

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**ALIMENTOS**

**CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES**  
**ETÍLICOS DE ÓLEO DE SOJA EM PROPANO**  
**PRESSURIZADO**

**Claiton Zanini Brusamarello**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**ERECHIM, FEVEREIRO DE 2010**

# **CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE SOJA EM PROPANO PRESSURIZADO**

**Claiton Zanini Brusamarello**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.  
Orientador

---

Débora de Oliveira, D. Sc.  
Co - Orientador

---

Marcio Antonio Mazutti, D. Sc.

---

Helen Treichel, D. Sc.

---

Luiz Henrique Castelan Carlson, D. Sc.

Erechim, 19 de fevereiro de 2010.

B912c Brusamarello, Claiton Zanini

Cinética da produção enzimática de ésteres etílicos de  
óleo de soja em propano  
pressurizado / Claiton Zanini Brusamarello. – 2010  
74f.

Monografia (dissertação) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai  
e das Missões, Erechim, 2010.

“Orientação: Prof. José Vladimir de Oliveira, Débora de Oliveira”.

1. Biodiesel 2. Propano pressurizado 3. Transesterificação 4. Modelo semi-empírico I. Título

C.D.U.: 664

## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, por ter me dado força, paciência e sabedoria para vencer mais esta etapa na vida.

Ao meu Pai, que em todos os momentos desta caminhada sempre esteve ao meu lado. Obrigado pela educação, pelas palavras de apoio e acima de tudo por seu exemplo de vida.

A minha mãe pelos primeiros ensinamentos; educação, amor, enfim aos detalhes da existência.

Aos meus orientadores José Vladimir de Oliveira e Débora de Oliveira, muito obrigado, por me orientarem no decorrer do projeto, pela paciência demonstrada sempre que precisei da ajuda de vocês, pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento das atividades.

A professor Marcio Mazutti, por sua contribuição e sua disponibilidade em sempre estender uma mão amiga.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Aos professores Marcos e Fernanda Corazza, sem a confiança e apoio inicial deles eu não estaria aqui hoje concluindo mais esta etapa.

A acadêmica do curso de Engenharia de Alimentos, Eline Rosset, que contribuiu para a concretização deste projeto.

Aos colegas de curso pelo apoio, pelas conversas nos intervalos e corredores dos laboratórios, aos verdadeiros amigos, ao apoio em todos os momentos desta longa jornada.

Ao Cenpes/Petrobras pelo apoio financeiro.

E por fim a todos que de alguma maneira ajudaram na concretização deste projeto. Obrigado!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## **Cinética da Produção Enzimática de Ésteres etílicos de Óleo de Soja em Propano Pressurizado.**

**Claiton Zanini Brusamarello**

Orientadores: José Vladimir de Oliveira  
Débora de Oliveira

Este trabalho apresenta novos dados experimentais e a proposição de um modelo matemático que descreva a produção enzimática de biodiesel de óleo de soja e etanol como substratos em um meio reacional com propano pressurizado utilizando como catalisador a lipase imobilizada comercial Novozym 435. Os experimentos foram desenvolvidos em um reator batelada com capacidade para 300 mL, com controle de temperatura, agitação e pressão. Os dados cinéticos mensurados foram avaliados na faixa de temperatura de 45 a 70°C, concentração de enzima de 1 a 20% (m/m) e razão molar óleo:etanol de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:15. A razão mássica solvente:substrato foi fixada em 2:1 e a pressão em 50 bar. Os resultados demonstraram que a catálise enzimática em propano pressurizado pode ser uma alternativa potencial, frente às técnicas convencionais para a produção de biodiesel, uma vez que foram obtidos teores dos ésteres etílicos de soja próximo de 92% (m/m) nas condições de 65°C e 50 bar, para uma concentração de 20% (m/m) de enzima após 8 horas de reação. Um modelo semi-empírico baseado nas equações de balanço foi proposto para descrever a cinética da transesterificação em propano pressurizado, a qual foi capaz de fornecer uma representação satisfatória dos resultados experimentais. Os resultados do modelo permitem um melhor entendimento da reação de transesterificação.

*Palavras-chave:* Biodiesel; propano pressurizado; transesterificação, modelo Semi-Empírico.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

## **Enzymatic Kinetics Production of ethyl esters From Soybean Oil in Propane Pressurized**

**Claiton Zanini Brusamarello**

Advisors: José Vladimir de Oliveira  
Débora de Oliveira

This work reports new experimental data and mathematical modeling of lipase-catalyzed biodiesel production of soybean oil and ethanol as substrates in pressurized n-propane as solvent reaction medium with pressurized propane using as catalyst the lipase immobilized commercial Novozym 435. The experiments were developed in a reactor batch reactor with capacity for 300 mL, with temperature control, agitation and pressure. The measured kinetic data were evaluating the effects of temperature in the range of 45 to 70°C, enzyme concentration from 1 to 20wt% and oil to ethanol molar ratio at 1:3, 1:6, 1:9 and 1:15. The solvent to substrates mass ratio and pressure were fixed at 2:1 and 50bar, respectively. The results demonstrate that the enzymatic catalysis in pressurized propane can be a potential alternative, front to the conventional techniques for the biodiesel production, once they were obtained percents of the close of 92% (m/m) ethyl esters of soybean in the conditions of 65°C and 50 bar, for a concentration of 20% (m/m) after 8 hours of reaction. A semi-empirical mathematical model based on balance equations was proposed to describe the transesterification kinetics in pressurized n-propane, which was capable to supply a satisfactory representation of the experimental data, thus allowing better understanding of the transesterification reaction.

*Keywords:* biodiesel; pressurized n-propane; transesterification, Semi-Empirical model.

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

**ABIOVE** – Associação Brasileira das Indstrias de leos Vegetais

**ANP** – Agência Nacional de Petróleo

**CONAB** – Companhia Nacional de Abastecimento

**DAG** – Diglicerídeo

**ETOH** - Etanol

**FAEE** – Biodiesel

**GLY** – Glicerol

**IFP** - Innovation, Energy, Environment

**MAG** - Monoglicerídeo

**PETROBRAS** – Petróleo Brasileiro

**TAG** – Triglicerídeo

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 2.1 - Produção brasileira de óleos vegetais, 2002 (Abiove) .....	11
TABELA 2.2 - Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos (Smith et al., 2005). .....	23
TABELA 3.1- Variáveis estudadas na avaliação da cinética da reação. ....	44
TABELA 4.1 – Resultados experimentais do teor em ésteres % (m/m), avaliando-se o efeito da temperatura. ....	56
TABELA 4.2 – Resultados experimentais da concentração em ésteres (%) para o estudo com diferentes concentrações de enzima.....	59
TABELA 4.3 – Resultados experimentais do teor de ésteres % (m/m) para o estudo com diferentes razões molares óleo:etanol.....	62
TABELA A.1 – Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos .....	70

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel, Dezembro de 2008 (www.anp.gov.br). .....	10
FIGURA 2.2 - Distribuição dos principais países produtores de biodiesel no mundo no ano de 2005 (www.ifp.com).....	12
FIGURA 2.3 - Representação da reação de alcoólise de triglicerídeos. ....	13
FIGURA 2.4 - Reações intermediárias da reação de alcoólise de triglicerídeos.....	13
FIGURA 2.5 - Estrutura tridimensional da lipase B de Candida Antarctica (Cygler e Schrag, 1999). .....	18
FIGURA 2.6 - Representação do mecanismo Ping-pong bi-bi. ....	19
FIGURA 2.7- Diagrama de fases do CO <sub>2</sub> . .....	23
FIGURA 2.9 - Diagrama P-T para o sistema propano-óleo de soja. ....	25
FIGURA 2.8 - Diagrama PT para o sistema dióxido de carbono-óleo de soja para diferentes frações mássicas (w) de dióxido de carbono .....	8
FIGURA 3.1 – Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática.....	34
FIGURA 3.2– Diagrama esquemático do aparato experimental da unidade 1.....	37
FIGURA 3.3 – Vista geral da unidade experimental 1 para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.....	37
FIGURA 3.4 – Vista do Reator (Parr) utilizado para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado. ....	38
FIGURA 3.5 – Diagrama esquemático do aparato experimental da unidade 2.....	34
FIGURA 3.6 – Vista geral da unidade experimental 2 para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.....	40
FIGURA 3.7 – Vista do Reator (Autoclave Engineers) utilizado para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.....	40
FIGURA 3.8 – Vista do sistema de agitação do Reator (Autoclave Engineers) utilizado para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado. ....	41
FIGURA 4.1 – Comparação das agitações testadas no reator Parr.....	50
FIGURA 4.2 – Rendimento em ésteres etílicos de óleo de soja e etanol em propano pressurizado: Reator Parr versus reator Autoclave Engineers.....	52
FIGURA 4.3 – Comparação da atividade enzimática entre os reatores em estudo. ....	53
FIGURA 4.4 – (A) Sistema de agitação do reator Autoclave Engineers (B) Sistema de agitação do reator Parr.....	45

FIGURA 4.5 – Efeito da temperatura sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEE utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado.....	57
FIGURA 4.6 – Efeito da concentração de enzima sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEE utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado.....	60
FIGURA 4.7 - Efeito da razão molar óleo:etanol sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEE utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado.....	63

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
SUMÁRIO .....	XI
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivos .....	4
1.2 Referências bibliográficas .....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
2.1. Contexto geral sobre biodiesel .....	8
2.1.2 Biodiesel no Mundo .....	11
2.2. Técnicas para produção de biodiesel .....	13
2.3. Enzimas .....	16
2.3.1. Lipases .....	17
2.3.2 Mecanismo reacional das lipases .....	18
2.4. Produção de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores .....	20
2.5. Produção de biodiesel em fluidos pressurizados .....	22
2.6. Modelagem matemática da produção enzimática de biodiesel .....	26
2.7 Considerações a respeito do estado da arte .....	27
2.8 Referências Bibliográficas .....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1. Especificação dos materiais .....	34
3.2. Equipamentos e Metodologia .....	34
3.2.1. Determinação da atividade enzimática das lipases .....	34
3.2.2. Reações em propano pressurizado .....	36
3.3. Método para determinação de ésteres .....	42
3.4. Método para determinação de mono-, di- e triglicerídeos .....	43
3.5. Condições experimentais testadas .....	43
3.6. Modelagem Matemática .....	45
3.7. Referências Bibliográficas .....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	49
4.1. Testes Preliminares para avaliação do nível de agitação e sistema de amostragem do reator Parr .....	49
4.2. Efeito das variáveis de processo sobre a transesterificação de óleo de soja em propano pressurizado .....	55
4.2.1. Temperatura .....	55
4.2.2. Concentração de enzima .....	58
4.2.3. Efeito da razão molar óleo:etanol .....	61
4.4. Referências Bibliográficas .....	65
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	67
5.1. Conclusões .....	67
5.2 Sugestões .....	67
APÊNDICE A - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	69

A.1 Procedimentos realizados para análise de TAG, DAG e MAG .....	69
A.1.1 Condições cromatográficas.....	69
A.1.2 Preparação e análise das soluções de calibração .....	69
A.1.3 Cálculos das concentrações de TAG, DAG e MAG.....	72
A.2 MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES .....	73
A.2.1 Método.....	73
A.2.2 Cromatografia .....	74
A.2.3 Cálculo do teor em ésteres: com base a EN 14103 .....	74

## 1. INTRODUÇÃO

O fim da era da energia renovável (hidráulica, eólica, combustão da madeira) após a Revolução Industrial, no século 19, foi marcado pela introdução do uso do carvão mineral, que deu origem à era da energia não renovável, a era dos combustíveis fósseis. No entanto, com o declínio das reservas mundiais deste combustível, o petróleo consagrou-se no início do século XX como a principal fonte energética mundial, posição que ainda hoje ocupa. Porém, devido à escassez deste recurso e os problemas de poluição ambiental, a busca por uma fonte alternativa de energia tornou-se de extrema importância (Srivastava e Prasad, 2000).

Considerando estes fatores, dentre as fontes disponíveis, a modificação de óleos e gorduras tem sido largamente investigada, por se tratar do processamento de uma fonte de energia renovável, com crescente disponibilidade, com produção disponível em vários países e por seu uso sustentável não provocar danos ao meio ambiente (Ramos *et al.*, 2003).

Entre os processos utilizados para modificação de óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como: diluição, micro emulsão, decomposição térmica, craqueamento catalítico e transesterificação (Srivastava e Prasad, 2000). Atualmente, a transesterificação tem sido o método mais utilizado. Tal técnica consiste na reação de um triglicerídeo (de fonte vegetal ou animal) com um álcool, na presença ou ausência de catalisador, da qual resulta uma mistura de ésteres de ácidos graxos, denominada biodiesel, e o glicerol como subproduto (Ma e Hanna, 1999).

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biodiesel é um “combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” ([www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br)).

O biodiesel apresenta características físico-químicas semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizado em motores do ciclo diesel praticamente sem nenhuma modificação. É um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis e com crescente disponibilidade, que apresenta grande potencial como alternativa, substituto ou aditivo, ao diesel de petróleo (Kusdiana e Saka, 2001), possibilitando também uma expressiva capacidade de redução da emissão de matéria particulada e gases poluentes causadores do efeito estufa (Meher *et al.*, 2006).

Para o Brasil, os chamados biocombustíveis, produzidos através de óleos vegetais, podem representar excelente oportunidade de crescimento sócio-econômico em regiões agrícolas pouco exploradas. O potencial da mamona, presente no Nordeste, bem como do girassol e da soja, cultivados no Centro-Sul, além do potencial de matérias-primas como babaçu, dendê, andiroba, pequi e macaúba, nativos nas regiões amazônicas, cerrado e semi-árido, permitem prever com otimismo uma futura liderança mundial do país na produção de biodiesel. Aliado a este fator político/econômico, têm-se a possibilidade do fortalecimento da agricultura familiar numa estrutura de desenvolvimento sustentável ([www.petrobras.com.br](http://www.petrobras.com.br)).

A importância do estudo e desenvolvimento da tecnologia de produção do biodiesel (ésteres dos ácidos graxos) é resolver problemas energéticos, pois este pode substituir eficientemente o diesel proveniente do petróleo. Para o Brasil, o biodiesel é uma ótima alternativa visto que sua produção tem como base a transesterificação de óleos vegetais, e o país é um grande produtor de oleaginosas. Em termos ambientais, a adoção do biodiesel, mesmo que de forma progressiva, ou seja, em adições de 2 a 5% no diesel de petróleo, poderão resultar em uma redução significativa no padrão de emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa (Mittelbach *et al.*, 1983). O biodiesel tem recebido atenção especial por ser um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Os benefícios ambientais decorrentes de seu uso incluem também uma emissão mais baixa de material particulado e gases do efeito estufa como CO, CO<sub>2</sub> e SO<sub>x</sub> (Pizarro e Park, 2003).

A fonte para a produção do biodiesel pode ser escolhida de acordo com a disponibilidade em cada região ou país. Qualquer fonte de ácido graxo pode ser em princípio usada na síntese de biodiesel (Pinto *et al.*, 2005). Em relação ao álcool a ser utilizado, geralmente se trabalha com metanol e etanol, devido às propriedades físicas, polaridade e por possuírem curta cadeia carbônica (Ma e Hanna, 1999).

