queda de 20% e o tempo de meia-vida do biocatalisador foi cerca de quatro vezes inferior. A diminuição do tempo de meia-vida pode ser explicada pelo aumento do efeito negativo do glicerol, provocado tanto pelo aumento de sua produção, uma vez que o rendimento de transesterificação foi praticamente dobrado, quanto pelo aumento no tempo espacial, que promove um contato maior do glicerol com o biocatalisador. O produto obtido, após a etapa de purificação, apresentou viscosidade cinemática média de $14,0 \text{ mm}^2/\text{s}$.

5.4.2. Influência da razão molar (Experimento 4)

A fim de verificar a influência da razão molar entre os reagentes no rendimento de transesterificação, optou-se pela utilização da razão 1:12 (óleo de babaçu:etanol) em vez da razão 1:7 usada no experimento anterior. Todas as outras condições reacionais, conforme mostra a Tabela 5.7, permaneceram inalteradas.

As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.5.

Tabela 5.7. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência da razão molar para 27 h de tempo espacial.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	20,7 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,49 g/mL
<i>Atividade da enzima imobilizada</i>	1951 ± 79 U/g (massa seca)
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,067 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	3,6 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	27,0 h

A Figura 5.10 mostra o sistema reacional utilizado tanto neste quanto no experimento anterior, empregando reator de 42,4 mL.

Figura 5.10. Sistema reacional empregando o reator com maior capacidade (Experimentos 3 e 4).

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, de rendimentos de transesterificação e de produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se no APÊNDICE F, e a Figura 5.11 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 12 dias de reação.

Figura 5.11. Rendimento de transesterificação ao longo dos 12 dias de reação (Experimento 4).

Foi observado que durante os 12 dias de reação o rendimento obtido mostrou tendência de queda, apresentando um valor médio de $(53,97 \pm 9,19)\%$, valor próximo ao obtido quando se utilizou razão molar de 1:7, que foi de 56,7 %. Para a produtividade, foi

obtido um valor médio de $3,54 \cdot 10^{-6}$ mol_{éster}/g_{cat}/min, 20% inferior àquele obtido no experimento anterior ($4,50 \cdot 10^{-6}$ mol_{éster}/g_{cat}/min). O tempo de meia-vida calculado para o biocatalisador foi de 10 dias. Desta forma, a variação da razão molar entre os reagentes de 1:7 para 1:12 não demonstrou influência expressiva, causando uma ligeira queda em todos os parâmetros analisados. Conforme relatado por Silva (2013) e apresentado no ANEXO E, o elevado grau de hidrofilicidade da matriz SiO₂-PVA dificulta o alcance de altas taxas de conversão na produção de biodiesel, uma vez que o glicerol produzido durante a reação forma uma camada que causa uma limitação difusional dos reagentes hidrofóbicos utilizados nos sítios ativos da enzima. Assim, com a finalidade de minimizar o efeito negativo do glicerol no rendimento de transesterificação, foram propostas duas modificações cujos detalhes são descritos no item a seguir. A razão molar óleo:etanol permaneceu em 1:12.

5.4.3. Influência do tempo espacial e da coluna com Lewatit® GF202 para remoção de glicerol (Experimento 5)

Para este experimento, o tempo espacial foi reduzido para 9,3 h (valor três vezes inferior ao utilizado nos dois experimentos anteriores). Além desta mudança, foi adicionada ao sistema uma coluna com 7,0 g de Lewatit® GF202, situada entre a saída do reator e o reservatório de recirculação. As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento da influência do tempo espacial com razão molar 1:12.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	22,3 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,53 g/mL
<i>Atividade da enzima imobilizada</i>	2008 ± 57 U/g (massa seca)
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,19 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	3,0 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	9,3 h

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, de rendimentos de transesterificação e de produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se no APÊNDICE G, e a Figura 5.12 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os dez dias de reação.

Figura 5.12. Rendimento de transesterificação ao longo dos dez dias de reação (Experimento 5).

O rendimento médio de 52,96% obtido neste experimento (razão molar 1:12 e tempo espacial de 9,3 h) foi similar aos rendimentos encontrados no experimento do item 5.4.1 (56,57%; razão molar 1:7; tempo espacial de 27 h) e experimento do item 5.4.2 (53,97%; razão molar 1:12; tempo espacial de 27 h). O principal avanço obtido frente às mudanças realizadas ao longo dos experimentos foi com relação à produtividade ($9,31 \cdot 10^{-6}$ mol_{éster}/g_{cat}/min), que foi cerca de duas vezes maior que a obtida no Experimento 3 ($4,50 \cdot 10^{-6}$ mol_{éster}/g_{cat}/min) e de três vezes maior que a obtida no Experimento 4 ($3,54 \cdot 10^{-6}$ mol_{éster}/g_{cat}/min). O tempo de meia-vida obtido para o biocatalisador foi de 18 dias. Diante de tais resultados, pode-se afirmar que o uso da coluna com a resina para remoção de glicerol foi eficiente, pois aumentou em cerca de duas vezes tanto a produtividade de biodiesel quanto o tempo de meia-vida do biocatalisador.

5.5. Análise global dos experimentos utilizando lipase imobilizada em SiO₂-PVA

Um resumo dos principais resultados obtidos por meio dos experimentos realizados encontra-se na Tabela 5.9. Em todos os experimentos realizados, foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida (SiO₂-PVA) como catalisador, sendo que no último ensaio foi utilizada uma coluna com resina para extração do glicerol formado.

Tabela 5.9. Resumo dos principais resultados obtidos nos experimentos.

Experimento	1	2	3	4	5*
Razão molar óleo de babaçu:etanol	1:7	1:12 1:9 1:5	1:7	1:12	1:12
Volume do reator (mL)	32,3	32,3	42,4	42,4	42,4
Massa de enzima imobilizada (g)	9,17	9,07	20,83	20,68	22,34
Carregamento catalítico(U)	17240	20349	39818	40355	44849
Atividade da enzima imobilizada (U/g)	1880	2244	1912	1951	2008
Alimentação (mL/min)	0,067	0,067	0,067	0,067	0,194
Recirculação (mL/min)	8,5	17	2,32	3,59	2,95
Tempo espacial (h)	14,8	12,5	27	27	9,3
Concentração em ésteres de etila (g/g)	28,28	15,49 15,45 15,48	41,50	32,37	31,77
Rendimento de transesterificação (%)	38,56	25,83 22,95 18,89	56,57	53,97	52,96
Produtividade (10 ⁻⁶ moléster/g _{cat} /min)	6,97	3,85 3,84 3,85	4,50	3,54	9,31
Tempo de meia-vida (dia)	47	40	12	10	18
Tempo de operação (dia)	29	7 7 3	8	12	10

*Utilização de coluna extratora de glicerol.

O melhor desempenho foi alcançado empregando substrato na razão molar óleo:etanol de 1:12, tempo espacial de 9,3 h e na presença da coluna com Lewatit® GF202. Nestas condições, obtiveram-se os seguintes resultados: rendimento médio de transesterificação de $(53,0 \pm 4,8) \%$, produtividade de $(9,31 \pm 0,84) \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$ e tempo de meia-vida do biocatalisador de 18 dias.

Os resultados obtidos, embora melhorados com a utilização da coluna extratora de glicerol, não foram satisfatórios devido às baixas conversões alcançadas (50 a 60%), as quais, em se tratando de produção de biodiesel, não atendem às normas vigentes. Desta forma, e devido às poucas variações no rendimento de transesterificação frente às mudanças tanto nos parâmetros razão molar, tempo espacial quanto na estrutura do aparato experimental, foi avaliada a utilização da lipase imobilizada Novozym® 435, adquirida comercialmente, para averiguar uma possível limitação pela atividade catalítica disponível no leito.

5.6. Produção de biodiesel em reator de leito fluidizado empregando a Novozym® 435 como biocatalisador (Experimento 6)

Diante dos resultados não satisfatórios com a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, optou-se pela continuação dos estudos do sistema reacional com a Novozym® 435 para verificar a influência do biocatalisador no rendimento de transesterificação e na produtividade em ésteres. Todas as outras condições, incluindo a coluna com 7,0 g de Lewatit® GF202 situada entre a saída do reator e o reservatório de recirculação, foram mantidas em relação ao Experimento 5, como mostra a Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Principais parâmetros e informações referentes ao experimento 6.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym® 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	7,00 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,165 g/mL
<i>Atividade da enzima imobilizada*</i>	1500 U/g
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,187 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	2,32 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	10,0 h

* atividade medida na hidrólise do butirato de metila

Um esquema do novo sistema empregando a coluna preenchida com resina para remoção do glicerol é mostrado na Figura 5.13.

Figura 5.13. Sistema reacional utilizado nos experimentos com Novozym® 435 (1 – reator de leito fluidizado; 2 – tanque de alimentação; 3 – tanque de recirculação; 4 – tanque de coleta de produto; 5 e 6 – bombas peristálticas; 7 e 8 – condensadores de refluxo; 9 – aquecedor; 10 – banho termostático; 11 – coluna com Lewatit® GF202).

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, de rendimento de transesterificação e de produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se no APÊNDICE H, e a Figura 5.14 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação e viscosidade cinemática durante os 15 dias de reação.

Figura 5.14. Rendimento de transesterificação e viscosidade cinemática durante 15 dias de reação, empregando Novozym® 435 como catalisador (Experimento 6).

Os resultados obtidos mostraram que o sistema proposto foi capaz de conduzir de forma promissora a etanolise do óleo de babaçu para a produção de biodiesel empregando-se reator de leito fluidizado em meio isento de solventes com Novozym[®] 435 como catalisador. O êxito da proposta foi comprovado quantitativamente para um tempo espacial no reator igual a 10 h, resultando em produtividade de $(5,33 \pm 0,25) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$ e rendimento de transesterificação de $(98,95 \pm 1,40) \%$ durante 15 dias de reação. Nestas condições, as amostras de biodiesel purificadas apresentaram viscosidade média de $(4,96 \pm 0,42) \text{ mm}^2/\text{s}$, enquadrando-se, com relação a este item, nas normas brasileiras (Regulamento Técnico ANP nº4/2012 – ANEXO A), que estabelece que a viscosidade cinemática do B100 deve situar-se na faixa entre 3,0 e 6,0 mm^2/s . Durante todo o período de operação do sistema, não foi observada nenhuma perda de atividade catalítica, ratificando as excelentes propriedades de estabilidade operacional para este biocatalisador.

O quadro da Figura 5.15 compara os principais resultados obtidos neste ensaio com os do experimento realizado anteriormente, no qual se utilizaram praticamente as mesmas condições, excetuando-se o biocatalisador.

