UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ALINE SANTIAGO SIMÕES

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

Lorena
2011

ALINE SANTIAGO SIMÕES

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

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientador: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Lorena
2011

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

Simões, Aline Santiago

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. / Aline Santiago Simões. – 2011.

115 p: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011.

Orientador: Heizer Ferreira de Castro.

1. Lipase 2. Transesterificação (Reações químicas) 2. Leito empacotado 3. Óleo de Babaçu 4. Etanol. I. Título.

577.152.9 – CDU

Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Ao Robson, pelo apoio incondicional e conselhos.

A Profa. Heizir Ferreira de Castro, pelos ensinamentos e suporte durante o período de trabalho.

Aos Profs. Adriano A. Mendes e Júlio C. dos Santos, obrigada pela amizade e grande disponibilidade.

A todos do Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena: Ariela, André, Grazielle, Daniel, Gisele, Larissa, Márcio, Natália, Matheus, Patrícia, Jose Roberto, Karine, Livia, Márcio, Murilo, Weriton, Tamires.

A EEL-USP e ao Departamento de Engenharia Química, seus professores e funcionários, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A profa. Gisella M. Zanin coordenadora do Projeto Pró-Engenharia “Aplicação da tecnologia de imobilização de lipase para a produção de biodiesel de diferentes óleos vegetais” (Nº: 23038-028317/2008-44) e a CAPES pela concessão de bolsa de estudos vinculada ao mencionado projeto.

E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

RESUMO

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 Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

O presente trabalho teve como objetivo aprimorar a síntese de biodiesel por via enzimática empregando óleo de babaçu pela rota etílica. A motivação do uso do óleo de babaçu é referente ao seu forte potencial para a produção de combustível, tendo em vista que é de baixo custo e abundante em localidades carentes de fontes de energia, o que estimula a realização de pesquisas nesta área, procurando benefícios ambientais, energéticos e econômicos. Para atingir o objetivo proposto, teve-se como proposta a transesterificação do óleo de babaçu com etanol mediada pela enzima lipase em fluxo contínuo empregando reator de leito fixo. A enzima selecionada para condução dos experimentos foi a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* (lipase PS) imobilizada covalentemente em matriz híbrida sílica-PVA com comprovada eficiência na síntese de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas. Todos os experimentos foram efetuados na ausência de solventes a 50°C. A parte experimental foi iniciada pelos testes comparativos de desempenho da montagem experimental proposta utilizando a preparação de lipase previamente selecionada e a lipase Novozym® 435 disponível comercialmente na forma imobilizada, de comprovada eficiência para utilização em reatores de leito fixo. Os resultados indicaram que ambas as preparações de lipase são adequadas para catalisar a síntese de biodiesel em regime contínuo, entretanto a grande limitação de operação do reator está relacionada com a elevada composição em ácidos graxos saturados ($\approx 83\%$) na matéria-prima lipídica, que acarreta entupimentos nas conexões e obstrução do leito. Para contornar as limitações identificadas foi proposto um sistema de aquecimento para manter constante a temperatura na faixa requerida (45-50°C) em todo o aparato experimental. O desempenho do reator (diâmetro interno X altura: 15 mm X 210 mm) foi avaliado para substratos constituídos de óleo de babaçu e etanol em duas razões molares (1:7 e 1:12), definindo os limites de operação em termos de vazão do substrato. Foi quantificado o desempenho do sistema para 4 diferentes vazões volumétricas correspondendo a tempos espaciais entre 7 a 13h e determinadas para cada condição a influência do tempo espacial na concentração de ésteres de etila formados, rendimentos de transesterificação e produtividade. A razão molar entre os materiais de partida interferiu de maneira marcante no alcance de elevadas conversões dos ácidos graxos presentes no óleo de babaçu em seus ésteres de etila correspondentes, sendo o sistema maximizado para substratos contendo maior excesso de etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12). Nessas condições, o funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais no reator iguais ou superiores a 11h, fornecendo rendimentos de transesterificação médios de $95,00 \pm 4,68 \%$ e produtividade de $54,80 \pm 2,70 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA foi estável quanto a suas características morfológicas e catalíticas revelando tempo médio de meia-vida ($t_{1/2}$) de 40 dias, sendo ainda possível sua reutilização em um novo ensaio. As características globais do desempenho do sistema contínuo proposto tornam atrativo a continuidade dos estudos em escala ampliada de processo, entretanto recomenda-se a utilização de óleos vegetais com menor teor de ácidos graxos saturados.

Palavras-chave: Lipase, Transesterificação, Leito Empacotado, Óleo de Babaçu, Etanol

ABSTRACT

SIMÕES, A.S. **Enzymatic synthesis of biodiesel from babassu oil by ethanolic route in packed bed reactor:** establishment of the operational conditions in solvent free medium. 2011, 115 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

The purpose of this work was to enhance the enzymatic synthesis of biodiesel from babassu oil by ethanolic route. Babassu oil was chosen as a feedstock due to its potential for fuel production, including low cost and availability in regions where energy sources are needed; stimulating the developing of research projects looking for environmental, energetic and economical benefits. To attain this purpose, the transesterification reaction of babassu oil with ethanol was mediated by the enzyme lipase on packed bed reactor running on continuous mode. The selected enzyme was the microbial lipase from *Burkholderia cepacia* (lipase PS) covalent immobilized on hybrid matrix silica-PVA (SiO_2 -PVA) which showed already satisfactory performance in the biodiesel synthesis from different lipidic feedstocks. The experiments were carried out in solvent free system at 50°C. The experimental work was started by performing comparative tests of the proposed experimental assembly, using the previously selected lipase preparation and a commercial available immobilized lipase Novozym® 435, which has consistent high performance to be used on fixed packed reactors. The results indicated that both lipase preparations are able to catalyze the biodiesel synthesis under continuous operation; however limitations were found to maintain stable operation. This was related to the high concentration of saturated fatty acids (83%) present in the feedstock, which blocked the tube connections and led to bed obstruction. To overcome these limitations, a warming system was proposed to ensure constant the temperature at the required range (45-50°C) in the entirely experimental apparatus. The performance of the reactor (inner diameter X height: 15 mm X 210 mm) was evaluated for substrates composed by babassu oil and ethanol in two molar ratios (1:7 e 1:12), determining its operation limits in terms of substrate flow rate. The system performance was quantified for four different flow rates corresponded to spatial times between 7 and 13 h. For each condition, the influence of spatial times in the ethyl esters formation, transesterification yields and productivities were determined. The raw materials molar ratio interfered, in a remarkable way, the conversion of babassu oil into the correspondent ethyl esters and the system was optimized for the substrates containing high excess of ethanol (oil-to-ethanol molar ratio of 1:12). In these conditions, the reactor operation was demonstrated for spatial times higher than 11h, attaining transesterification yields of $95,00 \pm 4,60\%$ and productivities of $54,80 \pm 2,70 \text{ mg}_{\text{esters}} \cdot \text{g}_{\text{medium}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. The lipase PS immobilized on SiO_2 -PVA was found to be stable regarding its morphological and catalytic characteristics, showing half-life time ($t_{1/2}$) of 40 days. The immobilized enzyme can be also reused in a new run and the presence of substrate containing high ethanol levels did not affected the lipase stability. The performance characteristics of the proposed continuous system made attractive to develop further studies aiming at scaling up the process, however it is recommended to use vegetable oils having lower saturated fatty acids levels.

Key words: Lipase, Transesterification, Packed bed reactor, Babassu oil, Ethanol

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Especificação do biodiesel conforme normas da ANP	23
Tabela 2.2. Características de algumas plantas oleaginosas com potencial uso energético	26
Tabela 2.3. Comparação das vantagens e desvantagens do metanol e etanol como agentes acilantes na obtenção de biodiesel.....	29
Tabela 2.4. Características físico-químicas das amostras de biodiesel de babaçu obtidas por via metílica e etílica e algumas especificações legais da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).....	30
Tabela 2.5. Comparação entre diferentes tecnologias de produção de biodiesel.	35
Tabela 2.6. Comparação de configurações de reatores enzimáticos (agitado, leito fixo e leito fluidizado).....	48
Tabela 2.7. Processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzida em reator de leito fixo.....	53
Tabela 3.1. Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fixo	60
Tabela 3.2. Condições para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.	66
Tabela 4.1. Propriedades texturais do suporte e da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	69
Tabela 4.2. Cálculos dos parâmetros operacionais do reator de leito fixo	70
Tabela 4.3. Descrição dos experimentos realizados neste trabalho.....	75
Tabela 4.4. Quadro comparativo dos resultados obtidos nos testes operacionais em reator de leito fixo por etanólise enzimática de óleo de babaçu catalisada pela enzima Novozym® 435 e lipase PS imobilizada em SiO ₂ - PVA, utilizando temperatura de 50 °C e razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol).....	80
Tabela 4.5. Desempenho do reator na etanólise do óleo de babaçu operando sob diferentes carregamentos catalíticos.....	83
Tabela 4.6. Condições experimentais demonstrando vazão e tempos espaciais ao longo do processo	84
Tabela 4.7. Valores médios alcançados no processo de etanólise do óleo de babaçu em regime contínuo para diferentes tempos espaciais.....	86
Tabela 4.8. Estabilidade da lipase PS imobilizada na etanólise do óleo de babaçu	88

Tabela 4.9. Condições experimentais demonstrando vazão e tempos espaciais utilizados ao longo do processo (Experimentos 6 e 7). 89

Tabela 4.10. Quadro comparativo dos resultados obtidos nos testes em reator de leito fixo por etanólise enzimática de óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂- PVA...93

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. a) Equação geral. b) Três reações consecutivas e reversíveis. R', R'' e R''', representam grupos alquila.....	31
Figura 2.2. Mecanismo de transesterificação de óleos vegetais por catálise ácida.	32
Figura 2.3. Mecanismo de transesterificação de triglicerídeos por catálise básica	33
Figura 2.4. Representação esquemática do mecanismo de reação de transesterificação entre etanol e um triglicerídeo catalisada por lipase.....	34
Figura 2.5. Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e aspartato ou glutamato.	37
Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases	39
Figura 2.7. Etapas envolvidas na formação do SiO ₂ -PVA (“R” representa o grupo alquil). ...	42
Figura 2.8. Efeito sinérgico de duas lipases de diferentes atividades atuando isoladamente ou combinadas na formação de biodiesel de óleo de soja refinado (SO) e óleo de soja contendo 20% de ácidos graxos livres (SO+AGL). Condições: MeOH/Ácidos graxos = 0,44 (proporção molar) 30% água, 50°C, 3h, utilizando enzimas líquidas. Cinza: LTL, 50ppm; Preto: CALB, 50ppm; Branco: LTL + CALB: 25 + 25ppm.	44
Figura 2.9. Configuração de reator de leito fixo proposto para produção de biodiesel usando adição em etapas de metanol e separação de glicerol entre as colunas.	51
Figura 3.1. Esquema experimental do reator de leito fixo: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.	63
Figura 4.1- Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de babaçu e etanol).....	71
Figura 4.2. Ilustração do sistema durante o teste de traçador demonstrando a distribuição do corante no reator.	73
Figura 4.3. Concentração do corante lipossolúvel em função do tempo.	74
Figura 4.4. Distribuição de Tempo de Residência em reator tubular empacotado com lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA (inativada).	74
Figura 4.5. Concentração total em ésteres etílicos obtida na etanólise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo (10 mL) operando em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão	

molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol), vazão 0,028mL.min ⁻¹ , tempo espacial 4,0h) empregando a lipase Novozym® 435 como catalisador.....	76
Figura 4.6. Foto ilustrativa do reator em operação destacando a formação de bolhas de ar no leito	77
Figura 4.7. Sistema com lipase Novozym® 435 operando em condições estáveis.....	77
Figura 4.8. Ajuste do modelo de desativação da lipase Novozym® 435 na formação de ésteres de etila na etanólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo a 50 °C. ..	78
Figura 4.9. Foto do leito fixo ilustrando a obstrução do leito	79
Figura 4.10. Sistema com lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA operando em condições estáveis, com manutenção da temperatura do sistema utilizando um mini-aquecedor	79
Figura 4.11. Concentração total em ésteres etílicos obtida na etanólise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 10 mL operando de modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol), vazão 0,013mL.min ⁻¹ , tempo espacial 7,0h) empregando a lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA como catalisador	80
Figura 4.12. Composição média em ésteres etílicos de diferentes ácidos graxos durante o estado estacionário nas reações catalisadas pelas enzimas Novozym® 435 e lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA e composição de ácidos graxos do óleo de babaçu empregado como matéria-prima.....	81
Figura 4.13. Concentração total em ésteres etílicos obtida na etanólise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 10 mL operando de modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol), vazão 0,013 mL.min ⁻¹ , tempo 7,0h) empregando a lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA reutilizada como catalisador.....	83
Figura 4.14. Concentração total em ésteres de etila formados na etanólise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 32 mL operando de modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar óleo de babaçu:etanol 1:7) empregando a lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA como catalisador, (a) vazão decrescente; (b) vazão crescente.....	85
Figura 4.15. Influência do tempo espacial no desempenho do reator na síntese de biodiesel pela etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA como catalisador e substrato na razão molar óleo e etanol de 1:7.....	87
Figura 4.16. Concentração total em ésteres etílicos, valores médios e desvios obtidos nas etanólises enzimáticas do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 32 mL operando de modo contínuo (temperatura 50°C, razão molar óleo de babaçu:etanol 1:12) empregando a lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA como catalisador	89
Figura 4.17. Influência do tempo espacial no desempenho do reator na síntese de biodiesel pela etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA como catalisador e substrato na razão molar de 1:12 (óleo de babaçu:etanol).	90

ABREVIACES E SBOLOS

ABNT	Associa Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ASTM 6751	Especifica físico-químicas de qualidade para o biodiesel (Estados Unidos)
B5, B20, B100	Mistura de biodiesel no diesel
BSTR	Reator Batelada de Tanque Agitado
CALB	Lipase B de <i>Candida Antarctica</i>
CSTR	Reator de Tanque Agitado Contínuo
EN 14214	Especifica físico-químicas de qualidade para o biodiesel (Europa)
EtOH	Etanol
H-Bio	Diesel produzido a partir do processamento de óleos vegetais
k_d	Constante de desativa térmica
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LRM	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i>
MeOH	Metanol
NBR	Norma da Associa Brasileira de Normas Técnicas
NOx	Compostos nitrogenados
PS	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
PVA	lcool Polivinílico
SiO₂-PVA	Suporte Híbrido Polissiloxano – lcool polivinílico
STR	Reator de Tanque Agitado
$t_{(1/2)}$	Tempo de meia-vida (dias)
TEOS	Tetraetilortosilicato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Biodiesel e o cenário energético atual	21
2.2. Matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel.....	24
2.2.1. Óleo de babaçu.....	26
2.3. Agente acilante	28
2.4. Métodos de obtenção do biodiesel.....	30
2.4.1. Catálise ácida	32
2.4.2. Catálise básica.....	33
2.4.3. Catálise enzimática	34
2.5. Lipases	35
2.5.1. Estrutura e mecanismo de ação das lipases	36
2.5.2. Reações catalisadas por lipases	38
2.5.3. Comportamento das lipases em meio não aquoso	39
2.5.4. Uso de lipases imobilizadas.....	40
2.6. Produção enzimática de biodiesel.....	43
2.6.1. Teor de água.....	45
2.6.2. Efeito inibidor do agente acilante	45
2.6.3. Solventes	46
2.7. Configuração do reator	47
2.7.1. Reator de tanque agitado em batelada (BSTR)	49
2.7.2. Reator de tanque agitado contínuo (CSTR).....	50
2.7.3. Reatores de leito fixo	50
2.7.4. Reatores de leito fluidizado.....	51
2.8. Processos de obtenção de biodiesel em regime contínuo	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1. Materiais	59
3.1.1. Fontes de lipase	59
3.1.2. Materiais de partida	59
3.1.3. Suporte de imobilização	59
3.1.4. Outros reagentes	59
3.2. Equipamentos	60
3.2.1. Biorreator de leito fixo	60
3.2.2. Principais equipamentos	60
3.3. Metodologia experimental.....	61
3.3.1. Síntese do suporte híbrido e imobilização da lipase	61
3.4. Testes operacionais.....	61
3.4.1. Calibração da bomba peristáltica	61
3.4.2. Cálculo da distribuição do tempo de residência	62
3.5. Montagem experimental	63
3.6. Síntese de biodiesel em reator de leito fixo.....	64
3.7. Métodos de análise	65
3.7.1. Análises texturais do suporte e biocatalisador	65

3.7.2. Densidade do suporte	65
3.7.3. Teor de umidade	65
3.7.4. Determinação da atividade hidrolítica	65
3.7.5. Dosagem dos ésteres de etila	66
3.7.6. Purificação das amostras de biodiesel	66
3.8. Cálculos	67
3.8.1. Rendimento da transesterificação	67
3.8.2. Tempo espacial.....	68
3.8.3. Produtividade.....	68
3.8.4. Tempo de meia-vida do biocatalisador	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Propriedades dos biocatalisadores	69
4.1.1. Propriedades da lipase Novozym® 435	69
4.1.2. Propriedades da lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em SiO ₂ -PVA	69
4.2. Ajuste da vazão da bomba peristáltica e cálculo do tempo espacial	70
4.3. Distribuição de tempo de residência (DTR)	71
4.3.1. Curva de calibração	71
4.3.2. Cálculo da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)	72
4.4. Operação do reator de leito fixo	74
4.4.1 Processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela Novozym 435..	75
4.4.2. Processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	78
4.5. Recuperação e reutilização da lipase PS imobilizada no processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu	82
4.6. Influência do tempo espacial no desempenho do reator na etanólise do óleo de babaçu catalisada pela Lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	84
4.7. Influência da razão molar (óleo de babaçu:etanol) no processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.	88
4.8. Qualidade do biodiesel obtido por processo contínuo.....	91
4.9. Análise global do desempenho do reator.....	92
5. CONCLUSÕES.....	95
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca por combustíveis alternativos ao diesel mineral tem se intensificado, implicando na proposição do uso de combustíveis derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, obtidos por transesterificação com álcoois de cadeia curta gerando ésteres monoalquílicos de ácidos graxos denominados de biodiesel (PINTO et al, 2005; RAMOS et al., 2003). “Bio” representa sua fonte renovável e biológica em contraste com o combustível diesel derivado do petróleo e “diesel” se refere ao uso em motores diesel. Como um combustível alternativo, o biodiesel pode ser utilizado em sua forma pura ou misturado com o diesel derivado de petróleo (ZHANG et al., 2003).

O histórico nacional do biodiesel data da década de 1980, adquirindo impulsão renovada em 2002 quando foi anunciado pelo Governo Federal o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), tendo como objetivo estabelecer um arcabouço regulatório para o desenvolvimento e a produção nacional de biodiesel (KNOTHE et al., 2006). Baseado neste programa, o governo brasileiro em 13 de janeiro de 2005 publicou a Lei 11.097 que estabeleceu o uso obrigatório comercial de misturas de biodiesel e óleo diesel em proporção de até 20% em volume ao óleo diesel (ANP, 2011). De acordo com esta lei, a mistura B5 entraria em vigor apenas em 2013. No entanto, com o sucesso do Programa, a mistura foi antecipada para janeiro de 2010 (Resolução Nº 06/2009 do Conselho Nacional de Política Energética - CNPE). Com o B5, a produção de biodiesel em 2010 foi de aproximadamente 2,4 milhões de m³, com capacidade instalada para a produção de 5,8 milhões de m³ (ANP, 2011). Com esse volume, o Brasil saltou de 4º para 2º o maior produtor mundial, ultrapassando Estados Unidos e França, ficando atrás apenas da Alemanha (BRASIL, 2011).

Esse crescimento da demanda de biodiesel no mercado nacional passa por uma evolução no sistema de produção de forma a torná-lo mais eficiente e ambientalmente favorável (DE CASTRO et al, 2010; QUINTELLA et al., 2009).

A tecnologia estabelecida para a produção industrial de biodiesel é baseada na reação de óleos vegetais com metanol (alcoólise) mediada por catalisadores homogêneos (ácidos ou básicos) para promover a clivagem das moléculas de triglicerídeos e gerar uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos. Apesar do elevado rendimento obtido por esta via, o metanol, 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).