A transesterificação enzimática, utilizando lipase como catalisador, tornou-se uma alternativa atrativa para a produção de biodiesel, uma vez que temperaturas amenas são empregadas, aliado ao fato de que o glicerol produzido como um subproduto pode facilmente ser recuperado e a purificação dos ésteres é facilmente realizada (Fukuda *et al.*, 2001). Por outro lado, a transesterificação enzimática exige altas proporções de solvente orgânico para que a reação ocorra a contento. Oliveira (1999) e Faccio (2004) utilizaram níveis de solvente (n-hexano)/substrato de 40:1 na transesterificação de óleo de dendê,

mamona e soja utilizando as lipases imobilizadas comerciais Novozym 435 e Lipozyme IM.

A fim de superar os problemas da transesterificação por catálise química, os quais implicam em elevado custo de produção e emprego de grande quantidade de solventes, Kusdiana e Saka (2001) e Demirbas (2002) propuseram que o biodiesel pode ser produzido a partir de óleo vegetal através da transesterificação não-catalítica com metanol supercrítico. Como consequência, a reação é completada em tempos de residência muito curtos. Comparado aos processos catalíticos empregando bases e ácidos, a purificação dos produtos parece ser muito mais simples. Entretanto, a reação requer temperaturas na faixa de 350-400°C e pressões entre 45-65 MPa, valores estes não muito apreciados no ambiente industrial. Além disso, tais temperaturas e pressões elevadas conduzem a elevados custos iniciais de fabricação, de processamento e de energia (Cao *et al.*, 2005).

Dados da literatura apontam a possibilidade de realizar reações enzimáticas de óleos vegetais em dióxido de carbono líquido ou supercrítico, obtendo-se seletividade e taxas de reações maiores do que aquelas obtidas com solventes usuais (Savage *et al.*, 1995; Mesiano *et al.*, 1999; Brennecke e Chateauf, 1997; Knez e Habulin, 2001; Rezaei e Temelli, 2001; Oliveira e Oliveira, 2000 e 2001). Apesar deste cenário positivo apontado, o uso de dióxido de carbono em reações enzimáticas que utilizam óleos vegetais como substrato, apresenta algumas limitações quanto à solubilidade de tais compostos e no que diz respeito à atividade/estabilidade de algumas lipases neste solvente comprimido (Feihmann *et al.*, 2006; Ndiaye *et al.*, 2006). Referente a este aspecto, as propriedades do propano apontam vantagens sobre o dióxido de carbono, o que implica em um sistema mais apropriado para a realização das reações enzimáticas a partir de óleos vegetais (Dalla Rosa *et al.*, 2008; Feihmann *et al.*, 2006; Lanza *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos na literatura são encontrados nos quais a modelagem da cinética de reação com lipases é empregada. (Al-Zuhair *et al.*, 2007, Pilarek e Szweczyk 2006, Xu *et al.*, 2004 e Chi 1997). Mas em se tratando da modelagem da cinética da reação da produção de biodiesel enzimático, a literatura apresenta ainda poucos trabalhos que evidenciam este estudo, dentre eles podemos citar o trabalho de Kroumov *et al.* (2007), no qual os autores desenvolveram um modelo para a cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para a produção de biodiesel, onde foram utilizados dados experimentais reportados por Iso *et al.* (2001).

## 1.1 Objetivos

Observando estes aspectos e avaliando as informações disponíveis na literatura sobre a alta solubilidade do óleo de soja em propano, o aumento da atividade enzimática da lipase imobilizada Novozym 435 neste solvente, foi possível estabelecer a proposta deste trabalho, que tem como objetivo geral coletar dados experimentais e propor um modelo da cinética enzimática da produção de biodiesel a partir de óleo de soja e etanol em propano pressurizado, utilizando uma lipase comercial como catalisador, como base para estudos de otimização do processo. Em consonância com o objetivo geral deste trabalho os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Estudo do efeito das variáveis temperatura (45°C - 70°C), pressão (50 bar), concentração de enzima (1% m/m – 20% m/m), razão molar óleo:etanol (1:3 – 1:15) e razão mássica solvente/substratos (2:1) sobre a cinética de produção de diglicerídeos (DAG), monoglicerídeos (MAG), ésteres etílicos de soja (FAEE) e consumo de triglicerídeos (TAG) em propano pressurizado;
- Proposição de um modelo matemático simplificado para a reação.

Como forma de embasamento deste trabalho, primeiramente será apresentada uma revisão bibliográfica, procurando evidenciar os resultados disponíveis na literatura referentes ao tema do presente estudo. O Capítulo 3 apresenta os métodos analíticos utilizados no decorrer deste trabalho, bem como procedimento experimental adotado ao longo deste estudo. No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados para os sistemas estudados e, por fim, as conclusões, bem como sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 5.

## 1.2 Referências bibliográficas

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. **Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase**. Process Biochemistry, v. 42, p. 951-960, 2007.

BRENNECKE, J. F.; CHATEAU NEUF, J. E. **Homogeneous organic reactions as mechanistic probes in supercritical fluids**. Chemical Reviews, v. 99, n. 2, p. 433-452, 1997.

CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. **Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and co-solvent**. Fuel, v. 84, p. 347-351, 2005.

CHI, Y.; M. **Kinetic study of the Lipase-catalyzed interesterification of triolein and stearic acid in nonpolar media.** Journal of Biochemical Molecular Biology, v. 30, n. 1, p. 7-12, 1997.

DALLA ROSA; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane.** Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 49–53, 2008.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol.** Energy Conversion and Management, v. 43, p. 2349-2356, 2002.

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.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais.** Dissertação de Ms., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

FEIHRMANN, A. C.; OLIVEIRA, D.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of Supercritical Fluids, v. 38, p. 373-382, 2006.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 16, p. 53-58, 2001.

KNEZ, Z.; HABULIN, M. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids, v.23, p. 29-42, 2001.

KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; WENZEL, B. M. **Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel.** Acta Scientiarum. Technology. v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol.** Fuel, v.80, p. 225-231, 2001.

LANZA, M.; PRIAMO, L.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. **The effect of temperature, pressure, exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO<sub>2</sub>.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 113-116, p. 181-187, 2004.

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

MEHER, L.C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S.N., **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review,** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.10, p. 248–268, 2006.

MESIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Supercritical Biocatalysis.** Chemical Reviews, v. 99, n. 2, 623-633, 1999.

MITTELBACH, M.; WÖRGETTER, M.; PERNKOPF, J.; JUNEK, H. **Diesel fuel derived from vegetable oils: preparation and use of rape oil methyl ester.** *Energy in Agriculture*, v.2, p.369-384, 1983.

NDIAYE, P. M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F. W.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 29-37, 2006.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico.** Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and in SCCO<sub>2</sub>.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, n. 2, p. 141-148, 2001.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>.** *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 39, n. 12, p. 4450-4454, 2000.

PILAREK, M.; SZEWCZYK, K. W.; **Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases.** *Journal of Biotechnology*, v. 127, p. 736–744, 2007.

PINTO, A. C.; GUARIEIROA, L. L. N.; REZENDEA, M. J. C.; RIBEIROA, N. M.; TORRES, E. A.; LOPESC, W. A.; PEREIRAC, P.A. P.; ANDRADE, J. B. **Biodiesel: An Overview.** *Journal Brazilian Chemical Society*., v. 16, p. 1313-1330, 2005.

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

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMIGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil.** *Biocologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 31, p. 27-37, 2003.

REZAEI, K.; TEMELLI, F. **On-line extration-reaction of canola oil using immobilized lipase in supercritical CO<sub>2</sub>.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 263-274, 2001.

SAVAGE, P. E.; GOPALAN, S.; MIZAN, T. I.; MARTINO, C. J.; BROCK, E. E. **Reactions at supercritical conditions: Applications and fundamentals.** *AIChE Journal*, v. 41, p. 1723-1778, 1995.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. **Triglycerides-based diesel fuels.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 4, p. 111-133, 2000.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D. **Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, p. 241–245, 2005.

[www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br) – Acessado em Novembro 2009.

[www.petrobras.com.br](http://www.petrobras.com.br) – Acessado em Novembro 2009.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um grande número de fatores coloca a biomassa na vanguarda da política energética. Os altos preços e a dependência de fontes de energia não renováveis (petróleo, gás e carvão), legislação ambiental cada vez mais rígida e problemas ambientais devido à combustão de combustíveis fósseis aumentou o interesse em fontes de energia renováveis.

Além destes aspectos, o Brasil tem um grande potencial na produção do biodiesel, por ser um país com proporções continentais e, dessa forma, poder explorar de maneira ordenada o cultivo das diversas oleaginosas que são base da matéria-prima em diferentes regiões do país, gerando emprego e renda, inclusão social, redução das emissões de poluentes, envolvendo, portanto, aspectos de natureza social, estratégica, econômica e ambiental.

A seguir é apresentada uma breve explanação sobre o contexto geral do biodiesel no Brasil e no mundo, bem como um histórico sucinto sobre o tema. O presente capítulo contempla também os métodos utilizados para produção de biodiesel. A revisão da literatura apresenta trabalhos existentes com o emprego de enzima, a produção de biodiesel em fluidos pressurizados, e a modelagem da cinética da produção de biodiesel.

### 2.1. Contexto geral sobre biodiesel

O combustível diesel tem uma função primordial na economia industrial de um país, seja pelo seu uso em transporte de bens industriais e agroindustriais ou como fonte de energia para a movimentação de máquinas e implementos. A elevada demanda de energia no mundo industrializado assim como no setor doméstico, e os problemas de poluição causada devido ao uso difundido de combustíveis fósseis tornam cada vez mais necessário estudar fontes de energia renováveis de duração ilimitada e de menor impacto ambiental do que a tradicional. Esta constatação estimulou o interesse recente na busca de fontes alternativas para combustíveis derivados do petróleo (Meher *et al.*, 2006). A demanda brasileira atual de diesel é de cerca de 37 bilhões de litros por ano, dos quais 6 bilhões de litros (cerca de 15%) são importados, ao custo anual de US\$ 1,2 bilhão ([www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)).

Os combustíveis alternativos ao diesel devem ser tecnicamente e economicamente competitivos, ambientalmente aceitáveis e facilmente disponíveis. Para atender a estas exigências, triglicerídeos (óleos vegetais e gorduras animais) e seus derivados podem ser considerados como alternativa viável ao diesel. Óleos vegetais são obtidos de uma grande

variedade de fontes renováveis (Srivastava e Prasad, 2000). Os óleos vegetais têm sido largamente investigados como candidatos a programas de energia renovável, pois proporcionam uma geração descentralizada de energia e um apoio à agricultura familiar, valorizando potencialidades regionais e oferecendo alternativas a problemas econômicos e sócio-ambientais (Ramos *et al.*, 2003).

O uso de óleos vegetais em motores diesel é quase tão antigo quanto o próprio motor diesel. O inventor do motor diesel, Rudolf Diesel, segundo relatos, utilizou óleo de amendoim como combustível para fins de demonstração em 1900. Alguns outros trabalhos investigaram o uso de óleos vegetais em motor diesel nas décadas de 30 e 40. As crises energéticas no início da década de 70 e nos anos 80, bem como preocupações sobre a queda dos recursos não-renováveis do mundo, proveram os incentivos para buscar alternativas aos combustíveis convencionais a base de petróleo. Neste contexto, retomaram-se os estudos envolvendo a aplicação de óleos vegetais como combustíveis para motor diesel. Em decorrência, eles ocupam hoje uma posição proeminente no desenvolvimento de combustíveis alternativos. Centenas de artigos científicos e vários relatórios a respeito de procedimentos alternativos para obtenção de combustíveis a partir de óleos vegetais têm sido relatados no mundo todo (Knothe *et al.*, 2002).

O biodiesel obtido a partir de óleo vegetal não produz óxido de enxofre, minimiza a emissão de particulados em até três vezes e aumenta significativamente a lubrificidade em comparação com o combustível derivado do petróleo. Em função destas vantagens técnicas e ambientais, vislumbra-se o biodiesel como um combustível substituto, ou pelo menos, como aditivo ao diesel convencional (Mamuro *et al.*, 2001). Além disso, o biodiesel tem despertado grande interesse devido aos baixos níveis de poluentes emitidos, o que viria a reduzir o impacto ambiental quando de sua adição ao diesel.

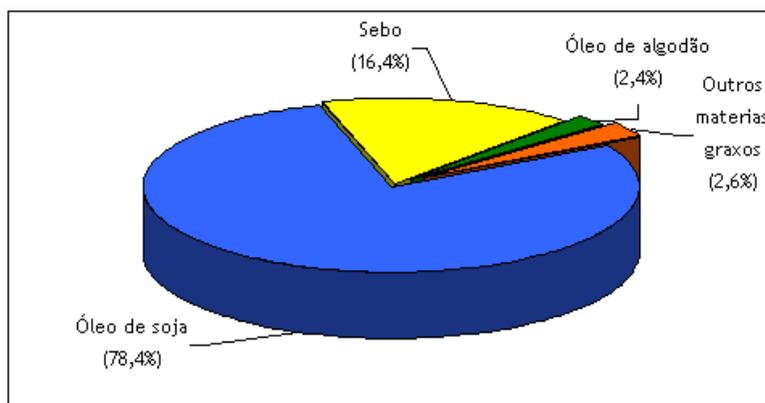
No trabalho de Altin *et al.* (2001) avaliou-se o desempenho de motores a diesel, utilizando como combustível biodiesel derivado de óleos vegetais. Os autores constataram que a performance do motor não foi afetada pela utilização de biocombustível oriundo das diversas fontes vegetais.

### **2.1.1. Biodiesel no Brasil**

Em se tratando de óleos vegetais, atualmente conhece-se aproximadamente 350 tipos de leguminosas de óleo identificadas, dentre as oleaginosas já investigadas para a produção de biodiesel figuram a soja, o girassol, a mamona, o milho, a canola, o babaçu, o buriti, o

dendê, o amendoim, entre outras (Ma e Hanna, 1999). O problema principal associado ao uso de óleos vegetais puros como combustíveis para motor diesel é devido principalmente à alta viscosidade do óleo, que prejudica a ignição. Os óleos vegetais apresentam viscosidades que se situam em torno de 10–20 vezes maiores que o biodiesel correspondente (Demirbas, 2002).

No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor de óleo vegetal, sua produtividade, bem como a adaptação territorial (Ramos *et al.*, 2003). Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, é de fundamental importância que se tenha uma visão geral da potencialidade dos óleos vegetais visando a produção de biodiesel. A Figura 2.1 apresenta as principais fontes de matéria-prima utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil no ano de 2008.



**FIGURA 2.1** - Principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel, Dezembro de 2008 ([www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)).

A Tabela 2.1 apresenta a produção nacional de óleos vegetais no ano de 2002. Com base nos dados da Tabela 2.1 pode-se observar a tendência do Brasil em adotar a soja como matéria-prima para produção de biodiesel. A produção desta oleaginosa representa 90% da produção nacional de óleos vegetais (Abiove), apresentando o maior potencial para servir de modelo para o desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel. Em termos mundiais o Brasil se encontra como o segundo maior produtor de soja ([www.conab.com.br](http://www.conab.com.br)).

Além da soja, várias outras oleaginosas, que ainda se encontram em fase de avaliação e desenvolvimento de suas cadeias produtivas, podem ser empregadas na produção de biodiesel (Ramos *et al.*, 2003). Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, é de fundamental importância que se tenha uma visão geral acerca dos óleos vegetal potenciais na produção de biodiesel.