Parâmetros	Lipase PS em SiO ₂ -PVA	Novozym [®] 435
Massa de catalisador:	22,3 g	7,0 g
Tempo espacial:	9,3 h	10,0 h
Rendimento:	52,96%	98,95%
Produtividade:	$9,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$	$5,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$
Tempo de operação:	10 dias	15 dias
Tempo de meia-vida:	18 dias	Sem perda de atividade

Figura 5.15. Quadro comparativo do desempenho da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA e da Novozym[®] 435 na síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado com coluna extratora de glicerol.

De acordo com os resultados obtidos, as características globais do desempenho do sistema proposto tornam atrativa a continuidade dos estudos, uma vez que melhorias significativas ainda podem ser obtidas no sistema com Novozym[®] 435. Antes dos testes de produção de biodiesel visando às melhores condições reacionais, o reator foi caracterizado por meio de um teste de expansão do leito, que permitiu a obtenção da velocidade e porosidade mínimas de fluidização e da velocidade terminal da partícula. Também foi realizado um teste de traçador tipo pulso para a caracterização da DTR. Tais testes

encontram-se descritos nos itens seguintes e os experimentos para verificar a influência do tempo espacial, da razão molar entre os reagentes (óleo de babaçu e etanol) e da massa de biocatalisador no rendimento e produtividade da síntese de biodiesel são detalhados na sequência.

5.7. Caracterização hidrodinâmica do leito utilizando Novozym® 435

5.7.1. Velocidade mínima de fluidização

Primeiramente, foi medida altura do leito em função da vazão empregada e da quantidade de enzima imobilizada, conforme mostrado na Tabela 5.11. Para cada condição de massa de enzima imobilizada utilizada no teste, foram obtidos os valores de porosidade do leito, coeficiente de expansão e velocidade terminal da partícula. Os dados encontram-se no APÊNDICE I.

Tabela 5.11. Altura do leito fluidizado em função da massa de Novozym® 435 e da vazão.

Vazão (mL/min)	Altura do leito (cm)			
	1,0 g	3,0 g	5,0 g	7,0 g
0,40	3,7	11,5	19,3	27,6
1,38	3,8	11,7	19,5	27,6
2,41	4,3	14,2	23,9	33,2
3,20	4,7	15,9	26,4	37,5*
4,08	5,0	17,7	28,8	37,5*
5,03	5,5	19,5	31,1	37,0*
5,93	6,0	21,9	33,9	37,5*
6,85	6,6	24,4	37,5*	37,5*
8,12	7,2	27,2	37,5*	37,5*

* altura máxima da coluna

Pelos resultados dos experimentos realizados, obtiveram-se os seguintes valores médios com seus desvios-padrões para o coeficiente de expansão e velocidade terminal da partícula corrigida: $n = 7,4 \pm 0,3$ e $u_{tc} = (22,9 \pm 2,2)$ cm/min. Com a Equação 4.5, o valor estimado para a velocidade terminal da partícula foi de 24,7 cm/min.

Utilizando o valor médio de porosidade mínima de fluidização, $\epsilon_{min} = 0,668$, $n = 7,4$ e $u_{tc} = 22,9$ cm/min na Equação 4.4, a velocidade mínima de fluidização, u_{min} , estimada foi

de 1,16 cm/min ($1,93 \cdot 10^{-4}$ m/s), que corresponde a uma vazão mínima de fluidização, Q_{min} , de 1,31 mL/min ($7,86 \cdot 10^{-5}$ m³/h). A Tabela 5.12 mostra a variação da porosidade do leito em função da vazão e da massa de enzima imobilizada empregadas.

Tabela 5.12. Porosidade do leito fluidizado em função da vazão e da massa de Novozym® 435.

Vazão (mL/min)	Porosidade do leito			
	1,0 g	3,0 g	5,0 g	7,0 g
0,40	0,659	0,666	0,669	0,676
1,38	0,664	0,672	0,672	0,676
2,41	0,706	0,731	0,733	0,730
3,20	0,728	0,759	0,758	0,758
4,08	0,744	0,784	0,778	-
5,03	0,768	0,803	0,794	-
5,93	0,787	0,825	0,811	-
6,85	0,808	0,843	-	-
8,12	0,822	0,859	-	-

De posse dos valores de ϵ_{min} (0,668) e Q_{min} ($7,86 \cdot 10^{-5}$ m³/h), e mantendo a razão altura/diâmetro do reator em 30, a altura mínima do reator de leito fluidizado para um tempo espacial de 10 h (tempo obtido experimentalmente e suficiente para rendimentos em torno de 100%) é de aproximadamente 70 cm (com diâmetro de 2,3 cm). Nessas condições, o volume total do reator é de 296 mL e seria necessário o uso de 67 g de Novozym® 435 para obter os valores esperados de rendimento dentro das condições mínimas de vazão estimadas, tornando inviável, devido ao custo do biocatalisador, num primeiro momento, o uso de um sistema de leito fluidizado sem recirculação também para este biocatalisador.

5.7.2. Número de Reynolds e Froude

Para caracterizar o escoamento no reator, o número de Reynolds foi calculado pela Equação 4.7 (item 4.2.5). Com os valores $\rho = 850$ kg/m³, $u = 3,71 \cdot 10^{-4}$ m/s, $D_p = 4 \cdot 10^{-4}$ m e $\mu = 4,41 \cdot 10^{-3}$ kg/m.s (obtidos dos experimentos com melhores resultados), determinou-se um número de Reynolds de 0,03, caracterizando o regime de escoamento como laminar.

Para caracterizar a fluidização, utilizou-se o número adimensional de Froude, Fr, que foi calculado pela Equação 4.8 (item 4.2.5). Para os dados obtidos dos experimentos com

melhores resultados, obteve-se $Fr = 3,5.10^{-5}$, caracterizando a fluidização como particulada ou homogênea.

5.7.3. Distribuição de tempo de residência

Para a determinação experimental do tempo médio de residência dos reagentes no reator utilizado, e de outros momentos da DTR foi realizado um teste de traçador tipo pulso de forma similar ao realizado para a lipase imobilizada em SiO_2 -PVA. Utilizou-se Novozym[®] 435 inativada e corante lipossolúvel azul.

Para a construção da curva de calibração, a solução de corante 15% foi diluída 100 vezes em meio reacional (óleo de babaçu:etanol na razão molar de 1:12) e diluições subsequentes com terc-butanol foram realizadas. Por meio dos valores de concentração do corante e absorbância obtidos na curva de calibração, construiu-se o gráfico da Figura 5.16.

Após as etapas iniciais de preparação da solução de corante e construção da curva de calibração, o teste de traçador tipo pulso foi realizado no mesmo sistema reacional empregando na reação de produção de biodiesel, tendo como objetivo a determinação do tempo espacial, variância, coeficiente de assimetria, coeficiente de variação e do parâmetro n (número de CSTR em série que corresponde ao reator utilizado).

Figura 5.16. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e absorbância no teste de traçador tipo pulso para o biocatalisador Novozym[®] 435.

A função de distribuição do tempo de residência foi determinada experimentalmente injetando-se a solução de corante lipossolúvel azul (15%) em meio reacional óleo de babaçu:etanol na proporção molar de 1:12 no tempo $t = 0$ e, então, medindo-se a concentração, C , do traçador no efluente do reator em função do tempo (Figura 5.17). As medidas de concentração do corante foram realizadas no espectrofotômetro UV-Visível Varian modelo Cary 50 Conc em 646 nm.

Figura 5.17. Teste de traçador tipo pulso empregando corante lipossolúvel azul e Novozym® 435.

O experimento foi realizado por 21 horas, com retirada de amostra a cada hora. As leituras de absorbância, realizadas em duplicata, e a concentração (C) se encontram no APÊNDICE J. Cada amostra foi diluída 6 vezes (até amostra de 8 h) ou 3 vezes (demais amostras) com terc-butanol para a realização da leitura de absorbância. Os valores de concentração do corante após o tempo de 21 h foram determinados pelo modelo matemático de decaimento exponencial obtido com os valores reais e que é mostrado na Figura 5.18.

Como a vazão volumétrica utilizada foi constante, a função da DTR, $E(t)$, pôde ser calculada pela Equação 4.9. Para a determinação do valor do denominador da referida equação, foi construído um gráfico de $C(t)$ versus t até um tempo de 49 h, pois a partir deste tempo a concentração de corante é praticamente nula, não havendo a necessidade de tempos maiores para a resolução gráfica da integral.

Figura 5.18. Determinação de modelo matemático correlacionando concentração e tempo no teste de traçador tipo pulso com Novozym[®] 435.

Por meio do software OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724), foi determinado que:

$$\int_0^{\infty} C(t)dt = 0,0086689 \text{ g.h/mL}$$

Assim, para cada valor de tempo, a função da DTR, $E(t)$, foi determinada e, finalmente, o tempo médio de residência, t_m , que corresponde ao tempo espacial, τ , foi, então, calculado pela Equação 4.10. Novamente, foi utilizado o software OriginPro 8 para a determinação da área do gráfico de $t.E(t)$ versus t para um tempo de 0 a 49 h (Figura 5.19).

Desta forma, foi determinado que:

$$\tau = t_m = 7,37 \text{ h.}$$

O valor calculado no teste de traçador foi 37% superior ao tempo espacial calculado pela razão entre o volume útil do reator e a vazão volumétrica sobre a seção da coluna, que foi de 5,39 h, demonstrando a possível existência de zonas mortas ou retromistura no sistema reacional.

Figura 5.19. Determinação do tempo médio de residência do reator pela curva de $t \cdot E(t)$ versus tempo.

O valor determinado experimentalmente para a variância, σ^2 , foi de 57,21 h², correspondendo a um desvio-padrão de 7,56 h. Para o coeficiente de assimetria, s^3 , o valor obtido foi de 35,38 h^{3/2}.

O coeficiente de variação, C_V , calculado pela razão entre o desvio-padrão da distribuição e o valor do tempo médio de residência, foi de 100%.

Modelos para reatores não ideais também podem ser obtidos por parâmetros determinados pela DTR em um teste de traçador. Como exemplo de modelos de um parâmetro tem-se: modelo de dispersão e modelo de tanques-em-série. O modelo de dispersão tem a vantagem de que todas as correlações para escoamento em reatores reais usam invariavelmente este modelo. Por outro lado, o modelo de tanques-em-série é simples, pode ser usado com qualquer cinética e pode ser estendido, sem muita dificuldade, para qualquer arranjo de compartimentos, com ou sem reciclo. Para esse modelo, analisa-se a DTR para determinar o número de tanques ideais, n , em série que corresponderá aproximadamente à mesma DTR do reator não ideal utilizado, o que já foi realizado anteriormente para o sistema empregando lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA.