Assim, a substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma opção promissora, pois atende a demanda por processos menos poluentes e mais seletivos, em função das inúmeras vantagens que os processos heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos, tais como pouca ou nenhuma corrosão; fácil separação; poucos problemas com rejeitos; fácil manuseio e possibilidade de reutilização (PINTO et al., 2005). Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel, reduzindo a ocorrência das reações indesejáveis de saponificação e permite uma simplificação e redução dos custos dos processos pela redução do número de operações associadas. Várias pesquisas recentes relacionadas a alcoólise de triglicerídeos envolvem o uso de catalisadores heterogêneos, como por exemplo, zeólitas básicas, óxidos e carbonatos de metais alcalino-terrosos e enzimas, em particular lipases (DE CASTRO et al. 2010; PINTO et al., 2005; YUSUF; KAMARUDIN; YAAKUB, 2011).

A síntese de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras permite a recuperação do catalisador, elimina os problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio, verificados no processo químico (BAJAJ et al., 2010; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2008; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Além disso, é uma alternativa que atende aos pressupostos da Química Verde, pois reduz o impacto ambiental pela minimização dos resíduos gerados no processo.

Esta rota vem sendo estudada no país por diversos pesquisadores, incluindo o Grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) que desenvolve processos de obtenção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas, empregando diferentes fontes de lipases comerciais previamente imobilizadas em suportes obtidos pela técnica sol-gel (DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; MOREIRA et al., 2007; PAULA et al., 2007; SILVA et al., 2009). Os resultados obtidos são altamente promissores, pois os ésteres alquílicos obtidos atendem as especificações exigidas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para uso como biocombustível (MENDES et al., 2011; MOREIRA et al., 2007; SOUZA, 2010;).

Os trabalhos experimentais têm sido efetuados em reatores operando em regime batelada em pequena escala de produção. Entretanto, em termos práticos, os processos que envolvem enzimas imobilizadas são preferivelmente operados de forma contínua. Este sistema, quando comparado com o processo em batelada, apresenta algumas vantagens

técnicas, principalmente por possibilitar o controle automático, ser mais fácil de operar e favorecer o controle de qualidade do produto (HALIM et al., 2009; WANG et al., 2011).

Diferentes configurações de reatores têm sido usadas em estudos com lipases imobilizadas. Duas fases estão invariavelmente presentes - uma sólida (isto é, o suporte no qual a enzima está imobilizada) e uma ou duas fases líquidas, a fase sólida, em reatores trifásicos, pode aparecer com uma fase dispersa ou uma fase contínua. O leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente empregado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação. Esse tipo de reator usualmente proporciona uma maior área superficial para a reação, por unidade de volume, do que um reator de membrana e é cineticamente mais favorável que os reatores contínuos com agitação, e não têm a desvantagem das elevadas tensões de corte devido à agitação mecânica (HALIM et al., 2009; LEE et al., 2010; ROSA et al., 2009; WANG et al., 2011).

Com base neste contexto, o presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma tecnologia viável de produção de biodiesel por etanólise de óleo de babaçu mediada por lipase imobilizada em reator de leito fixo operando em regime contínuo. Para alcançar o objetivo proposto, a preparação comercial de lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) foi previamente imobilizada covalentemente em SiO₂-PVA ativada por epícloridrina e foram testados como materiais de partida óleo de babaçu e etanol. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo geral do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas:

- a) Testes operacionais da montagem experimental empregando a lipase selecionada imobilizada em matriz híbrida SiO₂-PVA;
- b) Determinação da estabilidade operacional da lipase imobilizada (tempo de meia-vida) em meio isento de solventes;
- c) Estabelecimento das condições operacionais do biorreator visando atingir um desempenho estável com elevada conversão e produtividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica será dado um enfoque aos principais temas relacionados com o trabalho, iniciando-se pela importância das fontes renováveis de energia para o meio ambiente, seguido das principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel e os processos de produção de biodiesel como transesterificação química e enzimática. Particular ênfase será dada aos processos enzimáticos de obtenção de biodiesel operando em regime contínuo, incluindo as diferentes configurações de reatores propostas, bem como os problemas operacionais relatados na literatura.

2.1. Biodiesel e o cenário energético atual

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém dos combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural). Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento em um futuro próximo, portanto, a busca por fontes alternativas de energia tem sido considerada como meta estratégica. Um dos grandes destaques da atualidade é o interesse pelo uso de recursos naturais baseados em materiais lignocelulósicos para a produção de etanol ou por fontes lipídicas empregadas para a produção de hidrocarbonetos e/ou substituto do petrodiesel (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

Com relação aos hidrocarbonetos, os processos alternativos mais discutidos no Brasil são o craqueamento, o hidrocraqueamento (H-Bio) e o eletrocraqueamento. Estas rotas têm a vantagem de permitir o uso de insumos residuais de baixa pureza e baixo custo (SUAREZ et al., 2009). A aplicação de óleos vegetais e gorduras animais para a substituição do óleo diesel em motores de ignição por compressão é a uma opção bastante promissora (PINTO et al., 2005). Adicionalmente, a possibilidade de emprego de combustíveis de origem agrícola em motores de ciclo diesel é bastante atrativa, tendo em vista o aspecto ambiental, por serem fonte renovável de energia, além do fato do seu desenvolvimento permitir a redução da dependência de importação de petróleo (PINTO et al., 2005; SUAREZ et al., 2009).

A busca pela inserção do biodiesel na matriz energética tem sido preocupação de vários países e blocos comerciais. Esta intensificação do uso do biodiesel se alicerça em um tripé (QUINTELLA et al., 2009):

- (1) ambiente (melhoria das condições climáticas por redução das emissões e utilização de CO₂ pela matéria-prima);
- (2) social (desenvolvimento rural associado à produção de matéria-prima);
- (3) energia (independência de fornecedores, consumidores produzindo sua própria energia).

A proposta de utilizar óleos vegetais em substituição ao diesel é antiga, desde o final do século XX. O conceito foi abandonado devido aos baixos preços dos combustíveis derivados do petróleo na época, mas foi retomado devido a preocupações ambientais e a diminuição das fontes convencionais. A limitação da utilização de óleos vegetais puros nos motores diesel está associada a sua elevada viscosidade (valores variando de 29,51 cSt para o óleo de babaçu a 40,6 cSt para o óleo de andiroba) que pode ocasionar bloqueio de filtros, altas pressões de abertura de válvulas e baixa atomização (NWAFOR, 2004). Esses valores são cerca de dez vezes mais elevados que a viscosidade do petrodiesel, que varia entre 2,5 e 5,5 cSt (ANP, 2011).

Várias abordagens são propostas para reduzir a viscosidade de óleos vegetais como o uso de misturas binárias com petrodiesel, pirólise, microemulsificação (ou mistura co-solvente) e transesterificação (KNOTHE et al., 2006; MA; HANNA, 1999). Entretanto, o método tradicional de produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras é a transesterificação com alcoóis de cadeia curta como metanol ou etanol (QUINTELLA et al., 2009).

O termo biodiesel normalmente se refere aos ésteres alquílicos de ácidos graxos. De fato, as normas de biodiesel requerem ou especificam indiretamente que biodiesel é um derivado de ésteres metílicos de ácidos graxos (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Na Europa, as especificações físico-químicas de qualidade para o biodiesel estão agrupadas na norma EN 14214, nos Estados Unidos são regulamentadas pela norma ASTM 6751; enquanto no Brasil o mesmo é feito pela Resolução 07/2008 da ANP (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

A especificação brasileira é similar à europeia e americana, com alguma flexibilidade para atender às características das matérias-primas nacionais. Alguns itens possuem a informação anotar, significando que a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo, conforme mostrado Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Especificação do biodiesel conforme normas da ANP

Característica	Unidade	Límite	Método (ABNT- NBR)
Aspecto	-	LII ⁽¹⁾	-
Massa específica a 20° C	Kg.m ⁻³	850-900	7148, 14065
Viscosidade cinemática a 40°C	mm ² .s ⁻¹	3,0-6,0	10441
Teor de água, máx.	mg.Kg ⁻¹	500	-
Contaminação total, máx.	mg.Kg ⁻¹	24	-
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598
Teor de éster, mín	% m.m ⁻¹	96,5	15764
Resíduo de carbono	% m.m ⁻¹	0,050	15586
Cinzas sulfatadas, máx.	% m.m ⁻¹	0,020	6294
Enxofre total, máx.	mg.Kg ⁻¹	50	-
Sódio + potássio, máx.	mg.Kg ⁻¹	5	15554, 15555 15553, 15556
Cálcio + magnésio, máx.	mg.Kg ⁻¹	5	15553, 15556
Fósforo, máx.	mg.Kg ⁻¹	10	15553
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359
Número de cetano	-	Anotar	-
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19	14747
Índice de acidez, máx.	mg KOH.g ⁻¹	0,50	14448 -
Glicerol livre, máx.	% m.m ⁻¹	0,02	15341, 15771 - -
Glicerol total, máx.	% m.m ⁻¹	0,25	15344 -
Mono, di, triacilglicerol	% m.m ⁻¹	Anotar	15342, 15344
Metanol ou etanol, máx.	% m.m ⁻¹	0,20	15343
Índice de iodo	g.100g ⁻¹	Anotar	-
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	h	6	-

(1) Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio

Fonte: ANP (2011).

Nas análises, esses campos devem ser anotados para referência. Existem vários motivos para a ANP se posicionar dessa maneira, em se tratando de viscosidade (a mistura B20 deve atender a especificada para diesel) e do índice de iodo (indicador de ligações duplas e, portanto do nível de insaturação do biodiesel). Isto 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).

A estabilidade oxidativa do biodiesel tem sido objeto de muitas pesquisas (KNOTHE; DUNN, 2003). A influência dos parâmetros, tais como a presença do ar, calor, luz, traços do metal, antioxidantes, peróxidos, bem como as de natureza do recipiente de armazenamento foram investigadas (BANNISTER et al., 2011; KNOTHE, 2007). Geralmente, os fatores tais como a presença de ar, temperaturas elevadas ou presença de metais facilita a oxidação. A autooxidação dos ácidos graxos ocorre em diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das ligações duplas, por isto o acompanhamento deste parâmetro apresenta grande importância para a caracterização do biodiesel.

2.2. Matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel

O Brasil apresenta uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel, como a soja, o girassol, a mamona, o milho, o pinhão-manso, o algodão, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, a macaúba, o amendoim, dentre outras. Óleos de descarte, gorduras animais e óleos usados para cocção de alimentos também são utilizados como matérias-primas alternativas. No entanto, é importante ressaltar que as propriedades químicas e físicas das matérias-primas estão diretamente associadas à tecnologia e ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, à qualidade do produto final (SARAF; THOMAS, 2007).

De uma forma geral, pode-se afirmar que ésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de matéria-prima oleaginosa, mas nem toda matéria-prima pode ser utilizada para a produção de biodiesel que atenda às especificações internacionais. Isso porque algumas delas apresentam propriedades não ideais que são transferidas para o biocombustível e que o torna inadequado para uso direto (B100) em motores do ciclo Diesel. Uma propriedade indesejada é a baixa estabilidade à oxidação, que torna o armazenamento do biodiesel mais complexo e compromete o seu uso direto em motores. Por outro lado, viscosidades muito elevadas são tecnicamente indesejáveis, por exemplo, o óleo de mamona é muito viscoso (~239 cSt) e, por consequência, produz ésteres de viscosidade (~14 cSt) superior aos limites estabelecidos pela especificação do motor (~5,5 cSt) (KNOTHE, 2007).

É importante ressaltar que muitas matérias-primas ainda dependem de uma avaliação detalhada sobre a sua respectiva cadeia produtiva que, em muitos casos, ainda se encontra nos primórdios de seu desenvolvimento. Assim, seria coerente reconhecer que a viabilidade de uma matéria-prima depende da competitividade técnica, econômica e sócio-ambiental, incluindo ainda importantes aspectos agronômicos, tais como:

- (a) o teor de óleo vegetal e a complexidade exigida no processo de extração;
- (b) a produtividade por unidade de área;
- (c) o equilíbrio agronômico;
- (d) a atenção a diferentes sistemas produtivos;
- (e) o ciclo de vida da planta (sazonalidade);
- (f) sua adaptação territorial; e
- (g) o impacto sócio-ambiental de seu desenvolvimento.

Avaliações como estas são fundamentais para a produção de biodiesel e estes parâmetros são considerados importantes, para um país que pretende explorar o potencial energético de seus recursos naturais (biomassa) de forma comprovadamente sustentável. Uma vez comprovada a viabilidade de uma determinada matéria-prima (particularmente as mais exóticas), ainda restará a necessidade da implantação de projetos de ampliação de escala, incluindo a realização de testes de longa duração em motores de tecnologia atual e a condução de estudos agronômicos mais aprofundados que venham a garantir sua disponibilidade nos momentos de maior demanda (SUAREZ et al., 2009).

A importância da seleção da matéria-prima pode ser inicialmente avaliada pelo seu impacto sobre o custo da produção industrial do biodiesel por transesterificação em meio alcalino. De acordo com avaliações do National Biodiesel Board, baseadas na produção norte-americana de ésteres metílicos de óleos ou gorduras, a matéria-prima corresponde a 70% do custo de produção, cabendo 8,8% a administração e vendas (incluindo marketing), 6,3% ao custo de capital; 5,1% ao álcool empregado na transesterificação; 3,4% ao custo de pessoal; 1,6% ao catalisador alcalino; 4,0% a manutenção, seguro e despesas incidentais e 1,0% ao capital de giro. Portanto, ao mesmo tempo em que revelam grande maturidade tecnológica, estes dados reputam importância estratégica à escolha da matéria-prima, o que depende fortemente dos arranjos produtivos locais. Em última análise, isto significa que a escolha da

matéria-prima não deve ser atrelada a uma decisão meramente política.

A Tabela 2.2 apresenta o conteúdo de óleo e a produtividade das espécies oleaginosas mais interessantes no contexto brasileiro. Pode-se destacar o óleo de palma ou dendê por sua produtividade e por possibilitar uma substituição de grandes quantidades de derivados de petróleo a médio e longo prazo (LORA; ANDRADE, 2009).

Tabela 2.2. Características de algumas plantas oleaginosas com potencial uso energético

Espécie	Conteúdo de óleo (%)	Produtividade em óleo (ton.ha⁻¹)
Dendê (<i>Elacis guineensis</i>)	20	3,0–6,0
Abacate (<i>Persea americana</i>)	7–35	1,3–5,0
Coco (<i>Cocus numifera</i>)	55–60	1,3–1,9
Babaçu (<i>Orbignya martiana</i>)	66	0,1–0,3
Girassol (<i>Helianthus annus</i>)	38–48	0,5–1,9
Canola (<i>Brassica campestris</i>)	40–48	0,5–0,9
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	43–45	0,5–0,9
Amendoim (<i>Orachis hypogaeae</i>)	40–43	0,6–0,8
Soja (<i>Glycine max</i>)	17	0,2–0,4
Algodão (<i>Gossypium hirsut</i>)	15	0,1–0,2

Fonte: Adaptado de Lora e Andrade (2009).

Outros óleos alternativos também têm sido empregados para a produção de biodiesel, em escala de laboratório, como o óleo de babaçu. Esse óleo contém uma reduzida concentração de ácidos poli-insaturados, gomas e fosfolipídios e não necessita da implantação de uma unidade de refino, o que torna atrativo a sua aplicação em reações de síntese de biodiesel sendo, portanto, selecionado para desenvolvimento deste projeto.

2.2.1. Óleo de babaçu

O babaçu conhecido como baguaçu ou coco-de-macaco (*Orbignya speciosa*), pertence à família botânica da Palma original no Brasil - Região Amazônica e Mata Atlântica na Bahia. Os frutos são ovais alongados, de coloração castanha, a polpa é farinácea e oleosa, envolvendo de 3 a 4 sementes oleaginosas (TEIXEIRA, 2008). O babaçu é uma cultura pouco explorada, apesar do nordeste brasileiro possuir cerca de 17 milhões de hectares plantados de babaçu e mensalmente são extraídos cerca de 140.000 ton de amêndoas destes babaçuais. O coco de babaçu possui, em média, 7% de amêndoas, com 62% de óleo, logo esta espécie não

dever ser considerada como uma espécie oleaginosa, pois possui somente 4% de óleo. (PARENTE, 2011).

Considerando os 17 milhões de hectares de florestas onde predomina a palmeira do babaçu e as possibilidades de aproveitamento integral do coco, o babaçu constitui, potencialmente, uma extraordinária matéria-prima para a obtenção de produtos com altos teores de matérias graxas, com grande aplicação industrial. Esse óleo é utilizado para a fabricação de sabão, glicerina e óleo comestível, entre outros. O óleo de coco de babaçu refinado é um produto largamente utilizado na produção de cosméticos, tais como, cremes faciais, cremes para o corpo, cremes para os lábios, preparados para cabelos secos ou quebradiços entre outros (PARENTE, 2011).

No entanto, acredita-se que o babaçu apresenta um forte potencial para a produção de óleo combustível, devido à sua composição química ser predominantemente láurica. Este fato facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente acilante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas. Resultados descritos na literatura mostram que, quando catalisadores homogêneos e o óleo de babaçu são empregados na síntese de biodiesel, rendimentos mais elevados em biodiesel são obtidos (LIMA et al., 2007).

Apesar dessa potencialidade, a exploração do coco de babaçu é ainda realizada, em grande parte do nordeste, de forma muito artesanal, tendo em vista que essas pequenas comunidades não têm acesso aos equipamentos existentes para a quebra automática do coco de babaçu e separação de seus constituintes, bem como as tecnologias de aplicação das matérias-primas resultantes. 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 como Maranhão, Piauí, Tocantins, parte de Goiás, além de várias micro-regiões isoladas no Ceará, em Mato Grosso, em Rondônia e outras. Neste cenário, o óleo de babaçu poderia ingressar no mercado energético, com quantidades substanciais e preços competitivos (PARENTE, 2011).

2.3. Agente acilante

Diferentes álcoois têm sido investigados para a síntese de biodiesel, incluindo todos os álcoois de cadeia curta: metanol, etanol, 1- e 2-propanol e isômeros de butanol (COSTA NETO et al., 2000). Isopropanol age não só como um aceptor de grupos acila para a síntese de biodiesel, mas também como solvente (CHANG et al., 2009). Entretanto, o metanol é o álcool mais frequentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade) (COSTA NETO et al., 2000). Metanol tem boa reatividade na reação de síntese alcalina e na maioria das regiões do mundo é o álcool mais barato. Ressalta-se, no entanto, que o metanol apresenta elevada toxicidade à saúde humana, podendo causar, inclusive, cegueira e câncer. Por outro lado, o etanol apresenta a vantagem de não ser tóxico, ser biodegradável e ser produzido a partir de fontes renováveis (COSTA; OLIVEIRA, 2006).

A Tabela 2.3 permite uma melhor avaliação das vantagens e desvantagens da utilização do etanol ou metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel (COSTA; OLIVEIRA, 2006), na qual verifica-se que a opção de utilização de etanol no Brasil é bastante atrativa devido à grande vocação agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país.

Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica (mais lenta, consome mais álcool, maior dificuldade de separação), o biodiesel etílico possui uma viscosidade maior que o biodiesel metílico, promovendo uma maior lubricidade. Destaca-se ainda que biodiesel etílico gera significativamente menos opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras coisas, uma redução nas emissões de NO_x (PENTEADO, 2005).

Para comprovar as vantagens do uso de etanol como agente acilante, Lima et al. (2007) desenvolveram um estudo comparativo da obtenção de biodiesel de babaçu utilizando metanol e etanol como agentes acilantes e hidróxido de sódio como catalisador, visando determinar o rendimento da reação e, ainda, caracterizar o produto obtido segundo parâmetros físico-químicos (Tabela 2.4).

Tabela 2.3. Comparação das vantagens e desvantagens do metanol e etanol como agentes acilantes na obtenção de biodiesel.

Uso do metanol	
Vantagens	Desvantagens
O consumo de metanol no processo de transesterificação é cerca de 45% menor que o consumo do etanol anidro.	Apesar de poder ser produzido a partir da biomassa, é tradicionalmente um produto de origem fóssil.
O preço do metanol é quase a metade do preço do etanol.	É bastante tóxico.
É mais reativo.	Maior risco de incêndios. Chama invisível.
Para uma mesma taxa de conversão, o tempo de reação utilizando o metanol é menos da metade do tempo de quando se emprega o etanol.	Transporte é controlado pela Polícia Federal, por se tratar de matéria-prima para extração de drogas.
Os equipamentos da planta operando pela rota metílica têm cerca de um quarto do volume dos equipamentos em comparação com a rota etílica, para uma mesma produtividade e qualidade.	A capacidade atual de produção brasileira de metanol só garantiria o estágio inicial de programa de âmbito nacional.
Uso do etanol	
Vantagens	Desvantagens
Produção alcooleira no Brasil consolidada.	Os ésteres etílicos possuem maior afinidade com a glicerina, dificultando a separação.
Produce biodiesel com maior índice de cetano e maior lubricidade, se comparado ao biodiesel metílico.	Possui azeotropia quando misturado em água, com isso a etapa de desidratação requer maiores gastos energéticos e investimentos com equipamentos.
Se for feito a partir de biomassa produz um combustível 100% renovável.	Dependendo do preço da matéria-prima, o custo de produção de biodiesel etílico pode ser até 100% maior que o metílico.
Gera ainda mais economia de divisas.	
Não é tóxico como o metanol.	
Menor risco de incêndios.	
Fonte: Costa e Oliveira (2006).	