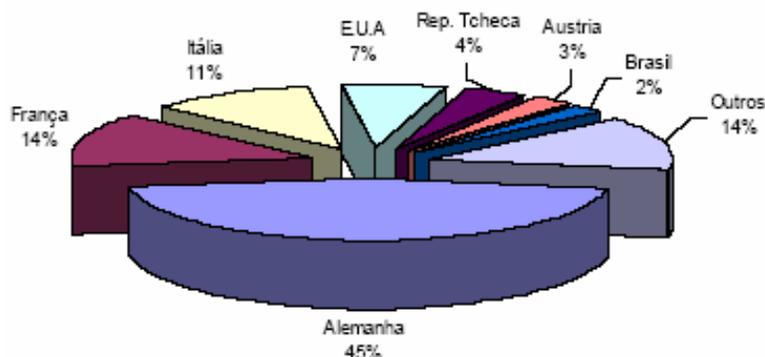
**TABELA 2.1** - Produção brasileira de óleos vegetais, 2002 (Abiove)

<b>Óleo Vegetal</b>	<b>Produção (mil toneladas)</b>	<b>Percentual (%)</b>
Soja	4.937	90,57
Algodão	193	3,54
Amendoim	28	0,51
Girassol	56	1,03
Colza	17	0,31
Milho	46	0,84
Dendê (Palma)	118	2,16
Palmiste	13	0,24
Cocô	2	0,04
Mamona	41	0,75
Total	5.451	100,00

Existem vários tipos de álcool que podem ser utilizados para promover a reação de transesterificação, podendo-se citar o metanol, etanol, propanol ou butanol; entretanto o metanol e etanol são utilizados com maior frequência (Macedo e Macedo, 2004). No cenário nacional, o etanol destaca-se como forte candidato para ser utilizado como substrato, devido a grande disponibilidade deste produto e por ser obtido de fontes renováveis. Segundo dados da ANP, o Brasil está entre os principais produtores de etanol, sendo a produção do mesmo expressiva em praticamente todas as regiões do país.

### **2.1.2 Biodiesel no Mundo**

Em nível mundial, os países que iniciaram o desenvolvimento da produção de biodiesel foram a Alemanha e a França. Conforme dados apresentados na Figura 2.2, a Europa Ocidental é o maior produtor de biodiesel do mundo.



**FIGURA 2.2** - Distribuição dos principais países produtores de biodiesel no mundo no ano de 2005 (www.ifp.com).

Na União Européia, a principal matéria prima utilizada para a produção do biodiesel é o óleo de colza ou canola. Embora os óleos de palma e da soja liderem a oferta do mercado mundial, os países da União Européia não têm utilizado os mesmos em grande proporção na produção do biodiesel.

No caso da Alemanha, as usinas produtoras utilizam o óleo de palma importado somente no verão e o óleo de canola OGM (Organismo Geneticamente Modificado) ao longo de todo o ano para atender à demanda interna. A restrição do uso do óleo de palma no inverno ocorre em função da característica física do produto, visto que o óleo de palma fica mais denso e reduz a eficiência da combustão, tendo em conta a baixa temperatura do inverno Europeu. A legislação alemã restringe a utilização do óleo de soja para a produção de biodiesel, reduzindo a oportunidade de exportação desta oleaginosa por parte da Argentina e do Brasil (Osaki e Batalha, 2008).

Nos Estados Unidos, o programa de biocombustível tem priorizado a produção de etanol a partir do milho. No caso específico do biodiesel, os investimentos nas instalações de usinas de biodiesel são incipientes em relação ao de etanol.

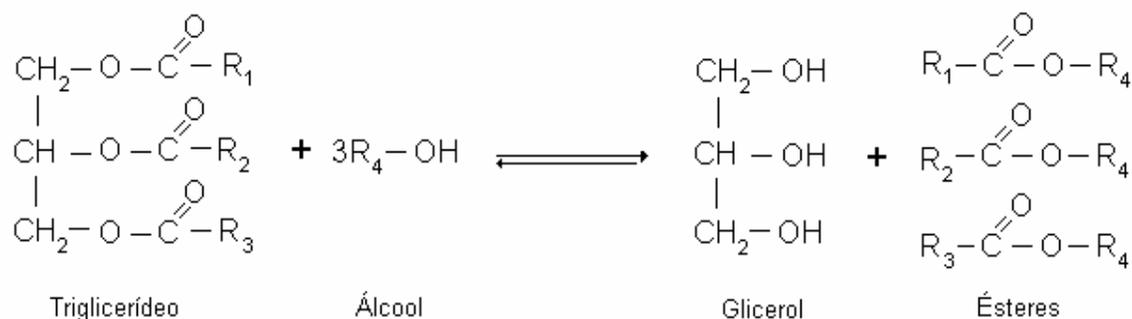
Na África do Sul, o programa de biocombustível obrigou a mistura de 2% de etanol (E2) na gasolina e 2% de biodiesel no diesel (B2) a partir do ano de 2008. No ano de 2010, a proporção do biodiesel no diesel aumentará para B5. Já o etanol na gasolina poderá ser de 10% no ano de 2012. As fontes oleaginosas para a produção de biodiesel são a soja e o girassol (Osaki e Batalha, 2008).

## 2.2. Técnicas para produção de biodiesel

O surgimento da transesterificação é datado de 1846, quando Rochieder descreveu a produção de glicerol pela etanolise de óleo de mamona. Desde aquele momento, o processo de alcoólise tem sido largamente estudado (Demirbas, 2003).

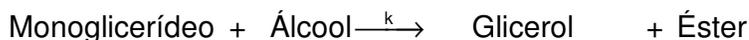
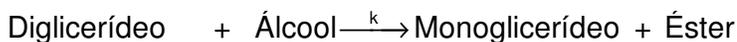
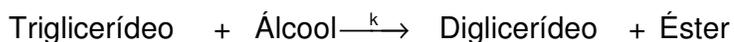
Na atualidade, o biodiesel é produzido mundialmente em larga escala através da transesterificação de óleos vegetais empregando catalisadores químicos. Porém, as exigências de remoção do catalisador e de excessivas quantidades de energia empregadas são as principais desvantagens de tal processo químico (Mamuro *et al.*, 2001).

Segundo Srivastava e Prasad (2000), a transesterificação consiste na reação de um triglicerídeo (TAG) com um álcool (Figura 2.3), resultando na produção de 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol (GL).



**FIGURA 2.3** - Representação da reação de alcoólise de triglicerídeos.

Acredita-se que três sucessivas e reversíveis reações aconteçam. O primeiro passo é a conversão de um triglicerídeo a um diglicerídeo, seguido pela conversão de um diglicerídeo a monoglicerídeo e de monoglicerídeo para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (Srivastava e Prasad, 2000), conforme representado na Figura 2.4.



**FIGURA 2.4** - Reações intermediárias da reação de alcoólise de triglicerídeos.

O processo de transesterificação reduz o peso molecular para aproximadamente 1/3 em relação aos triglicerídeos, reduz significativamente a viscosidade e melhora a

volatilidade. Após a reação, os produtos consistem em uma mistura dos ésteres de ácidos graxos, glicerol, álcool, catalisador e uma porcentagem baixa de tri, di e monoglicerídeos (Pinto *et al.*, 2005).

A transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, também denominada de alcoólise, pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas, em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados (Ramos *et al.*, 2003).

A catálise química (ácida ou básica) é a técnica mais utilizada na reação de transesterificação, pois permite, no caso da catálise alcalina, a obtenção de altas conversões em baixos tempos de reação, como relatam estudos na literatura (Freedman *et al.*, 1986; Nouredini e Zhu, 1997; Darnoko e Cheryan, 2000; Faccio, 2004; Martinez, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Dalla Rosa *et al.*, 2008).

Assim, a transesterificação por catálise básica utilizando reagentes como hidróxido de sódio é mais eficiente em relação à catálise ácida devido ao tempo bastante reduzido de reação.

O processo global de transesterificação catalítica contempla a recuperação do reagente, a purificação dos ésteres e a separação do glicerol e do catalisador a partir do produto final, sendo tais etapas dispendiosas e onerosas. Assim, os processos catalíticos homogêneos implicam em elevado custo de produção e emprego de grande quantidade de solventes, sendo o principal desafio a separação do catalisador e dos produtos finais da reação (Madras *et al.*, 2004).

Oliveira *et al.* (2005) apresentam o estudo dos fatores que influenciam na reação de produção de ésteres etílicos utilizando NaOH como catalisador. Para o óleo de mamona, os parâmetros otimizados foram temperatura de 70°C, 0,5% (m/m) de catalisador e razão molar óleo:etanol de 1:3, para conversão de 96,2%. Já para o óleo de soja, chegou-se a conversão de 94,1%, nas condições de temperatura de 70°C, 0,5 % (m/m) de catalisador e razão molar óleo:etanol de 1:9.

O método químico embora de concepção simples, rápido e com altos rendimentos apresenta vários inconvenientes tais como custos com catalisador, dificuldade de purificação e separação dos produtos da reação, o que implica em altos custos de produção e energia (Kusdiana e Saka, 2001b). A remoção do catalisador é tecnicamente difícil e traz custo extra ao produto. A utilização de catalisadores básicos acarreta a formação de sabão que é uma reação indesejável, levando ao consumo parcial do catalisador, diminuindo o rendimento da reação, fato que torna as etapas de separação e purificação dos produtos complexa (Pinto *et al.*, 2005).

Visando superar os inconvenientes da transesterificação via catálise alcalina e ácida, Kusdiana e Saka (2001) propuseram que o biodiesel pudesse ser produzido a partir de óleo vegetal através da transesterificação não-catalítica com metanol supercrítico. Os autores verificaram que a conversão da reação é praticamente completa, com tempos de residência bastante curtos. Comparado com os processos catalíticos, a purificação dos produtos aparenta simplicidade e é ambientalmente correta. Entretanto, a reação requer temperaturas de 350-400°C e pressões de 45-65 MPa, que não são atualmente viáveis no contexto industrial. Além disso, tais temperaturas e pressões elevadas conduzem a elevados custos iniciais de fabricação, de processamento e de energia (Cao *et al.*, 2005).

De maneira geral alguns fatores interferem no rendimento da reação de transesterificação, dentre os quais pode-se mencionar:

- Tipo de Catalisador: catalisadores usados para transesterificação de triglicerídeos são classificados em químicos homogêneos (alcalinos e ácidos), enzimáticos e heterogêneos suportados em materiais porosos.

- Tempo de reação: para reação de transesterificação, o tempo necessário para atingir altas conversões depende do tipo de catalisador utilizado. Para sistemas utilizando catalisadores químicos, a completa conversão do sistema é geralmente atingida em torno de 20 minutos de reação (Faccio, 2004). O método supercrítico sem utilização de catalisador indica um tempo de reação de 4 minutos para que a reação completa ocorra (Kusdiana e Saka 2001a, b e c).

- Temperatura de reação: cada metodologia indica uma temperatura ótima para que a reação de transesterificação ocorra de maneira satisfatória. Segundo Darnoko e Cheryan (2000), a temperatura ótima para a reação utilizando catalisadores químicos situa-se próxima a temperatura normal de ebulição do álcool a ser utilizado na reação. Em relação a sistemas enzimáticos, à temperatura ótima de operação é função da enzima a ser utilizada como catalisador da reação (Nascimento *et al.*, 2004). Quando a reação é não catalítica, recomenda-se que seja a temperatura da reação maior que a temperatura crítica do álcool a ser utilizado como agente de transesterificação.

- Razão molar óleo:álcool: uma das mais importantes variáveis que afetam o rendimento em ésteres é a relação molar entre o álcool e o triglicerídeo. A estequiometria da reação de transesterificação requer três moles do álcool e um mol do triglicerídeo para render três moles de ésteres do ácido graxo e um mol de

glicerol. Porém, um excesso de álcool é utilizado com o intuito de deslocar o equilíbrio da reação, no sentido de favorecer a formação dos produtos. Altas razões molares resultam em elevadas conversões em ésteres em curtos tempos de reação (Ma e Hanna, 1999). Em sistemas enzimáticos uma quantidade de álcool em excesso pode causar efeito de inibição por substrato na reação, diminuindo os níveis de conversão (Noureddini *et al.*, 2005). No método supercrítico, para que a reação apresente rendimentos satisfatórios, razões na ordem de 1:40 (óleo:álcool) são igualmente utilizadas.

- Teor de ácidos graxos livres e água: o rendimento da reação é afetado diretamente pelo teor de ácidos graxos livres e água, quando a mesma é conduzida por intermédio de catalisadores básicos. Uma vez que parte do catalisador é utilizada para neutralizar os ácidos graxos livres e a água pode levar à formação de ácidos graxos, reduzindo a eficiência da reação. Reações em condições supercríticas, no entanto, não são afetadas por estas variáveis (Kusdiana e Saka, 2004).

- Intensidade de mistura: a natureza das duas fases óleo/álcool requer vigorosa agitação para proceder à reação de transesterificação (Kusdiana e Saka, 2001b). Sistemas de agitação são normalmente aplicados para aumentar o contato entre os reagentes, resultando no acréscimo na taxa de transferência de massa, o que interfere diretamente no rendimento da reação (Noureddini e Zhu, 1997).

### 2.3. Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem em células e outros organismos sem se alterarem. Estas apresentam diversas vantagens relativamente aos seus congêneres químicos, em particular a regioseletividade (preferência por um entre vários grupos funcionais idênticos na molécula de substrato), a enantioseletividade (preferência por um enantiômero, ou seja, moléculas que são imagens no espelho uma da outra e não são sobreponíveis, nem por rotação nem por translação. A mistura de enantiômeros numa solução denomina-se mistura racémica ) e a quimioseletividade (favorecimento de um determinado grupo funcional do substrato). A crescente procura por enzimas para aplicações industriais (Ghanem e Aboul-Enein, 2005; Krishna, 2002; Schmid *et al.*, 2002) está precisamente relacionada com a seletividade para o substrato: capacidade de discriminar substratos distintos mas

estruturalmente semelhantes (Klibanov, 2001). Do ponto de vista energético, as enzimas são também muito eficientes, uma vez que operam a temperaturas e pressões moderadas, assim como em faixas moderadas de pH. Estes catalisadores são extremamente eficientes do ponto de vista do aumento de velocidade que proporcionam relativamente à reação não catalisada. Geralmente, a ligação do substrato à enzima é um processo que se dá com uma variação de energia de Gibbs negativa, o que contribui para a estabilização do substrato. É precisamente este fato da afinidade da enzima para o estado de transição ser maior do que para o substrato que explica a diminuição da energia de Gibbs de ativação associada à ação das enzimas (Price *et al.*, 2001).

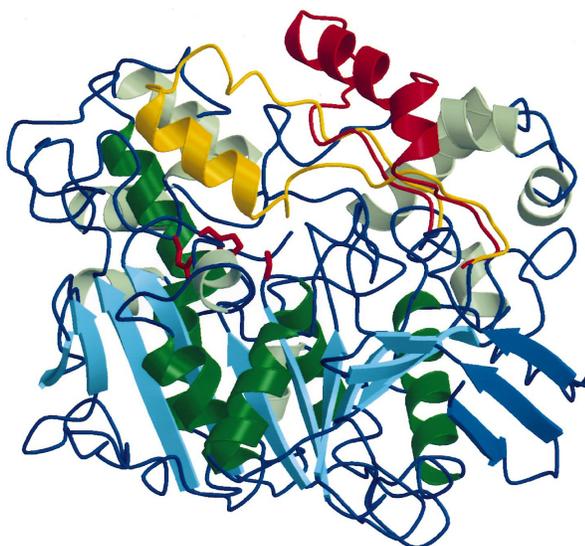
### 2.3.1. Lipases

As lipases são certamente as enzimas com maior interesse prático devido ao fato de aceitarem uma grande variedade de substratos, possuírem uma estabilidade relativamente alta, não necessitarem de co-fatores dispendiosos e serem facilmente obtidas comercialmente e com produtividade elevada a partir de microrganismos, nomeadamente fungos e bactérias. O fato da estrutura de muitas lipases ser conhecida facilita a aplicação de novas estratégias de modelagem da atividade das mesmas de uma forma mais racional (Jaeger e Eggert, 2002). As lipases podem ser usadas em várias reações de esterificação, interesterificação e hidrólise de ésteres (Reetz *et al.*, 1995). A utilização de lipases imobilizadas como catalisadores para produção de biodiesel apresenta grande potencial comparado com os métodos químicos que fazem uso de catalisadores alcalinos e ácidos, tendo em vista que nenhuma operação complexa é necessária para a separação do glicerol e também do catalisador (Du *et al.*, 2004). A ação de lipases sobre ligações ésteres tem sido muito estudada com o intuito de explorar as vantagens deste biocatalisador na modificação de óleos e gorduras. Neste sentido, observa-se que alguns parâmetros influenciam significativamente as reações catalisadas por lipases.