Para o teste realizado, determinou-se $n = 1$, demonstrando que o sistema reacional utilizado corresponde a um reator CSTR. Para $n = 1$, a função de distribuição do tempo de residência para o CSTR é calculada pela Equação 5.2.

$$E(t) = \frac{1}{t_m} \cdot e^{-\frac{t}{t_m}} \quad (5.2)$$

A semelhança do sistema em estudo (FBR) em relação a um CSTR ideal é explicitada na Figura 5.20, em que são traçados os gráficos da curva $E(t)$ versus tempo para ambos os reatores.

Figura 5.20. $E(t)$ versus tempo para um CSTR ideal e o FBR utilizado empregando Novozym[®] 435.

5.8. Influência do tempo espacial utilizando Novozym[®] 435 (Experimentos 7 e 8)

5.8.1. Influência do tempo espacial descendente (Experimento 7)

Dando continuidade ao estudo do reator de leito fluidizado com a Novozym[®] 435, foi realizado um experimento a fim de verificar a influência do tempo espacial no rendimento de transesterificação e na produtividade. Optou-se pela utilização de um tempo espacial de 10 h durante os 6 primeiros dias e um tempo espacial de 5 h durante os 3 dias seguintes. O sistema reacional utilizado é mostrado na Figura 5.21, no qual é possível observar a coluna com Lewatit[®] GF202 entre a saída do reator e a entrada no tanque de recirculação. As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.13.

Figura 5.21. Sistema reacional utilizado nos ensaios para verificar a influência do tempo espacial no rendimento e produtividade da síntese de biodiesel (Experimentos 7 e 8)

Tabela 5.13. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 7.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym [®] 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Porosidade do leito</i>	72,8 %
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	7,0 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,165 g/mL
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,2 – 0,4 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	2,3 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	10,0 – 5,0 h

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, rendimento de transesterificação e produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se na Tabela 5.14 e a Figura 5.22 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os nove dias de reação.

Tabela 5.14. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 9).

Tempo (h)	Concentração (% g_{éster}/g_{meio})	Rendimento (%)	Produtividade (10⁻⁵ mol_{éster}/g_{cat}/min)
18	49,63	82,74	4,74
25	49,42	82,39	4,72
43	49,97	83,32	4,78
49	55,42	92,41	5,30
69	60,39	100,00	5,77
93	54,55	90,96	5,22
111	58,84	98,10	5,63
117	56,01	93,38	5,35
135	57,32	95,57	5,48
141	51,10	85,20	19,54
159	55,58	92,67	21,26
165	42,97	71,64	16,43
183	41,68	69,49	15,94
189	47,66	79,46	18,23
205	46,25	77,11	17,69
210	45,72	76,22	17,49

Figura 5.22. Rendimento de transesterificação para o Experimento 7 (região 1: estabilização das condições; região 2: tempo espacial de 10 h; região 3: transição de mudança de tempo espacial; região 4: tempo espacial de 5 h).

Para um tempo espacial de 10 h foram obtidos rendimentos de $(95,07 \pm 3,48)\%$ e produtividades de $(5,50 \pm 0,21) \cdot 10^{-5}$ mol_{éster}/g_{cat}/min. Quando dobrou-se a vazão de alimentação dos reagentes, o que corresponde a diminuir o tempo espacial de 10 para 5 h, foi observada uma queda de 20% no rendimento de transesterificação: $(74,79 \pm 4,10)\%$. Em

contrapartida, a produtividade foi aumentada em 57%, apresentando um valor médio com seu respectivo desvio-padrão de $(8,65 \pm 0,47) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Apesar do aumento de produtividade para um tempo espacial de 5 h, as amostras de biodiesel obtidas nessa condição apresentaram teores em ésteres distantes dos 96,5% requeridos pela ANP (Resolução nº 14, de 11 de maio de 2012 - Regulamento Técnico nº 4/2012). Além desse parâmetro, a viscosidade cinemática obtida, $(6,75 \pm 0,37) \text{ mm}^2/\text{s}$, também se mostrou superior ao exigido pelas normas brasileiras (3,0 a 6,0 mm^2/s). Desta forma, os melhores resultados, numa análise geral, foram obtidos para um tempo espacial de 10 h, condição na qual as amostras de biodiesel apresentaram viscosidade cinemática de $(5,19 \pm 0,05) \text{ mm}^2/\text{s}$.

5.8.2. Influência do tempo espacial ascendente (Experimento 8)

A fim de verificar se a queda de rendimento observada foi causada pela mudança de tempo espacial e não pela perda de atividade do biocatalisador com o tempo, foi realizado um novo experimento nas mesmas condições do anterior. Como diferencial, iniciou-se a reação com um tempo espacial de 5 h durante os primeiros 7 dias e, em seguida, o tempo espacial foi alterado para 10 h durante os 13 dias seguintes. As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.15.

Tabela 5.15. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 8.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym® 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Porosidade do leito</i>	72,8 %
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	7,0 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,165 g/mL
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,4 – 0,2 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	2,32 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	5,0 – 10,0 h

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, rendimento de transesterificação e produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se na Tabela 5.16 e a Figura 5.23 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 20 dias de reação.

Figura 5.23. Rendimento de transesterificação para o experimento 8 (região 1: estabilização das condições; região 2: tempo espacial de 5 h; região 3: transição de mudança de tempo espacial; região 4: tempo espacial de 10 h).

Tabela 5.16. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 8).

Tempo (h)	Concentração (% g _{éster} /g _{meio})	Rendimento (%)	Produtividade (10 ⁻⁵ mol _{éster} /g _{cat} /min)
24	59,98	100,00	11,56
48	59,98	100,00	11,56
53	56,00	93,38	10,79
70	50,89	84,85	9,81
94	59,98	100,00	11,56
142	43,62	72,72	8,41
147	46,48	77,50	8,96
164	41,77	69,64	8,05
170	53,85	89,79	5,19
187	51,83	86,41	5,00
194	53,28	88,84	5,14
211	56,25	93,78	5,42
240	58,57	97,65	5,64
259	59,98	98,41	5,78
283	56,21	93,72	5,42
307	57,29	100,00	5,52
313	54,40	90,70	5,24
331	51,49	85,85	4,96
355	52,20	87,02	5,03
402	58,55	97,62	5,64
426	53,67	100,00	5,17
450	54,19	90,35	5,22
474	71,35	100,00	6,88

Para um tempo espacial inicial de 5 h foram obtidos rendimentos de $(83,01 \pm 11,95)\%$ e produtividades de $(9,60 \pm 1,38) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Elevando-se o tempo espacial para 10 h, foi observado um aumento de 13% no rendimento de transesterificação: $(94,15 \pm 5,13)\%$. Por outro lado, a produtividade sofreu um decréscimo de 43%, apresentando um valor médio de $(5,43 \pm 0,53) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Os valores médios de viscosidade cinemática obtidos foram de 6,99 e 5,32 mm^2/s nas condições para tempos espaciais de 5 e 10 h, respectivamente.

Desta forma, os resultados confirmaram que a queda de rendimento de transesterificação nos experimentos realizados está associada ao tempo de contato insuficiente entre os reagentes e a Novozym[®] 435 quando se altera o tempo espacial de 10 para 5 h e não à perda de atividade do biocatalisador com o tempo. A Tabela 5.17 resume o desempenho do sistema para tempos espaciais de 5 e 10 h na razão molar óleo de babaçu:etanol de 1:12.

Tabela 5.17. Concentração, rendimento e produtividade (Experimentos 7 e 8).

	Tempo espacial (h)	Concentração (% g/g)	Rendimento (%)	Produtividade ($10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$)
Exp. 7	5	$44,85 \pm 2,46$	$74,79 \pm 4,10$	$8,65 \pm 0,47$
	10	$57,09 \pm 2,21$	$95,07 \pm 3,48$	$5,50 \pm 0,21$
Exp. 8	5	$49,79 \pm 7,17$	$83,01 \pm 11,95$	$9,60 \pm 1,38$
	10	$56,35 \pm 5,54$	$94,15 \pm 5,13$	$5,43 \pm 0,53$
Médias	5	$47,55 \pm 5,90$	$79,27 \pm 9,83$	$9,17 \pm 1,14$
	10	$57,04 \pm 4,37$	$94,61 \pm 4,54$	$5,50 \pm 0,42$

Confirma-se, assim, um melhor desempenho do sistema de forma geral para um tempo espacial de 10 h, razão molar óleo de babaçu:etanol de 1:12 e 7,0 g de Novozym[®] 435, condições nas quais se obtiveram rendimentos em torno de 95%. No próximo item, encontram-se os resultados obtidos com mudança na razão molar entre os reagentes.

5.9. Influência da razão molar utilizando Novozym[®] 435 (Experimento 9)

Com o intuito de manter elevados rendimentos de transesterificação e ao mesmo tempo aumentar a concentração de biodiesel no meio de saída do reator, foi avaliada a razão

molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol) em comparação com a razão 1:12 usada nos experimentos anteriores. Iniciou-se a reação com um tempo espacial de 10 h durante os primeiros dez dias e, em seguida, o tempo espacial foi alterado para 5 h, sendo mantido nesse patamar durante os oito dias seguintes. Não houve mudança na configuração do aparato experimental, sendo que as principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.18.

Tabela 5.18. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 9.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:7 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym [®] 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Porosidade do leito</i>	72,8 %
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	7,0 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,165 g/mL
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,2 – 0,4 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	2,3 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	10,0 – 5,0 h

A Figura 5.24 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 18 dias de reação.

Figura 5.24. Rendimento de transesterificação para o experimento 9 (região 1: tempo espacial de 10 h; região 2: tempo espacial de 5 h).

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, rendimento de transesterificação e produtividade obtidos ao longo do tempo encontram-se na Tabela 5.19.

Tabela 5.19. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 9).

Tempo (h)	Concentração (% g_{éster}/g_{meio})	Rendimento (%)	Produtividade (10⁻⁵ mol_{éster}/g_{cat}/min)
48	54,09	73,74	5,21
64	42,84	58,40	4,13
72	48,64	66,31	4,69
88	43,83	59,76	4,22
95	47,54	64,81	4,58
115	53,08	72,36	5,12
141	51,82	70,64	4,99
162	52,14	71,09	5,03
168	53,35	72,74	5,14
185	48,41	66,00	4,67
192	50,57	68,94	4,87
209	49,21	67,09	4,74
216	49,90	68,03	4,81
233	51,79	70,61	4,99
257	42,83	58,39	8,26
264	37,24	50,76	7,18
282	41,43	56,48	7,99
306	42,97	58,58	8,28
330	38,41	52,36	7,40
336	43,93	59,89	8,47
352	46,98	64,05	9,06
360	43,82	59,73	8,45
376	40,44	55,13	7,80
400	41,19	56,16	7,94
408	37,66	51,35	7,26
427	42,13	57,43	8,12

Para os primeiros dez dias, em que o tempo espacial foi de 10 h, foram obtidos rendimentos de $(67,89 \pm 4,61) \%$ e produtividades de $(4,80 \pm 0,33) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Com a alteração do tempo espacial de 10 para 5 h, foi observada uma queda de 16% no rendimento de transesterificação: $(56,69 \pm 3,88) \%$. Em contrapartida, a produtividade foi aumentada em 67%, apresentando um valor médio com seu respectivo desvio-padrão de $(8,02 \pm 0,55) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Desta forma, pode-se dizer que os melhores resultados na razão molar 1:7 foram obtidos com o tempo espacial de 5 h, uma vez que a produtividade foi superior àquela conseguida com o tempo de 10 h. De qualquer forma, os resultados obtidos em relação aos rendimentos de transesterificação não foram satisfatórios, pois apresentaram valor médio inferior a 68%. Os próximos experimentos consistiram na verificação da influência da massa de biocatalisador empregado a melhor razão molar obtida

entre óleo de babaçu e etanol que foi de 1:12 (óleo:etanol). Buscou-se, também, verificar os limites dos valores de tempo espacial que ainda pudessem fornecer rendimentos de transesterificação elevados. Em todos os experimentos, foi utilizada a coluna para remoção de glicerol contendo 7,0 de Lewatit® GF202.