Tabela 2.4. Características físico-químicas das amostras de biodiesel de babaçu obtidas por via metílica e etílica e algumas especificações legais da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

Característica físico-química	Biodiesel		Resolução ANP n°42/04
	BME	BET	
Alcalinidade combinada (meq.g ⁻¹)	0,004 ± 0,000	0,006 ± 0,001	NC
Alcalinidade total (meq.g ⁻¹)	0,004 ± 0,000	0,006 ± 0,001	NC
Acidez do biodiesel (mg KOH.g ⁻¹)	0,224 ± 0,001	0,448 ± 0,003	0,8
Glicerina livre (%)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02
Densidade a 20 °C (g.cm ⁻³)	0,88 ± 0,00	0,87 ± 0,00	(1)
Ponto de fulgor (°C)	112 ± 0,6	122 ± 0,6	Min*. 100
Teor de enxofre (%)	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,001	Anotar
Viscosidade 40,0 ± 0,1 °C (mm ² .s ⁻¹)	4,0 ± 0,02	3,8 ± 0,02	Max** 6,0

NC = Não cita. (1) = Limites para o diesel tipo B: 0,82 a 0,88 g.cm⁻³.

* = Mínimo. ** = Máximo

BME – Biodiesel Metílico, BET – Biodiesel Etílico.

Fonte: Lima et al., 2007.

As características sumarizadas na Tabela 2.4 indicam que as propriedades físico-químicas das amostras dos ésteres metílico e etílico do óleo de babaçu estão de acordo com os limites estabelecidos pela ANP, sendo, nestes termos, possível utilizá-los puros ou misturados ao diesel, em motores a ciclo diesel, sem que seja necessário fazer qualquer adaptação nestas máquinas. Além disso, o biodiesel produzido com etanol tem qualidades satisfatórias e, às vezes, até melhores que aquelas encontradas para o biodiesel metílico, sendo, portanto uma opção bastante promissora para a rota de produção brasileira.

2.4. Métodos de obtenção do biodiesel

O processo mais empregado na produção industrial de biodiesel é a transesterificação. Esta reação ocorre entre triglicerídeos e álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) empregando catalisadores que podem ser ácidos, básicos ou enzimas (lipases) que promovem a clivagem das moléculas de triglicerídeos, formando ésteres dos ácidos graxos correspondentes e glicerina como subproduto (Figura 2.1 a). Para que ocorra a reação é importante monitorar as três etapas consecutivas e a reversibilidade da reação, como mostrado na Figura 2.1 b. (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

a)

b)

Figura 2.1. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. a) Equação geral. b) Três reações consecutivas e reversíveis. R', R'' e R''', representam grupos alquila.

Fonte: Adaptado de Fukuda, Kondo e Noda (2001).

Na primeira etapa ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeo, seguido pela conversão do diglicerídeo para monoglicerídeo, e do monoglicerídeo para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada etapa (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986).

Parâmetros importantes que devem ser considerados em uma reação de transesterificação são: razão molar, temperatura, tempo de reação e o tipo de catalisador (ANTCZAK et al., 2009). Para a realização da transesterificação, é necessário utilizar um excesso de álcool para aumentar a eficiência do processo, excesso esse que pode ser recuperado posteriormente. Nessa etapa se formam duas fases: a glicerina e o biodiesel. Após a separação entre as fases, o biodiesel deve ser purificado antes de sua utilização em motores (RANGANATHAN et al., 2008).

2.4.1. Catálise ácida

O processo de transesterificação por catálise ácida utiliza preferencialmente ácido sulfônico e ácido sulfúrico (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986). Esses catalisadores proporcionam um alto rendimento reacional, mas requerem altas temperaturas, geralmente acima de 100°C e um tempo de reação superior a 3 h para a completa conversão (FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984). O mecanismo para a reação de transesterificação utilizando catalisadores ácidos está demonstrado na Figura 2.2.

Figura 2.2. Mecanismo de transesterificação de óleos vegetais por catálise ácida.

Estudos mais recentes mostram que têm sido desenvolvidos vários protocolos envolvendo catalisadores ácidos em meio livre de solventes. Reações irradiadas por micro-

ondas também têm apresentado resultados bastante significativos em relação à redução do tempo reacional (SUPPALAKPANYA; RATANAWILAI; TONGURAI, 2010; ZHANG et al., 2010).

2.4.2. Catálise básica

O processo de transesterificação por catálise básica apresenta velocidade reacional superior ao processo ácido citado anteriormente. Além disso, o processo básico é preferido em relação ao ácido em processos industriais pelo simples fato dos compostos alcalinos serem menos corrosivos do que os ácidos. O mecanismo de transesterificação por catálise básica é esquematizado na Figura 2.3. As principais bases utilizadas são alcóxidos e hidróxidos de metais alcalinos, bem como carbonatos de sódio ou potássio (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Figura 2.3. Mecanismo de transesterificação de triglicerídeos por catálise básica

Na primeira etapa (2.3.1), ocorre a reação da base com o álcool produzindo um alcóxido. O nucleófilo alcóxido ataca o grupo carbonil do triglicerídeo gerando um intermediário tetraédrico (2.3.2.), sendo que o alquil éster e o ânion correspondente do diglicerídeo são formados (2.3.3). Em seguida, o catalisador desprotonado é então regenerado pela espécie ativa (2.3.4) que reage com a segunda molécula de álcool, iniciando novamente o ciclo catalítico. Diglicerídeos e os monoglicerídeos são convertidos na mistura alquil ésteres e glicerol pelo mesmo mecanismo.

2.4.3. Catálise enzimática

A conversão do óleo vegetal em ésteres etílicos correspondentes, por via enzimática, é mostrada pela Figura 2.4. Neste mecanismo, está ilustrado o sítio ativo da enzima que é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, aspartato e histidina (DE CASTRO et al., 2010).

Figura 2.4. Representação esquemática do mecanismo de reação de transesterificação entre etanol e um triglicerídeo catalisada por lipase.

Fonte: Adaptado de De Castro et al. (2010).

A reação se inicia pelo ataque nucleofílico do oxigênio do resíduo Ser105 ao átomo de carbono carbonílico na ligação éster, levando a formação de um intermediário I tetraédrico que é estabilizado por meio de pontes de hidrogênio pelos resíduos de Asp187 e His224. Então é liberada uma molécula de ácido graxo, ou seja, início da formação da glicerina (triol) (primeiro ocorre a formação do diglicerídeo, depois do monoglicerídeo e por último da glicerina), seguido de ataque do oxigênio do etanol ao carbono carbonílico formando o intermediário II tetraédrico também estabilizado por meio de ligações de hidrogênio pelos resíduos de Asp187 e His224, havendo então a formação do produto principal que é o monoéster etílico. É importante lembrar que este ciclo se repete por 3 vezes para que ocorra a formação da glicerina (triol) e de 3 moléculas do monoéster.

Diante desses métodos de obtenção de biodiesel, pode-se comparar, portanto, as vantagens e as desvantagens de cada um desses procedimentos como disposto na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Comparação entre diferentes tecnologias de produção de biodiesel.

Variável	Catálise ácida	Catálise alcalina	Catálise enzimática
Temperatura de reação (°C)	55-80	60-70	30-50
Ácidos graxos livres no material	Ésteres	Produto saponificável	Ésteres
Água no material	Interfere na reação	Interfere na reação	Não influencia
Recuperação do glicerol	Difícil	Difícil	Fácil
Purificação dos ésteres	Repetidas Lavagens	Repetidas lavagens	Menor necessidade de lavagens
Custo de produção do catalisador	Barato	Barato	Relativamente caro

Fonte: Adaptado de Ranganathan, Narasimhan e Muthukumar (2008).

2.5. Lipases

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases; EC 3.1.1.3) fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas, de origem e propriedades diversas, que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, para liberar ácidos graxos e glicerol. O modo de ação das lipases é bastante complexo, porque estas enzimas atuam em sistemas bifásicos, são hidrofílicas, mas com substratos hidrofóbicos e sítio ativo protegido por uma tampa hidrofóbica. As reações lipolíticas ocorrem na interface

lipídio-água onde substratos lipolíticos geralmente formam um equilíbrio entre os estados monomérico, micelar e emulsificado (REIS et al., 2009).

As lipases são produzidas por várias fontes, inclusive tecidos humanos, porém neste caso não apresentam interesse industrial (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de isolar micro-organismos produtores destas enzimas, incluindo vários gêneros e espécies de bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos. Dependendo da sua origem, lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa e atuar numa ampla faixa de pH (4-9) e de temperatura, a qual varia da temperatura ambiente até 70°C (CASTRO; ANDERSON, 1995).

Apesar de lipases de fontes distintas serem capazes de catalisar a mesma reação, os desempenhos de cada uma delas, sob as mesmas condições de reação, pode ser bastante diferente (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

2.5.1. Estrutura e mecanismo de ação das lipases

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foi determinada em 1990 (JAEGER; REETZ, 1998). Até 1998, entre as 12 estruturas de lipases elucidadas, todas eram membros da família “entrelace α/β hidrolase”, com uma arquitetura comum composta de uma sequência de α hélices e fitas β (SCHMID; VERGER, 1998).

O cerne da lipase é composto de uma lâmina β central, a qual consiste de oito diferentes fitas β ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas por seis α hélices (A-F). O sítio catalítico é formado por uma tríade catalítica (três aminoácidos), consistindo dos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina; o resíduo nucleofílico de serina é localizado no C-terminal da fita $\beta 5$, num pentapeptídico altamente conservado, GX SXG, o qual forma um “motivo” característico β -giro- α , chamado de “cotovelo nucleofílico” (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases atuam na interface óleo/água de emulsões e são ativas inclusive em solventes orgânicos. A hidrólise do substrato inicia com um ataque nucleofílico ao átomo carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico. Ocorre a formação de um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado pelos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal da enzima, que pertencem a “cavidade oxiânion” (JAEGER; REETZ, 1998).

A cavidade oxiânion é uma região eletrofílica em torno do resíduo de serina, criada pela reestruturação conformacional da lipase (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). Um

álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado, liberando o ácido graxo e regenerando a enzima (Figura 2.5) (SCHMID; VERGER, 1998).

Figura 2.5. Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e aspartato ou glutamato.
Fonte: Schmid e Verger (1998).

Um aspecto estrutural comum à maioria das lipases é a presença de uma tampa (*lid*), composta de uma sequência peptídica em α -hélice, que cobre o sítio ativo e, na conformação fechada, isto é, na ausência de uma interface ou solvente, previne o acesso do substrato à tríade catalítica (SCHMID; VERGER, 1998). O lado da tampa voltado para o sítio ativo é composto principalmente de cadeias laterais hidrofóbicas alifáticas, enquanto que a face oposta é hidrofílica e estabilizada pelas interações na superfície a proteína (VERGER, 1997).

A ativação de lipases na presença de superfícies hidrofóbicas (micelas de substrato, solventes orgânicos imiscíveis, bolha de ar, entre outras), fenômeno conhecido como ativação

interfacial, é uma característica importante destas enzimas (BASTIDA et al., 1998).

O fenômeno de ativação interfacial é geralmente associado com a orientação da estrutura α -hélice da tampa, aumentando a hidrofobicidade da superfície nas vizinhanças do sítio ativo (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Na presença da interface lipídio/água, a tampa sofre uma mudança conformacional (VERGER, 1997), produzindo a “estrutura aberta”, conferindo funcionalidade à enzima (BASTIDA et al., 1998).

Entretanto, nem todas as lipases são ativadas por interfaces, como é o caso das lipases de *Pseudomonas glumae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e, também, que tanto a qualidade como a quantidade da interface desempenha papel importante na ativação dessas enzimas (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). A qualidade da interface, em termos de tensão interfacial, é um dos parâmetros mais decisivos quando se trabalha com enzimas lipolíticas, o que significa que comparações válidas, somente podem ser feitas entre dados obtidos sob condições estritamente idênticas, preferencialmente no mesmo laboratório (VERGER, 1997).

2.5.2. Reações catalisadas por lipases

Lipases catalisam a clivagem de ligações éster via reação de hidrólise (com concomitante consumo de moléculas de água) (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). Também podem catalisar a reação reversa, isto é, a formação de ésteres a partir de um álcool, como glicerol, e um ácido carboxílico de um ácido de cadeia longa, como um ácido graxo, com liberação de moléculas de água, num processo denominado esterificação (DE CASTRO et al., 2004).

Esses dois processos básicos podem ser combinados num padrão sequencial para dar origem a um grupo de reações denominadas de interesterificação, que, dependendo do substrato de partida, pode ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um álcool) e transesterificação (quando dois grupos acilas são deslocados entre dois ésteres), sem ocorrer nem consumo nem formação de água (Figura 2.6) (DE CASTRO et al., 2004).

Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases

Fonte: De Castro et al. (2004).

2.5.3. Comportamento das lipases em meio não aquoso

O comportamento da lipase no sistema reacional é uma consequência da estrutura típica dessa enzima. Água tem um efeito primordial no comportamento da lipase afetando diretamente a hidratação da enzima ou indiretamente pela mudança da natureza do meio de reação e/ou dos materiais de suporte. A importância da água é muito mais marcante com o entendimento dos vários tipos de meios de reação. Desta forma, a seleção das condições adequadas para a realização de uma reação enzimática em meios não convencionais, deve seguir uma cuidadosa manipulação do meio-ambiente do biocatalisador, de tal forma que, a produtividade do sistema seja maximizada por meio da total potencialidade da atividade enzimática. Isto pode ser alcançado pela utilização de solventes apropriados, controle do teor de água no meio reacional e imobilização da enzima (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Neste trabalho, selecionou-se a técnica de imobilização da lipase para garantir um meio ambiente favorável para as reações de transesterificação.

2.5.4. Uso de lipases imobilizadas

Na literatura podem ser encontrados exemplos de aplicação de lipases em pó para mediar diversas reações em meio orgânico (KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ et al., 2008; YOSHIDA et al., 2011). Entretanto, é fortemente recomendado somente utilizar estas preparações de enzimas em larga escala, com cautela, devido principalmente, a questões de segurança (poeira de enzima é alergênica se inalada). Alternativamente, formulações de enzimas líquidas comercialmente disponíveis em soluções aquosas contem em sua composição estabilizantes (glicerol ou sorbitol) para prevenir a inativação da enzima e preservantes (benzoato) para evitar crescimento microbiano (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

Uma vantagem das enzimas não imobilizadas é que a adição de uma fase sólida extra no sistema reacional pode ser evitada. Isto é importante, pois os materiais de partida podem ser parcialmente imiscíveis e se formarem duas fases, ou múltiplas fases, podem acarretar menor velocidade de reação. Além disso, o suporte e o procedimento de imobilização representam um custo adicional ao processo. Entretanto, para ser competitiva, a reutilização de enzimas é uma necessidade e apesar de boas produtividades serem reportadas em exemplos da literatura empregando enzimas livres, deve ser levado em conta que os experimentos foram conduzidos em regime de batelada de uso único, sem tentativas de recuperação da atividade enzimática (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Desta forma, pode-se considerar que a vantagem fundamental das enzimas imobilizadas é que elas podem ser recuperadas e reutilizadas após um processo batelada, por filtração simples (MOREIRA et al., 2007). Além disso, o empacotamento de enzimas imobilizadas em colunas permite uma fácil implementação do processo contínuo. Deve ser ainda levado em conta que a imobilização da enzima tem um efeito benéfico na estabilidade da enzima, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima (DA RÓS et al., 2010; MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011; SIMÕES et al., 2011). A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas em meio não aquoso (DE CASTRO et al, 2008).

Diversos trabalhos disponíveis na literatura tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações em meio aquoso e não-aquoso, de acordo com as revisões publicadas por Jegannathan et al. (2008) e Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic (2009) e em alguns livros textos (DE CASTRO et al, 2008; ZANIN; MORAIS, 2004).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com

diferentes características como tamanho, forma, porosidade, hidrofobicidade e densidade, tem sido testada para a imobilização de lipases (DE CASTRO et al, 2008; DE CASTRO et al, 2010; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes, e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização, e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Suportes com alta resistência mecânica são desejáveis particularmente em sistemas com agitação. A presença de solventes pode requerer suportes com alta resistência química. Vários micro-organismos crescem em muitos substratos catalisados por lipase, portanto existe também a necessidade de suportes com resistência ao ataque microbiano. A aplicação de suportes com geometrias internas adequadas é bastante atrativa, pois reduz os efeitos de limitação difusional dos substratos aos sítios ativos da enzima imobilizada (MENDES et al., 2011). Considerando que a perda de atividade é uma questão de tempo, o suporte deve ser também facilmente regenerado e reutilizado (DE CASTRO et al, 2008).

Estudos de seleção de suportes adequados para imobilização da enzima lipase de diferentes fontes microbianas tem sido desenvolvidos (DA RÓS et al., 2010; MENDES et al., 2011; SÉVERAC et al., 2011; SIMÕES et al., 2011). Entre as matrizes testadas, resultados promissores foram alcançados pela matriz híbrida polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) (DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; MOREIRA et al., 2007; PAULA et al., 2007; PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008a,b). A matriz híbrida SiO_2 -PVA é obtida pela técnica sol-gel, a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA). O produto resultante, polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) é um composto que combina atributos físico-químicos de material orgânico e inorgânico. A síntese desta matriz envolve três etapas, conforme esquematizado na Figura 2.7 (SANTOS et al., 2008a).

As boas propriedades morfológicas do suporte aliadas à eficiência do método desenvolvido de imobilização da lipase conferem elevada estabilidade operacional do sistema imobilizado em reações de síntese. Estas características são essenciais para o processo de imobilização de enzimas e por este motivo a matriz híbrida SiO₂-PVA foi selecionada para a realização do presente trabalho.

2.6. Produção enzimática de biodiesel

Lipases de diferentes fontes têm sido testadas para a síntese enzimática de biodiesel. A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) tem sido extensivamente investigada nas aplicações de biodiesel, ainda que sejam relatados benefícios de outras lipases, como por exemplo: *Candida rugosa* (LCR) (LEE et al., 2006), *Rhizomucor miehei* (LRM) (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996), *Burkholderia cepacia* (PS) (DA ROS et al, 2010) e *Thermomyces lanuginosus* (LTL) (MENDES et al., 2011). Muitas dessas enzimas são disponíveis comercialmente, também na forma imobilizada. CALB, LRM e LTL imobilizadas são comercializadas pela Novozymes como Novozym[®] 435, Lipozyme[®] RM IM e Lipozyme[®] TL IM, respectivamente. Recentemente, a Amano lançou no mercado a Lipase PS "Amano" IM imobilizada em terra diatomácea com elevada atividade de transesterificação (AMANO, 2011).

Apesar das reações de transesterificação serem preferencialmente catalisadas por uma preparação específica de lipase, alguns trabalhos reportados pela literatura especializada relatam a aplicação promissora de uma mistura de duas lipases com diferentes especificidades ao substrato (por exemplo, uma 1,3 – específica e uma lipase não específica), atuando de forma sinérgica (LEE et al., 2006). Outros trabalhos enfocam o uso combinado de lipases com diferentes atividades para esterificar ácidos graxos livres e transesterificar triglicerídeos. O sistema CALB-LTL parece ser um bom exemplo disto (Figura 2.8). CALB esterifica rapidamente ácidos graxos livres, mas apresenta baixa atividade em glicerídeos, enquanto a LTL tem preferência oposta.

Figura 2.8. Efeito sinérgico de duas lipases de diferentes atividades atuando isoladamente ou combinadas na formação de biodiesel de óleo de soja refinado (SO) e óleo de soja contendo 20% de ácidos graxos livres (SO+AGL). Condições: MeOH/Ácidos graxos = 0,44 (proporção molar) 30% água, 50°C, 3h, utilizando enzimas líquidas. Cinza: LTL, 50ppm; Preto: CALB, 50ppm; Branco: LTL + CALB: 25 + 25ppm. Fonte: Lee et al. (2006).