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é, entre várias enzimas, uma das mais utilizadas na área da biocatálise. Vários estudos têm demonstrado que esta enzima é particularmente útil na síntese de ésteres e aminas. A CALB mostra uma alta seletividade do substrato em relação à regioseletividade e enantioseletividade, sendo altamente regioseletiva na síntese de monoésteres de hidratos de carbono e enantioseletiva na resolução de inúmeros compostos, como, por exemplo, aminas, álcoois e ácidos e também

na preparação de compostos meso (Kirk e Christensen, 2002; Öhrner *et al.*, 1996; Rotticci *et al.*, 2001).

A estrutura desta enzima foi determinada em 1994, a qual é constituída por 317 aminoácidos, com um peso molecular de cerca de 33 kDa (Figura 2.5). O centro ativo desta enzima é constituído pela tríade catalítica Serina 105 – Histidina 224 – Aspartato 187 (Uppenberg *et al.*, 1994). Esta enzima, ao contrário da maioria das lipases, não apresenta ativação interfacial, uma vez que não possui a tampa característica da maior parte deste tipo de enzimas. O acesso ao centro ativo faz-se por um canal estreito, tendo ainda a particularidade da existência de uma pequena hélice com elevada mobilidade perto do centro ativo. A CALB encontra-se disponível no mercado, sob vários tipos de preparações, na forma livre ou imobilizada através de ligação iónica, esta mais utilizada em meios não aquosos (Rotticci *et al.*, 2001). A CALB imobilizada apresenta uma elevada estabilidade durante longos períodos de tempo na faixa de temperatura 60-80°C (Anderson *et al.*, 1998; Kirk e Christensen, 2002).

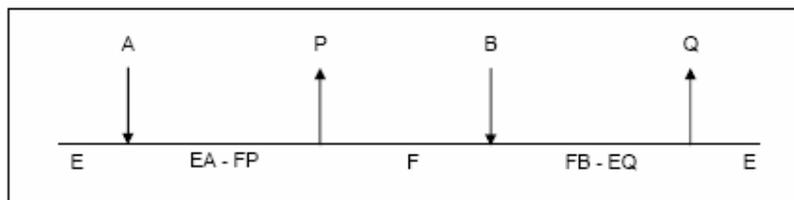


**FIGURA 2.5** - Estrutura tridimensional da lipase B de Candida Antarctica (Cygler e Schrag, 1999).

### 2.3.2 Mecanismo reacional das lipases

O mecanismo destas enzimas é normalmente descrito pelo modelo Ping-pong bi-bi (Figura 2.6). O termo Ping-pong aplica-se aos mecanismos em que um ou mais produtos são liberados da enzima antes que todos os substratos sejam adicionados. Neste tipo de mecanismo, o grupo a ser transferido é primeiro deslocado do substrato A pela enzima para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (F). Em seguida ocorre a

transferência de F para o segundo substrato B, formando-se o produto Q e regenerando-se E (Murray *et al.*, 2003). O primeiro passo é o de acilação, o primeiro substrato a ligar-se à enzima será o que fornece o grupo acilo (R-CO-) sendo designado por agente acilante (Warshel *et al.*, 1989; Daggett *et al.*, 1991; Hedstrom, 2002).



**FIGURA 2.6** - Representação do mecanismo Ping-pong bi-bi. A e B são substratos, P e Q são produtos, E e F são diferentes configurações da enzima livre, EA-FP e FB-EQ são complexos de transição.

É importante salientar o que se passa no centro ativo da enzima que é constituído pela tríade catalítica Serina 105 – Histidina 224 – Aspartato 187. Inicialmente, o oxigênio do grupo hidroxila da Serina ataca o átomo de carbono do grupo carbonilo do substrato. A ligação C=O do substrato transforma-se numa ligação simples e o átomo de oxigênio adquire uma carga negativa. Forma-se um estado de transição de geometria tetraédrica em torno daquele carbono, através de pontes de hidrogênio entre o oxigênio e dois grupos NH de cadeias principais. Com a formação deste composto, ocorre a transferência de um próton da Serina para a Histidina. O Aspartato (o ácido aspártico tem que estar desprotonado) neutraliza, em parte, a carga que se desenvolve no estado de transição. A ligação carbonilo é então refeita, com o auxílio da forma protonada da Histidina que perde o próton, e dá-se a quebra do intermediário tetraédrico com expulsão de um primeiro produto (o álcool). A cadeia alquilo do primeiro substrato permanece ligada covalentemente à Serina, formando o intermediário acil enzima. Completa-se assim o passo de acilação. Em seguida ocorre o passo de desacilação que se desenvolve de forma semelhante, mas por ordem inversa. Inicia-se assim com o ataque nucleofílico à acil-enzima, por parte do reagente álcool (na reação de transesterificação) ou da água (na reação de hidrólise), resultando na formação, mais uma vez com o auxílio da Histidina, de um novo intermediário tetraédrico que quebra com liberação de um segundo produto (éster, na reação de transesterificação, e ácido, na reação de hidrólise). A enzima retorna ao seu princípio, ou seja, a sua estrutura inicial (Cygler e Schrag, 1999).

## 2.4. Produção de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores

A reação catalisada por enzimas apresenta facilidade de separação do catalisador, possibilidade de reutilização do mesmo e maior grau de pureza dos produtos da reação. No entanto, as desvantagens desta metodologia referem-se ao longo tempo de reação, custo das enzimas e muitas vezes baixos rendimentos obtidos (Nascimento *et al.*, 2004). O método enzimático pode ser conduzido na presença de solventes orgânicos, visando minimizar problemas de transferência de massa e imiscibilidade entre as fases, requerendo, no entanto, a utilização de elevadas razões solvente/óleo vegetal.

Dalla Rosa *et al.* (2008) apresentaram a obtenção de biodiesel de soja em propano pressurizado com a enzima comercial Novozym 435. Conversões completas da reação são relatadas em tempo de reação de 2 horas, utilizando razão mássica óleo:etanol de 1:6 e razão solvente:substrato de 2:1 e concentração de 20% (m/m) de enzima.

Um estudo da produção de ésteres etílicos de soja utilizando a enzima comercial Lipozyme IM e n-hexano como solvente é apresentado por Faccio (2004), tendo reportado 96% de conversão, utilizando uma razão óleo:solvente de 1:40, em aproximadamente 5 horas de reação.

Wang *et al.* (2006) realizaram estudos sobre a alcoolise da lipase catalisada a partir do destilado desodorizado do óleo de soja para a produção de biodiesel, nele os autores reportam que não houve perda significativa da atividade da lipase por 120 ciclos seguidos.

Noureddini *et al.* (2005) realizaram estudos sobre o efeito da imobilização de lipases na transesterificação de óleo de soja e o uso de metanol e etanol como solventes em diversas concentrações. Nove cepas de lipases foram inicialmente testadas e a de *Pseudomonas cepacia* conduziu ao melhor resultado de conversão em ésteres. As condições ótimas para a reação com óleo de soja foram: 35°C, 1:7,5 razão molar óleo/metanol, 0,5 g de água e 0,475 g de lipase nas reações com metanol e 35°C, 1:15,2 razão molar óleo/etanol, 0,3 g de água, 0,475 g de lipase para as reações com etanol. O número de ciclos de utilização da lipase imobilizada selecionada foi avaliado e os autores observaram que a lipase imobilizada demonstrou grande estabilidade e pouca perda de atividade quando sujeita a até 12 reciclos.

Shimada *et al.* (2002) apresentaram uma revisão apontando para a dificuldade de reutilização de enzimas na transesterificação e observaram que o metanol insolúvel é o constituinte que inativa irreversivelmente a lipase na quantidade de 1:1 razão molar óleo:metanol insolúvel, ainda que imobilizada. Avaliaram a reação de metanólise realizada

pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada, e óleos residuais em batelada de duas etapas, com variação das proporções de enzima e metanol, obtendo rendimentos superiores a 90% em biodiesel.

Watanabe *et al.* (2001) utilizaram a lipase de *Candida antarctica* imobilizada na transesterificação de óleos residuais numa coluna com proporções variadas de metanol e observaram que a atividade da enzima permanecia a mesma durante 100 dias de reação sem diminuir sua atividade.

Vários estudos sobre o tipo de álcool e as diferentes concentrações testadas em reações catalisadas por lipases podem ser encontrados na literatura. Nelson *et al.* (1996) realizaram a catálise enzimática empregando diversos óleos vegetais, álcoois e também diferentes espécies de lipases. A lipase de *M. miehei* foi a mais eficiente para converter triglicerídeos em ésteres utilizando álcool primário, considerando que a lipase de *C. antarctica* foi a mais eficiente utilizando álcool secundário. Conversões máximas de 94,8 – 98,5% foram obtidas para as reações com álcoois primários, como metanol, etanol, propanol, butanol e isobutanol e também 2-butanol empregando n-hexano como solvente. Os autores observaram que os rendimentos com metanol e etanol diminuíram na ausência de solvente: quando comparado ao obtido com hexano, o rendimento com metanol foi da ordem de 20%.

Entre os diversos estudos que relatam a influência do álcool, o de Abigor *et al.* (2000) descreve as conversões de ésteres obtidas a partir de óleo de palma e óleo de coco usando a lipase de *P. cepacia*, obtendo 72% de conversão fazendo uso de etanol e 15% de conversão com metanol. Ao contrário, Nelson *et al.* (1996) relatam que a eficiência da reação de transesterificação é muito menor quando se utiliza o metanol comparado ao etanol, nos sistemas com ou sem o emprego de solvente.

Sobre o uso de solventes em reações de transesterificação enzimática, alguns trabalhos são encontrados na literatura. A atividade enzimática depende do tipo de fluido utilizado, provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações de hidrogênio e iônicas. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água

essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (Knez e Habulin, 2001).

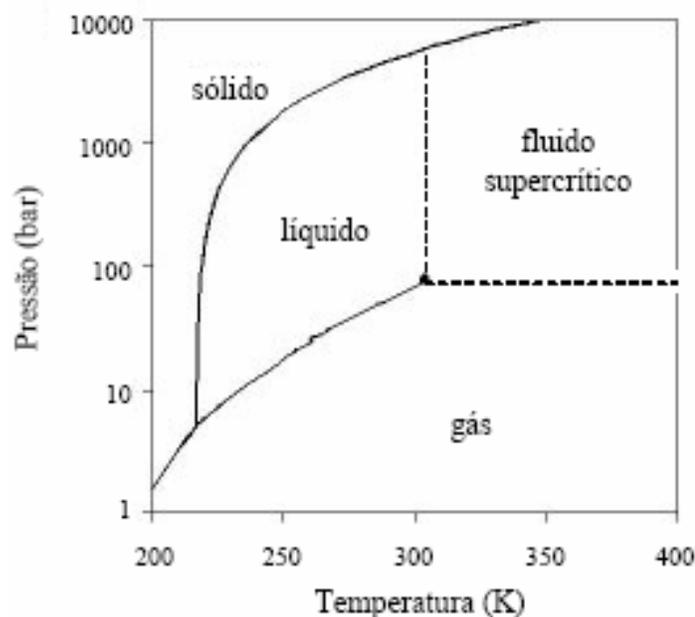
A produção de ésteres etílicos a partir de óleo de mamona e de soja usando n-hexano como solvente e duas lipases comerciais (Novozym 435 e Lipozyme IM) foi realizado por Oliveira *et al.* (2004, 2005). Diversos trabalhos descrevem a produção de ésteres por via enzimática utilizando lipases como catalisadores, e em todos os casos conversões satisfatórias foram observadas quando da utilização de uma razão mássica de solvente:substrato em torno de 40:1. Esta é, sem dúvida, uma das principais desvantagens do uso de enzimas como catalisadores da transesterificação de óleos vegetais em solventes orgânicos.

## **2.5. Produção de biodiesel em fluidos pressurizados**

A utilização de fluidos supercríticos em reações catalisadas por enzimas foi descrita inicialmente no final do século passado, mais precisamente na década de 80 por Randolph *et al.* (1985), Hammond *et al.* (1985) e Nakamura *et al.* (1986). Desde então, esta área tem sido alvo de grande expansão. A facilidade de manipulação das propriedades físicas do solvente através da simples alteração da pressão e/ou da temperatura é uma propriedade única dos sistemas supercríticos (Mesiano *et al.*, 1999).

O fluido supercrítico mais popular é o dióxido de carbono, pois possui uma baixa toxicidade, alta disponibilidade e existe na natureza. Cabe salientar também o fato da sua temperatura crítica ser baixa (Tabela 2.2) comparado a outros solventes e estar bastante próxima da temperatura ambiente, o que representa uma vantagem no uso de enzimas como catalisadores. O dióxido de carbono foi dirigido como a solução ideal para algumas aplicações comerciais. No entanto, há muitos compostos que apresentam baixa solubilidade em dióxido de carbono, o que limitou o campo de aplicações deste solvente. Apesar disso, a possibilidade de combinar catalisadores naturais com solventes naturais alavancou os estudos nesta área (Mesiano *et al.*, 1999; Lozano *et al.*, 2004).

O estado supercrítico ocorre quando uma substância encontra-se em condições de pressão e temperatura acima dos valores críticos respectivos (Figura 2.7). Em temperaturas superiores à temperatura crítica, a forma gasosa da substância não pode ser liquefeita por maior que seja a pressão aplicada, devido ao movimento molecular intenso que impede um balanço positivo favorável das atrações intermoleculares necessárias à formação de um líquido.



**FIGURA 2.7-** Diagrama de fases do CO<sub>2</sub>.

Na Tabela 2.2 encontram-se as temperaturas e pressões críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos.