5.10. Influência da massa de Novozym® 435 e do tempo espacial

5.10.1. Influência do tempo espacial para 3,0 g de Novozym® 435 (Experimento 10)

Com o objetivo de estudar os limites de operação do sistema de produção de biodiesel com relação à massa de biocatalisador e o tempo espacial, foi realizado um experimento empregando 3,0 g de Novozym® 435 com variação nos valores do tempo espacial (6, 8, 10, 12 e 14 h). As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.20.

Tabela 5.20. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 10.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym® 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Porosidade do leito</i>	80,5 %
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	3,0 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,071 g/mL
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,33 – 0,26 – 0,20 – 0,17 – 0,14 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	7,3 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	6,0 – 8,0 – 10,0 – 12,0 – 14,0 h

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, rendimento de transesterificação e produtividade, obtidos ao longo do tempo, encontram-se na Tabela 5.21 e a Figura 5.25 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 26 dias de reação.

Figura 5.25. Rendimento de transesterificação para o experimento 10 (região 1: tempo espacial de 6 h; região 2: tempo espacial de 8 h; região 3: tempo espacial de 10 h; região 4: tempo espacial de 12 h; região 5: tempo espacial de 14 h).

Tabela 5.21. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 10).

Tempo (h)	Concentração (% g_{éster}/g_{meio})	Rendimento (%)	Produtividade (10⁻⁵ mol_{éster}/g_{cat}/min)
15	45,94	76,59	16,80
48	40,21	67,04	14,70
96	48,34	80,60	17,68
120	38,96	64,96	14,24
144	49,44	82,43	13,93
168	45,67	76,14	12,86
192	49,59	82,67	13,97
216	42,53	70,91	11,98
240	53,23	88,75	11,99
264	50,92	84,90	11,47
288	52,26	87,13	11,78
312	48,81	81,38	11,00
336	56,38	94,00	10,65
360	54,20	90,37	10,24
384	54,05	90,11	10,21
408	55,14	91,93	10,41
456	57,50	95,86	9,15
504	54,19	90,34	8,62
552	56,51	94,21	8,99
600	57,90	96,54	9,21
624	55,87	93,14	8,89

Para um tempo espacial inicial de 6 h, foram obtidos rendimentos de $(72,30 \pm 9,98)\%$ e produtividades de $(15,85 \pm 2,49) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Pôde-se observar que os valores de rendimento acompanharam o aumento nos tempos espaciais, chegando a um valor de $(94,02 \pm 0,28)\%$, que correspondeu a um acréscimo de 30% em relação ao valor inicial. Por outro lado, a produtividade sofreu um decréscimo final de 43%, mostrando uma tendência de queda à medida que o tempo espacial era aumentado. Para 14 h de tempo espacial, o valor de produtividade obtido foi de $(8,97 \pm 1,23) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. O valor médio de viscosidade cinemática obtido nessa condição foi de $5,85 \text{ mm}^2/\text{s}$.

5.10.2. Influência do tempo espacial para 5,0 g de Novozym® 435 (Experimento 11)

Objetivando-se aumentar o desempenho do sistema, foi realizado um experimento empregando 5,0 g de Novozym® 435 com variação nos valores do tempo espacial (6, 8 e 10 h). As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.22.

Tabela 5.22. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 11.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym® 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Porosidade do leito</i>	78,1 %
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	5,0 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,118 g/mL
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,34 – 0,26 – 0,20 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	3,2 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	6,0 – 8,0 – 10,0 h

Os valores em concentração de ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, rendimento de transesterificação e produtividade, obtidos ao longo do tempo, encontram-se na Tabela 5.23 e a Figura 5.26 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 20 dias de reação.

Figura 5.26. Rendimento de transesterificação para o experimento 11 (região 1: tempo espacial de 6 h; região 2: tempo espacial de 8 h; região 3: tempo espacial de 10 h).

Tabela 5.23. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 11).

Tempo (h)	Concentração (% g_{éster}/g_{meio})	Rendimento (%)	Produtividade (10⁻⁵ mol_{éster}/g_{cat}/min)
48	56,61	94,38	12,76
72	52,52	87,56	11,83
96	53,75	89,61	12,11
120	56,05	93,45	12,63
144	58,46	97,46	13,17
168	53,18	88,66	11,98
192	56,86	94,80	12,81
216	59,17	98,65	10,00
240	59,98	100,00	10,14
264	58,11	96,89	9,82
288	59,98	100,00	10,14
312	56,17	93,64	9,49
336	59,98	100,00	10,14
360	58,41	97,38	9,87
384	57,06	95,13	7,71
408	59,98	100,00	8,11
432	59,98	100,00	8,11
456	58,04	96,76	7,85
480	59,98	100,00	8,11

Para um tempo espacial inicial de 6 h, foram obtidos rendimentos de $(92,27 \pm 3,68)\%$ e produtividades de $(12,47 \pm 0,50) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Sob os tempos espaciais de 8 e 10 h, os rendimentos de transesterificação obtidos foram semelhantes, apresentando um valor

médio ligeiramente superior a 98%, com queda de 20% da produtividade em ésteres etílicos ao se alterar o tempo espacial de 8 para 10h. Assim, para 5,0 g de Novozym[®] 435, o melhor resultado foi observado no tempo espacial de 8 h, condição na qual obtiveram-se rendimento de transesterificação de $(98,08 \pm 2,35)\%$ e produtividade em ésteres de $(9,94 \pm 0,24) \cdot 10^{-5}$ mol_{éster}/g_{cat}/min. Os valor médio de viscosidade cinemática obtido nessa condição foi de 5,01 mm²/s.

5.10.3. Influência do tempo espacial para 7,0 g de Novozym[®] 435 (Experimento 12)

Neste último experimento, foram utilizados novamente 7,0 g de Novozym[®] 435 a fim de verificar o mínimo valor de tempo espacial capaz de fornecer elevados rendimentos de transesterificação e comparar a produtividade em ésteres com as obtidas nas condições em que se empregou menores quantidades do biocatalisador. As principais informações referentes ao novo ensaio são mostradas na Tabela 5.24.

Tabela 5.24. Principais parâmetros e informações referentes ao Experimento 12.

<i>Parâmetro</i>	<i>Especificação</i>
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Meio reacional</i>	Óleo de babaçu:etanol 1:12 (mol:mol)
<i>Catalisador</i>	Novozym [®] 435
<i>Volume do reator</i>	42,4 mL
<i>Porosidade do leito</i>	72,8 %
<i>Massa de enzima imobilizada</i>	7,0 g
<i>Carregamento catalítico</i>	0,165 g/mL
<i>Vazão de alimentação e coleta de produto</i>	0,20 – 0,25 – 0,33 mL/min
<i>Vazão de recirculação</i>	2,3 mL/min
<i>Tempo espacial</i>	6,0 – 8,0 – 10,0 h

Os valores de concentração em ésteres etílicos presentes no meio de saída do reator, rendimento de transesterificação e produtividade, obtidos ao longo do tempo, encontram-se na Tabela 5.25 e a Figura 5.27 mostra uma visão geral do progresso da reação com relação ao rendimento de transesterificação durante os 27 dias de reação.

Figura 5.27. Rendimento de transesterificação para o experimento 12 (região 1: tempo espacial de 6 h; região 2: tempo espacial de 8 h; região 3: tempo espacial de 10 h).

Tabela 5.25. Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo (Experimento 12).

Tempo (h)	Concentração (% g _{éster} /g _{meio})	Rendimento (%)	Produtividade (10 ⁻⁵ mol _{éster} /g _{cat} /min)
24	57,17	95,32	8,93
48	51,83	86,41	8,10
72	54,13	90,24	8,46
96	52,83	88,08	8,25
120	48,66	81,13	7,60
168	50,05	83,44	7,82
192	50,59	84,35	7,90
216	55,27	92,14	8,63
240	54,72	91,23	6,48
264	52,99	88,35	6,27
288	59,59	99,35	7,05
312	59,09	98,51	6,99
336	59,98	100,00	7,10
384	57,75	96,29	6,84
408	59,48	99,17	7,04
432	59,98	100,00	7,10
456	59,98	100,00	5,68
480	57,36	95,64	5,43
504	55,39	92,35	5,24
528	58,97	98,32	5,58
576	59,98	100,00	5,68
600	58,31	97,21	5,52
624	59,98	100,00	5,68
648	57,64	96,10	5,46

Para um tempo espacial inicial de 6 h, foram obtidos rendimentos de $(88,29 \pm 4,86)\%$ e produtividades de $(8,27 \pm 0,46) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. Com 10 h de tempo espacial, o valor de rendimento foi apenas 2% maior quando comparado com o de 8 h (97,74% e 95,91%). A produtividade, entretanto, apresentou uma queda de 19% quando o tempo espacial foi alterado de 8 para 10 h. Diante desses resultados, pode-se concluir que, utilizando-se 7,0 g de Novozym[®] 435, o melhor desempenho foi obtido com tempo espacial de 8 h, condição na qual obteve-se uma produtividade em ésteres de $(6,81 \pm 0,33) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$. O valor médio de viscosidade cinemática obtido nessa condição foi de $5,15 \text{ mm}^2/\text{s}$.

5.11. Análise global dos experimentos utilizando Novozym® 435

Um resumo das principais condições e resultados obtidos nos experimentos realizados com Novozym® 435 encontra-se na Tabela 5.26.

Tabela 5.26. Resumo dos principais resultados obtidos nos experimentos com Novozym® 435.