Diversos trabalhos reportados na literatura descrevem a síntese de biodiesel mediada por lipases, utilizando diferentes matérias-primas e álcoois sob condições diversas (AKOH et al., 2007; DA RÓS et al., 2010; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2008; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MOREIRA et al., 2007; NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996). Diante da diversidade dos sistemas reacionais testados para a síntese enzimática de biodiesel, pode ser difícil generalizar as condições de reação e a qualidade do produto obtida. Os estudos frequentemente mostram longos períodos de reação e um biodiesel caracterizado somente pelo conteúdo de ésteres alquílicos (MENDES et al., 2011). Vários trabalhos mostram rendimentos de ésteres de ácidos graxos próximos a 100%, mas por outro lado não discutem se o produto obtido atende as especificações para uso como combustível.

A qualidade da matéria-prima lipídica também pode interferir na qualidade do produto. Por exemplo, em óleos residuais (óleo de fritura) com elevado teor de ácidos graxos livres pode requerer uma etapa adicional de destilação final do produto. Além do conteúdo de ácidos graxos livres, outros componentes ou possíveis impurezas devem ser considerados, até mesmo um componente comum em diversos óleos vegetais como o fosfolípídeo tem sido reportado como inibidor da atividade da lipase. Isto foi ilustrado em experimentos empregando 3 diferentes qualidades de óleo de soja (cru, degomado e refinado) empregando CALB imobilizada (WATANABE et al., 2002). Os resultados obtidos indicaram que

conversões mais elevadas foram alcançadas nos experimentos conduzidos com óleo degomado. Desta forma, recomenda-se efetuar a degomagem do óleo, principalmente o óleo de soja, antes da reação de transesterificação ou alternativamente, efetuar a degomagem enzimática e a síntese de biodiesel simultaneamente (HOLM; NIELSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Os problemas críticos de teor de água, estabilidade a temperatura, estabilidade aos agentes acilantes (álcoois de cadeia curta), uso de solventes e formação de glicerol como sub-produto são discutidos em relação a produção de biodiesel empregando lipases imobilizadas (ANTCZAK et al., 2009).

2.6.1. Teor de água

É necessário um baixo teor de água na fase oleosa para promover a reação de transesterificação com elevada conversão. Entretanto, a remoção de água do meio reacional deve ser equilibrada, pois uma concentração de água muito baixa pode acarretar a inativação do biocatalisador. Novozym[®] 435 atua sob concentrações de água muito menores que outras lipases (SHAH; GUPTA, 2007). A importância da remoção de água durante a esterificação de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres foi demonstrada por Watanabe et al. (2007). Neste trabalho, glicerol foi adicionado para adsorver água formada na transesterificação de um hidrolisado de ácidos graxos com metanol. Em experimentos diferentes, o efeito positivo da adição de peneira molecular para a remoção de água foi demonstrado na transesterificação do óleo de soja desodorizado com metanol, o que resultou em conversões significativamente maiores quando comparado ao experimento controle sem remoção de água (DU; WANG; LIU, 2007). Li et al. (2006) também reportaram um desempenho reduzido em reações conduzidas com óleos contendo elevados teores de água (óleo de colza refinado e óleo de fritura usado) empregando uma combinação de lipases CALB e LTL na presença de *tert*-butanol como solvente.

2.6.2. Efeito inibidor do agente acilante

Lipases imobilizadas são em geral mais termoestáveis em óleos. O processo comercial para interesterificação enzimática (óleo de soja e gordura do leite) é, geralmente efetuado a 70°C (OSÓRIO; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2006). Entretanto, nas reações de

transesterificação (óleo e álcool), álcoois de cadeia curta tem um impacto negativo na estabilidade das lipases, e este efeito inibidor aumenta com o incremento da temperatura. Watanabe et al. (2002) demonstraram o efeito negativo do metanol, etanol e *n*-propanol em diferentes temperaturas para Novozym[®] 435. Os resultados apontaram que a utilização de metanol em temperaturas superiores a 30°C a enzima foi parcialmente inativada, enquanto que etanol e especialmente *n*-propanol forneceram melhores resultados. O efeito inibidor dos álcoois na atividade das lipases parece diminuir com o aumento da massa molecular do álcool e tem sido relatada uma aparente relação entre a solubilidade do álcool no óleo e o efeito desestabilizante do óleo (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). A solubilidade do metanol em óleo corresponde a aproximadamente 1/3 em equivalente (1/3 da quantidade necessária para esterificar todo ácido graxo) e esquemas detalhados têm sido desenvolvidos para a adição gradativa de metanol a mistura reacional, ou seja, batelada alimentada (SHIMADA et al., 2002).

2.6.3. Solventes

Há vários exemplos do uso de solventes orgânicos em reações de síntese de biodiesel, entre os quais se destacam, hexano, *terc*-butanol, isopropano, dentre outros. De Oliveira et al. (2004) utilizaram hexano na síntese de ésteres etílicos empregando CALB e *Mucor miehei* a partir do óleo de palma. *Terc*-butanol tem sido empregado como solvente na síntese de biodiesel por diversos pesquisadores (DU et al., 2007; LI et al., 2006; ROYON et al., 2007). Devido ao impedimento estérico, este álcool não é aceito pela maioria das lipases na reação de transesterificação, e como solvente tem a habilidade de dissolver óleo, álcool e glicerol nas concentrações e temperaturas de interesse. Solubilização do metanol tem um efeito positivo na estabilidade da enzima, e a solubilização do glicerol previne deposição no suporte da enzima, que em vários exemplos tem sido descrito como fator limitante do número de reusos de enzimas imobilizadas (WATANABE et al., 2000). Du et al. (2007) demonstraram a variação significativa na estabilidade da enzima quando diferentes solventes foram testados, e os resultados obtidos indicaram a superioridade do *terc*-butanol. Entretanto, para a produção em escala industrial, deve ser levado em conta que mesmo tendo benefícios os solventes introduzem outros problemas operacionais, como redução da capacidade volumétrica, problemas ambientais (toxicidade, emissões) e custos (recuperação e perdas). Desta forma, os efeitos negativos têm que ser cuidadosamente avaliados com os positivos.

2.7. Configuração do reator

Entre todas as possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante (AL-ZUHAIR et al., 2011; CHEN; CHEN, 2011). 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 o equipamento no qual as enzimas imobilizadas são colocadas em contato com a solução de substrato (FERNANDES, 2010).

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: tanque agitado em batelada, tanque agitado contínuo (CSTR), leito fixo (coluna de recheio) e leito fluidizado (ZANIN; MORAIS, 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 passa pelo leito. Estes são os tipos de reatores preferidos para as aplicações em larga escala. Uma comparação dos reatores mais utilizados para enzimas imobilizadas é apresentada na Tabela 2.6. (ZANIN, 1989).

A seleção do reator mais apropriado para um determinado bioprocessos 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. No caso específico de obtenção de biodiesel a configuração do processo é muito importante e devem ser levados em conta os problemas técnicos como a homogeneidade da mistura de reação/produto, solubilidade do álcool, estabilidade da enzima, recuperação da enzima, entre outros.

Tabela 2.6. Comparação de configurações de reatores enzimáticos (agitado, leito fixo e leito fluidizado).

Variável	Contínuo Agitado (CSTR)	Leito Fixo ou Empacotado	Reator de Leito Fluidizado
Diâmetro da partícula	Partículas pequenas	Partículas grandes	Partículas Pequenas
Queda de pressão para a mesma vazão	–	Alta	Baixa
Gradiente de concentração	Pode ser eliminada com o aumento de temperatura	Presença	Ausência
Alimentação com novo catalisador	Fácil	Difícil	Fácil
Concentração do catalisador por volume de reator	Baixa	Alta	Relativamente Alta
Distribuição da temperatura no reator	Distribuição e controle razoável	Gradientes de temperatura; Controle difícil	Constante e uniforme; fácil controle
Fluxo de calor e massa no reator	Razoável	Ineficiência	Eficiência para uma dada razão e altura
Obstrução do reator	Ocorre em alguns casos	Ocorre facilmente	Muito difícil
Caminhos preferenciais	Difícil	Pode ocorrer facilmente	Distribuição uniforme do fluido
Sólidos em suspensão no substrato, e substrato viscoso.	Não causam problemas	Problemas sérios	Não causam problemas
Distribuição do tempo de residência	Grande	Pequena	Intermediário
Conversão	Razoável (menor do que a obtida na batelada para um mesmo tempo espacial).	Razoável (depende da altura da coluna).	Eficiente
Área superficial relativa por unidade de volume do reator	Alta	Baixa	Alta
Problemas com inibição pelo substrato	Grandes devido a alta concentração	Maiores que no leito fluidizado	Não causa problemas sérios

Fonte: Zanin (1989).

2.7.1. Reator de tanque agitado em batelada (BSTR)

O processo batelada em reatores de tanque agitado é um processo típico usado em laboratório devido a simples montagem do aparato. Os reatores em batelada, geralmente são os mais utilizados nos processos com enzimas em solução, entretanto enzimas imobilizadas são também empregadas. Normalmente, a enzima é introduzida no reator juntamente com o substrato, sendo que o conteúdo é descarregado quando se alcança o grau de conversão desejado (DA RÓS et al., 2010; MENDES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010). O processo pode ser operado com a adição de todos os componentes no início, considerando, que em alguns casos é recomendada a adição gradativa de um dos componentes do substrato, como por exemplo, na transesterificação de lipídios com metanol (RODRIGUES et al., 2010).

A condução de um processo em regime de batelada é útil para coletar dados sobre o processo, como por exemplo, a cinética da reação (DA RÓS et al., 2010; MENDES et al., 2011). Esses reatores têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases. Entretanto, apresentam 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 (FERNANDES, 2010; WATANABE et al., 2005).

Outros fatores negativos deste tipo de processo em larga escala são: necessidade de tanque de alto volume e longo tempo de reação. É ainda importante considerar, o declínio gradual da atividade enzimática em função do número de ciclos do sistema imobilizado. Quando a atividade enzimática diminui, o tempo de reação precisa ser aumentado adequadamente para manter constante um elevado grau de conversão. Com o tempo, a capacidade da planta diminuirá e eventualmente ficará inaceitavelmente baixo. Neste ponto a enzima deve ser substituída. A decisão difícil é o ajuste entre capacidade e custo do catalisador. Entretanto, é difícil imaginar uma planta operando com catalisador numa atividade enzimática 20% da inicial, por exemplo, o que pode ser necessário para atingir a produtividade necessária.

Para superar ou minimizar as dificuldades anteriormente citadas foram projetados alguns modelos de reatores descontínuos. Um desses, embora em escala de laboratório, é o reator com agitação provido de cesto (basket reactor) que retém a enzima imobilizada e permite a reutilização do biocatalisador sem perdas consideráveis de massa (DORS, 2011).

2.7.2. Reator de tanque agitado contínuo (CSTR)

Um reator contínuo de tanque agitado é um container com alimentação e retirada de produtos continuamente (JUNG; PARK; PARK, 2010). O projeto requer tanques múltiplos em série para assegurar o mesmo grau de conversão para o mesmo tempo de reação, significando que o volume total do tanque será grande. A vantagem desse sistema é a capacidade da planta ser mais constante, pois os tanques podem conter enzimas com diferentes valores de atividades. Isto também implica que a enzima pode ser usada mais eficientemente até que a atividade fique muito baixa. Outra vantagem desta configuração é a possibilidade de inserir etapas de separação entre os tanques para eliminação de produto ou sub-produto com potencialidade de inibição na reação, por exemplo, na produção de biodiesel essa etapa poderá ter como objetivo separar o glicerol liberado na reação (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

2.7.3. Reatores de leito fixo

Embora em escala laboratorial os reatores de tanque agitados (STR) sejam bastante comuns, o leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores biocatalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação (CHANG et al., 2009; CHEN; LIN, 2009; HALIM et al., 2009; FERNANDES, 2010; WANG et al., 2011). Ele requer um mínimo de equipamentos auxiliares e é muito eficiente. Neste caso, as tensões de cisalhamento impostas ao sistema imobilizado são menores e um reator ideal deste tipo opera, ao contrário do STR, como um reator tubular. Isto, mesmo em reatores não ideais, resulta em altas taxas de conversão no reator. 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 (FERNANDES, 2010; ZANIN; MORAIS, 2004).

Um sistema de colunas de leito fixo com enzimas imobilizadas resulta em um tempo de contato bem definido entre os reagentes líquidos e o biocatalisador sólido. Além disso, com esta montagem a proporção entre enzima e substrato será alta para qualquer tempo específico, e todo o sistema pode ser projetado para ser relativamente compacto. Em escala comercial esta tecnologia já foi implementada com sucesso para a interesterificação de óleos vegetais (OSÓRIO; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2006).

Para produção enzimática de biodiesel, diversos trabalhos são encontrados na literatura, entretanto merece destaque a montagem projetada por Shimada et al. (2002) que incorpora soluções alternativas para minimizar a inativação da enzima pelo metanol e o efeito

inibidor do glicerol formado na reação. A Figura 2.9 ilustra a montagem de reatores de leito fixo em série, no qual metanol em quantidade pré-estabelecida foi adicionado em cada coluna, facilitando a miscibilidade dos materiais de partida. De maneira similar, o glicerol formado na reação foi removido entre as colunas.

Figura 2.9. Configuração de reator de leito fixo proposto para produção de biodiesel usando adição em etapas de metanol e separação de glicerol entre as colunas.

Fonte: Shimada et al. (2002).

2.7.4. Reatores de leito fluidizado

Outra opção que permite 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 (FERNANDES, 2010). 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 da qual as partículas são carregadas para fora do reator (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996).

2.8. Processos de obtenção de biodiesel em regime contínuo

A transesterificação enzimática de óleos vegetais é substancialmente mais rápida e economicamente viável em reatores contínuos do que em reatores batelada (LEE et al., 2010; ROSA et al., 2009; WANG et al., 2011). Neste sentido, a aplicação de reatores contínuos tem sido amplamente reportada pela literatura especializada devido às suas vantagens como o custo de produção e o tempo podem ser ajustados de acordo com os níveis de trabalho, uma grande quantidade de biodiesel por unidade de volume pode ser obtida e permite fácil controle das condições reacionais, em termos de otimização da qualidade do biodiesel (HALIM et al., 2009; WANG et al., 2011). Na Tabela 2.7 são listados alguns trabalhos publicados referentes à produção de biodiesel em reatores contínuos, especificamente de leito fixo.

Shimada et al. (2002) descreveram uma configuração de reator adequada para produção enzimática de biodiesel por metanólise de óleos vegetais e de resíduos de óleo comestível. Os autores observaram que a baixa conversão em biodiesel empregando reator batelada foi decorrente da elevada inativação irreversível da lipase pelo contato com metanol. Com base neste resultado, os autores desenvolveram um sistema de metanólise em modo contínuo catalisado por Novozym[®] 435. A metanólise contínua foi realizada em três colunas de 15 mm x 80 mm empacotadas com a enzima imobilizada a 30°C e vazão de 6 mL.h⁻¹. A adição do metanol era feita em etapas, sendo um terço de equivalente molar adicionado a cada coluna. No efluente de cada coluna era efetuada a separação de glicerol e a coluna subsequente era alimentada. No caso da utilização do óleo vegetal, as conversões obtidas em cada reator foram respectivamente: 33%, 66% e 93%. A lipase pode ser utilizada por mais de 100 dias, sem redução da atividade.

Hsu et al. (2004) estudaram a etanólise contínua de óleo residual de fritura em reator de leito fixo (135 mm x 25 mm de diâmetro interno) empacotado com 10 gramas de lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada. As condições operacionais que maximizaram a produção de ésteres (rendimento = 96%) foram: vazão de 30 mL.min⁻¹; temperatura de 50°C, razão molar dos materiais de partida 4:1 etanol: óleo e tempo de reação de 48 h.

Tabela 2.7. Processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzida em reator de leito fixo.

Lipase	Óleo	Agente acilante	Meio	Referência
Novozym® 435	Óleo residual	MeOH	Isento de solventes	SHIMADA et al., 2002.
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo residual	EtOH	Isento de solventes	HSU et al., 2004.
<i>Candida</i> sp. imobilizada em membrana de algodão	Óleo vegetal Óleo residual	MeOH	Éter de petróleo/ água	NIE et al., 2006.
Novozym® 435	Óleo de semente de algodão	MeOH	<i>terc</i> -butanol	ROYON et al., 2007.
Novozym® 435	Óleo de soja	MeOH	<i>n</i> -hexano <i>terc</i> -butanol	SHAW et al., 2008.
Novozym® 435	Óleo de palma residual	MeOH	<i>terc</i> -butanol	HALIM et al., 2009.
Novozym® 435	Óleo de canola	MeOH	Isento de solventes	HAJAR et al., 2009.
Novozym® 435	Óleo de girassol	MeOH	Isento de solventes	OGNJANOVIC; BEZBRADICA; KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009.
Novozym® 435	Óleo de soja	Iso-propanol	Isento de solventes	CHANG et al., 2009.
Novozym® 435 Lipozyme TL-IM	Óleo de girassol	MeOH EtOH Isopropanol	Ésteres de ácidos graxos	JACHMANIAN et al., 2010.
Lipase AK Lipase AY	Óleo de palma	EtOH	Isento de solventes	TONGBORIBOON; CHEIRSILP; H-KITTIKUN, 2010.
Novozym® 435	Óleo de soja	MeOH	<i>terc</i> -butanol	CHEN et al., 2010.
Lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA	Óleo de palma	EtOH	<i>terc</i> -butanol	DORS, 2011.

Nie et al. (2006) realizaram experimentos visando a otimização da alcoólise de óleos vegetal e residual de fritura operando em regime batelada e contínuo, empregando lipase de *Candida sp.* 99-125 imobilizada em membrana de algodão. A transesterificação com metanol, em processo contínuo, foi realizada em três reatores em série (10 mm x 180 mm de diâmetro interno) contendo 500 g de enzima, com três etapas de adição de um terço equivalente molar de metanol (uma adição em cada reator) e éter de petróleo foi utilizado como solvente. O glicerol foi separado na saída de cada reator. A conversão do processo contínuo foi de 90% para o óleo vegetal e de 92% para o óleo de descarte. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi superior a 20 dias.

Royon et al. (2007) relataram a produção de biodiesel por metanólise do óleo de semente de algodão utilizando Novozym[®] 435 como catalisador em solvente *terc*-butanol. No processo batelada, foi possível observar que a inibição da enzima, causada pelo metanol insolúvel, foi eliminada pela adição do *terc*-butanol ao meio reacional, que também proporcionou um aumento no rendimento em ésteres. Um rendimento de 97 % foi determinado em 24 h de reação a 50°C, em meio reacional contendo 32,5% de *terc*-butanol, 13,5% metanol e 54% óleo e carregamento catalítico de 0,017g de enzima.g⁻¹de óleo. Rendimento de 95 % foi obtido utilizando um reator contínuo de leito fixo (180 x 6 mm) com uma vazão de 9,6 mL.h⁻¹.g_{enzima}⁻¹. O sistema contínuo operou por mais de 500 h sem apresentar expressiva redução no rendimento em ésteres.

O processo contínuo de metanólise do óleo de soja, catalisado pela Novozym[®] 435 na presença de co-solvente, uma mistura de *n*-hexano: *terc*-butanol foi investigado por Shaw et al. (2008). O reator de leito fixo consistiu de um tubo de aço inoxidável de 250 x 25 mm empacotado com 1 g de enzima. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar os efeitos dos parâmetros de síntese, as melhores condições de síntese foram: temperatura 52°C, vazão de 0,1 mL.min⁻¹ e razão molar de metanol:óleo de soja 4,3:1. O valor predito para a conversão foi de 74,2 % e o valor experimental de 75,2 %.

Halim et al. (2009) estudaram a metanólise do óleo de palma residual catalisada pela Novozym[®] 435 com objetivo de determinar a condição ótima para o processo contínuo de transesterificação em um reator de leito empacotado, visando a possibilidade de aumento de escala de processo. As duas colunas com dimensões de 180 mm x 10 mm foram alimentadas em fluxo ascendente. Duas importantes variáveis do processo foram estudadas: altura do leito e vazão do substrato. As melhores condições para a transesterificação foram: 105,3 mm de altura do leito e vazão volumétrica de 0,57 mL.min⁻¹ de substrato, nestas condições o rendimento em ésteres metílicos foi de 79,0 % tendo um valor predito de 80,3%.