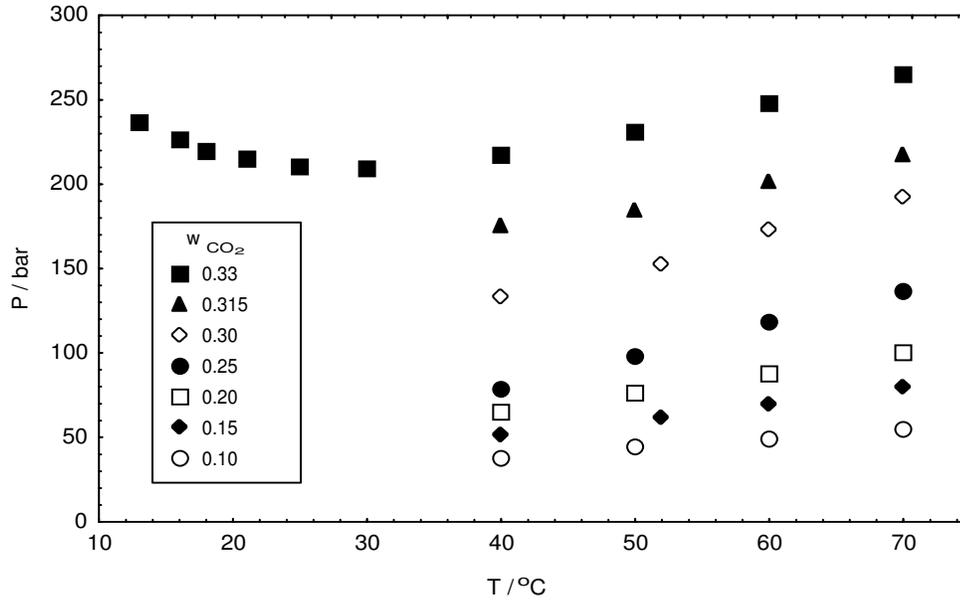
**TABELA 2.2** - Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos (Smith *et al.*, 2005).

<b>Solvente</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>P<sub>c</sub> (bar)</b>
Dióxido de Carbono	31,1	73,8
Etano	32,3	48,8
Propano	96,7	42,5
Etanol	243,1	63,8
Água	374,2	220,5

Segundo Dordick (1989) e Klibanov (1997), os fluidos supercríticos são meios atrativos para executar e para controlar reações de biocatálise. A motivação da realização destes trabalhos foi o fato de que uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima similares aquelas de seu meio nativo, e, então, mostrar atividade maior quando comparada à água pura. Os substratos podem também ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente.

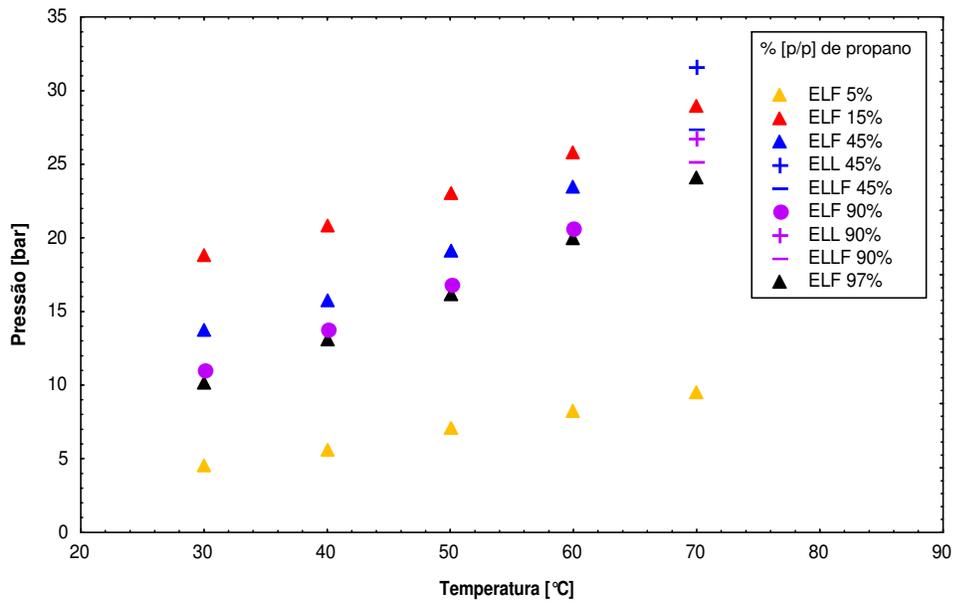
Desta forma, a substituição de um solvente orgânico, tal como o n-hexano, por um fluido supercrítico em reações enzimáticas, poderá resultar em maiores taxas de transferência de massa devido às propriedades de transporte favoráveis. Além das vantagens já citadas, é possível um controle mais apurado das variáveis operacionais. Um benefício adicional do emprego de fluidos supercríticos na catálise enzimática é a presença de um meio adequado à recuperação dos produtos e reagentes (Oliveira e Oliveira, 2000, 2001). King *et al.* (1995) relatam a alcoólise de óleos vegetais em CO<sub>2</sub> supercrítico a partir do óleo de milho e a utilização do glicerol (subproduto da reação) para depois a obtenção de mono- e diglicerídeos.

Mais especificamente no caso de biodiesel, o comportamento de fases a alta pressão de óleos vegetais em solventes pressurizados é um aspecto evidente. Lanza (2004) investigou o comportamento de fases a alta pressão do óleo de soja em solventes pressurizados, como propano e dióxido de carbono. Os resultados obtidos mostraram que o tipo de equilíbrio observado depende do sistema e que para o sistema contendo óleo de soja em propano foi identificada uma ampla região em composição contendo uma única fase, com pressões de transição relativamente baixas (abaixo de 40 bar), indicando um meio propício para as reações de transesterificação enzimática. Um estudo do sistema dióxido de carbono-óleo de soja revelou elevadas pressões de transição para o sistema que contém óleo de soja, segundo Ndiaye *et al.* (2006a), conforme apresentado na Figura 2.8.



**FIGURA 2.8** - Diagrama PT para o sistema dióxido de carbono-óleo de soja para diferentes frações mássicas (w) de dióxido de carbono (Ndiaye *et al.*, 2006a).

Na Figura 2.9 é apresentado o comportamento de fases do sistema propano - óleo de soja. Observa-se que as pressões de transição apresentadas são relativamente baixas, variando de 4 a 30 bar (Ndiaye *et al.*, 2006b).



**FIGURA 2.9** - Diagrama P-T para o sistema propano-óleo de soja (Ndiaye *et al.*, 2006b).

Os critérios para determinação da hidrofobicidade de um solvente estão, no entanto, sujeitos a controvérsias. Illanes (1994) aponta como um dos indicadores de hidrofobicidade a constante dielétrica que é responsável pelas interações específicas entre a enzima e o solvente. Admite-se que a diminuição da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula de enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. A modificação do valor da constante dielétrica também altera o valor de pKa dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer no sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada (Monot, 1994).

O uso de gases como solventes nas reações de transesterificação enzimática pode se constituir em alternativa para este inconveniente. Os fluidos pressurizados (gases em condições ambientes) possuem diversas vantagens sobre os solventes líquidos, dentre elas a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas.

## **2.6. Modelagem matemática da produção enzimática de biodiesel**

O conhecimento da cinética reacional permite esclarecer a natureza do mecanismo da reação, bem como a energia envolvida para ocorrência da mesma (Fogler, 1999). A determinação de parâmetros cinéticos é indispensável para avaliação e desenvolvimento de processos (Noureddini e Zhu, 1997), uma vez que tais parâmetros são utilizados para prever o comportamento da reação sob circunstâncias particulares (Darnoko e Cheryan, 2000), permitindo o projeto e o aumento de escala de reatores.

Na literatura encontram-se trabalhos referentes à cinética de transesterificação catalítica de óleos vegetais em modo batelada, onde vários modelos matemáticos foram propostos para ajuste dos dados experimentais. Santos *et al.* (2008) propuseram um modelo cinético da produção de biodiesel por rota enzimática utilizando a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435), utilizando um modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato através de ajuste não-linear, no qual seu ajuste demonstrou que o mecanismo de reação pode ser mais complexo, visto que o modelo afastou-se de seus dados experimentais quando a concentração de etanol foi aumentada. Al-Zuhair *et al.*

(2007) propuseram um mecanismo cinético para a produção de biodiesel a partir do óleo de palma, utilizando a lipase de *Mucor miehei*. O modelo enzimático utilizado para descrever a cinética de transesterificação foi baseado no modelo Ping Pong Bi Bi com inibição por ambos os reagentes e tal modelo pode ser utilizado para determinar o ótimo de concentração de álcool e substrato. Kroumov *et al.* (2007) propuseram um mecanismo por balanço de massa da transesterificação de triglicerídeos catalisada por lipase. O modelo proposto foi testado com diferentes experimentos em diversas condições operacionais encontradas na literatura, os resultados das simulações mostraram boa flexibilidade do modelo, ajustando os dados em várias condições de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel. Também pode-se citar os trabalhos realizados por Freedman *et al.*, 1986; Nouredini e Zhu, 1997; Darnoko e Cheryan, 2000; Martinez *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005. Tais modelos foram propostos com o intuito de avaliar o efeito de variáveis tais como tipo de álcool, razão molar óleo:álcool, tipo e quantidade de catalisador e temperatura reacional, sobre a ordem cinética da reação, taxa de reação e energia de ativação.

Atualmente, o *Simulated Annealing* (SA) vem sendo amplamente usado para otimização nas mais diversas áreas do conhecimento. Normalmente, os bioprocessos são altamente não lineares e apresentam múltiplos estados estacionários. Sendo assim, dependendo do método de otimização empregado há a possibilidade do mesmo convergir para um mínimo local. Assim, o emprego do *Simulated Annealing* torna-se interessante, uma vez que ele é um método de convergência global.

## **2.7 Considerações a respeito do estado da arte**

Considerando os aspectos nacionais, as matérias-primas que se destacam para serem utilizadas para produção de biodiesel são o óleo de soja e o etanol, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de etanol e o óleo de soja representa 90% da produção brasileira de óleos vegetais. Diante deste cenário, o uso do óleo de soja para a produção de biodiesel torna-se uma alternativa interessante no contexto nacional atual.

O emprego de enzimas como catalisadores nas reações de produção de biodiesel apresenta uma gama de vantagens em relação aos catalisadores químicos. Diversos pesquisadores relatam o uso de enzimas aplicadas às reações de transesterificação em solventes orgânicos, processo este desvantajoso no que diz respeito ao uso excessivo de solvente.

Os fluidos pressurizados possuem várias vantagens sobre os solventes orgânicos líquidos, como a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas. A maioria dos estudos encontrados na literatura referem-se ao emprego de dióxido de carbono como solvente, que apresenta desvantagens no que se refere à baixa solubilidade de óleos vegetais, suas características hidrofílicas e à perda de atividade de lipases imobilizadas. Como alternativa ao uso de dióxido de carbono, verifica-se, conforme relatado, valores de pressão de transição de fases muito inferiores para o sistema óleo de soja-propano e o incremento de atividade da lipase Novozym 435 quando exposta ao propano. Diante destes aspectos e das características hidrofóbicas do propano é que este fluido é apontado como um solvente de interesse (Dalla Rosa *et al.*, 2008) para as reações que fazem uso de óleos vegetais como substrato e uma lipase comercial como catalisador em sistema batelada, utilizando condições amenas de operação sem penalizar os valores de conversão reportados.

Diante dos estudos mencionados anteriormente sobre modelos encontrados na literatura, no entanto, poucos são os trabalhos que relatam o desenvolvimento da modelagem matemática na transesterificação enzimática para a produção de biodiesel, o que despertou real interesse e motivação para a realização da presente investigação, justificando, desta forma, o direcionamento de esforços nestas linhas.

## 2.8 Referências Bibliográficas

ABIGOR, R.; UADIA, P.; FOGLIA, T., HASS, M.; JONES, K.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J.; BAFOR, M. **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils**. Biochemical Society, v. 28, p. 978-981, 2000.

ALTIN, R.; ÇETINKAYA S.; YUCESU H. S. **The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines**. Energy Conversion and Management, v.42, p.529-538, 2001.

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. **Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase**. Process Biochemistry, v. 42, p. 951-960, 2007.

ANDERSON, E.M.; KARIN, M.; KIRK, O. **One biocatalyst – Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis**. Biocatalysis and Biotransformation, v. 16, p. 181-204, 1998.

CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. **Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and co-solvent**. Fuel, v. 84, p. 347-351, 2005.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. **Structure and conformational Flexibility of *Candida rugosa* lipase**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1441 p. 205-214, 1999.

DAGGETT, V.; SCHRODER, S.; KOLLMAN, P. **Catalytic pathway of serine proteases – classical and quantum mechanical**. Journal of the American Chemical Society v. 23, p. 8926-8935, 1991.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane**. Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 49–53, 2008.

DARNOKO, D.; CHERYAN, M. **Kinetics of palm oil: Trasesterification in a Batch Reactor**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 77, p.1263-1266, 2000.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol**. Energy Conversion and Management, v. 43, p. 2349-2356, 2002.

DORDICK, J.S. **Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents**. Enzyme Microbiology and Technology, v. 11, p. 194-211, 1989.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. **Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 30, p. 125-129, 2004.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. Dissertação de Ms., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

FOGLER, H. SCOTT. **Elements of chemical reaction engineering**. 3º edição, Prentice Hall, New Jersey, 1999.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. **Transesterification kinetics of soybean oil**. J. Am. Oil Chem. Soc., v.63, p. 1375-1380, 1986.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H.Y., **One-pro synthesis and chiral analysis of cyclopropane derivatives**. Chirality, v. 17, p. 1-15, 2005.

HAMMOND, D. A.; KAREL, M. E. KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in supercritical gases**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 11, p. 393, 1985.

HEDSTROM, L. **Serine protease mechanism and specificity**. Chemical Reviews, v. 102, p. 4501-4523, 2002.

ILLANES, A. **Biotecnologia de Enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile, 1994.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. **Lipases for Biotecnology**. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, p. 390-397, 2002.

KING, J.W.; JACKSON, M.A.; TEMELLI, F. **Development of industrially-useful synthetic processes in supercritical carbon dioxide**. Third Italian Conference on I Fluidi Supercritici e Loro Applicazione, v.1, p. 19-26, 1995.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.W. **Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin**. Organic Process Research & Development, v. 6, p. 446 – 451, 2002.

KLIBANOV, A. M. **Improving enzymes by using them in organic solvents**. Nature, v. 409, p. 241-246, 2001.

KLIBANOV, A. M. **Why are enzymes less active in organic solvents than in water?** Trends Biotechnological Science, v. 15, p. 97-101, 1997.

KNEZ, Z.; HABULIN, H. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review**. Journal of Supercritical Fluids, v. 23, p. 29-42, 2001.

KNOTHE, G.; DUNN, R.O.; BAGBY, M.O. **Biodiesel: the use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels**. Oil Chemical Research, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL61604 , 2002.

KRISHNA, S.H. **Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media**. Biotechnol. Adv. v. 20, p. 239-266. 2002.

KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; WENZEL, B. M. **Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel**. Acta Scientiarum. Technology. v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol**. Fuel, v.80, p. 225-231, 2001a.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Kinetics of transesterification in rapeseed oil to Biodiesel fuel as treated in supercritical methanol**. Fuel, v.80, p. 693-698, 2001b.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Methyl Esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol**. Journal of Chemical Engineering of Japan, v.34, p.383-387, 2001c.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Effets of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment**. Bioresource Technology, v.91, p.289-295, 2004.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Two-Step preparation for Catalyst-free biodiesel fuel production**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.113, p.781-791, 2004.

LANZA, M. **Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão**. Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

LOZANO, P.; VÍLLORA, G.; GÓMEZ, D.; GAYO, A.B.; SÁNCHEZ-CONESA, J.A.; RUBIO, M.; IBORRA, J.L. **Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester syntheses in supercritical carbon dioxide**. Journal of Supercritical Fluids, v. 29, p. 121-128, 2004.

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

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. **Biodiesel: Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.32, p.38-46, 2004.

MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. **Synthesis of biodiesel in supercritical fluids**. *Fuel*, v. 83, p. 2029-2033, 2004.