Experimento	6	7 / 8	9	10	11	12
Razão molar óleo de babaçu:etanol	1:12	1:12	1:7	1:12	1:12	1:12
Novozym® 435 (g)	7,0	7,0	7,0	3,0	5,0	7,0
Alimentação (mL/min)	0,19	0,20 0,40	0,20 0,40	0,33		
				0,26	0,34	0,33
				0,20	0,26	0,25
				0,17	0,20	0,20
				0,14		
Recirculação (mL/min)	2,32	2,32	2,32	7,31	3,20	2,32
Porosidade do leito (%)	72,8	72,8	72,8	80,5	78,1	72,8
Tempo espacial (h)	10	10 5	10 5	6		
				8	6	6
				10	8	8
				12	10	10
				14		
Rendimento (%)	98,95	94,61 79,27	67,89 56,69	72,30		
				78,04	92,27	88,29
				85,54	98,08	95,91
				91,60	98,38	97,74
				94,02		
Produtividade (10⁻⁵ mol/g_{cat}/min)	5,33	5,50 9,17	4,80 8,02	15,85		
				13,18	12,47	8,27
				11,56	9,94	6,81
				10,38	7,98	5,55
				8,97		

Os resultados obtidos nos primeiros ensaios com Novozym® 435 (Experimentos 6, 7, 8 e 9) mostraram um melhor desempenho quando utilizaram-se razão molar óleo de babaçu:etanol de 1:12 e tempo espacial de 10 h. Os ensaios seguintes (Experimentos 10, 11 e 12) foram realizados com a melhor condição de razão molar obtida anteriormente (1:12) e a influência dos parâmetros tempo espacial e massa de biocatalisador sobre o rendimento e a produtividade foi, então, investigada. A Figura 5.28 mostra uma comparação dos melhores resultados obtidos para cada condição de massa de biocatalisador utilizada.

Figura 5.28. Comparação dos valores de rendimento de transesterificação e produtividade para os melhores resultados obtidos nos experimentos com 3, 5 e 7 g de Novozym® 435.

A medida da produtividade indica o potencial de um dado sistema. Exemplos extraídos da literatura têm demonstrado que muitos processos contínuos somente alcançam produtividades elevadas à custa do decréscimo da taxa de conversão do substrato (altas concentrações de substrato não convertido) ou baixa concentração do produto formado. Em se tratando de uma escala industrial, o ideal seria a adoção de um sistema que apresentasse uma boa produtividade aliada a pequenas perdas de matéria-prima. Neste contexto, o melhor desempenho foi alcançado empregando substrato na razão molar óleo:etanol de 1:12, tempo espacial de 8,0 h e 5,0 g de biocatalisador. Nestas condições, obteve-se um rendimento médio de transesterificação de $(98,1 \pm 2,4)\%$, produtividade em ésteres de $(9,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{cat}}/\text{min}$ e as amostras de biodiesel apresentaram viscosidade cinemática média de $5,01 \text{ mm}^2/\text{s}$.

5.12. Qualidade do biodiesel

Sabe-se que é de fundamental importância relacionar a estrutura química e os teores de cada uma das substâncias presentes na matéria-prima, pois estas refletirão não só nas propriedades físico-químicas do biocombustível, mas poderão afetar a queima no motor, a formação de depósitos no sistema de injeção e ainda o tipo e a quantidade de substâncias ou gases poluentes emitidos.

Algumas propriedades referentes à qualidade do biodiesel obtido com óleo de babaçu foram estimadas por modelos empíricos, por se tratar de um método rápido e fácil que serve de base para uma análise preliminar sobre a viabilidade ou não do seu uso como matéria-prima para a produção de um biodiesel que atenda completamente às especificações de qualidade. Os resultados são mostrados na Tabela 5.27.

Tabela 5.27. Parâmetros de qualidade do biodiesel estimados por modelos empíricos.

Parâmetro	Resultado
Índice de Saponificação (IS)	257,1
Índice de Iodo (II) g(I ₂)/100 g	16,9
Grau de insaturação (GI) %	18,8
Fator do comprimento da cadeia (FCC) %	2,5
Ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) °C	- 8,5
Índice de Cetano (IC)	63,7

O valor do índice de cetano estimado (63,7) foi superior ao das normas para biodiesel, que prescrevem um mínimo de 47 (ASTM D6751) ou 51 (EN 14214) (KNOTHE, 2005). Com relação ao índice de iodo, a norma EN 14214, uma das mais rigorosas nesse quesito, requer um valor máximo de 120 g(I₂)/100 g(biodiesel) e o valor de 16,9 estimado encontra-se num patamar bastante seguro. Para o PEFF, o valor de 8,5 °C negativos é excelente, uma vez que as normas brasileiras exigem, no caso mais extremo, um valor mínimo de 5 °C. Diante dos resultados obtidos, o óleo de babaçu mostra um excelente potencial para produção de biodiesel que atenda aos requisitos necessários referentes ao índice de iodo, ponto de entupimento de filtro a frio e número de cetano.

Outros parâmetros da qualidade do biodiesel foram obtidos para as amostras de biodiesel oriundas do experimento no qual foi verificado melhor desempenho: substrato na razão molar óleo:etanol de 1:12, tempo espacial de 8,0 h e 5,0 g de Novozym[®] 435. Os resultados são mostrados na Tabela 5.28.

Tabela 5.28. Parâmetros de qualidade do biodiesel obtidos para amostras de biodiesel nas melhores condições reacionais.

Parâmetro	Resultado
Aspecto	Transparente, levemente amarelado
Teor de éster (% massa)	97,1 ± 1,3
Massa específica a 20 °C (kg/m ³)	872 ± 4
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² /s)	4,86 ± 0,37
Monoacilglicerol (% massa)	1,4 ± 0,3
Diacilglicerol (% massa)	1,0 ± 0,2

Embora os índices de monoacilglicerol e diacilglicerol estejam acima dos limites requeridos pelas normas brasileiras (0,8 e 0,2 %, respectivamente), os resultados, de uma forma geral, são satisfatórios, uma vez que melhorias no processo de purificação, como a utilização da Lewatit[®] GF202, podem ser alcançadas. Além disso, o biodiesel de babaçu não precisa necessariamente ser empregado como única fonte de ésteres em um biocombustível. Ele pode ser utilizado numa mistura com ésteres de outras fontes de biodiesel com o intuito de melhorar algumas propriedades como, por exemplo, a estabilidade à oxidação devido à sua baixa composição em ácidos graxos insaturados. Concomitantemente, outros parâmetros, que não estariam dentro das normas exigidas, se fosse utilizado somente o biodiesel de babaçu, podem ser compensados, resultando em um biocombustível com melhores propriedades e que atenda às especificações requeridas.

6. CONCLUSÕES

O presente projeto teve como objetivo o aprimoramento da tecnologia enzimática de transesterificação de óleos vegetais pela rota etílica, buscando a maximização do desempenho da síntese de biodiesel em reator de leito fluidizado. A proposta inicial correspondeu à transesterificação do óleo de babaçu com etanol mediada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada matriz híbrida SiO₂-PVA e, posteriormente, foi utilizada a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em suporte acrílico (Novozym[®] 435). O conjunto de experimentos realizados no âmbito deste trabalho permitiu a identificação das principais limitações, resultando em uma visão mais evidente dos pontos cruciais para o sucesso de produção de biodiesel no sistema proposto. Os resultados obtidos foram satisfatórios e, com base nos dados relatados, pôde-se concluir que:

- É possível operar de forma estável um sistema contínuo para obtenção de biodiesel por via enzimática empregando uma configuração de reator de leito fluidizado com substratos contendo óleo de babaçu e etanol na ausência de solventes;
- Nos experimentos com a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, a razão molar entre óleo de babaçu e etanol e o tempo espacial do reator não foram variáveis que interferiram de forma expressiva no desempenho do reator com relação aos parâmetros rendimento e produtividade, devido ao caráter hidrofílico do suporte, que causou adsorção de glicerol formado como sub-produto. Mesmo com mudanças nessas variáveis não foram obtidos rendimentos elevados e o melhor desempenho foi alcançado quando se utilizaram os reagentes óleo:etanol na razão molar de 1:12, tempo espacial de 9,3 h e coluna extratora de glicerol contendo a resina Lewatit[®] GF202. Nestas condições, obteve-se um rendimento médio de transesterificação de 53,0%, produtividade de $9,3 \cdot 10^{-6} \pm 3,1$ mol_{éster}/g_{cat}/min e tempo de meia-vida do biocatalisador de 18 dias;

- Ao empregar-se Novozym[®] 435 como catalisador, em um sistema que incluiu uma coluna extratora de glicerol contendo a resina Lewatit[®] GF202, foi verificado um melhor desempenho do sistema quando comparado à lipase imobilizada em SiO₂-PVA. A influência das variáveis razão molar entre os reagentes, tempo espacial e massa de biocatalisador foi avaliada, tomando-se por base os parâmetros rendimento de transesterificação e produtividade. Os melhores resultados foram alcançados quando se empregou substrato na razão molar óleo:etanol de 1:12, tempo espacial de 8,0 h e 5,0 g de biocatalisador. Nestas condições, obteve-se um rendimento médio de transesterificação de $(98,1 \pm 2,4)\%$ e produtividade em ésteres de $(9,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$ mol_{éster}/g_{cat}/min. As amostras de biodiesel apresentaram viscosidade cinemática média de 5,01 mm²/s, enquadrando-se nas normas brasileiras (Regulamento Técnico ANP n°4/2012), que estabelece que a viscosidade cinemática do B100 deve situar-se na faixa entre 3,0 e 6,0 mm²/s.
- No teste de expansão de leito com Novozym[®] 435, os resultados mostraram que a velocidade mínima de fluidização correspondeu à vazão mínima de 1,31 mL/min. Para a determinação experimental do tempo médio de residência dos reagentes no reator utilizado, τ , bem como para a caracterização da mistura no leito reacional, foi realizado um teste de traçador tipo pulso. O valor de τ calculado no teste de traçador com Novozym[®] 435 foi 37% superior ao tempo espacial calculado pela razão entre o volume útil do reator e a vazão volumétrica sobre a seção da coluna, que foi de 5,39 h, demonstrando a possível existência de zonas mortas ou retromistura no sistema reacional. Usando o modelo de tanques em série, o perfil de escoamento pôde ser descrito como correspondente ao comportamento de um reator de tanque agitado contínuo ideal, no qual a concentração de qualquer substância na corrente efluente é igual à concentração em todo o reator. Para caracterizar o escoamento no reator, o número de Reynolds foi calculado e o valor de 0,03 revelou regime de escoamento laminar. O número adimensional de Froude obtido foi de $3,5 \cdot 10^{-5}$, caracterizando a fluidização como particulada ou homogênea.