A metanólise enzimática do óleo de canola em reator de leito fixo (100 mm x 15 mm) contendo 2 g de Novozym[®] 435 em meio isento de solventes contendo pequenos pedaços de esponja natural no interior do leito foi estudada por Hajar et al. (2010). O sistema foi constantemente recirculado durante 72 h e o metanol adicionado em 3 etapas, uma no início da reação (0 h), a segunda em 24 h e a terceira em 48 h. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para determinar o efeito das seguintes variáveis: fluxo do substrato, temperatura e razão molar etanol: óleo de canola. As condições ótimas obtidas foram: fluxo de 6,3 mL.min⁻¹, temperatura de 38°C e razão molar metanol: óleo de canola de 4,3:1. Estas condições foram repetidas por 6 ciclos (432 h) no reator de leito fixo, mantendo a conversão de ésteres metílicos superior a 97% (retiradas a cada 72 h).

Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic (2009) comprovaram a possibilidade de utilização de Novozym[®] 435 na síntese de biodiesel a partir de óleo de girassol e metanol, em sistema isento de solventes. Empregando a metodologia de superfície de resposta, foram estabelecidas as seguintes condições ótimas: temperatura 45°C, 3% de enzima em relação à massa de óleo, razão molar metanol:óleo 3:1 e sem adição de água no meio de alimentação. Nestas condições, a conversão dos óleos em ésteres metílicos foi superior a 99% em 50 h de reação. Entretanto, a atividade da enzima imobilizada diminuiu significativamente após alguns ciclos de 50 h. Outros aceptores acila foram testados para aumentar a estabilidade da enzima e o acetato de metila foi selecionado devido às elevadas conversões obtidas, superior a 95,65%, e ao aumento do tempo de meia-vida de 20 vezes com relação ao metanol. As reações de transesterificação foram efetuadas em processo batelada e em reator de leito fixo, sendo este último mais eficiente (conversão de 93,6% em 8 a 10 h).

A produção de biodiesel em um reator de leito fixo (aço inoxidável, 250 mm x 46 mm) mediada pela lipase Novozym[®] 435, a partir de óleo de soja com isopropanol em sistema isento de solvente foi investigado por Chang et al. (2010). Os autores utilizaram como ferramenta o planejamento estatístico para determinar as condições otimizadas da reação. As condições que permitiram uma conversão de 75 % em ésteres isopropílicos no processo contínuo foram: fluxo = 0,10 mL.min⁻¹, temperatura = 51,5 °C e razão molar de 1:4,14 (óleo:álcool), utilizando 1,7 g de lipase. A lipase mostrou excelente estabilidade operacional e o sistema foi operado durante sete dias sem redução da produção dos ésteres isopropílicos. Segundo os autores o álcool isopropílico é um subproduto da indústria eletrônica e sua utilização reduziria os custos do processo de produção de biodiesel.

A adição de ésteres ao substrato da reação de transesterificação contínua do óleo de girassol com etanol e isopropanol foi proposta por Jachmanian et al., 2010. O reator consistia de uma coluna de vidro (200 mm x 18 mm) e a alimentação era feita em fluxo descendente. A adição de ésteres alquílicos de ácidos graxos no início da reação pode ser útil para modificar a solubilidade entre o óleo e o álcool. Novozym® 435 e Lipozyme TL-IM foram testadas quanto sua atividade catalítica e produtividade na transformação contínua, usando substratos de composição variada. Foram alcançadas concentrações mássicas em ésteres da ordem de 80% por 80 h de ensaio, utilizando uma proporção de 35:35:30 (óleo de girassol:etanol:ésteres etílicos) e a lipase Novozym® 435.

A síntese de biodiesel utilizando um reator de leito fixo com uma mistura de lipases (*Pseudomonas fluorescens*-AK e *Candida rugosa*-AY) para a transesterificação do óleo de palma com etanol em meio isento de solvente foi proposta por Tongboriboon et al. (2010). O reator consistia de duas colunas empacotadas, na primeira as duas enzimas estavam misturadas e na segunda a Lipase AY estava no fundo e a Lipase AK no topo da coluna. O substrato foi alimentado em fluxo ascendente de 0,25 mL.min⁻¹ e a temperatura foi controlada por circulação de água (45°C). A conversão média do óleo de palma em biodiesel na coluna empacotada com as lipases separadas foi de apenas 14 %. Esse resultado foi atribuído ao efeito inibitório do etanol sobre a atividade da Lipase AY. Na coluna empacotada com a mistura das lipases a produção média de biodiesel foi da ordem de 22 %. Para aumentar a conversão do óleo de palma em biodiesel, os autores aumentaram a altura da coluna de reação. O teor de biodiesel obtido na coluna empacotada com as lipases separadas atingiu valor máximo de 67% em 8 h, mas diminuiu para 59 % e 49 % após 12 h e 22 h, respectivamente. Neste mesmo estudo foi testada a adição gradual de etanol. Observou-se que a diferença da conversão de biodiesel quando todo o etanol foi adicionado em uma única etapa (89 %) em relação ao teste efetuado com adição gradual em três etapas (91 %) foi de apenas 2 %. Assim, a adição em uma única etapa foi considerada a melhor escolha, pois a adição gradual do substrato pode impor limitações na configuração do reator, principalmente para operações em regime contínuo.

Chen et al. (2011) produziram biodiesel a partir de óleo de soja com metanol na presença de *tert*-butanol (32,5 % em relação a massa de óleo) mediado pela lipase CALB imobilizada (Novozym® 435). Este solvente aumenta a miscibilidade do metanol com óleos vegetais, bem como atua como agente de regeneração da lipase. Empregando um planejamento estatístico de experimentos e análise dos resultados pela metodologia de superfície de resposta foi investigada a influência das variáveis independentes (temperatura de

reação, vazão volumétrica e razão molar do substrato) na variável resposta considerada (conversão molar). As condições ótimas para operação contínua do reator de leito fixo proporcionaram uma conversão máxima de 83,31 % com vazão volumétrica de 0,1 mL.min⁻¹, 52,1°C e a razão molar de 4:1 (álcool:óleo). O reator de leito operou por mais de 30 dias sem uma perda significativa na conversão de substrato.

Dors (2011) efetuou um extenso trabalho com objetivo de estudar a reação de alcoólise enzimática do óleo de palma com etanol em sistema contínuo na ausência e presença de solvente (terc-butanol). Para tanto, foram utilizadas as lipases de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano – álcool polivinílico (AK SiO₂-PVA) e de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym® 435) disponível comercialmente. Foi avaliado o comportamento da reação de alcoólise em reator do tipo tanque agitado com cesta e do tipo leito fixo. Os rendimentos mais elevados no reator do tipo cesta (48%) foram obtidos com um tempo espacial de 13 h, utilizando 30 % de terc-butanol em relação ao óleo. No reator de leito fixo, os rendimentos mais elevados (88%) foram obtidos utilizando a enzima AK SiO₂-PVA, na presença de solvente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Fontes de lipase

Os experimentos foram realizados empregando a lipase não específica de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) adquirida na forma solúvel da Amano Enzyme Inc. (Japão) e posteriormente imobilizada em suporte híbrido polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA). A lipase de *Candida antarctica* gentilmente doada pela Novozymes (Araucária, Paraná), na forma imobilizada em suporte acrílico (Novozym® 435) foi utilizada para teste inicial de desempenho da montagem experimental proposta.

3.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: Etanol anidro (98%, Vetec) e óleo de babaçu refinado gentilmente cedido pela Cognis (Jacareí - SP), tendo uma composição aproximada em ácidos graxos de 3,5% Octanóico, 4,5% Decanóico, 44,7% Láurico, 17,5% Mirístico, 9,7% Palmítico, 3,1% Esteárico, 15,2% Oléico e 1,8% Linoléico. Massa molecular (709,4 g.mol⁻¹). Outras propriedades da amostra do óleo de babaçu incluem: índice de acidez (0,65%), índice de saponificação (238,20 mg KOH.g⁻¹), índice de iodo (25,38 g I₂.g⁻¹), massa específica (0,85 g.cm⁻³), ácidos graxos livres (0,33%), índice de oxidação (1,82 mEq.kg⁻¹) e viscosidade (29,51 cSt).

3.1.3. Suporte de imobilização

Como suporte foi selecionado o composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) preparado pela técnica sol-gel (PAULA et al., 2008), empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (EUA).

3.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (etanol – Nuclear, hexano – Quimex, *tert*-butanol - Dinâmica), álcool polivinílico (MM 72.000, Reagen), HCl (mínimo 36% Isofar), epícloridrina (Sigma), polietilenoglicol (Synth - MM 1500), goma arábica em pó pura

(Sinth) e óleo de oliva comercial baixo teor de acidez (Carbonell). Padrões cromatográficos sintetizados por via química de acordo com metodologia previamente estabelecida por Urioste et al. (2008).

3.2. Equipamentos

3.2.1. Biorreator de leito fixo

Para a construção e adaptação dos biorreatores de leito fixo para a produção do biodiesel, foram adquiridos colunas de vidro, bomba peristáltica, placa de agitação, tubulações de silicone, banho termostatizado, aquecedor e resistências flexíveis. As especificações dos equipamentos adquiridos estão descritas na Tabela 3.1. As conexões foram feitas por tubos de silicone e de marprene.

Tabela 3.1. Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fixo

Equipamento	Descrição	Marca
Bomba peristáltica	Bomba Peristáltica SJ-1211	Atto
Banho termostatizado	Banho Ultratermostato Criostato	Nova ética
Reatores de vidro de coluna encamisado	Diâmetro= 15 mm	Construídos em oficina especializada
	Altura = 55 mm	
	Volume = 10 mL	
	Diâmetro= 15 mm	
	Altura = 210 mm	
	Volume = 32 mL	
Agitador magnético	Agitador Magnético MA 085	Marconi
Aquecedor	Aquecedor e Desumidificador de ar (2000W)	Mondial
Resistências flexíveis	Resistência flexível 2m/25W	KW Resistências Elétricas

3.2.2. Principais equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica ID 50 Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda) para a determinação do teor de umidade dos suportes e derivados imobilizados; para as dosagens de atividade enzimática foram utilizados um banho termostatizado com agitação, Modelo 145 Marconi (Marconi) e um Titulador automático Modelo 794 BASIC TITRINO Metrohm (Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica Ltda, São Paulo, SP); incubadora MOD. 430 Nova Ética (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos Ltda) para imobilização das lipases; Cromatógrafo a gás Modelo GC-3800 VARIAN (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) para as

dosagens dos ésteres de etila. A viscosidade absoluta foi medida em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd., Inglaterra) empregando o cone CP 42.

3.3. Metodologia experimental

3.3.1. Síntese do suporte híbrido e imobilização da lipase

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado conforme metodologia descrita por Paula et al. (2008). O composto resultante foi triturado até que passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH. Em seguida, o suporte foi embebido em solução de agente de ativação epícloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7), na proporção massa de suporte: volume de solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com solução tampão de fosfato, e em seguida levado à estufa (60°C) por 24 h. O suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Em seguida, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg da lipase PS na forma livre e 100 μL de solução aquosa contendo 5 mg.mL^{-1} de polietilenoglicol (PEG-1500). A atividade hidrolítica do derivado imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberta 1 μmol de ácidos graxos livres por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em unidades de atividade por grama de sólido.

3.4. Testes operacionais

3.4.1. Calibração da bomba peristáltica

A bomba peristáltica foi calibrada sob as mesmas condições utilizadas nos ensaios de síntese de biodiesel, com relação à razão molar álcool:óleo do meio reacional e a temperatura. A mangueira utilizada foi de marprene 1,6 mm X 0,5 mm (WATSON – 913.AJ05.016). O ajuste inicial da bomba foi feito levando em consideração a calibração do fabricante da bomba que utiliza água para fazer a curva de calibração. A partir desse dado, foi feito o ajuste manual

na bomba para alcançar os valores das vazões utilizadas nos ensaios. O processo consistiu na coleta de determinado volume cronometrando-se o tempo.

3.4.2. Cálculo da distribuição do tempo de residência

Para o cálculo da Distribuição do Tempo de Residência (DTR) no reator de leito fixo, foi realizado um teste de traçador (corante lipossolúvel CI 61554) tipo pulso. Inicialmente, foi efetuada uma varredura de frequências em espectrofotômetro na faixa da luz visível (UV-Visível Varian modelo Cary 50), empregando-se uma concentração de traçador (15%) diluída no meio reacional óleo de babaçu e etanol (razão molar óleo: etanol de 1:7), visando determinar o comprimento de onda no qual a absorvância era máxima. Em seguida, empregando-se o comprimento de onda determinado (646 nm), foi construída a curva de calibração correlacionando a leitura da absorvância em função da concentração de traçador.

Para a realização do ensaio de Distribuição do Tempo de Residência utilizou-se o reator de coluna de capacidade de 32 mL empacotado com 21,95 gramas de lipase imobilizada em SiO₂-PVA previamente inativada, por aquecimento em estufa a 100 °C por 2 horas. O traçador (corante lipossolúvel CI 61554) na concentração de 15% em meio reacional foi injetado com o auxílio de uma bomba peristáltica, tendo sido injetado 0,4808 g da mistura. O reator foi alimentado com meio reacional numa vazão fixa de 0,088 mL.min⁻¹, sendo retiradas amostras na saída a cada 30 minutos por um período total de 10h, considerando-se como tempo inicial do ensaio o momento da injeção do traçador.

Os valores de concentração do corante na saída do reator foram calculados segundo equação obtida na curva de calibração. Por meio dos valores determinados, foi plotado um gráfico de concentração do corante (mg.mL⁻¹) em função do tempo e um modelo matemático exponencial foi ajustado aos pontos obtidos.

A função da DTR, E(t) foi calculada pela equação 3.1, considerando a constante vazão volumétrica utilizada.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (3.1)$$

Em que:

$C(t)$ = a concentração do corante no tempo t (g.mL⁻¹) e t = tempo (h).

Para determinar o valor do denominador da equação 3.1, foi construído um gráfico de $C(t)$ versus t e com o auxílio do software OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724), a função da DTR,

$E(t)$, foi determinada e o tempo médio de residência, t_m , que corresponde ao tempo espacial, τ , foi calculado pela equação 3.2.

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt \quad (3.2)$$

3.5. Montagem experimental

A Figura 3.1 apresenta o esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios, constituído de uma coluna vidro e conexões. A síntese de biodiesel foi realizada em colunas de vidro encamisada com capacidade nominal de 10 mL ou 32 mL. O substrato foi alimentado por meio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto), com fluxo ascendente na vazão requerida. A temperatura do sistema foi mantida constante (50°C) e controlada por um banho termostático. Para evitar perda de etanol no sistema, foi acoplado um condensador de refluxo ao frasco de alimentação.

Figura 3.1. Esquema experimental do reator de leito fixo: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.

Foram efetuados 7 experimentos. Para os experimentos 1 a 3 foi utilizado um reator de capacidade nominal de 10 mL (diâmetro interno = 15 mm, altura = 55 mm), enquanto nos experimentos 4 a 7 foi utilizado um reator de capacidade de 32 mL (diâmetro interno = 15 mm, altura = 210 mm). Em cada experimento a coluna foi empacotada com suspensão do derivado imobilizado no meio reacional e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna por um período equivalente a 3 tempos espaciais. Esta metodologia também permitiu a eliminação de bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna. As amostras foram recolhidas e estocadas a -2°C, até a realização das análises cromatográficas. Os resultados foram expressos em porcentagens mássicas dos ésteres obtidos.

3.6. Síntese de biodiesel em reator de leito fixo

A mistura reacional de óleo de babaçu e etanol foi mantida em um frasco de alimentação, sob agitação magnética (150 rpm) e temperatura de 50°C. O substrato foi bombeado através do reator de leito fixo com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto) na vazão requerida.

A parte experimental foi iniciada pelos testes de desempenho da montagem experimental proposta utilizando duas preparações de lipases imobilizadas, uma disponível comercialmente (Novozym® 435) de eficiência comprovada na literatura e outra adquirida na forma solúvel e posteriormente imobilizada (suporte não comercial SiO₂-PVA) de eficiência comprovada em trabalhos anteriormente efetuados em regime de batelada empregando óleo de babaçu (Freitas et al, 2009; Da Ros et al, 2010). Na sequência foram efetuados testes empregando substratos constituídos de óleo de babaçu e etanol em duas razões molares (1:7 e 1:12) e avaliado o desempenho do reator para 4 diferentes vazões volumétricas correspondendo a tempos espaciais entre 7 a 13h. Para cada condição, foi determinada a influência do tempo espacial na concentração de ésteres de etila formados, rendimentos de transesterificação e produtividade. Ao final dos experimentos a enzima foi recuperada e lavada com hexano para remoção de substrato e produtos eventualmente retidos nas partículas da matriz. A atividade hidrolítica residual dos derivados imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (item 3.7.4) e adotando o modelo de desativação de primeira ordem foram calculados a constante de desativação (k_d) e tempo de meia-vida (item 3.8.4).

3.7. Métodos de análise

3.7.1. Análises texturais do suporte e biocatalisador

As medidas de áreas superficiais, volume de poros e distribuição de volume de poros das amostras do suporte e do biocatalisador foram realizadas em um equipamento da marca BEL, modelo BELSORP-mini II, empregando-se a técnica de adsorção-dessorção física de nitrogênio a -196°C . As amostras foram previamente tratadas *in situ* sob aquecimento à temperatura de 100°C por 3 h para retirar água e os gases adsorvidos na superfície e nos poros do sólido.

3.7.2. Densidade do suporte

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 sob vácuo, 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).

3.7.3. Teor de umidade

Os teores de água do suporte e dos derivados imobilizados foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50).

3.7.4. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada 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 (0,02M) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera $1\mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 3.3 e expressas em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (U).

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{min}) = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad (3.3)$$

em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco, M = molaridade da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa em gramas.

3.7.5. Dosagem dos ésteres de etila

Os ésteres de etila formados foram quantificados por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo a gás, Varian 3800), com detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável 5% DEGS em Chromosorb WHP, 80/100 mesh (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), adotando metodologia previamente estabelecida por Urioste et al. (2008). Nitrogênio foi usado como gás de arraste. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 90°C por 3 min, 120°C por 10 min e 170°C por 15 min sendo aquecida numa taxa de 25°C min⁻¹. As condições para determinação dos ésteres de etila são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Condições para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.

Padrão interno	Hexanol
Programa de temperaturas	90°C (3min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min)
Taxa de variação	25 °C.min ⁻¹
Gás de arraste	Nitrogênio
Preparo da amostra	1:3 (amostra - hexano)
Preparo para injeção	1:1 (amostra - padrão interno)
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila (min)	C8 EtOH = 3,28
	C10 EtOH = 5,26
	C12 EtOH = 8,56
	C14 EtOH = 12,06
	C16 EtOH = 13,96
	C18 EtOH = 17,10
	C18:1 EtOH = 17,81
	C18:2 EtOH = 19,26

3.7.6. Purificação das amostras de biodiesel

Para a separação da glicerina liberada 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 do meio reacional. 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 (1569 g / 15 min) e posteriormente a evaporação em rota-evaporador (70°C/15 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. 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 a 40 °C, empregando aproximadamente 0,5 mL de amostra. Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram feitas a 15 °C, empregando-se 2,0 mL de amostra.

3.8. Cálculos

3.8.1. Rendimento da transesterificação

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila (ΣM_e). M_e é determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de babaçu (M_o), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 3.4a em que M_o corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) (Equação 3.4.b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (M_t) pela massa total teórica de ésteres de etila (ΣM_e), conforme mostrado na Equação 3.4 c.

$$M_e = \frac{(M_o \cdot MM_e)}{MM_a} \quad (a) \qquad M_o = C_a \cdot M_i \quad (b) \qquad R = \frac{M_t}{\sum M_e} \times 100 \quad (c) \qquad (3.4)$$

Em que: M_t = massa total de ésteres de etila produzidos (g); M_e = massa teórica máxima de ésteres de etila (g); M_o = massa de ácidos graxos presentes na massa inicial do óleo de babaçu (g); MM_a = massa molecular do ácido graxo (g mol^{-1}); MM_e = massa molecular do éster de etila (g mol^{-1}); C_a = concentração mássica do ácido graxo no óleo de babaçu (g g^{-1}); M_i = massa inicial de óleo de babaçu (g); R = rendimento.