MAMURO, I. A.; CHENB, B.; EGUCHI, M. KUDO, T.; SUREKHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.16, p.53-58, 2001.

MARTINEZ, M.; VICENTE, G.; ARACIL, J.; ESTEBAN, A. **Kinetics of Sunflower oil methanolysis**. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 44, p. 5447-5454, 2005.

MEHER, L.C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S.N., **Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review**, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.10, p. 248–268, 2006.

MESIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Supercritical Biocatalysis**. *Chemical Reviews*, v. 99, n. 2, p. 623-633, 1999.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26° Edição, McGraw-Hill, 2003.

NAKAMURA, K.; CHI, Y.M.; YAMADA, Y.; YANO, T. **Liase activity and stability in supercritical carbon dioxide**. *Chemical Engineering Community*, v. 45, p. 207, 1985.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. **Biotransformação de óleos e gorduras: Utilização de lípases para obtenção de biocombústiveis**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 33, p.27-38, 2004.

NDIAYE, P. M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F. W.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 29-37, 2006a.

NDIAYE, P. M.; LANZA, M.; TAVARES, F.W.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of olive and soybean oils in compressed propane and n-butane**. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n. 03, p. 405-415, 2006b.

NELSON, L.A.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. **Lipase catalyzed production of biodiesel**. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 78, p. 1191-1195, 1996.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. **Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil**. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 769-777, 2005.

NOUREDDINI, H.; ZHU, D. **Kinetics of transesterification of Soybean Oil**. JAOCS, v. 74, p.1457-1461, 1997.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Optimization of alkaline transesterificação of soybean oil and castor oil for biodiesel production**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 553 – 559, 2005.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and in SCCO<sub>2</sub>**. Journal of Supercritical Fluids, v. 19, n. 2, p. 141-148, 2001.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 39, n. 12, p. 4450-4454, 2000.

ÖHRNER, N.; ORRENIUS, C.; MATTSON, A., **Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *candida antarctica* lipase B**. Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p. 328-331, 1996.

OSAKI, M.; BATALHA, M. O. **PRODUÇÃO DE BIODIESEL E ÓLEO VEGETAL NO BRASIL: REALIDADE E DESAFIO**. Anais do XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural – Rio Branco, Acre 20 a 23 de julho de 2008.

PINTO, A. C.; GUARIEIROA, L. L. N.; REZENDEA, M. J. C.; RIBEIROA, N. M.; TORRES, E. A.; LOPESC, W. A.; PEREIRAC, P.A. P.; ANDRADE, J. B. **Biodiesel: An Overview**. Journal Brazilian Chemical Society, v.16, p. 1313-1330, 2005.

PRICE, N. C.; DWEK, R. A.; RATCLIFFE, R.G.; WORMALD, M.R. **Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists**, 3ª Edição, Oxford University Press, 2001.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMIGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 31, p. 27-37, 2003.

RANDOLPH, T.W.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, J.M.; WILKE, C.R. **Enzymatic catalysis in a supercritical fluid**. Biotechnology Letters, v.7, p. 325-328, 1985.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J., **Efficient Heterogeneous Biocatalysts by Entrapment of Lipases in Hydrophobic Sol-Gel Materials**. Angew. Chem. Int. E. v. 34, p. 301-303, 1995.

ROTTICCI, D.; OTTOSSON, J.; NORIN, T., HULT, K. **Enzymes in nonaqueous solvents methods and protocols**. Editado por Halling, P. J., Holland, H.,L. Vulfson, E.N., v. 15, p. 261-276, 2001.

SANTOS, J.R.; PAGAN, E.V.; COSTA FILHO, E.H.; FERREIRA, A.L.O.; **Modelo cinético da produção de biodiesel por rota enzimática utilizando lipase imobilizada**. Anais do XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA e IV

CONGRESSO BRASILEIRO DE TERMODINÂMICA APLICADA, 14 a 17 de setembro de 2008, Recife, Pernambuco.

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

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.

SMITH, J.M.; VAN NESS, H.C.; ABBOTT, M.M. **Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics**. 7ª Edição, McGraw – Hill International Edition 2005.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. **Triglycerides-based diesel fuels**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 4, p. 111-133, 2000.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. **The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica***. *Structure*, v. 2, p. 293-308, 1994.

XU, Y., DU, W., LIU, D. **Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with acetate as the acyl acceptor**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, p. 241-245, 2005.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, N. **Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, p. 29-32, 2006.

WARSHEL, A.; NARAYSZABO, G.; SUSSMAN, F. **How do serine proteases really work**. *Biochemistry*, v. 28, p. 3629-3637, 1989.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y. SUGIHARA A.; TOMINAGA, Y. **Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor**. *Journal of American Oil Chemists Society*, v. 78, p. 703-707, 2001.

[www.abiove.com.br](http://www.abiove.com.br) – Acessado em Novembro de 2009.

[www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br) – Acessado em Novembro de 2009.

[www.conab.com.br](http://www.conab.com.br) – Acessado em Novembro de 2009.

[www.ifp.com](http://www.ifp.com) - Acessado em Novembro de 2009.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e os métodos empregados no desenvolvimento das etapas deste trabalho. Após exposição das características dos materiais utilizados, serão apresentados os métodos e equipamentos empregados para a medida da atividade das enzimas, reação à alta pressão, cálculos dos teores em ésteres etílicos, triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos e a modelagem cinética da reação.

#### 3.1. Especificação dos materiais

Para a realização das reações foi utilizado óleo de soja refinado comercial marca Soya, álcool etílico Merck (99,9% de pureza), lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435 Novozymes S.A, Araucária, PR, Brasil) imobilizada em resina acrílica macroporosa, a qual atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo.

O solvente utilizado foi propano de procedência White Martins S.A. (com 99,5% pureza, fase líquida). As propriedades críticas do solvente utilizado, segundo Reid *et al.* (1997), são: pressão crítica = 42,49 bar, temperatura crítica = 96,6 °C e densidade crítica = 0,22 g/cm<sup>3</sup>.

As análises cromatográficas das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *on-column* e detector de ionização de chama (FID). As condições de operação foram segundo as Normas nº 14103 e 14105, do Comitê Europeu para Padronizações.

#### 3.2. Equipamentos e Metodologia

A seguir são apresentados os equipamentos utilizados para a obtenção dos dados experimentais e suas relativas metodologias de trabalho.

##### 3.2.1. Determinação da atividade enzimática das lipases

O procedimento adotado para determinação da atividade enzimática da Novozym 435 foi aquele descrito por Feirhmann (2006). A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido

láurico e glicerol com razão molar ácido: álcool de 3:1, à temperatura de 60°C, com a enzima a 5% (m/m) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional em um reator de vidro aberto de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (Figura 3.1). Alíquotas de 150 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação, foram diluídas em 20 mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e de extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A equação empregada para o cálculo da atividade da lipase é apresentada abaixo:

$$Atividade (U / g) = \frac{[(V_{NaOH}^0) - (V_{NaOH}^{40})] \times N \times 10^3}{t \times ma} \quad (3.1)$$

onde: N = normalidade da solução de NaOH;

$V_{NaOH}^0$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

$V_{NaOH}^{40}$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra após 40 minutos de reação (mL);

ma = massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min);

1 U = 1 µmol de ácido/min.

A atividade da enzima foi determinada no início e ao final das reações nos experimentos realizados, objetivando o acompanhamento da alteração da atividade da Novozym 435 durante a reação de transesterificação do óleo de soja em propano pressurizado.

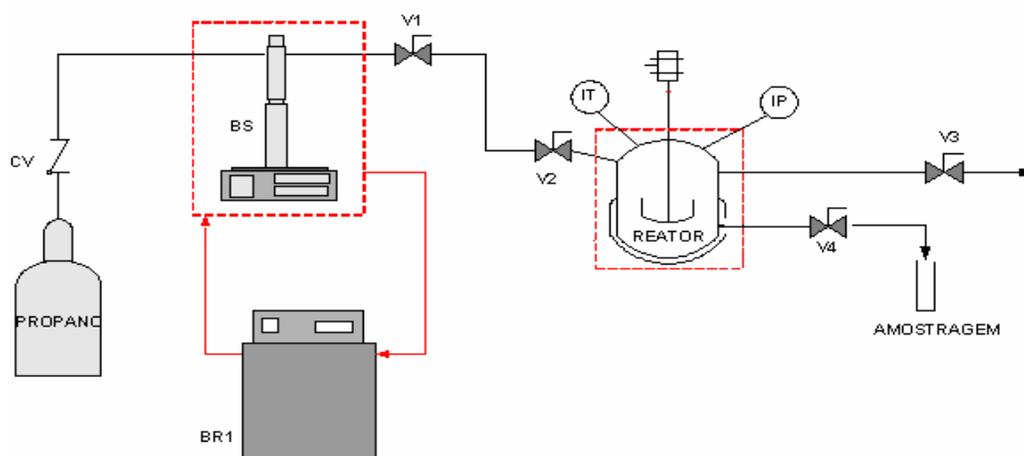


**FIGURA 3.1** – Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática.

### **3.2.2. Reações em propano pressurizado**

Duas unidades experimentais foram utilizadas para a produção de biodiesel etílico de óleo de soja com a Novozym 435 em propano pressurizado.

A primeira unidade utilizada consiste basicamente de um reator de aço inox com capacidade de 100 mL (Parr modelo 4593). O reator possui sistema de agitação mecânica, uma manta de aquecimento externa ao reator, um cilindro de propano e uma bomba de alta pressão (ISCO, modelo 260 D) de acordo com informações do fabricante o equipamento é projetado para operar em até 200 bar. Um banho termostático foi acoplado à bomba de seringa para manter constante a temperatura de alimentação do propano, permitindo assim, computar a massa de solvente adicionada ao reator. Válvulas de esfera, de agulha e de uma via (*check-valves*), além de indicadores de temperatura e de pressão completaram a unidade experimental. A Figura 3.2 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental da unidade 1. Uma vista geral da unidade pode ser visualizada na Figura 3.3 e detalhes da unidade experimental 1 a respeito do sistema de amostragem e manta de aquecimento do reator para controle da temperatura podem ser visualizados na Figura 3.4.



**FIGURA 3.2**– Diagrama esquemático do aparato experimental da unidade 1: cilindro de propano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1) banho termostático, (V1) válvula de segurança para a bomba, (V2) válvula de alimentação do reator, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (V3) válvula de alívio, (V4) válvula de amostragem.



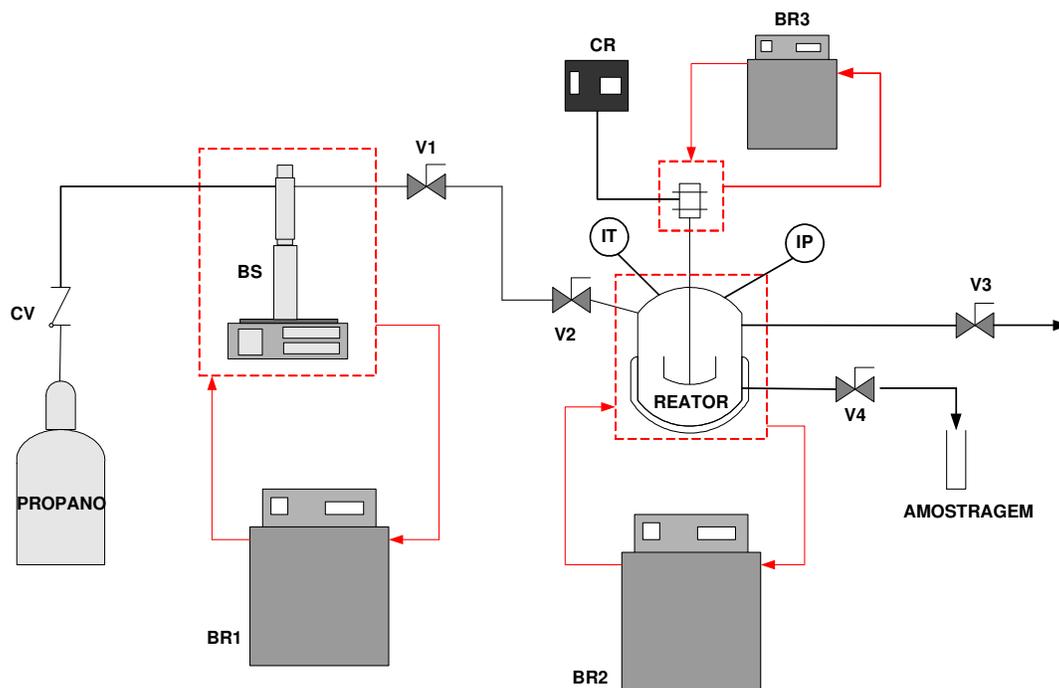
**FIGURA 3.3**– Vista geral da unidade experimental 1 para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.



**FIGURA 3.4** – Vista do Reator (Parr) utilizado para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.

A segunda unidade experimental utilizada para produção de biodiesel etílico a partir de óleo de soja com a Novozym 435 e propano pressurizado consiste basicamente de um reator de aço inox de 300 mL (Autoclave Engineers, modelo A303060B86000), um cilindro de propano e uma bomba de alta pressão (ISCO, modelo 260 D), unidade similar aquela utilizada por Dalla Rosa *et al.* (2008). O reator possui sistema de agitação mecânica e uma serpentina interna para controle da temperatura. De acordo com informação do fabricante, o equipamento é projetado para operar em pressões de até 400 bar. Três banhos termostáticos foram acoplados à unidade experimental, um sendo empregado no sistema de agitação do reator, o qual era mantido a 10°C para evitar o aquecimento de tal sistema. Um segundo banho foi conectado à serpentina interna do reator para controlar a temperatura da reação, enquanto que o terceiro banho foi acoplado à bomba de seringa para manter constante a temperatura de alimentação do propano, permitindo assim, computar a massa de solvente adicionada ao reator. Válvulas de esfera, de agulha e de uma via (*check-valves*), além de indicadores de temperatura e de pressão completaram a unidade experimental. A Figura 3.5 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental 2, e a Figura 3.6 apresenta uma vista geral da unidade. Detalhes da unidade experimental 2 a respeito do sistema de

amostragem, serpentina interna do reator para controle da temperatura podem ser visualizados na Figura 3.7, enquanto que detalhes da unidade experimental a respeito do sistema de amostragem, serpentina interna do reator para controle da temperatura, bem como uma vista geral da unidade podem ser visualizados na Figura 3.8.



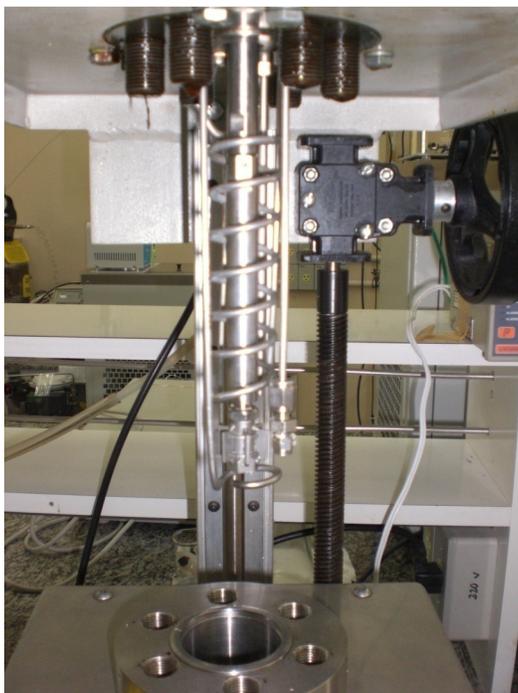
**FIGURA 3.5** – Diagrama esquemático do aparato experimental da unidade 2: cilindro de propano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1, BR2 e BR3) banhos termostáticos, (V1) válvula de segurança para a bomba, (V2) válvula de alimentação do reator, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (CR) comando do controle de agitação, (V3) válvula de alívio, (V4) válvula de amostragem.