- As amostras de biodiesel resultantes da melhor condição obtida (razão molar óleo:etanol de 1:12, tempo espacial de 8,0 h e 5,0 g de biocatalisador) foram caracterizadas com relação a alguns parâmetros de qualidade: teor de éster de 97,1%; massa específica a 20 °C de 872 kg/m³; viscosidade cinemática a 40 °C de 4,86 mm²/s; 1,4% em massa de monoacilglicerol; e 1,0% em massa de diacilglicerol. Outros parâmetros foram estimados por modelos teóricos, visando à predição da qualidade do biodiesel obtido do óleo de babaçu: 64 para o número de cetano; 257 para o índice de saponificação; 17 gI₂/100g para o índice de iodo; e – 8,5 ° C para o ponto de entupimento de filtro a frio.

De maneira geral, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios e contribuíram para o estabelecimento de condições reacionais e operacionais para a produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado, utilizando etanol e óleo de babaçu como materiais de partida em meio isento de solventes.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função dos resultados obtidos neste trabalho e com o intuito de aprimorar a tecnologia de produção enzimática de biodiesel, sugere-se:

- Avaliar a utilização de outras fontes de triglicerídeos.
- Testar outros compostos para remoção de glicerol, como Magnesol[®], sílica e casca de arroz;
- Avaliar a produção enzimática de biodiesel em sistema com reator de leito fluidizado sem recirculação;
- Estudar a obtenção de enzimas imobilizadas com propriedades magnéticas e com atividade de síntese e estabilidade operacional elevadas para sua utilização em reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado.

REFERÊNCIAS

- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.
- ALBIERO, D.; MACIEL, A. J. S.; LOPES, A. C.; MELLO, C. A.; GAMERO, C. A. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 3, p. 337-346, 2007.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso em: 19 ago. 2013.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. Biodiesel separation and purification: A review. **Renewable Energy**, v.36, p. 437-443, 2011.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, p. 1815-1835, 2010.
- BALCÃO, 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.
- BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: BARON, G. V., WILLAERT, R. G., BACKER. **Immobilised living cell systems: Modeling and Experimental Methods**. Chichester: John Wiley, 1996. p. 67-95.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, p.486–493, 1998.
- BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas potenciais do nordeste para a produção de biodiesel**. Campina Grande: EMBRAPA, 2007.
- BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.
- CHANG, SW.; SHAW, JF.; YANG, CK.; SHIEH, CJ. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1362-1366, 2007.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Petrópolis, RJ: EPUB, 2008. p. 72.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; PEREIRA, P. S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123-147.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1983-1991, 2009.

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, p. 194-200, 1999.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A. Review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1298-1315, 2009.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 853 p.

FRANCISCO, J. C.; GOUCH, S. P.; DEY, E. S. Use of lipases in the synthesis of structure lipids in supercritical carbón dioxide. INDUSTRIAL enzymes, Polaina J.; MacCabe, A.P., eds. Dordrecht: Springer, 2007, Cap. 20, p. 341-354.

FREEDMAN, B.; BAGBY, M. O. Heats of combustion of fatty esters and triglycerides. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 66, p. 1601-1605, 1989.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, p.48-56, 2000.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp), **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 78-90, 2010.

GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, p. 1646-1653, 2008.

GUISAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. p. 1-13.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. 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. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HARRIS, A. T.; DAVIDSON, J. F.; THORPE, R. B. Particle residence time distributions in circulating fluidised beds. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 3669-3680, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A. HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A. 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.

INGERSOLL, C. M.; BRIGHT, F. V. Using sol-gel-based platforms for chemical sensors. **Chemtech**, v. 27, p. 26-31, 1997.

KANSEDO, J. L.; LEE, K. T.; BHATIA, S. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Fuel**, v. 88, p. 1148-1150, 2009.

KENNEDY, J. F.; MELO E. H. M.; JUMEL, K. Immobilized enzymes and cells. **Chemical Engineering Program**, v. 86, p. 81-89, 1990.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Immobilized Enzymes. In: SOLID phase biochemistry - analytical and synthetic aspects. New York: John Wiley, 1983.

KENNEDY, J. F.; ROIG, M. G. Principles of Immobilization of Enzymes, In: HANDBOOK of enzyme biotechnology, A. Wiseman, T.J. Press (Ed.). 3rd ed. London: Ellis Horwood, 1995, p. 235, 246, 249.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, p. 364-373, 2010.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. **Fuels Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, p. 971-975, 2003.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do biodiesel**, São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KRISNANGKURA, K. a simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 63, n. 4, p. 552-553, 1986.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083-1095, 2010.

LEVENSPIEL, O. Engenharia das reações químicas. 3 ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 2000.

JOSÉ, M. N.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânicos e inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, p. 281-288, 2005.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS JR., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LOTTI, M. ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J.; MACCABE, A.P. **Industrial Enzymes**: structure, function and application. Valencia: Springer, 2007, cap. 16, p. 263-281.

LIU, C. Z.; WANG, F.; OU-YANG, F. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 878-882, 2009.

LU, J.; NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1367-1370, 2007.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, p. 334-340, 2009.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARTY, A.; DOSSAT, V.; CONDORET, J. S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: influence of the production of hydrophilic compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 232-237, 1997.

MENDES, A. A.; BARABOSA, B. C. M., SILVA, M. L. C. P.; DE CASTRO H. F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 5, p. 393-400, 2007.

MOREIRA, A.B.R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. Dissertação (Mestrado). Programa de Engenharia Química, Escola de Engenharia Química – USP. Lorena-SP, 120p., 2007.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.

MURUGESAN, A.; UMARANI, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 653-662, 2009.

NIE, K. L.; XIE, F.; WANG, F. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 142-147, 2006.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **Europe Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 692-700, 2008.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5146-5154, 2009.

OLIVEIRA, J. S.; LEITE, P. M.; SOUZA, L. B.; MELLO, V. M.; SILVA, E. C.; RUBIM, J. C.; MENEGHETTI, S. M. P.; SUAREZ, P. A. Z. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 449-453, 2009.

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, p. 82-93, 2009.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Tecbio, 68 p., 2003.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane- polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281-288, 2007.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PAULA, A. V. ; NUNES, G. F. M. ; SILVA, J. L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1146-1156, 2009.

PEREZ, V. H.; SILVA, G. S.; GOMES, M. G.; DE CASTRO, H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 13-19, 2007.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1313-1330, 2005.

QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, p. 41-46, 2008.

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 P&D&I opportunities and tasks. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

REETZ, M. T. Practical protocols for lipase immobilization via sol- gel techniques. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006, cap. 6, p. 65-76.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

RIBEIRO, M. F.; PEIXOTO, J. A. A.; SOUZA, C. G.; O biodiesel no contexto do desenvolvimento sustentável: um estudo exploratório. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. A integração de cadeias produtivas com a abordagem da manufatura sustentável, 28., 2008, Rio de Janeiro.

RICCA, E.; PAOLA, M. G.; CALABRO, V.; CURCIO, S.; IORI, G. Olive husk oil transesterification in a fluidized bed reactor with immobilized lipases. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 4, p. 365-368, 2009.

RICHARDSON, J. H.; ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidisation – Part I. **Transactions Institution Chemical Engineers**, v. 32, p. 35-53, 1954.

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.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Use of lipases for the production of biodiesel. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes: structure, function and application**. Valencia: Springer, 2007, cap. 19, p. 317-339.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporus polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19-26, 2008.

SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A. Bioenergetics of xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in fluidized bed reactor. Effect of the aeration rate, **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1210-1215, 2003.

SANTOS, J. C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 2005. 199 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

SANTOS, J. C.; PAULA, A.V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. M.; De CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane polyvinyl alcohol prepared by sol gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, p. 4823-4826, 2008a.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G.M.; DECASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008b.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SCHMID, A.; HOLLMAN, F.; PARK, J. B.; BUHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 359-366, 2002.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 61-70, 2011.

SHAW, J. F.; CHANG, S. W.; LIN, S. C. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym® 435. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008.

SHCHIPUNOV, Y. A. Sol-gel derived biomaterials of silica and carrageenans. **Journal of Colloidal and Interfaces Science**, v. 268, p. 68-76, 2003.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SILVA, W. C. **Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

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. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SLOTEMA, W. F.; SANDOVAL, G.; GUIEYSSE, D.; STRAATHOF, A. J. J.; MARTY, A. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, p. 664–669, 2003.

SMITHA, S.; SHAJESH, P.; MUKUNDAN, P.; WARRIER, K.G.K. Sol-gel synthesis of biocompatible silica-chitosan hybrids and hydrophobic coatings. **Journal of Materials Research**, v. 23, p. 2053-2060, 2008.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 745-757, 1999.

SUAREZ, P. A. Z.; MENENGHITTI, S.M.P. 70º Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, B. M. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 768-775, 2009.

TANG, H.; WANG, A.; SALLEY, S. O.; SIMON, K. Y. N. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 373-382, 2008.

TERRANOVA, B. E.; BURNS, M. A. Continuous cell-suspension processing using magnetically stabilized fluidized-beds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 2, p. 110-120, 1991.

VASUDESAN, P.T.; BRIGGS, M. Biodiesel production - current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 421–430, 2008.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A., BIAGGIO, F. C., DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008.

WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 425-430, 1994.

WATANABE, T.; SUGIURA, M.; SATO, M.; YAMADA, N.; NAKANISHI, K. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 637-643, 2004.

WEEB, C.; KANG, H. K.; MOFFAT, G.; WILLIAMS, R. A.; ESTÉVEZ, A. M.; CUÉLLAR, J.; JARAIZ, E.; GALÁN, M. A. The magnetically stabilized fluidized bed bioreactor: a tool for improved mass transfer in immobilized enzyme systems? **The Chemical Engineering Journal**, v. 61, p. 241-246, 1996.

WINAYANUWATTIKUN, P.; KAEWPIBOON, C.; PIRIYAKANANON, K.; TANTONG, S.; THAKERNKARNKIT, W.; CHULALAKSANANUKUL, W.; YONGVANICH, T. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1279-1286, 2009.

XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 799-805, 2009.

(YE, M.; VAN DER HOEF, M. A.; KUIPERS, J. A. M. The effects of particle and gas properties on the fluidization of Geldart A particles. *Chemical Engineering Science*, v. 60, p. 4567-4580, 2005.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. 1989. 454 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 1989.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p. 35-85.

ZENG, L.; LUO, K.; GONG, Y. Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 38, p. 24-30, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo para os testes iniciais de operação do sistema proposto (Experimento 1).

Tempo (h)	Concentração (100. g_{éster}.g_{meio}⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹)
48	44,94	61,26	30,36
96	33,93	46,26	22,93
120	28,67	39,09	19,37
144	33,05	45,06	22,33
168	28,24	38,50	19,08
216	26,49	36,12	17,90
264	27,41	37,36	18,52
288	36,62	49,92	24,74
312	34,87	47,53	23,56
336	25,04	34,13	16,92
360	24,86	33,89	16,80
384	30,36	41,39	20,52
408	29,79	40,61	20,13
432	23,81	32,46	16,09
456	24,53	33,44	16,57
480	31,60	43,08	21,35
504	23,76	32,39	16,05
528	23,95	32,65	16,18
552	23,27	31,72	15,72
552	23,27	31,72	15,72
624	34,01	46,36	22,98
624	34,01	46,36	22,98
672	25,72	35,06	17,38
696	23,23	31,67	15,70

APÊNDICE B – Valores de absorvância e concentração para diversas diluições do corante utilizados no teste de traçador tipo pulso referentes ao primeiro experimento reacional.