3.8.2. Tempo espacial

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (1972), conforme as Equações 3.5 (a), (b) e (c):

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (3.5 \text{ a})$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (3.5 \text{ b})$$

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{w}{\rho} \quad (3.5 \text{ c})$$

em que: τ = é o tempo espacial (min), V = volume útil do reator (mL), v_0 = vazão volumétrica sobre a seção da coluna ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), V_{reator} = volume total do reator, $V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator, w = massa do catalisador seco (g), ρ = densidade do biocatalisador seco ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

3.8.3. Produtividade

A produtividade foi definida e calculada de acordo com a Equação 3.6:

$$P = \frac{C}{\tau} \quad (3.6)$$

Em que:

P = produtividade ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

C = concentração de ésteres etílicos à saída do reator ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1}$)

τ = tempo espacial (h).

3.8.4. 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 3.7 e 3.8, respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d \cdot t} \quad (3.7)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (3.8)$$

Em que: A_0 e A referem-se, respectivamente, as atividades hidrolíticas inicial e residual do biocatalisador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Propriedades dos biocatalisadores

4.1.1. Propriedades da lipase Novozym® 435

Novozym® 435 é uma preparação de lipase de *Candida antarctica* (lipase B) produzida por fermentação submersa de uma linhagem *Aspergillus* geneticamente modificada e imobilizada por adsorção em resina aniônica macroporosa. Essa preparação de lipase é classificada como não específica e termo-estável, podendo ser usada em temperaturas entre 30-70°C. No entanto, para estender a estabilidade operacional é recomendado trabalhar em temperaturas na faixa de 50-60°C. Essa preparação é provavelmente o biocatalisador mais usado em biotransformação com lipases, podendo ser usada em meio isento de solvente ou na presença de solventes e em diversas configurações de reatores, em particular em reatores de leito fixo. A densidade do sólido medida de acordo com metodologia detalhada (item 3.7.2) forneceu um valor igual a 0,6915 g.mL⁻¹. Informações adicionais desse biocatalisador são listadas no Apêndice A (DALLA ROSA, 2009).

4.1.2. Propriedades da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA

Para realização dos experimentos foram preparadas diversas bateladas da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, conforme metodologia descrita em 3.3.1. Os biocatalisadores resultantes e suportes foram caracterizados quanto às suas propriedades texturais, utilizando o método B.E.T. a partir de isotermas de adsorção de N₂ a 77 K, conforme dados apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. 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

A atividade hidrolítica dos biocatalisadores variou numa faixa entre 1400 e 2200 U.g⁻¹ e umidade inferior a 10%. A massa específica do sólido determinada foi de 1,865 g.mL⁻¹.

O Apêndice B apresenta as propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, conforme dados publicados por Da Rós et al. (2010).

4.2. Ajuste da vazão da bomba peristáltica e cálculo do tempo espacial

Para este ajuste foram utilizados: bomba peristáltica, mangueira de marprene com diâmetro interno de 0,5 mm e frasco de alimentação aquecido na temperatura de reação, com agitação e condensador para evitar a perda de etanol por evaporação. O ajuste foi efetuado nas condições estabelecidas para condução dos experimentos: temperatura de 50°C, razão molar 1:7 (óleo de babaçu: etanol) para os experimentos 1 a 5 e razão molar 1:12 (óleo de babaçu: etanol) para os experimentos 6 e 7. O ajuste foi feito manualmente no botão de controle de rotação do motor da bomba e a vazão foi medida por meio da verificação do tempo necessário para se atingir um determinado volume, medido em proveta. O Apêndice C lista os valores de tempo e volume empregados para medição das vazões ajustadas.

Utilizando-se os valores médios de vazão medidos e de densidade do sólido, fez-se o cálculo dos tempos espaciais que seriam efetivamente empregados nos experimentos, para as reações catalisadas pela enzima Novozym® 435 e Lipase PS imobilizada em suporte SiO₂-PVA. O detalhamento dos cálculos é mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Cálculos dos parâmetros operacionais do reator de leito fixo

Experimento	Cálculos			
	Volume da enzima (mL)	Volume útil do leito (mL)	Vazão média (mL.min ⁻¹)	Tempo espacial (h)
	$V_{enzima} = \frac{m_{enzima}}{d_{cristalina}}$	$V_{útil} = V_{reator} - V_{enzima}$	Ajuste	$\tau = \frac{V_{útil}}{vazão}$
1	2,89	6,82	0,0278	4,0
2	4,17	5,54	0,0130	7,1
3	4,29	5,43	0,0130	7,0
4	11,80	20,50	0,046 - 0,025	7,0 - 13,0
5	13,03	19,28	0,025 - 0,046	13,0 - 7,0
6	12,09	20,21	0,026 - 0,048	13,0 - 7,0
7	12,88	19,43	0,025 - 0,046	13,0 - 7,0

Os valores médios dos tempos espaciais obtidos com as vazões ajustadas foram considerados satisfatórios e marcas foram feitas no botão de controle de rotação do motor da bomba para possibilitar a reprodução destas vazões durante a execução dos experimentos.

4.3. Distribuição de tempo de residência (DTR)

4.3.1. Curva de calibração

A construção da curva de calibração “absorbância X concentração de traçador”, para determinação da concentração de traçador na saída do reator foi realizada com o corante lipossolúvel CI 61554 na concentração de 15% em meio reacional óleo de babaçu e etanol na razão molar 1:7, adotando a metodologia descrita em 3.4.2. A varredura inicial feita no espectrofotômetro na faixa da luz visível mostrou que a maior absorbância para esse corante foi observada no comprimento de onda de 646 nm. Desta forma, neste comprimento de onda, foram feitas as leituras subsequentes para diferentes concentrações de solução de traçador em meio reacional empregando como solvente terc-butanol.

Na Figura 4.1 é mostrado o comportamento da absorbância em função da concentração do traçador, tomando por base os dados apresentados no Apêndice D. A reta que ajusta os dados experimentais é apresentada na Equação 4.1.

Figura 4.1- Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de babaçu e etanol)

$$\begin{aligned} \text{Absorbância} &= 0,0227 + 13,77 [T] \\ \text{Coeficiente de correlação} &= 0,9947 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Em que:

[T]= Concentração de traçador em meio reacional óleo de babaçu e etanol (%)

A densidade do suporte SiO₂-PVA foi de 1,865 g.mL⁻¹. Este valor corresponde à densidade do sólido, desconsiderando-se os espaços inter e intra-particulares. Deve-se observar que, após o carregamento do reator com o suporte sólido, o mesmo foi preenchido com meio reacional e mantido sob vácuo até que todo o ar fosse retirado dos poros das partículas. Assim, o valor da densidade do sólido foi considerado adequado para a determinação do volume de líquido no reator e, conseqüentemente, do tempo espacial.

4.3.2. Cálculo da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

A Distribuição do Tempo de Residência (DTR) é uma informação importante na operação de reatores que permite diagnosticar problemas de escoamento, entre os quais se destacam: i) existência de zonas de estagnação do fluido ou zonas mortas; ii) curto-circuitagem extrema e subpassagem do fluido; iii) existência de canalização, especialmente em operações em contracorrente; iv) dispersão axial em reatores tubulares e v) segregação, resultante das condições de mistura no reator (FOGLER, 2002).

DTR é determinada experimentalmente injetando no reator uma concentração conhecida de um traçador no tempo zero e medindo a concentração do mesmo no efluente do reator em função do tempo. Os dois métodos mais utilizados para injeção são o de entrada do tipo degrau e do tipo pulso, sendo que neste trabalho, empregou-se o tipo pulso. Em reatores tubulares ideais todos os componentes que saem do reator permanecem exatamente o mesmo tempo em seu interior e, neste caso a DTR é um pico de altura infinita e largura zero, cuja área é igual a 1 (FOGLER, 2002).

Em reatores ideais, sem caminhos preferenciais ou zonas mortas, o tempo médio de residência (t_m), calculado em função da distribuição de tempo de residência, deve coincidir com o tempo espacial (τ - tempo necessário para se processar um volume de reator), calculado conforme equação 3.2. Quanto maior for o número de caminhos preferenciais e de zonas mortas no empacotamento maior será a diferença entre os valores de tempo médio de residência (t_m) e o tempo espacial (τ).

No presente trabalho, a função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) foi determinada experimentalmente injetando-se 0,4808 g da solução de corante lipossolúvel azul (15%) em meio reacional (óleo de babaçu:etanol na proporção molar de 1:7) no tempo $t = 0$ e, medindo-se a concentração, C , do traçador na saída do reator em função do tempo. O teste foi realizado por 10 h, efetuando amostragens a cada 30 min. A Figura 4.2 ilustra o espalhamento do corante no interior do reator durante a realização do teste.

Figura 4.2. Ilustração do sistema durante o teste de traçador demonstrando a distribuição do corante no reator.

Os valores de absorvância das amostras previamente diluídas em terc-butanol apresentados no Apêndice E, serviram de base para calcular a concentração do corante na saída do reator por meio da equação obtida na curva de calibração (Figura 4.1). As concentrações do traçador na saída do reator foram plotados em função do tempo (Figura 4.3) e para cada valor de tempo, a função da DTR, $E(t)$ foi determinada, conforme dados apresentados na Figura 4.4.

O tempo espacial calculado foi de 4,1 h. Conhecendo-se o volume de líquido do reator, obtido por meio da diferença entre o volume total e o ocupado pelo suporte no empacotamento, e a vazão volumétrica empregada ($0,088 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), obteve-se tempo espacial de 3,87 h. Comparando-se este tempo com o correspondente tempo espacial calculado (4,1 h), tem-se uma diferença de 0,23 h (13,8 min), considerada aceitável neste tipo de ensaio em função dos erros experimentais envolvidos.

O espalhamento da curva de DTR apresentado na Figura 4.4 mostra o desvio do comportamento do reator utilizado em relação ao reator tubular ideal. Entretanto, a relativa similaridade entre os tempos espaciais pode ser considerada um indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou retromistura no leito, demonstrando boa qualidade do empacotamento.

Figura 4.3. Concentração do corante lipossolúvel em função do tempo.

Figura 4.4. Distribuição de Tempo de Residência em reator tubular empacotado com lipase imobilizada em SiO₂-PVA (inativada).

4.4. Operação do reator de leito fixo

Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 50°C, de acordo com as condições descritas na Tabela 4.3. No experimento 1, o leito foi empacotado com a lipase imobilizada disponível comercialmente (Novozym® 435) para teste inicial do aparato experimental e levantamento de dados operacionais como parâmetro de comparação com a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, utilizada como leito empacotado nas reações subsequentes. Desta forma, nos experimentos 1 e 2 foram avaliados os problemas operacionais, bem como aplicadas estratégias para correção do sistema visando manter uma operação estável do reator. Os resultados obtidos nesses experimentos também foram utilizados para estimar o tempo de meia-vida da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA. No experimento 3, a enzima (lipase PS) utilizada no experimento 2 foi recuperada e reutilizada numa nova reação nas mesmas condições operacionais. Nos experimentos 4 a 7 foram avaliados diferentes tempos espaciais para ensaios efetuados com meio reacional constituído de óleo de babaçu e etanol em duas diferentes razões molares (1:7 e 1:12 óleo de babaçu:etanol). Para a condução desses ensaios utilizou o reator com capacidade nominal de 32 mL.

Tabela 4.3. Descrição dos experimentos realizados neste trabalho

Experimento	Enzima	Razão molar óleo: álcool	Tempo espacial (h)	Reator (mL)	Objetivo
1	Novozym® 435	1:7	4,0	10,0	Testes operacionais e determinação do tempo de meia-vida dos biocatalisadores
2	Lipase PS imobilizada em SiO ₂ - PVA		7,0		
3			7,0		
4			7,0 – 13,0	32,0	Variação do tempo espacial
5					
6		1:12			
7					

4.4.1 Processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela Novozym® 435

Devido suas características favoráveis para uso em reator de leito fixo, conforme dados descritos na literatura, a lipase Novozym® 435 foi inicialmente utilizada como catalisador na reação de transesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol em meio isento de solventes, com o objetivo de determinar o comportamento do aparato experimental proposto. A primeira etapa consistiu do ajuste da bomba peristáltica para obter a vazão volumétrica requerida, tomando por base as condições operacionais estabelecidas, ou seja, mistura reacional óleo de babaçu:álcool na razão molar de 1:7 e temperatura de 50 °C.

O experimento foi iniciado pelo empacotamento de 2,0 gramas (massa seca) da enzima Novozym® 435 no reator de capacidade de 10 mL, formando uma coluna empacotada uniforme. A alimentação do substrato na razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol) foi efetuada em fluxo ascendente na vazão de 0,028 mL.min⁻¹, correspondendo a um tempo espacial de 4 h.

O reator foi operado por 17 dias, com oscilações inerentes a este tipo sistema correspondendo a uma variação na concentração do produto (ésteres de etila) entre 47,03 a 65,32 % (m.m⁻¹). Esses dados correspondem a rendimentos entre 60,59 a 84,16 % e produtividade na faixa de 117,57 a 163,32 mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹. A Figura 4.5 apresenta o

comportamento dinâmico da concentração total em ésteres de etila, produto da reação enzimática.

Figura 4.5. Concentração total em ésteres etílicos obtida na etanólise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo (10 mL) operando em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol), vazão 0,028mL.min⁻¹, tempo espacial 4,0h) empregando a lipase Novozym® 435 como catalisador.

As oscilações nas medidas de concentração de produto foram atribuídas a problemas operacionais constatados, entre os quais destacam-se: bolhas de ar no leito (Figura 4.6); entupimentos na mangueira de alimentação e obstrução do leito. Todos esses problemas foram associados a solidificação da matéria-prima (óleo de babaçu) nas conexões do reator. Esta solidificação foi causada pelo elevado teor de ácidos graxos saturados presentes no óleo de babaçu necessitando de um controle efetivo de temperatura nas conexões para permitir a fluidez do meio de alimentação. A utilização de resistências flexíveis ao redor das conexões reduziu sensivelmente esse problema, entretanto não foi suficiente para evitar eventuais problemas de solidificação do meio de alimentação. Cabe destacar, que uma vez sanados os problemas operacionais relatados o reator voltou a operar normalmente com recuperação da concentração dos ésteres etílicos para níveis similares aos alcançados antes da interrupção efetuada para os ajustes requeridos (Figura 4.7).

Figura 4.6. Foto ilustrativa do reator em operação destacando a formação de bolhas de ar no leito

Figura 4.7. Sistema com lipase Novozym® 435 operando em condições estáveis

Para estimar o tempo de meia-vida do biocatalisador, os resultados experimentais mostrados na Figura 4.5 foram ajustados para um modelo de desativação de primeira ordem para o cálculo da constante de desativação (k_d) e do tempo de meia-vida do biocatalisador, revelando valores de $1,53 \times 10^{-2} \text{ d}^{-1}$ e 45,30 dias, respectivamente (Figura 4.8).

Uma elevada estabilidade operacional do biocatalisador é necessária para a aplicação industrial das etanolises contínuas catalisadas por lipases, realizadas em reatores de leito fixo. O valor encontrado da ordem de 45,30 dias foi mais elevado que o reportado por Osório, Da Fonseca e Ferreira-Dias (2006) que estimaram um tempo de meia-vida de 17 dias para Novozym® 435, utilizando reator de leito fluidizado na glicerólise da estearina de palma com óleo de soja.

Os resultados de uma maneira geral indicaram que a montagem experimental foi adequada para efetuar a síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu na ausência de solventes em regime contínuo. A utilização da lipase Novozym® 435 se mostrou muito vantajosa fornecendo resultados que se comparam favoravelmente aos valores descritos na literatura para sistemas similares operando na presença de solventes. Halim et al. (2009), por exemplo, estudando a metanólise de óleo de palma residual de fritura catalisada por esta mesma preparação de lipase em reator de leito fixo usando *tert*-butanol como solvente, obtiveram rendimentos em ésteres metílicos entre 69 a 80%, os experimentos foram conduzidos segundo um planejamento fatorial tendo como objetivo determinar a altura do leito e a vazão de alimentação de substrato. Em outro trabalho, Shaw et al. (2008) estudaram a

produção de biodiesel em reator de leito fixo também empregando Novozym® 435 como biocatalisador da metanólise de óleo de soja e usando como solvente uma mistura *n*-hexano e *tert*-butanol (9:1 v/v). Neste caso, os autores analisaram o efeito das variáveis: temperatura, vazão de alimentação de substrato e razão molar álcool:óleo por planejamento fatorial e obtiveram rendimentos entre 17 a 75%.

Figura 4.8. Ajuste do modelo de desativação da lipase Novozym® 435 na formação de ésteres de etila na etanólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo a 50 °C.

4.4.2. Processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

A mesma configuração de reator foi testada com a lipase PS imobilizada, para tanto o reator (capacidade de 10 mL) foi preenchido com 7,8 gramas (massa seca) da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, formando uma coluna empacotada uniforme e correspondendo a um carregamento catalítico de 17160 unidades de atividade. A alimentação do substrato com razão molar 1:7 (óleo de babaçu: etanol) foi efetuada em fluxo ascendente numa vazão de 0,013 mL.min⁻¹, correspondendo a um tempo espacial de 7,0h.

O regime estacionário foi alcançado após 24 h (3,4 tempos espaciais) sendo possível operar o reator por 26 dias, com oscilações similares as constatadas no experimento anterior, em função dos problemas operacionais, como obstrução do leito (Figura 4.9) e bolhas visíveis no leito. Entretanto, esses problemas foram menos frequentes que os relatados anteriormente (Experimento 1) devido provavelmente à adaptação de um mini-aquecedor que promovia uma circulação de ar quente em todo sistema operacional, como ilustrado na Figura 4.10.

Figura 4.9. Foto do leito fixo ilustrando a obstrução do leito

Figura 4.10. Sistema com lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA operando em condições estáveis, com manutenção da temperatura do sistema utilizando um mini-aquecedor

O sistema de aquecimento foi eficiente e solucionou o problema de solidificação do óleo de babaçu nos tubos de silicone, conexões e outras partes não aquecidas, pois manteve a temperatura global da montagem experimental sem interferência de variações de temperatura externa. Por outro lado, a menor frequência de ocorrência de problemas operacionais resultou numa menor variação na concentração do produto no fluxo de saída do reator. Conforme pode ser observado na Figura 4.11, esta variação oscilou de 51,05 a 67,48 % (m.m^{-1}), correspondendo a rendimentos de transesterificação entre 65,77 a 86,94 % e produtividade na faixa de 72,93 a 96,41 $\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Ao final do experimento, a enzima foi recuperada e lavada com hexano para remoção de substrato e produtos eventualmente retidos nas partículas da matriz. A atividade hidrolítica residual do derivado imobilizado foi de $1017 \pm 23 \text{ U.g}^{-1}$, o que correspondeu a uma perda de atividade da ordem 54% em relação à atividade inicial. Aplicando as equações 3.7 e 3.8 foram obtidos os valores de $2,97 \cdot 10^{-2} \text{ d}^{-1}$ e 23,3 d para a constante de desativação e tempo de meia-vida, respectivamente.

Figura 4.11. Concentração total em ésteres etílicos obtida na etanolise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 10 mL operando de modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol), vazão 0,013mL.min⁻¹, tempo espacial 7,0h) empregando a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA como catalisador

Uma comparação do desempenho do reator operando nas condições previamente estabelecidas para cada biocatalisador está disposta na Tabela 4.4, na qual verifica-se diferenças significativas em função das propriedades morfológicas e catalíticas das lipases testadas.

Tabela 4.4. Quadro comparativo dos resultados obtidos nos testes operacionais em reator de leito fixo por etanolise enzimática de óleo de babaçu catalisada pela enzima Novozym® 435 e lipase PS imobilizada em SiO₂- PVA, utilizando temperatura de 50 °C e razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol).

Parâmetros		Experimento 1	Experimento 2
Enzima		Novozym	Lipase PS
Tempo espacial (h)		4	7
Concentração em ésteres etílicos (g.g ⁻¹)	Resultados obtidos no estado estacionário (valores médios)	53,17 ± 4,58	60,55 ± 4,21
Rendimento de transesterificação (%)		68,50 ± 5,89	78,00 ± 5,42
Produtividade (mg _{éster} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)		132,93 ± 11,44	86,49 ± 6,01
Constante de desativação (k _d , d ⁻¹) x10 ²	Estabilidade operacional do biocatalisador	1,53	2,97
Tempo de meia-vida (d)		45,3	23,3

Desta forma, embora o desempenho da Novozym® 435 tenha sido comparativamente superior, deve-se destacar que estes são resultados preliminares não otimizados, mas que já são capazes de demonstrar o potencial da enzima lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA para uso como catalisador no processo.

Além disso, a potencialidade da lipase PS como catalisador pode ser constatada pela similaridade com a Novozym® 435 quanto a seletividade para formação de ésteres etílicos a partir dos ácidos graxos presentes no óleo de babaçu, conforme ilustrado na Figura 4.12.