**FIGURA 3.6** – Vista geral da unidade experimental 2 para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.



**FIGURA 3.7** – Vista do Reator (Autoclave Engineers) utilizado para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.



**FIGURA 3.8** – Vista do sistema de agitação do Reator (Autoclave Engineers) utilizado para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado.

O procedimento experimental desenvolveu-se nas seguintes etapas: primeiramente o banho BR1, conectado à bomba de alta pressão (BS), era acionado na temperatura de 5°C. Após o banho termostático (BR1) atingir a temperatura estabelecida, a “check valve” (CV) conectada ao cilindro de propano era aberta e adicionava-se uma carga deste solvente na bomba (BS), a fim de que o propano estivesse liquefeito. Este procedimento demorava em torno de 2 horas. Checavam-se as válvulas V1, V2, V3 e V4 para que estivessem fechadas, impedindo a passagem de gás para a linha. O banho termostático BR2 conectado à serpentina do reator e o banho termostático BR3 conectado ao sistema de agitação eram ligados.

As quantidades de enzima, etanol e óleo de soja pré determinadas eram pesadas e adicionadas ao reator. A enzima era adicionada ao sistema por último e após sua adição o sistema era imediatamente fechado e pressurizado. A válvula V1 era então aberta e a linha era pressurizada na condição de pressão estabelecida para o experimento até a válvula V2. Após atingir a pressão desejada, anotava-se o volume de propano da bomba, para o controle de volume que era adicionado no reator. A válvula V2 era então aberta com fluxo constante de 20 mL/min. Após atingir a pressão desejada, o volume de propano adicionado era computado pelo decaimento do volume de solvente na bomba

de seringa, com os valores conhecidos da pressão e temperatura do propano na bomba, a densidade do solvente foi calculada usando a correlação com HBT (P-V-T) (Reid *et al.*, 1987), sendo possível estimar a massa de solvente carregada no reator. O procedimento para preencher o reator com solvente e pressurizar o sistema decorria em média de 5 minutos. O sistema de agitação (CR) era acionado, anotava-se o início do tempo reacional, quando se promovia a interação do solvente com o substrato, propiciando as condições para que a reação tivesse início. Monitorava-se constantemente o fluxo da bomba (BS), a pressão (IP) e a temperatura (IT) do sistema.

Depois de cumprido o tempo estabelecido para amostragem, amostras eram retiradas através da válvula V4 e recebidas em frascos previamente pesados de 12 mL, levadas à balança (Gilbertini E154) e devidamente pesadas, após o etanol presente na amostra era colocado em nitrogênio para sua evaporação. O frasco era fechado, vedado e levado ao refrigerador para posterior análise cromatográfica. Ao final do tempo de reação, o sistema era despressurizado manualmente através da válvula de alívio V3. O sistema demandava em média 2 horas para sua total despressurização. O sistema era aberto e o vaso do reator desconectado do mesmo. O conteúdo do reator era filtrado com o auxílio de n-hexano, a fim de reter a enzima utilizada na reação. O procedimento experimental utilizado para realizar as reações na unidade 1 é muito similar aos realizados na unidade 2, exceto o fato da unidade 1 possuir apenas 1 banho termostático, como mencionado anteriormente na descrição das unidades experimentais.

### 3.3. Método para determinação de ésteres

O Apêndice A apresenta detalhes de todo o procedimento cromatográfico e, neste sentido, no corpo do texto somente as etapas principais serão apresentadas. Os compostos foram quantificados seguindo a norma UNE-EN 14105 (2003).

Após a coleta de 1 à 2 gramas de amostra (quantidade que foi sendo padronizada em aproximadamente 1 grama no decorrer dos experimentos, conforme adquiria-se precisão no manuseio da válvula de amostragem) em frasco de 12 mL, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, evaporou-se o etanol em nitrogênio até peso constante.

A solução era então injetada em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama Shimadzu CG – 2010, equipado com FID e coluna capilar Rtx – WAX de 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno. O programa de

temperaturas se inicia em 50°C com rampa de aquecimento de 15°C/min até temperatura de 280°C.

O resultado final da concentração dos ésteres é expresso em ppm ou mg/L. Os cálculos pertinentes para se obter o teor dos ésteres produzidos são apresentados em detalhes no Apêndice A.

### 3.4. Método para determinação de mono-, di- e triglicerídeos

Os compostos foram quantificados seguindo a norma UNE-EN 14105. Em cada solução de calibração foi adicionado 100 µL do derivatizante MSTFA, após a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 minutos para que o derivatizante reagisse. Em seguida, completou-se o volume (10 mL) com n-heptano. As soluções foram transferidas para os frascos de amostragem e levadas ao GC-FID para análise. As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *e on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (J e W Scientific, nº de série: US7162944H), de 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm.

### 3.5. Condições experimentais testadas

Oliveira e Oliveira (2001) realizaram a alcoólise do óleo de dendê em dióxido de carbono supercrítico, utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme IM como catalisadores e observaram resultados superiores utilizando-se a lipase Novozym 435. Feihmann *et al.* (2006), ao avaliar o comportamento da atividade destas duas lipases em propano comprimido, também observaram que a Novozym 435 apresentou desempenho superior do que a Lipozyme IM. Dalla Rosa *et al.* (2008), utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme IM na produção de ésteres etílicos em propano pressurizado, observou que a lipase Novozym 435 alcançou um desempenho superior ao da Lipozyme IM. Conforme os trabalhos mencionados anteriormente para o desenvolvimento deste trabalho empregou-se a lipase Novozym 435.

Conforme Ndiaye *et al.* (2006) e Dalla Rosa *et al.* (2008), o comportamento do sistema óleo de soja – propano, nas faixas de pressão e temperatura investigados, apresenta-se em uma única fase. Dentro da faixa experimental deste trabalho o propano encontra-se como líquido comprimido e, neste sentido, apresenta pouca variação de

densidade. Conseqüentemente, a pressão apresenta pouca influência sobre as conversões já que as propriedades do solvente variam pouco.

Em relação à temperatura, a faixa ótima de operação da Novozym 435 na reação padrão para medida da atividade situava-se em torno de 70°C. Dalla Rosa (2006), em seus testes preliminares, verificou que temperaturas de 70°C ou superiores levavam à dificuldades na manipulação da válvula de amostragem do sistema. Assim sendo, optou-se por fixar o nível superior da temperatura em 70°C. Oliveira e Oliveira (2001) avaliaram o efeito da razão molar óleo:etanol e da quantidade de enzima sobre a transesterificação de óleo de dendê e constataram que ambas as variáveis foram significativas na conversão da reação. A Tabela 3.1 apresenta as variáveis e condições estudadas no presente trabalho.

**TABELA 3.1**– Variáveis estudadas na avaliação da cinética da reação.

<b>Experimento</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Concentração [E] % (m/m)</b>	<b>Razão O/E (mol/mol)</b>
1	45	20	1:6
2	55	20	1:6
3	65	20	1:6
4	70	20	1:6
5	65	1	1:6
6	65	5	1:6
7	65	10	1:6
8	65	20	1:3
9	65	20	1:9
10	65	20	1:15

Neste sentido, o intervalo de estudo das variáveis foi assim definido no presente trabalho: temperatura de 45°C à 70°C, pressão de 50 bar, razão molar óleo:etanol de 1:3 à 1:15, razão mássica de solvente/substrato de 2:1, concentração de enzima de 1% à 20% (m/m). A agitação, após testes preliminares, foi mantida fixa em 1000 rpm. Para

todas as condições experimentais foram retiradas amostras nos intervalos de 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos a fim de avaliar a cinética da reação.

### 3.6. Modelagem Matemática

Para a representação dos dados cinéticos experimentais, um modelo semi-empírico baseado em equações de balanço de massa foi proposto. A modelagem foi conduzida através das taxas de estimação das constantes das reações simultâneas que ocorrem. A reação de transesterificação global pode ser apresentada como:



A reação global ocorre em três etapas que se sucedem: na primeira etapa (Equação 3.3), a transferência de um ácido graxo (FA) para triglicerídeo (TAG) para etanol (EtOH) formando diglicerídeo (DAG) e Biodiesel (FAEE). Na segunda etapa (Equação 3.4), monoglicerídeos (MAG) e Biodiesel (FAEE) são formados por transferência de um ácido graxo (FA) para DAG para etanol. Na terceira etapa (Equação 3.5), FAEE e glicerol (GLY) são formados por transferência de um FA para MAG para etanol.



Admitindo que as Equações (3.3 e 3.4) são reversíveis,  $k_{1-6}$  representam a taxa para cada etapa. Além disso, admitiu-se que os grupos acil disponíveis estão randomicamente distribuídos entre as misturas de TAG, DAG e MAG. Em tese a água não participa destas reações e a concentração de etanol pode ser considerada constante porque foi usado excesso em relação à estequiometria em todos os experimentos. Considerando as etapas da reação descritas nas Equações (3.3 e 3.4) a taxa de mudança na concentração para cada componente da reação pode ser descrito pelas seguintes equações diferenciais:

$$\frac{dTAG}{dt} = -k_1 \cdot TAG \cdot EtOH + k_2 \cdot DAG \cdot FAEE \quad (3.6)$$

$$\frac{dDAG}{dt} = k_1 \cdot TAG \cdot EtOH - k_2 \cdot DAG \cdot FAEE - k_3 \cdot DAG \cdot EtOH + k_4 \cdot MAG \cdot FAEE \quad (3.7)$$

$$\frac{dMAG}{dt} = k_3 \cdot DAG \cdot EtOH - k_4 \cdot MAG \cdot FAEE - k_5 \cdot MAG \cdot EtOH + k_6 \cdot GLY \cdot FAEE \quad (3.8)$$

$$\frac{dFAEE}{dt} = k_1 \cdot TAG \cdot EtOH - k_2 \cdot DAG \cdot FAEE + k_3 \cdot DAG \cdot EtOH - k_4 \cdot MAG \cdot FAEE + k_5 \cdot MAG \cdot EtOH - k_6 \cdot GLY \cdot FAEE \quad (3.9)$$

Os parâmetros cinéticos (Equações 3.6 à 3.9) foram considerados proporcionais à concentração de enzima (Atividade da Lipase), conforme  $k_i = k_i^* \cdot A_T$ , ( $i = 1, \dots, 6$ ), onde  $A_T$  representa o total da atividade enzimática (U). Os parâmetros cinéticos,  $k_{0i}$  e  $Ea_i/R$ , foram estimados através da equação de Arrhenius reparametrizada, apresentada por Schwaab e Pinto, (2007).

$$k_i^* = k_{i,T_{ref}} \cdot \exp \left[ -\frac{Ea_i}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (3.10)$$

onde,

$$k_{i,T_{ref}} = k_{i,0} \cdot \exp \left[ -\frac{Ea_i}{R} \cdot \frac{1}{T_{ref}} \right] \quad (3.11)$$

Como temperatura de referência foi utilizado 333.15K ( $T_{ref}$ ) e  $R$  é a constante universal dos gases.

Os parâmetros do modelo (Equações 3.3 à 3.9),  $k_0$  e  $Ea$ , foram estimados através da minimização da seguinte função objetivo (f):

$$f = \sum_j^{NOBS} \sum_k^{NVAR} (C_{jk}^{exp} - C_{jk}^{calc}) \quad (3.12)$$

onde  $C^{exp}$  e  $C^{calc}$  referem-se aos valores experimentais e calculados dos teores de TAG, DAG, MAG e FAEE (base livre de solvente), respectivamente, NOBS representa o número de dados experimentais e NVAR é o número de variáveis consideradas no

modelo. Um código computacional em linguagem Fortran foi desenvolvido e implementado para a estimação dos parâmetros, utilizando o algoritmo *Simulated Annealing*, minimizando os desvios do modelo para os dados experimentais. As equações diferenciais de balanço (Equações 3.6 à 3.9) foram numericamente resolvidas usando o algoritmo *LIMEX* (Deuffhard *et al.*, 1987).

Na versão do algoritmo de Simulated Annealing utilizada, um novo vetor  $\mathbf{x}^{-k+1}$  é aleatoriamente gerado a partir do estado inicial  $\mathbf{x}^{k=0}$ , de acordo com a equação abaixo (Faber *et al.*, 2005):

$$x_i^{-k+1} = x_i^k + r\Delta x^l \quad \text{para } i = 1, \dots, n \text{ e } r \in [-1, 1] \quad (3.13)$$

onde  $x_i^{-k+1}$  é um possível valor para  $x_i^{k+1}$ ,  $r$  é um número aleatoriamente escolhido e  $\Delta x^l$  é o incremento atual de  $\mathbf{x}$ . Se  $\varphi(\mathbf{x}^{-k+1}) \leq \varphi(\mathbf{x})$ , então o novo estado é incondicionalmente aceito, ou seja,  $\mathbf{x}^{-k+1} = \mathbf{x}^{k+1} = \mathbf{x}^{-opt}$ ; do contrário, a probabilidade de que esse estado seja aceito é determinada pelo critério de Metropolis:

$$\text{Pr} = \exp\left(-\frac{\varphi(\mathbf{x}^{-k+1}) - \varphi(\mathbf{x}^k)}{k_B T_A^m}\right) \quad (3.14)$$

onde  $T_A^m$  é a temperatura atual de *annealing*. A convergência do problema de otimização é avaliada pela diferença entre  $\varphi(\mathbf{x})$  para as últimas  $N_\epsilon$  iterações e o atual  $\varphi(\mathbf{x}^{-opt})$ , isto é:

$$|\varphi(\mathbf{x}^{-k-i}) - \varphi(\mathbf{x}^{-opt})| \leq \epsilon \quad \text{para } i = 0, \dots, N_\epsilon - 1 \quad (3.15)$$

onde  $\epsilon$  é o parâmetro de convergência especificado. A redução do valor de  $\Delta x^l$  é controlada pela frequência de aceitações ou rejeições dos estados produzidos e visa a permitir uma exploração mais minuciosa do espaço-solução do problema em torno de  $\mathbf{x}$ . O progressivo decréscimo da temperatura de *annealing* após certo número de iterações, por sua vez, reduz a probabilidade de que um estado de maior conteúdo energético seja selecionado; como sugerem Faber *et al.* (2005), pode-se fazer:

$$T_A^{m+1} = \alpha T_A^m \quad \text{com } 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (3.16)$$

onde  $\alpha$  é um fator, admitido, constante.

A eficiência computacional do algoritmo de otimização é dependente da escolha correta dos seus parâmetros internos. No caso do *Simulated Annealing* usado neste trabalho os parâmetros internos ajustáveis são a temperatura inicial do resfriamento ( $T_A$ ) e a taxa de resfriamento ( $\alpha$ ). Após testes preliminares foi definido que a temperatura inicial de resfriamento era 10°C e a taxa de decaimento da temperatura foi de 0,99.

### 3.7. Referências Bibliográficas

DALLA ROSA, C.. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja utilizando lipase em propano**. Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2006.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 49–53, 2008.

DEUFLHARD, E.; HAIRER, E.; ZUGCK J. **One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems**. *Numer Math* v. 51, p. 501-516, 1987.

FABER, R.; JOCKENHOVEL, T.; TSATSARONIS, G. **Dynamic optimization with simulated annealing**. *Computers & Chemical Engineering*, v. 29, p. 273-290, 2005.