<i>Diluições</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Concentração (g/mL)</i>
150	1,5505	0,00011689
200	1,1903	0,00008767
300	0,7998	0,00005845
400	0,6861	0,00004383
600	0,4945	0,00002922
800	0,3435	0,00002192
1200	0,2046	0,00001461
1600	0,1701	0,00001096
2000	0,1431	0,00000877
2500	0,1146	0,00000701
5000	0,0705	0,00000351

APÊNDICE C – Concentração das amostras segundo modelo matemático da calibração.

<i>Amostra</i>	<i>Absorbância</i>	<i>Concentração (g/mL)</i>
1 h	0,5271	0,0002209889
2 h	0,5361	0,0002250820*
3 h	0,5301	0,0002223533*
4 h	0,4388	0,0001808307
5 h	0,4163	0,0001705979
6 h	0,4034	0,0001647311
7 h	0,3802	0,0001541799
8 h	0,3739	0,0001513147
9 h	0,3461	0,0001386714
10 h	0,3107	0,0001225718
11 h	0,3021	0,0001186606
12 h	0,2679	0,0001031067
13 h	0,2533	0,0000964667
14 h	0,2260	0,0000840508
15 h	0,2193	0,0000810037
16 h	0,2385	0,0000897358*
17 h	0,2178	0,0000803215
18 h	0,1922	0,0000686789
19 h	0,1810	0,0000635852
20 h	0,1732	0,0000600378
21 h	0,1544	0,0000514877
22 h	0,1499	0,0000494411
23 h	0,1494	0,0000492137
24 h	0,1471	0,0000481677
25 h	0,1245	0,0000378894
26 h	0,174	0,0000604016*
27 h	0,1085	0,0000306127
28 h	0,1059	0,0000294302
29 h	0,0970	0,0000253826
30 h	0,0943	0,0000241547
31 h	0,0790	0,0000171963

*Valores excluídos na construção do modelo matemático para o gráfico de concentração *versus* tempo.

APÊNDICE D – Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo para o segundo experimento realizado.

Tempo (h)	Concentração (100. g_{éster}.g_{meio}⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹)
24	14,34	23,91	11,49
48	14,66	24,44	11,75
96	18,47	30,80	14,80
120	15,41	25,70	12,35
144	15,81	26,35	12,66
168	14,27	23,79	11,44
216	14,69	21,81	11,77
264	17,91	26,59	14,35
288	13,81	20,51	11,07
312	14,80	21,97	11,86
336	15,39	22,85	12,33
360	16,17	24,00	12,95
480	15,21	18,89	12,19
504	15,32	19,03	12,28
528	15,91	19,76	12,75

APÊNDICE E – Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo no experimento da influência do tempo espacial.

Tempo (h)	Concentração (100. g_{éster}.g_{meio}⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹)
12	50,23	68,48	18,60
24	45,65	62,23	16,91
36	44,88	61,18	16,62
48	44,69	60,93	16,55
60	39,67	54,08	14,69
108	41,92	57,15	15,53
120	41,11	56,05	15,23
132	32,76	44,66	12,13
144	48,89	66,65	18,11
160	34,18	46,60	12,66
172	38,39	52,33	14,22
184	35,60	48,54	13,19

APÊNDICE F – Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo referentes ao experimento da influência da razão molar para 27 h de tempo espacial.

Tempo (h)	Concentração (100. g_{éster}.g_{meio}⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹)
12	28,85	48,10	10,68
24	35,34	58,92	13,09
36	34,90	58,19	12,93
48	29,22	48,72	10,82
72	34,76	57,96	12,87
96	41,69	69,52	15,44
108	41,54	69,26	15,38
120	39,25	65,44	14,54
132	28,64	47,75	10,61
144	31,03	51,74	11,49
168	36,52	60,89	13,53
192	23,03	38,40	8,53
216	27,41	45,69	10,15
240	27,08	45,14	10,03
264	30,53	50,90	11,31
288	28,16	46,95	10,43

APÊNDICE G – Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo referentes ao experimento da influência do tempo espacial na razão molar 1:12.

Tempo (h)	Concentração (100. g_{éster}.g_{meio}⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹)
24	37,98	63,33	40,93
36	35,88	59,82	38,66
48	34,64	57,76	37,33
60	29,54	49,26	31,84
72	38,55	64,27	41,54
96	32,93	54,91	35,49
120	33,24	55,43	35,82
132	31,88	53,15	34,35
144	31,20	52,02	33,62
156	29,74	49,59	32,05
168	30,68	51,15	33,06
180	28,37	47,30	30,57
192	29,38	48,98	31,66
204	26,05	43,43	28,07
216	29,21	48,71	31,48
230	28,98	48,32	31,23

APÊNDICE H – Concentração, rendimento e produtividade ao longo do tempo referentes ao experimento com Novozym® 435.

Tempo (h)	Concentração (100. g_{éster}.g_{meio}⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹)
24	57,86	96,48	62,35
36	59,98	100,00	67,16
60	59,98	100,00	66,98
84	59,98	100,00	72,56
96	58,54	97,61	63,09
108	59,98	100,00	65,87
120	58,77	97,98	63,32
132	59,98	100,00	68,38
144	58,56	97,63	63,10
156	59,98	100,00	70,02
168	59,98	100,00	69,85
180	59,98	100,00	70,44
192	57,22	95,40	61,66
204	58,01	96,72	62,51
228	59,98	100,00	66,42
252	59,98	100,00	69,20
264	59,74	99,61	64,38
276	59,98	100,00	68,07
300	59,42	99,07	64,03
312	58,84	98,10	63,40
348	59,98	100,00	65,34

APÊNDICE I – Tempo espacial e porosidade do leito para cada condição de massa de biocatalisador utilizada no teste de expansão de leito.

Tabela I – Tempo espacial e porosidade do leito para 1,0 g de biocatalisador.

Marcação na bomba	Vazão (mL/min)	h (cm)	V _{reator} (mL)	V _{útil} (mL)	τ (min)	ε	ln(u)	ln(ε)
1	0,40	3,8	4,24	2,79	7,08	0,659	-1,05	-0,42
2	1,38	3,8	4,30	2,85	2,07	0,664	0,20	-0,41
3	2,41	4,4	4,92	3,47	1,44	0,706	0,76	-0,35
4	3,20	4,7	5,32	3,87	1,21	0,728	1,04	-0,32
5	4,08	5,0	5,65	4,21	1,03	0,744	1,28	-0,30
6	5,03	5,5	6,22	4,77	0,95	0,768	1,49	-0,26
7	5,93	6,0	6,79	5,34	0,90	0,787	1,66	-0,24
8	6,85	6,7	7,52	6,07	0,89	0,808	1,80	-0,21
9	8,12	7,2	8,14	6,70	0,82	0,822	1,97	-0,20

Linearização da equação de Richardson e Zaki para 1,0 g de enzima imobilizada: $n = 8,2$ e $u_{tc} = 36,8$ cm/min.

Tabela II – Tempo espacial e porosidade do leito para 3,0 g de biocatalisador.

Marcação na bomba	Vazão (mL/min)	h (cm)	V _{reator} (mL)	V _{útil} (mL)	τ (min)	ε	ln(u)	ln(ε)
1	0,40	11,5	13,01	8,67	21,94	0,666	-1,05	-0,41
2	1,38	11,7	13,23	8,89	6,46	0,672	0,20	-0,40
3	2,41	14,3	16,12	11,78	4,88	0,731	0,76	-0,31
4	3,20	16,0	18,04	13,70	4,28	0,759	1,04	-0,28
5	4,08	17,8	20,07	15,74	3,86	0,784	1,28	-0,24
6	5,03	19,5	22,05	17,71	3,52	0,803	1,49	-0,22
7	5,93	22,0	24,82	20,49	3,46	0,825	1,66	-0,19
8	6,85	24,5	27,65	23,31	3,40	0,843	1,80	-0,17
9	8,12	27,2	30,76	26,42	3,25	0,859	1,97	-0,15

Linearização da equação de Richardson e Zaki para 3,0 g de enzima imobilizada: $n = 7,2$ e $u_{tc} = 21,2$ cm/min.

Tabela III – Tempo espacial e porosidade do leito para 5,0 g de biocatalisador.

Marcação na bomba	Vazão (mL/min)	h (cm)	V _{reator} (mL)	V _{útil} (mL)	τ (min)	ε	ln(u)	ln(ε)
1	0,40	19,3	21,83	14,60	36,95	0,669	-1,05	-0,40
2	1,38	19,5	22,05	14,82	10,77	0,672	0,20	-0,40
3	2,41	24,0	27,09	19,86	8,24	0,733	0,76	-0,31
4	3,20	26,5	29,91	22,68	7,08	0,758	1,04	-0,28
5	4,08	28,9	32,63	25,40	6,23	0,778	1,28	-0,25
6	5,03	31,1	35,17	27,94	5,56	0,794	1,49	-0,23
7	5,93	33,9	38,34	31,11	5,25	0,811	1,66	-0,21
8	6,85	37,0	41,84	34,61	5,05	0,827	1,80	-0,19
9	8,12	37,0	41,84	34,61	4,26	0,827	1,97	-0,19

Linearização da equação de Richardson e Zaki para 5,0 g de enzima imobilizada: $n = 7,8$ e $u_{tc} = 26,0$ cm/min.

Tabela IV – Tempo espacial e porosidade do leito para 7,0 g de biocatalisador.

Marcação na bomba	Vazão (mL/min)	h (cm)	V _{reator} (mL)	V _{útil} (mL)	τ (min)	ε	ln(u)	ln(ε)
1	0,40	27,6	31,21	21,09	53,39	0,676	-1,05	-0,39
2	1,38	27,6	31,21	21,09	15,33	0,676	0,20	-0,39
3	2,41	33,2	37,55	27,42	11,37	0,730	0,76	-0,31
4	3,20	37,0	41,84	31,72	9,91	0,758	1,04	-0,28
5	4,08	37,0	41,84	31,72	7,78	0,758	1,28	-0,28
6	5,03	37,0	41,84	31,72	6,31	0,758	1,49	-0,28
7	5,93	37,0	41,84	31,72	5,35	0,758	1,66	-0,28
8	6,85	37,0	41,84	31,72	4,63	0,758	1,80	-0,28
9	8,12	37,0	41,84	31,72	3,91	0,758	1,97	-0,28

Linearização da equação de Richardson e Zaki para 7,0 g de enzima imobilizada: $n = 7,3$ e $u_{tc} = 21,4$ cm/min.