Para ambas as enzimas o principal éster produzido foi o laurato de etila (C12), seguido do oleato de etila (C18:1), sendo os outros ésteres produzidos em menor quantidade. Verifica-se ainda que a Novozym® 435 tem preferência pela formação de ésteres etílicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados (C18:1, C18:2), enquanto a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, apresenta preferência pela formação de ésteres etílicos de ácidos graxos saturados (C12, C14 e C16).

Figura 4.12. Composição média em ésteres etílicos de diferentes ácidos graxos durante o estado estacionário nas reações catalisadas pelas enzimas Novozym® 435 e lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA e composição de ácidos graxos do óleo de babaçu empregado como matéria-prima

4.5. Recuperação e reutilização da lipase PS imobilizada no processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu

Para verificar a possibilidade de reutilização do derivado imobilizado, um novo teste foi efetuado empregando 70% do derivado recuperado ao final do experimento 2 e complementando com 30% de lipase imobilizada com atividade plena ($2213 \pm 84 \text{ U.g}^{-1}$). O reator foi então preenchido com 8,0 gramas (massa seca) da formulação de derivado imobilizado com atividade hidrolítica global de $1271 \pm 69 \text{ U.g}^{-1}$ formando, como anteriormente, uma coluna uniformemente empacotada com um carregamento catalítico da ordem de 10160 unidades de atividade. As condições operacionais foram as mesmas adotadas para o experimento 2, incluindo alimentação do substrato na razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol) em fluxo ascendente numa vazão de $0,013 \text{ mL.min}^{-1}$, correspondendo a um tempo espacial de 7,0h. O regime estacionário foi alcançado em 24 h (3,4 tempos espaciais) sendo o reator operado por um período de 15 dias.

A Figura 4.13 mostra a variação da concentração em ésteres etílicos ao longo do tempo. Conforme era esperado, houve uma redução no desempenho do reator em termos de formação de ésteres etílicos, em função do menor carregamento de atividade catalítica no leito do reator. A concentração em ésteres de etila, no estado estacionário, variou de 39,87 a 50,08 (g.g^{-1}), correspondendo a rendimentos de transesterificação entre 51,37 e 64,52% e produtividade na faixa de 56,96 a $71,54 \text{ mg}_{\text{éster.g}^{-1} \text{ meio.h}^{-1}}$.

Entretanto, a atividade residual do biocatalisador da ordem de $889 \pm 27 \text{ U.g}^{-1}$ forneceu valores similares aos determinados anteriormente: constante de desativação térmica (k_d) = $2,38.10^{-2} \text{ d}^{-1}$ e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) = 29,2 d.

Um quadro comparativo do desempenho do reator operando sob diferentes condições de carregamento catalítico é apresentado na Tabela 4.5, destacando os valores médios de concentração total de ésteres, rendimento e produtividade no estado estacionário.

Os resultados indicaram uma forte dependência do sistema operacional do carregamento catalítico do leito, sendo verificada uma limitação da atividade hidrolítica disponível para mediar a conversão total do óleo em ésteres etílicos.

Figura 4.13. Concentração total em ésteres etílicos obtida na etanolise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 10 mL operando de modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol), vazão 0,013 mL.min⁻¹, tempo 7,0h) empregando a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA reutilizada como catalisador

Tabela 4.5. Desempenho do reator na etanolise do óleo de babaçu operando sob diferentes carregamentos catalíticos.

	Experimento 2	Experimento 3
Massa de lipase imobilizada (g)	7,8	8,0
Atividade inicial (U.g ⁻¹)	2200 ± 60	1271 ± 69
Unidades de atividade do leito (U)	17.160	10.160
Tempo espacial (h)	7	7
Tempo total de operação (d)	26	15
Concentração total de ésteres (g.g ⁻¹)	60,55 ± 4,21	44,73 ± 3,11
Rendimento de transesterificação (%)	78,00 ± 5,42	57,62 ± 4,00
Produtividade (mg _{éster} .g ⁻¹ _{meio} .h ⁻¹)	86,49 ± 6,01	63,90 ± 4,44
Estabilidade operacional t _{1/2} (d)	23,2	29,2

Os resultados obtidos sugerem a viabilidade técnica da aplicação da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em partículas de SiO₂-PVA para mediar a síntese enzimática de biodiesel em meio isento de solventes, em função de sua satisfatória estabilidade operacional. A reutilização do biocatalisador é também possível, contanto que o mesmo carregamento em unidades de atividade hidrolítica seja fornecido ao sistema por meio

de complementação com derivado imobilizado original. Os tempos de meia-vida encontrados para o biocatalisador foram de 23,2 dias (enzima nova) e 29,2 dias (enzima reutilizada).

4.6. Influência do tempo espacial no desempenho do reator na etanólise do óleo de babaçu catalisada pela Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

Tendo constatado a elevada estabilidade operacional da lipase PS imobilizada, testes foram conduzidos visando definir os limites de operação do reator em termos de vazão volumétrica do substrato. O reator de capacidade de 32 mL foi preenchido com $23,15 \pm 1,62$ gramas (massa seca) da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, formando uma coluna empacotada uniforme e correspondendo a um carregamento catalítico de 38084 ± 2114 unidades de atividade. A alimentação do substrato na razão molar 1:7 (óleo de babaçu: etanol) foi efetuada em fluxo ascendente com variação da vazão ao longo do processo. Dois experimentos foram realizados (codificados como 4 e 5) nos quais a variação da vazão do fluxo ao longo do ensaio foi decrescente para o experimento 4 (0,046 a 0,025 mL min⁻¹, correspondendo a tempos espaciais de 7 a 13 h, respectivamente) e crescente para o experimento 5 (0,025 a 0,046 mL.min⁻¹, correspondendo a tempos espaciais de 13 a 7 h, respectivamente), conforme apresentado na Tabela 4.6. As Figuras 4.14 (a,b) mostram o comportamento dinâmico na formação de ésteres de etila para os experimentos 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4.6. Condições experimentais demonstrando vazão e tempos espaciais ao longo do processo

Experimento 4			Experimento 5		
Tempos espaciais (h)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Período (dias)	Tempos espaciais (h)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Período (dias)
7,00	0,046	6	13,0	0,025	8
9,00	0,036	8	11,0	0,029	7
11,00	0,029	7	9,0	0,036	7
13,00	0,025	9	7,0	0,046	8

A alteração do tempo espacial ao longo do processo, conforme esperado, interferiu na formação de ésteres de etila. Para o Experimento 4 (Figura 4.14a) verifica-se que a concentração em ésteres de etila variou de 59,87 a 70,09 % (m.m⁻¹), correspondendo a rendimentos de transesterificação entre 77,14 a 90,31 %. Comportamento diferenciado foi obtido no experimento 5 (Figura 4.14b), a concentração variou de 50,77 a 59,81 % (m.m⁻¹), correspondendo a rendimentos de transesterificação entre 65,42 a 77,06 %.

Experimento 4 (a)

Experimento 5 (b)

Figura 4.14. Concentração total em ésteres de etila formados na etanolise enzimática do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 32 mL operando de modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar óleo de babaçu:etanol 1:7) empregando a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA como catalisador, (a) vazão decrescente; (b) vazão crescente

Verifica-se ainda que a alternativa de alimentação do substrato em fluxo crescente (Experimento 5) resultou em menor oscilação das concentrações de ésteres de etila formados, bem como apresentou um comportamento dentro do perfil esperado, ou seja, o aumento gradual da vazão do substrato promoveu reduções na concentração dos ésteres formados. Por outro lado, o perfil alcançado pelos resultados obtidos no Experimento 4, demonstrando pouca interferência do tempo espacial na formação de ésteres de etila, pode ser associado a inúmeros fatores, incluindo problemas ocasionais de entupimento das conexões, bem como erros experimentais. Além disso, é provável que a perda da atividade catalítica da lipase imobilizada tenha sido contrabalançada pelo aumento do tempo espacial. Desta forma, observa-se que para tempos espaciais mais elevados (11 e 13h), independente da forma de alteração do fluxo de alimentação do substrato (crescente ou decrescente) valores similares de concentração do produto foram alcançados.

Para permitir uma melhor avaliação dos resultados obtidos, os valores médios de concentração de ésteres de etila, rendimentos de transesterificação e produtividades alcançados em cada experimento, bem como para cada tempo espacial são apresentados na Tabela 4.7. Na Figura 4.15 uma compilação dos valores médios de produtividade e rendimento são plotados em função do tempo espacial.

Tabela 4.7. Valores médios alcançados no processo de etanólise do óleo de babaçu em regime contínuo para diferentes tempos espaciais

Tempo espacial (h)	Experimento 4			Experimento 5		
	Ésteres (g.g ⁻¹)	Produtividade (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (%)	Ésteres (g.g ⁻¹)	Produtividade (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (%)
7	63,51 ± 0,82	90,72 ± 1,17	81,83 ± 1,06	52,83 ± 1,89	75,47 ± 2,70	68,10 ± 2,44
9	67,32 ± 2,36	74,80 ± 2,62	86,74 ± 3,04	56,57 ± 2,63	62,85 ± 2,92	72,89 ± 3,76
11	62,69 ± 1,43	56,99 ± 1,30	80,77 ± 1,84	62,71 ± 2,98	57,00 ± 2,71	80,80 ± 3,49
13	64,72 ± 3,01	49,78 ± 2,32	83,39 ± 3,88	69,48 ± 3,58	53,46 ± 2,75	89,52 ± 3,54

Na faixa de variação do fluxo de alimentação estudada, verifica-se que o melhor desempenho do reator foi constatado para tempo espacial de 13h (vazão volumétrica = 0,045 mL.min⁻¹). Nessa condição, 86,71 ± 2,81% dos ácidos graxos presentes no óleo de babaçu foram convertidos nos ésteres de etila correspondentes, alcançando uma produtividade média de 51,62 ± 1,84 mg_{éster}.g⁻¹_{meio}.h⁻¹. Esses resultados se comparam favoravelmente aos dados descritos na literatura, principalmente se for considerado que os experimentos foram efetuados em meio reacional isento de solventes.

Entretanto, por razões ligadas a viabilidade econômica do processo de obtenção de biodiesel, a maximização da conversão do substrato é essencial, tendo em vista que o preço da matéria-prima é um dos insumos de maior peso no processo. Além disso, somente produtos transesterificados com elevadas conversões molares atendem as normas da ANP para uso como biocombustível. Desta forma, apesar dos resultados favoráveis obtidos, o processo necessita ainda de ajustes para se tornar competitivo industrialmente. Pensando em termos de uma escala industrial, o objetivo ideal a ser alcançado seria a adoção de um sistema que apresentasse uma boa produtividade aliada a pequenas perdas da matéria-prima (máximo 5%).

Figura 4.15. Influência do tempo espacial no desempenho do reator na síntese de biodiesel pela etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA como catalisador e substrato na razão molar óleo e etanol de 1:7.

Deve ser ainda destacado que não foi encontrada nenhuma evidência de problemas de perda de desempenho do reator em função da atividade catalítica do leito, conforme confirmado por meio da quantificação da atividade hidrolítica dos derivados imobilizados de lipase recuperados ao final de cada experimento. A atividade hidrolítica do derivado imobilizado recuperado ao final do Experimento 4 foi de $1003 \pm 56 \text{ U.g}^{-1}$, o que correspondeu a uma perda de atividade da ordem 38,65% em relação à atividade inicial ($1635 \pm 19 \text{ U.g}^{-1}$) e para o Experimento 5, foi constatada uma perda de 37,18% em relação a atividade hidrolítica

inicial ($1651 \pm 120 \text{ U.g}^{-1}$). Aplicando as equações 3.7 e 3.8 foram obtidos os valores para a constante de desativação e tempo de meio-vida dos biocatalisadores, como dispostos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Estabilidade da lipase PS imobilizada na etanólise do óleo de babaçu

Parâmetro	Experimento 4	Experimento 5
Massa de lipase imobilizada (g)	22,0	24,3
Atividade hidrolítica inicial (U.g^{-1})	1635 ± 19	1651 ± 120
Unidades de atividade do leito (U)	35970 ± 418	40119 ± 2916
Atividade hidrolítica residual (U.g^{-1})	1003 ± 56	1037 ± 42
Tempo de operação (d)	30	30
Constante de desativação (k_d, d^{-1}). 10^2	1,63	1,55
Estabilidade operacional $t_{1/2}$ (d)	42,6	44,7

4.7. Influência da razão molar (óleo de babaçu:etanol) no processo contínuo de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA.

Conforme descrito na seção anterior, o desempenho do reator para substrato constituído de óleo de babaçu e etanol numa razão molar 1:7, forneceu nas condições otimizadas uma concentração em ésteres de etila da ordem de $67,10 \pm 2,38\%$, correspondendo um rendimento de transesterificação médio de $86,71 \pm 2,81\%$.

Visando reduzir a perda de matéria-prima no processo, foi testada a alimentação do substrato contendo maior excesso de etanol, ou seja, a razão molar entre óleo de babaçu e etanol foi aumentada de 1:7 para 1:12. Além de investigar uma possível limitação do processo em termos da concentração de etanol, foi também verificada a tolerância da lipase para substratos contendo elevado excesso de etanol. Por outro lado, substratos contendo maior concentração de etanol apresentam menor viscosidade e podem facilitar o escoamento através do leito, contornando desta forma limitações de operação do reator por entupimentos ocasionais das conexões. A viscosidade do meio de alimentação na razão molar óleo: etanol de 1:7 e de 1:12 foi, respectivamente, da ordem de 8,12 cP e 6,95 cP.

Para verificar essas premissas dois experimentos (codificados como experimentos 6 e 7) foram efetuados empregando meio reacional numa razão molar 1:12 (óleo de babaçu e etanol), mantendo fixas as outras condições operacionais. Desta forma, o reator encamisado de 32 mL foi preenchido com $24,55 \pm 0,45$ gramas (massa seca) da lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA com atividade de $1849 \pm 192 \text{ U.g}^{-1}$, formando uma coluna empacotada uniforme e correspondendo a um carregamento catalítico de 45393 ± 4714 unidades de atividade. A

alimentação do substrato na razão molar 1:12 (óleo de babaçu:etanol) foi efetuada em fluxo ascendente com tempos espaciais decrescentes (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Condições experimentais demonstrando vazão e tempos espaciais utilizados ao longo do processo (Experimentos 6 e 7).

Tempo espaciais (h)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Período (dias)
13,0	0,026	7
11,0	0,031	7
9,0	0,037	7
7,0	0,048	7

Para ambos os experimentos o regime estacionário foi alcançado em 40 h (3 tempos espaciais) sendo possível operar o reator por 28 dias sem perdas apreciáveis da atividade catalítica dos derivados empregados, entretanto foram constatadas oscilações nos valores de concentração dos ésteres de etila formados, conforme pode ser verificado na Figura 4.16 que apresenta os valores médios e desvios dos resultados obtidos nos experimentos 6 e 7.

Figura 4.16. Concentração total em ésteres etílicos, valores médios e desvios obtidos nas etanolises enzimáticas do óleo de babaçu em reator de leito fixo de 32 mL operando de modo contínuo (temperatura 50°C, razão molar óleo de babaçu:etanol 1:12) empregando a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA como catalisador

Apesar das oscilações apresentadas, de uma maneira geral os valores médios de concentração em ésteres de etila alcançados ao longo do processo para ambos os experimentos indicaram menor perda de matéria-prima (rendimento de transesterificação mínimo de $90,38 \pm 1,83$ %), independente do fluxo de alimentação do substrato. Desta forma, o substrato constituído de óleo de babaçu e etanol na razão molar 1:12 promoveu maior conversão dos ácidos graxos presentes no óleo de babaçu nos ésteres de etila correspondentes. Na Figura 4.17 são plotados os valores médios de produtividade e rendimento de transesterificação para os tempos espaciais testados.

Figura 4.17. Influência do tempo espacial no desempenho do reator na síntese de biodiesel pela etanolíse do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA como catalisador e substrato na razão molar de 1:12 (óleo de babaçu:etanol).

Com base nesses resultados, verifica-se que para o substrato contendo etanol em excesso (razão molar óleo de babaçu:etanol de 1:12), tempos espaciais iguais ou superiores a 9h forneceram rendimentos de transesterificação superiores a $92,20 \pm 3,30$ %. Os rendimentos mais elevados ($95,00 \pm 4,68$ %) foram obtidos para o reator operando a partir de um fluxo de $0,031 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\tau = 11 \text{ h}$), correspondendo a uma produtividade da ordem de $54,80 \pm 2,70 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Destaca-se ainda que a exemplo dos experimentos anteriores não foi verificado problemas de perdas acentuadas no desempenho do reator em função da atividade catalítica

do leito, mesmo utilizando substrato com maior excesso de etanol. A quantificação da atividade hidrolítica dos derivados imobilizados de lipase recuperados ao final dos experimentos indicou uma redução de atividade catalítica da ordem de $43,78 \pm 5,70 \%$, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de $32,08 \pm 6,42$ dias.

4.8. Qualidade do biodiesel obtido por processo contínuo

O aspecto do biodiesel produzido e purificado é uma análise preliminar, no qual se procura verificar a presença de impurezas que possam ser identificadas visualmente, como materiais em suspensão, sedimentos ou mesmo turvação na amostra de biodiesel, que pode ser decorrente da presença de água. Na ausência desses contaminantes, o biodiesel é classificado como límpido e isento de impurezas. Elevadas concentrações de glicerina no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação da glicerina nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos, também podem ser relacionados com a alta concentração da glicerina no biodiesel.

Para evitar esses problemas, a purificação do produto final da transesterificação da matéria-prima lipídica deve ser conduzida por meio de lavagens consecutivas para eliminar a glicerina formada no processo. A glicerina combinada, que inclui mono-, di- e triglicerídeos, é proveniente da reação incompleta dos triglicerídeos, logo, este é um importante parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel. Dependendo da concentração em que podem estar presentes no biodiesel, os triglicerídeos não reagidos podem aumentar a viscosidade do combustível e, conseqüentemente, reduzir a eficiência da combustão, provocando entupimento do filtro de combustível e formação de depósitos em partes do motor como pistões, válvulas e bicos injetores.

No presente trabalho, a qualidade dos ésteres formados não foi determinada tendo em vista que esse padrão de qualidade está relacionado com a eficiência do processo, e somente processos com elevados rendimentos fornecem amostras de biodiesel que atendem as normas da ANP para serem consideradas como biocombustível. Entretanto, amostras coletadas durante a realização dos experimentos foram submetidas a análise de viscosidade, conforme descrito no item 3.7.6. Os resultados obtidos demonstraram consistente redução da viscosidade das amostras de biodiesel purificadas em relação ao óleo de babaçu (29,51 Cst)

confirmando que a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos como determinado por cromatografia de fase gasosa (item 3.72) foi indiretamente proporcional a viscosidade (Apêndice F). Para rendimentos de transesterificação da ordem de $= 95,00 \pm 4,68$), as amostras de biodiesel purificadas (viscosidade média de $4,27 \pm 0,74$ cSt) se enquadram na norma ASTM 6751-02, que estabelece que a viscosidade cinemática do B100 deve estar na faixa entre 1,0 -6,0 Cst.

4.9. Análise global do desempenho do reator

A medida da produtividade indica o potencial de um particular sistema. Exemplos extraídos da literatura têm demonstrado que muitos processos contínuos somente alcançam produtividades elevadas às custas do decréscimo da taxa de conversão do substrato (altas concentrações de substrato não convertido) ou baixa concentração do produto formado. Pensando em termos de uma escala industrial, o objetivo ideal a ser alcançado seria a adoção de um sistema que apresentasse uma boa produtividade aliada a pequenas perdas da matéria-prima. Neste contexto, no presente trabalho, a análise dos dados levou em consideração os critérios econômicos do processo, bem como critérios técnicos.

Uma comparação dos resultados obtidos é apresentada na Tabela 4.10 na qual são listados os valores médios obtidos nos experimentos 2 a 7.

Nas condições testadas, verifica-se que o melhor desempenho do reator foi obtido para substrato constituído de óleo de babaçu: etanol numa razão molar de 1:12 e tempos espaciais iguais ou superiores a 11h. Nessas condições foram obtidos rendimentos de transesterificação médios de $95,00 \pm 4,68$ % e produtividades de $54,80 \pm 2,70$ $\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Em todos os experimentos a lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA foi estável quanto a suas características morfológicas e catalíticas, revelando tempo médio de meia-vida ($t_{1/2}$) de 35 dias.