APÊNDICE J – Valores de absorvância e concentração do corante para o teste de traçador tipo pulso com Novozym[®] 435.

Tempo (h)	Absorvância (1)	Absorvância (2)	C (g/mL)
0	0,6697	0,6739	0,00151477
1	0,4785	0,4795	0,00108005
2	0,3901	0,3902	0,00087971
3	0,3384	0,3362	0,00076054
4	0,2942	0,2932	0,00066223
5	0,2391	0,2407	0,00054093
6	0,2282	0,2297	0,00051624
7	0,1879	0,1890	0,00042492
8	0,1475	0,1489	0,00033416
9	0,2709	0,2712	0,00030558
10	0,2316	0,2322	0,00026144
12	0,1979	0,1961	0,00022210
13	0,1759	0,1762	0,00019848
14	0,1648	0,1652	0,00018602
15	0,1363	0,1346	0,00015271
16	0,1229	0,1219	0,00013799
17	0,1081	0,1070	0,00012125
18	0,0924	0,0925	0,00010423
19	0,0819	0,0814	0,00009205
20	0,0721	0,0724	0,00008145
21	0,0678	0,0655	0,00007514

ANEXOS

ANEXO A – Especificações do biodiesel segundo o Regulamento Técnico da ANP nº 14/2012.

Tabela I – Especificação do biodiesel

Característica	Unidade	Limite
Aspecto	-	LII (1)
Massa específica a 20 °C	kg/m ³	850 a 900
Viscosidade Cinemática a 40 °C	mm ² /s	3,0 a 6,0
Teor de água, máx.	mg/kg	(2)
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0
Teor de éster, mín.	% massa	96,5
Resíduo de carbono, máx. (4)	% massa	0,050
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020
Enxofre total, máx.	mg/kg	10
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5
Fósforo, máx.	mg/kg	10
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1
Número Cetano (5)	-	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(6)
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02
Glicerol total, máx. (7)	% massa	0,25
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,80
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20
Índice de Iodo	g/100g	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín. (8)	h	6

Nota:

- (1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio.
- (2) Será admitido o limite de 380 mg/kg 60 dias após a publicação da Resolução. A partir de 1º de janeiro de 2013 até 31 de dezembro de 2013 será admitido o limite máximo de 350 mg/kg e a partir de 1º de janeiro de 2014, o limite máximo será de 200 mg/kg.
- (3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130° C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.
- (4) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.
- (5) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados à ANP pelo Produtor de biodiesel, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de material graxo, o Produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de materiais graxos utilizados.
- (6) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.
- (7) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa.
- (8) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível.

Tabela II - Ponto de Entupimento de Filtro a Frio

Estados	limite máximo, °C											
	Jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
Grupo 1	14	14	14	12	8	8	8	8	8	12	14	14
Grupo 2	14	14	14	14	10	10	10	10	10	14	14	14
Grupo 3	14	14	14	10	5	5	5	5	5	10	14	14

* Grupo 1: SP, MG e MS; Grupo 2: GO/DF, MT, ES e RJ; Grupo 3: PR, SC e RS

ANEXO B – Ficha técnica da Novozym® 435

Descrição Geral	
Forma iônica (como fornecido)	Neutra
Grupo funcional	-
Matriz	Metacrilato ligação cruzada
Estrutura	Esferas porosas
Aparência	Branca, opaca
Propriedades Físicas e Químicas	
Tamanho da esfera – (mínimo 90%) (mm)	0,315 – 1,000
Tamanho efetivo (mm)	0,35 - 0,45
Coefficiente de uniformidade – (máximo)	1,8
Finos (< 0,315 mm) (% máxima)	10
Esferas Inferiores (> 1000 mm) (% máxima)	5
Área superficial (BET) (m ² .g ⁻¹)	130
Diâmetro do poro (médio) (nm)	15
Volume do poro (mL.g ⁻¹)	0,5
Estabilidade a temperatura (° C)	-10 – 100
Faixa de Ph	5 – 9
Temperatura de estocagem (° C)	1 – 40
Tempo de estocagem (anos)	2

Fonte: Dalla Rosa (2009)

DALLA ROSA, C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. 2009. 136 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2009.

ANEXO C

Tabela I – Propriedades catalíticas da lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS) imobilizada em SiO₂-PVA

Parâmetro		Valor
Temperatura ótima, °C		40-60
pH ótimo		8,5
Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) à 60°C, (h)		6,24
Constante de desativação térmica (K_d), (h ⁻¹)		0,11
Parâmetros cinéticos	K_m (mM)	1883
	V_{max} (U.g ⁻¹)	3873
$d_{sólido}$ (g.mL ⁻¹)		1,865

Fonte: SIMÕES, 2011

Tabela II – Propriedades texturais do suporte e da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

Material	Área superficial Específica (m ² .g ⁻¹)	Volume de poros específico (cm ³ .g ⁻¹)	Diâmetro médio dos poros (Å)
Suporte	461	0,28	22,91
Derivado imobilizado	337	0,25	29,42

Fonte: DA RÓS, 2011

DA RÓS, P. C. M. **Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2009.

ANEXO D

PRODUCT INFORMATION
LEWATIT® GF 202

General Description

Ionic form as shipped	Neutral
Functional group	acidic
Structure	macroporous
Appearance	opaque

Physical and Chemical Properties

	metric units	
Glycerine capacity at 1 - 2 BV/h throughput	max. g/l	250
Uniformity Coefficient*	max.	1.1
Mean bead size*	mm	(0.65 +/- 0.05)
Bulk density (+/- 5 %)	g/l	740
Density	approx. g/ml	1.24
Water retention	wt. %	52 - 57
Storability of the product	max. years	2
Storability temperature range	°C	-20 - +40

* Specification values subjected to continuous monitoring.

Recommended Operating Conditions*

	metric units	
Operating temperature	°C	rec. 30 - 50
Bed depth	min. mm	1000
Bed depth	max. mm	3000
Pressure drop	max. kPa	1200
Linear velocity operation	max. m/h	4 - 5
Specific flow rate exhaustion	max. BV/h	2 - 3
Freeboard backwash (extern / intern)	vol. %	20
Regenerant		Methanol
Regeneration level	approx. g/l	10
Linear velocity regeneration	approx. m/h	2

* The recommended operating conditions refer to the use of the product under normal operating conditions. It is based on tests in pilot plants and data obtained from industrial applications. However, additional data are needed to calculate the resin volumes required for ion exchange units. These data are to be found in our Technical Information Sheets.

This document contains important information and must be read in its entirety.

Edition: 2011-10-13
 Previous Edition: 2011-07-25

LANXESS
 Energizing Chemistry

Additional Information & Regulations

Safety precautions

Strong oxidants, e.g. nitric acid, can cause violent reactions if they come into contact with ion exchange resins.

Toxicity

The safety data sheet must be observed. It contains additional data on product description, transport, storage, handling, safety and ecology.

Disposal

In the European Community ion exchange resins have to be disposed, according to the European waste nomenclature which can be accessed on the internet-site of the European Union.

Storage

It is recommended to store ion exchange resins at temperatures above the freezing point of water under roof in dry conditions without exposure to direct sunlight. If resin should become frozen, it should not be mechanically handled and left to thaw out gradually at ambient temperature. It must be completely thawed before handling or use. No attempt should be made to accelerate the thawing process.

This information and our technical advice – whether verbal, in writing or by way of trials – are given in good faith but without warranty, and this also applies where proprietary rights of third parties are involved. Our advice does not release you from the obligation to check its validity and to test our products as to their suitability for the intended processes and uses. The application, use and processing of our products and the products manufactured by you on the basis of our technical advice are beyond our control and, therefore, entirely your own responsibility. Our products are sold in accordance with the current version of our General Conditions of Sale and Delivery.

LENNTECH

info@lenntech.com

www.lenntech.com

Tel. +31-15-261.09.00

Fax. +31-15-261.62.89

This document contains important information and must be read in its entirety.

Edition: 2011-10-13
Previous Edition: 2011-07-25

LANXESS
Energizing Chemistry

ANEXO E

Efeito do glicerol na etanólise contínua em reator de leito fixo

Silva (2013) examinou o comportamento do glicerol no leito catalítico empacotado com lipase imobilizada em SiO_2 -PVA empregando um método simples de tingimento com o corante Amaranto. Para tanto, em misturas preparada com etanol, biocatalisador e glicerol (em diferentes proporções 0-10%), foi adicionado o corante Amaranto na proporção de 10% (g/g) em relação ao derivado imobilizado. As fotos ilustradas na Figura 1 mostram a afinidade do glicerol (indicado pela presença do corante de cor vermelha) durante a investigação no sistema multifásico. De acordo com a literatura, o glicerol forma uma camada na superfície da lipase imobilizada; logo, o glicerol adicionado à mistura reacional preparada foi identificado pelo corante (cor vermelha), sendo que nas fotos (1) e (7), o glicerol apresentou afinidade tanto para o suporte híbrido formado por SiO_2 -PVA, quanto para a lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO_2 -PVA.

Figura 1. Afinidade do glicerol pelo suporte de SiO_2 -PVA e pela lipase imobilizada em SiO_2 -PVA (derivado imobilizado): (1) derivado imobilizado e 0 % glicerol; (2) derivado imobilizado e 2 % glicerol; (3) derivado imobilizado e 4 % glicerol; (4) derivado imobilizado e 6 % glicerol; (5) derivado imobilizado e 8 % glicerol; (6) derivado imobilizado e 10 % glicerol; (7) suporte SiO_2 -PVA e 10 % glicerol.

Segundo Silva (2013), esses resultados são similares aos reportados por Xu et al. (2011), que investigaram a afinidade do suporte à base de sílica e da Novozym[®] 435 pelo glicerol empregando o mesmo corante. Os resultados obtidos mostraram que o suporte à base de sílica apresentou grande afinidade pelo glicerol, em razão das propriedades hidrofílicas do material. Entretanto, a Novozym[®] 435 demonstrou afinidade moderada, sugerindo que a

lipase imobilizada no suporte diminuiu o caráter hidrofóbico do suporte, em função dos grupos polares presente na enzima.

Em função dessas observações, Silva (2013) propôs uma estratégia para remoção do glicerol visando reduzir os problemas de transferência de massa causados por sua presença no leito do reator e que influenciam na eficiência global do processo. Para tanto, foi considerada uma configuração de reatores PBR em duplo estágio, incorporando entre os reatores uma coluna de vidro recheada com a resina Lewatit® GF 202 para remoção do glicerol.

XU, Y; NORDBLAD, M; NIELSEN, P. M; BRASK, J; WOODLEY, J. M. *In situ* visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 213-219, 2011.