Por outro lado, os benefícios de utilizar um sistema isento de solventes devem ser reavaliados em função dos problemas operacionais constatados, principalmente para óleos vegetais com elevado teor de ácidos graxos saturados como o óleo de babaçu.

Tabela 4.10. Quadro comparativo dos resultados obtidos nos testes em reator de leito fixo por etanolise enzimática de óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂- PVA.

Parâmetro	Experimento 2	Experimentos 4 e 5	Experimentos 6 e 7
Condições Operacionais			
Atividade inicial da lipase imobilizada	2200	1643 ± 11	1849 ± 451
Substrato (razão molar óleo de babaçu: etanol)	1:7	1:7	1:12
Volume do reator (mL)	10	32	32
Tempo espacial (h)	7	13	11
Duração do experimento (d)	15	30	28
Resultados			
Concentração em ésteres de etila (g.g ⁻¹)	60,55 ± 4,21	67,10 ± 2,38	60,29 ± 2,97
Viscosidade do produto purificado cSt a 40°C	9,70± 1,36	8,22±0,76	4,27 ± 0,74
Rendimento de transesterificação (%)	78,00 ± 5,42	86,71±2,81	95,00 ± 4,68
Produtividade (mg _{éster} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)	86,49 ± 6,01	51,62 ± 1,84	54,80 ± 2,70
Constante de desativação (k _d , d ⁻¹) x10 ²	2,97	1,59 ± 0,36	2,25 ± 0,45
Tempo de meia-vida (d)	23,3	43,65 ± 1,05	32,08 ± 6,42

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema eficiente para a produção enzimática de biodiesel em meio isento de solventes pela rota etílica. Este objetivo foi buscado tendo-se como alvo o estabelecimento de um processo simples, de fácil manuseio, que resultasse em menor consumo de energia e redução de resíduos, permitindo desta forma, a obtenção de resultados satisfatórios que possam competir com a via química. Teve-se como proposta a transesterificação do óleo de babaçu com etanol mediada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em partículas de SiO₂-PVA em fluxo contínuo empregando reator de leito fixo. O conjunto de experimentos realizado no âmbito deste trabalho permitiu definir os limites de operação do reator e identificar problemas e insuficiências ligadas a estabilidade do processo, em meio isento de solvente. Os resultados alcançados demonstraram que:

- É possível operar um sistema contínuo para obtenção de biodiesel por via enzimática empregando uma configuração de reator de leito fixo com substratos contendo óleo de babaçu e etanol na ausência de solventes, entretanto o processo necessita de um controle permanente de temperatura para evitar solidificação do substrato em função da elevada composição de ácidos graxos saturados (83%) presente nesta matéria-prima;
- A razão molar entre óleo de babaçu e etanol foi um parâmetro crítico para obtenção de elevados rendimentos, sendo o desempenho mais elevado constatado para substratos contendo elevado excesso de etanol, ou seja, razão molar óleo de babaçu e etanol de 1:12;
- A lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA foi estável quanto a suas características morfológicas e catalíticas apresentando tempo de meia-vida médio da ordem de 40 dias;

- A reutilização do biocatalisador é também possível, contanto que o mesmo carregamento em unidades de atividade hidrolítica seja fornecido ao sistema por meio de complementação com derivado imobilizado original. O tempo de meia-vida do biocatalisador reutilizado foi da ordem de 29 dias;
- O funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais no reator iguais ou superiores a 11h, resultando em produtividades da ordem de $54,80 \pm 2,70 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com perdas mínimas de matéria-prima (rendimento de transesterificação = $95,00 \pm 4,68$);
- Nas condições estabelecidas, as amostras de biodiesel purificadas (viscosidade média de $4,27 \pm 0,74 \text{ cSt}$) se enquadram na norma ASTM 6751-02, que estabelece que a viscosidade cinemática do B100 deve estar na faixa entre 1,0 -6,0 Cst;
- As características globais do desempenho do sistema proposto tornam atrativa a continuidade dos estudos em escala ampliada de processo.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar os estudos de obtenção de biodiesel em reator de leito fixo, recomendam-se as seguintes etapas:

- Empregando o óleo de babaçu estudos adicionais são ainda necessários visando a obtenção de uma operação mais estável do reator, em função do elevado teor de ácidos graxos saturados desta matéria-prima lipídica. Alternativas de controle de temperatura e utilização de solventes apropriados devem ser investigadas.
- Estudar a utilização de outros óleos vegetais com menor proporção de ácidos graxos saturados para evitar os problemas acima mencionados, como por exemplo, o óleo de macaúba.

REFERÊNCIAS

- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO O biodiesel obrigatório Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1306718975785>>. Acesso em 18 mai. 2011.
- AKOH, C. C.; CHANG, S.-W.; LEE, G.-C.; SHAW, J.-F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995–9005, 2007.
- AL-ZUHAIR, S.; ALMENHALI, A.; HAMAD, I.; ALSHEHHI, M.; ALSUWAIDI, N.; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used waste oils: Design of a pilot plant. **Renewable Energy**, 2011. doi:10.1016/j.renene.2010.05.010. No prelo.
- AMANO ENZYME INC. Disponível em: <<http://www.amano-enzyme.co.jp/eng/index.html>>. Acesso em 18 mai. 2011.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.
- 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, n. 1, p. 9-14, 2010.
- BANNISTER, C.D.; CHUCK, C.J.; BOUNDS, M.; HAWLEY, J.G. Oxidative stability of biodiesel fuel. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering**, v. 225, n. 1, p. 99-114, 2011.
- BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: _____. **Immobilised living cell systems: Modeling and experimental methods**. Chichester: John Wiley, 1996. p. 67-95.
- BASTIDA, A.; SABUGUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.
- BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acesso em 18 mai. 2011.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.
- CHANG, C.; CHEN, J.; CHANG, C. J.; WU, T.; SHIEH, C.; Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 26, n. 3-4, p. 187-192, 2009.
- CHEN, H.; CHEN, G.Q. Energy cost of rapeseed-based biodiesel as alternative energy in China. **Renewable Energy**, v. 36, p.1374-1378, 2011.

CHEN, Y. H.; HUANG, Y.H.; LIN, R.H.; SHANG, N. C. A continuous-flow biodiesel production process using a rotating packed bed. **Bioresource Technology**, v.101, p. 668–673, 2010.

CHEN, J.P.; LIN, G.H. Optimization of biodiesel production catalyzed by fungus cells immobilized in fibrous supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-14, 2009.

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

COSTA, B. J.; OLIVEIRA, S. M. M. **Dossiê técnico**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, 2006.

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

DABDOUB, M. J., BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: A critical overview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

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

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.; SÁ-PEREIRA, P. 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, Brasil: Interciência, 2008. Cap. 6. p. 123. ISBN 978-85-7193-189-3.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A.J., PORTO, A.L.M. **Biocatálise e Biotransformação**: Fundamentos e Aplicação. Salto, Brasil: Schoba, 2010. v.1,p. 275-317.

DE OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. D.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; DE OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113–116, p. 771–780, 2004.

DORS, G. **Etanolise enzimática do óleo de palma visando a produção de biodiesel em sistema contínuo**. 2011 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2011. 197 p.

DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, L. Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a *tert*-butanol system. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 1087–1090, 2007.

DU, W.; WANG, L.; LIU, D. Improved methanol tolerance during Novozym 435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 9, p. 173–176, 2007.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, 2010, doi:10.4061/2010/862537), No prelo.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2008.

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

FREEDMAN B.; PRYDE E. H.; MOUNTS T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists Society**. v.63, n. 10, p.1375-1380, 1986.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v.44, n. 10, p.1068-1074, 2009.

FREITAS, L. SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Packed-bed reactor running on babassu oil and glycerol to produce monoglycerides by enzymatic route using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 372-381, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n.5, p. 405-416, 2001.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 188-194, 2009.

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.

HOLM, H. C.; NIELSEN, P. M.; CHRISTENSEN, M.W. Production of de-gummed fatty acid alkyl esters. **Patent WO 2006/133698**

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

JACHMANIÁN, I.; DOBROYÁN, M.; MOLTINI, M.; SEGURA, N.; IRIGARAY, B.; VEIRA, J.P.; VIEITEZ, I.; GROMPONE, M.A. Continuous lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil: Effect of phase-equilibrium on process efficiency. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, n. 1, p. 45-53, 2010.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253-264, 2008.

JUNG, S. M.; PARK, Y.C.; PARK, K. Effects of environmental conditions and methanol feeding strategy on lipase-mediated biodiesel production using soybean oil. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 614-619, 2010.

KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIĆ, Z.; BRANKOVIĆ-DIMITRIJEVIĆ, S.; MIJIN, D. Lipase catalyzed synthesis of flavor esters in non-aqueous media: Optimization of the yield of pentyl 2-methylpropanoate by statistical analysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 73, p. 1139-1151, 2008.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 7, p. 669-677, 2007.

KNOTHE, G.; DUNN, R. O. Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 80, n. 10, p. 1021-1026, 2003.

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

LEE, D. H.; KIM, J. M.; SHIN, H. Y.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 522-525, 2006.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; PARK, C.; TAE, B.; HAN, S. O.; KIM, S.W. Development of batch and continuous processes on biodiesel production in a packed-bed reactor by a mixture of immobilized *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 365-371, 2010.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**, 2nd ed. New York: John Wiley, 1972.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, p. 58-62, 2006.

LIMA, J. R. D. O.; DA SILVA, R. B.; DA SILVA, C. C. M.; DOS SANTOS, L. S. S.; DOS SANTOS Jr., J. R.; MOURA, E. M.; DE MOURA, C. V. R. Biodiesel from babassu (*Orbignya* sp.) synthesized via ethanolic route. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LORA, E. S.; ANDRADE, R. V. Biomass as energy source in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 4, p. 777-788, 2009.

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

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MENDES, A.A.; DE CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D.S.; ADRIANO, W.S.; TARDIOLI, P.W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2010, doi: 10.1007/s10295-010-0880-9. No prelo.

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.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. M. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, p. 1191-1195, 1996.

NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. 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. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692-700, 2008.

NWAFOR, O. M. I. Emission characteristics of diesel engine running on vegetable oil with elevated fuel inlet temperature. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, n. 5, p. 507-511, 2004.

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, n. 21, p. 5146-5154, 2009.

OSÓRIO, N. M.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 7, p. 545-553, 2006.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel**: Uma aventura tecnológica num país engraçado. Disponível em: <www.xitizap.com/Livro-Biodiesel>. Acesso em 18 mai. 2011.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; DE CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparative performance of *Candida rugosa* lipase immobilized on polysiloxane polyvinyl alcohol hybrid support using different methodologies. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; DE 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, p. 281-288, 2007.

PENTEADO, M. C. P. S. **Identificação dos gargalos e estabelecimento de um plano de ação para o sucesso do programa brasileiro de biodiesel**. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Automotiva, Universidade de São Paulo – Escola Politécnica, São Paulo-SP. 2005, 177 p.

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.

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

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

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008.

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.

RODRIGUES, R.C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, p.1268-1273, 2010.

ROSA, C. D.; MORANDIM, M. B.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. **Bioresource Technology**, v. 100, p.5818–5826, 2009.

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.

SANTOS, J. C.; MIJONE, P.D.; NUNES, G. F. M.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane-polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 61, p.229-236, 2008 a.

SANTOS, J. C.; PAULA, A.V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, 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, 2008 b.

SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 85, n. 5 B, p. 360-364, 2007.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1609-1633, 1998.

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.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 409-414, 2007.

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

SHAW, J.; CHANG, S.; LIN, S.; WU, T.; JU, H.; AKOH, C. C.; CHANG, R.; SHIEH, C. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy and Fuels**, v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008.

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

SILVA, G. S.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic transformation of palm oil in biodiesel using porcine pancreatic lipase immobilized on hybrid matrix. **International Review of Chemical Engineering**, v. 1, n. 6, 2009.

SIMÕES, A. S.; MORI, R.Y.; FARIA, R.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-Quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, p. 33-38, 2011.

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.77-9, p. 745-757, 1999.

SOUZA, L. T. A. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curca* L pela rota etílica**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – USP, Lorena-SP, 2010.

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

SUPPALAKPANYA, K.; RATANAWILAI, S. B.; TONGURAI, C. Production of ethyl ester from esterified crude palm oil by microwave with dry washing by bleaching earth. **Applied Energy**, 2010. doi:10.1016/j.apenergy.2009.12.006. No prelo.

TEIXEIRA, M. A. Babassu - A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 9, p. 857-864, 2008.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 52-59, 2010.

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.

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

WANG, X.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6352-6355, 2011.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015–1021, 2007.

WATANABE, Y.; PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 11, p. 825-831, 2005.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y., SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 355–360, 2000.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y., SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 151–155, 2002.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; NAKASHIMA, K.; KONDO, A. Water activity dependence of performance of surface-displayed lipase in yeast cells: A unique water requirement for enzymatic synthetic reaction in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 334-338, 2011.

YUSUF, N.N.A.N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 7, p. 2741-2751, 2011.

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

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

ZHANG, Y.; DUBE, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1-16, 2003.

ZHANG, S.; ZU, Y. G.; FU, Y.J.; LUO, M.; ZHANG, D.Y.; EFFERTH, T. Rapid microwave-assisted transesterification of yellow horn oil to biodiesel using a heteropolyacid solid catalyst. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 931-936, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - 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
Coeficiente 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)	

APÊNDICE B - 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 (Kd), (h ⁻¹)	0,11
Parâmetros cinéticos Km (mM)	1883
$Vmax$ (U.g ⁻¹)	3873
$d_{sólido}$ (g.mL ⁻¹)	1,865

Fonte: Da Rós et al., 2010.

APÊNDICE C - Valores de vazão volumétrica obtidos nos testes de ajuste da vazão da bomba peristáltica (ATTO)

Experimento 1 - Tempo espacial = 4 h - vazão $0,0278 \pm 0,0016 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
36 min – 1,0 mL $v = 0,0278 \text{ mL.min}^{-1}$	34 min – 1 mL $v = 0,0294 \text{ mL.min}^{-1}$	36 min – 1 mL $v = 0,0278 \text{ mL.min}^{-1}$
Experimento 2 - Tempo espacial = 7 h - vazão $0,013 \pm 0,001 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
36 min – 0,5 mL $v = 0,0139 \text{ mL.min}^{-1}$	71 min – 1 mL $v = 0,0141 \text{ mL.min}^{-1}$	156 min – 2 mL $v = 0,0128 \text{ mL.min}^{-1}$
Experimento 3 - Tempo espacial = 7 h - vazão $0,013 \pm 0,002 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
71 min – 1 mL $v = 0,0141 \text{ mL.min}^{-1}$	91 min – 1 mL $v = 0,0110 \text{ mL.min}^{-1}$	77 min – 1 mL $v = 0,0130 \text{ mL.min}^{-1}$
Experimento 4		
Tempo espacial = 7 h - vazão $0,048 \pm 0,005 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
11 min – 0,5 mL $v = 0,0454 \text{ mL.min}^{-1}$	19 min – 1 mL $v = 0,0526 \text{ mL.min}^{-1}$	21 min – 1 mL $v = 0,0476 \text{ mL.min}^{-1}$
Tempo espacial = 9 h - vazão $0,038 \pm 0,004 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
14 min – 0,5 mL $v = 0,0357 \text{ mL.min}^{-1}$	12 min – 0,5 mL $v = 0,0417 \text{ mL.min}^{-1}$	27 min – 1 mL $v = 0,0370 \text{ mL.min}^{-1}$
Tempo espacial = 11 h - vazão $0,031 \pm 0,002 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
17 min – 0,5 mL $v = 0,0294 \text{ mL.min}^{-1}$	15 min – 0,5 mL $v = 0,0333 \text{ mL.min}^{-1}$	16 min – 0,5 mL $v = 0,0313 \text{ mL.min}^{-1}$
Tempo espacial = 13 h - vazão $0,026 \pm 0,001 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
19 min – 0,5 mL $v = 0,0263 \text{ mL.min}^{-1}$	19 min – 0,5 mL $v = 0,0263 \text{ mL.min}^{-1}$	20 min – 0,5 mL $v = 0,0250 \text{ mL.min}^{-1}$

Experimento 5

Tempo espacial = 13 h – vazão $0,025 \pm 0,001 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
42 min – 1 mL	38 min – 1 mL	40 min – 1 mL
$v = 0,0238 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0263 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0250 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo espacial = 11 h – vazão $0,029 \pm 0,002 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
34 min – 1 mL	37 min – 1 mL	32 min – 1 mL
$v = 0,0294 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0270 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0313 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo espacial = 9 h – vazão $0,036 \pm 0,003 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
28 min – 1 mL	30 min – 1 mL	27 min – 1 mL
$v = 0,0357 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0333 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0370 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo espacial = 7 h - vazão $0,046 \pm 0,003 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
22 min – 1 mL	23 min – 1 mL	21 min – 1 mL
$v = 0,0454 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0435 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0476 \text{ mL.min}^{-1}$

Experimentos 6 e 7

Tempo espacial = 13 h – vazão $0,026 \pm 0,001 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
40 min – 1 mL	39 min – 1 mL	40 min – 1 mL
$v = 0,0250 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0256 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0250 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo espacial = 11 h – vazão $0,031 \pm 0,001 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
33 min – 1 mL	31 min – 1 mL	32 min – 1 mL
$v = 0,0303 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0323 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0313 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo espacial = 9 h – vazão $0,037 \pm 0,001 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
28 min – 1 mL	26 min – 1 mL	27 min – 1 mL
$v = 0,0357 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0381 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0370 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo espacial = 7 h - vazão $0,048 \pm 0,005 \text{ mL.min}^{-1}$

1ª medição	2ª medição	3ª medição
21 min – 1 mL	19 min – 1 mL	22 min – 1 mL
$v = 0,0476 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0526 \text{ mL.min}^{-1}$	$v = 0,0455 \text{ mL.min}^{-1}$

APÊNDICE D – Dados referentes a construção da curva de calibração (Absorbância e concentração de corante)

Diluição	Absorbância	Concentração (mg.mL⁻¹)
300	0,7998	0,05845
400	0,6861	0,04383
600	0,4945	0,02922
800	0,3435	0,02192
1200	0,2046	0,01461
1600	0,1701	0,01096
2000	0,1431	0,00877
2500	0,1146	0,00701
5000	0,0705	0,00351

APÊNDICE E - Concentração de corante nas amostras de acordo com a equação da reta

Tempo (h)	Diluição Amostra/<i>terc</i>-butanol	Absorbância	Concentração (g.mL⁻¹).10⁶
0	-	0,0000	0,0000
0,12	-	0,0000	0,0000
0,62	-	0,0000	0,0000
1,12	-	0,0000	0,0000
1,62	-	0,0000	0,0000
2,12	-	0,0000	0,0000
2,62	6	0,0577	7,5092
3,12	6	0,2446	92,5100
3,62	4	0,7450	213,3921
4,12	4	0,9688	281,2472
4,62	4	0,5177	144,4759
5,12	4	0,2722	70,0415
5,62	2	0,2725	35,0662
6,12	2	0,1374	14,5854
6,62	2	0,1588	17,8296
7,12	2	0,0066	0,0000
7,62	2	0,0036	0,0000
8,12	2	0,0038	0,0000
8,62	2	0,0230	0,0000
9,12	2	0,0200	0,0000
9,62	2	0,0029	0,0000

APENDICE F - Construção da curva de calibração relacionando viscosidade e conversão do óleo de babaçu em ésteres etílicos.

Para construção da curva de calibração foi efetuado um experimento em regime de batelada empregando as condições previamente estabelecidas por Freitas et al., 2009 (razão molar óleo de babaçu: etanol de 1:7, 500 unidades da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA por grama de óleo e temperatura 45°C. Esse ensaio foi efetuado com uma massa total de reagentes de 60 g em reator de 100mL. O monitoramento da reação foi efetuado pela determinação dos ésteres etílicos formados e viscosidade cinemática em amostras retiradas em intervalos de 4 h por um período máximo de 24 h. Os resultados obtidos são mostrados na Figura F1, na qual observa-se uma relação inversamente proporcional entre viscosidade e rendimento de transesterificação. A partir dos dados obtidos foi construído a curva de calibração relacionando a viscosidade do produto purificado e rendimento de transesterificação (Figura F2). Essa curva de calibração serviu de base para confirmação dos dados obtidos nos ensaios conduzidos em regime contínuo.

Figura F1- Perfil da reação de transesterificação do óleo de babaçu com etanol (razão molar etanol/óleo= 7, temperatura 45°C).

Figura F2- Curva de calibração relacionando viscosidade do produto purificado e rendimento de transesterificação.