FEIHRMANN, A. F.; OLIVEIRA, D.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. *Journal of Supercritical Fluids*, in press, 2006.

NDIAYE, P. M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F. W.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 29-37, 2006.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 141-148, 2001.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. **The Properties of Gases and Liquids**. McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 1987.

PRESS, V.W.; TEUKOLSKY, S.A.; VETTERLING, W.T.; FLANNERY, B.P. **Numerical Recipes in FORTRAN**, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press (1992).

SCHWAAB, M.; PINTO, J.C. **Optimum reference temperature for the reparameterization of the Arrhenius equation**. *Chem. Eng. Sci.*, v. 62, p. 2750-2764, 2007.

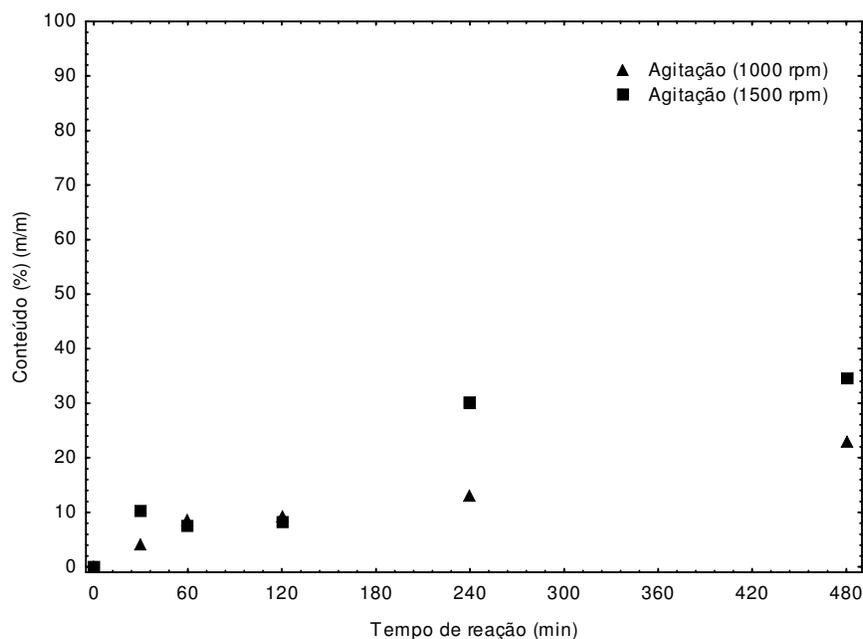
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer do trabalho. Os resultados obtidos em termos do teor de TAG, DAG, MAG e FAEE serão reportados sempre em termos percentuais. Detalhes acerca dos cálculos de concentração e alguns cromatogramas podem ser encontrados no Apêndice A. Com o intuito de solucionar problemas de quantidade de reagentes, foram realizados alguns testes preliminares em um reator da marca Parr, conforme descrito a seguir.

### 4.1. Testes Preliminares para avaliação do nível de agitação e sistema de amostragem do reator Parr

Segundo Dalla Rosa (2006), em função da baixa solubilidade do glicerol no sistema reacional em questão no presente trabalho, a agitação é uma variável importante a ser avaliada, pois a mesma pode promover uma melhor homogeneização do meio durante a reação, minimizando a separação de fases e permitindo o adequado contato enzima/substratos. Da mesma forma, a agitação pode também influenciar diretamente a amostragem do sistema reacional. A fim de verificar a influência desta variável, foram realizados dois testes experimentais. Primeiramente, foi realizado um teste no reator da marca Parr, com capacidade para 100 mL, para a verificação do sistema de agitação do mesmo. Os testes consistiram na realização de experimento proposto por Dalla Rosa (2008) nas seguintes condições experimentais: razão solvente/substrato 2:1, razão molar óleo/etanol 1:6, concentração de enzima 5% (m/m) e temperatura de 65°C, nos tempos de 0,5; 1; 2; 4 e 8 horas. A agitação foi testada nos valores de 1000 rpm e 1500 rpm, sendo realizada amostragem destrutiva do experimento, ou seja, a cada tempo de amostragem a reação era interrompida, realizava-se a despressurização do sistema, a qual demandava em torno de 45 minutos. Após esta etapa, o meio reacional era retirado e colocado em um frasco, previamente pesado. Posteriormente era mensurada a sua massa em uma balança (Gilbertini – E154), o frasco era então fechado e vedado e armazenado em refrigerador para posterior análise por cromatografia para quantificação dos ésteres. A enzima era filtrada com o auxílio de n-hexano, e então armazenada em um frasco devidamente lacrado e armazenado em refrigerador para posterior medida de sua atividade.

A massa de amostra retirada foi de aproximadamente 8 g em frasco de 12 mL. Este teste foi realizado em duplicata para cada agitação. A Figura 4.1 apresenta os resultados da análise cromatográfica referente ao teor de ésteres de óleo de soja para as duas agitações testadas.

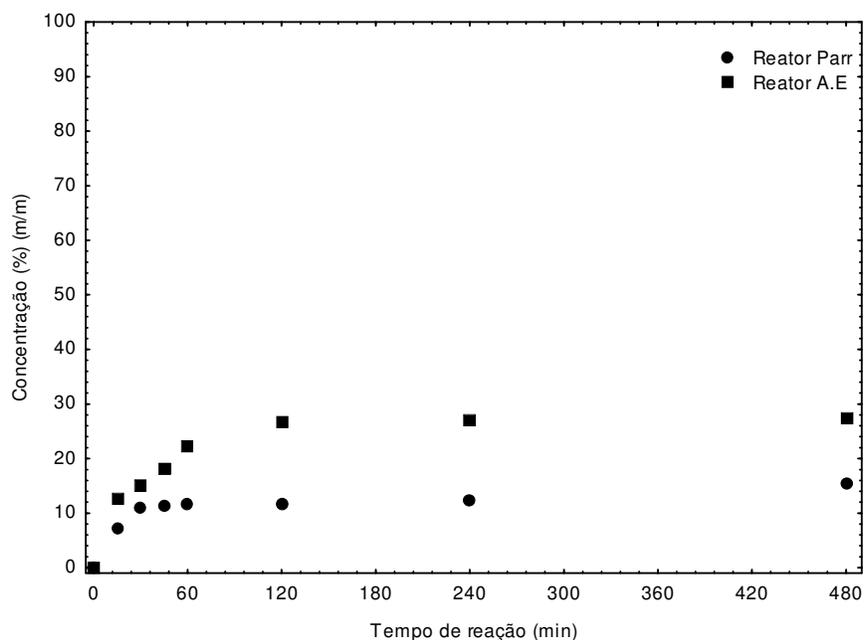


**FIGURA 4.1** – Comparação das agitações testadas no reator Parr.

A partir da Figura 4.1 pode ser observado que para curtos períodos de tempo não observou-se uma diferença no teor de ésteres obtidos com ambas as agitações, mas com aproximadamente 240 minutos de reação, observa-se praticamente o dobro de teor de ésteres quando a agitação de 1500 rpm foi empregada. Para a agitação de 1000 rpm ao fim do tempo de reação encontrou-se uma diferença de cerca de 10% em relação ao teor de ésteres etílicos, sendo assim pode-se verificar que a agitação de 1500 rpm mostrou-se mais adequada, quando da consecução do experimento no reator Parr. Uma possível explicação para este fato poderia ser a formação de agregados e uma não distribuição homogênea da enzima devido ao sistema de agitação do reator. As moléculas de enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa dentro da partícula do biocatalisador pode drasticamente limitar a concentração de substrato no interior da partícula (Karra-Châabouni *et al.*,2006).

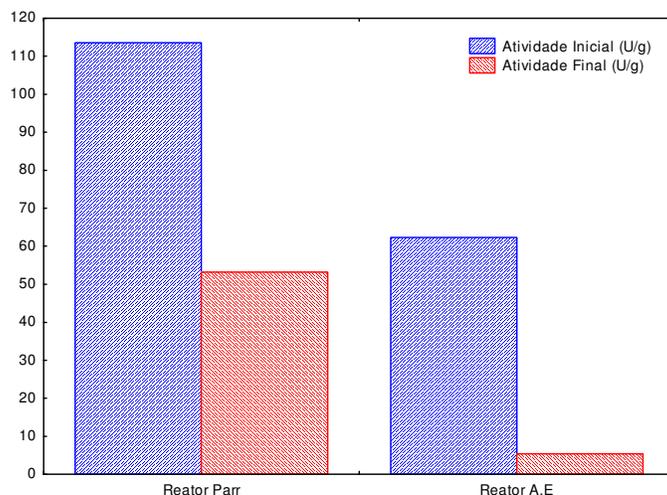
Tendo em vista os relativos baixos teores em biodiesel obtidas no teste anterior, um novo teste com a utilização de dois reatores, um da marca Parr e outro da marca Autoclave Engineers foi proposto. O objetivo foi obter uma comparação entre ambos em relação ao teor de ésteres etílicos de óleo de soja. O experimento seguiu a metodologia descrita por Dalla Rosa *et al.* (2008), na qual a amostragem foi realizada por um tubo pescador interno, a esse tubo foi acoplada uma conexão com filtro metálico, a fim de manter a enzima no meio reacional. A avaliação deste sistema foi visual, tendo observado que o mesmo resistiu aos testes preliminares de agitação, impedindo a passagem da enzima durante a amostragem. As condições experimentais foram as seguintes: razão mássica solvente/substrato 2:1, razão molar óleo/etanol 1:6, concentração de enzima 5% (m/m) e temperatura de 65°C, alíquotas foram retiradas nos tempos de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4 e 8 horas. É importante salientar que no decorrer deste experimento foram utilizados dois lotes diferentes da enzima Novozym 435, a qual acarretou uma diferença significativa de atividade inicial e final da enzima no experimento.

A massa de amostra retirada foi de aproximadamente 1 g em frasco de 12 mL. A Figura 4.2 apresenta os resultados da cinética do experimento para os reatores estudados.



**FIGURA 4.2** – Rendimento em ésteres etílicos de óleo de soja e etanol em propano pressurizado: Reator Parr versus reator Autoclave Engineers.

Na Figura 4.2 pode-se observar que o reator Autoclave Engineers conduziu a melhores rendimentos, em termos de ésteres etílicos de soja durante o tempo reacional, salientando que o experimento no reator Autoclave Engineers foi conduzido com uma atividade enzimática de aproximadamente de 62 U/g e o experimento no reator Parr a enzima possuía uma atividade de aproximadamente de 113 U/g, evidenciando assim as características de configuração do reator Autoclave Engineers. A Figura 4.3, mostra a diferença na atividade enzimática entre os experimentos realizados nos reatores estudados na fase preliminar com diferentes lotes da enzima Novozym 435.



**FIGURA 4.3** – Comparação da atividade enzimática entre os reatores em estudo.

Observa-se na Figura 4.3 que a atividade enzimática entre ambos os reatores difere entre si. Como mencionado anteriormente, estes experimentos foram conduzidos com diferentes lotes de enzimas, o lote que foi utilizado no experimento do reator Parr possuía uma atividade enzimática inicial de aproximadamente 113,52 U/g e ao final do experimento sua atividade foi de 53,14 U/g. No experimento com o reator Autoclave Engineers a atividade inicial do lote era de 62,28 U/g e ao final foi de 5,35 U/g. Realizando o cálculo para mensurar a atividade residual da enzima em cada experimento tem-se:

- $AR = \text{Atividade residual } (Af/Ai) \cdot 100\%$ ;

Onde:

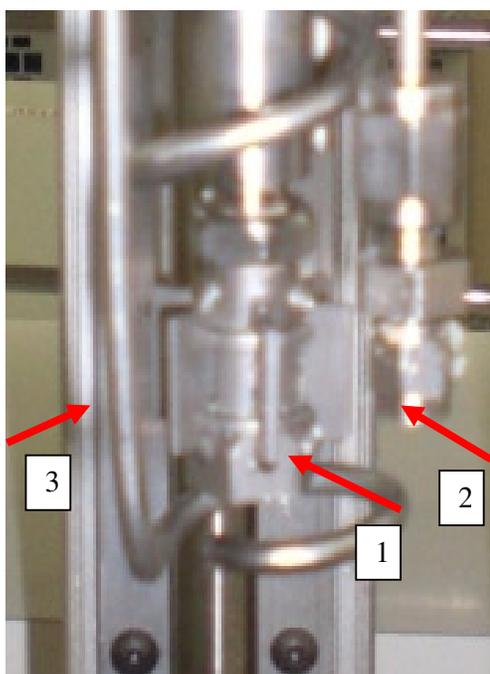
Af – Atividade final enzimática;

Ai – Atividade inicial enzimática;

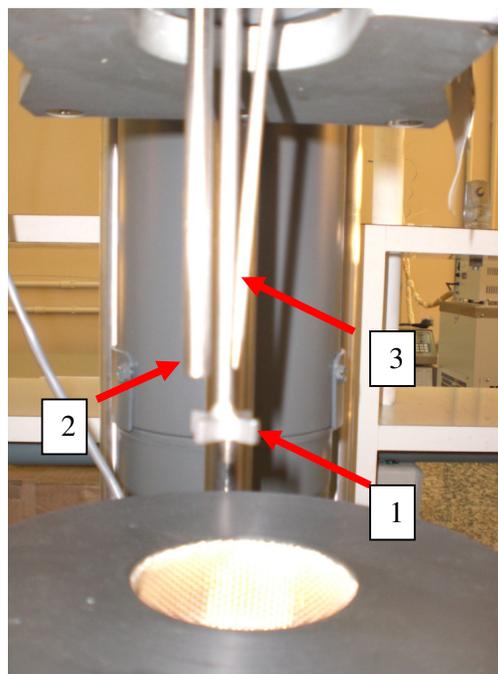
- Reator Parr = 46,81 % atividade residual;
- Reator AutoClave Engineers = 8,6% atividade residual.

A Figura 4.4 mostra que o sistema de agitação do reator Autoclave Engineers é mais completo, ou seja, além de possuir um sistema de hélices com uma altura maior, que proporciona um maior contato com o meio reacional, também é disponibilizado um sistema de chicanas que envolvem a parte anterior do sistema de agitação. A função das chicanas é auxiliar o sistema de agitação para promover uma melhor mistura do meio

reacional, promovem também uma maior turbulência no sistema e evitar a formação de vortex. É importante também salientar o fato de o encaixe do reator com o sistema de agitação ser mais preciso, sendo praticamente o diâmetro do reator todo ocupado pelo sistema de agitação, o que ajuda numa maior eficiência do sistema. Em contrapartida, o sistema de agitação do reator Parr é mais simples, suas hélices são relativamente pequenas, o mesmo não possui sistema com chicanas e o diâmetro do reator é grande em comparação com o sistema de agitação proporcionado pelo equipamento, ou seja, seu interior é menos completo, o que pode vir a acarretar em partes do meio reacional que não são misturados com eficiência. No sistema reacional sob investigação, cabe frisar, a baixa eficiência de agitação poderá promover uma insatisfatória interação entre o solvente, os substratos e a enzima.



**FIGURA 4.4 – (A)** Sistema de agitação do reator AutoClave Engineers, os números indicam, (1) – Sistema de agitação, (2) Tubo pescador, (3) Chicanas.



**FIGURA 4.4 – (B)** Sistema de agitação do reator Parr, os números indicam, (1) – Sistema de agitação, (2) Tubo pescador, (3) Termopar.

Foi reportado no início do capítulo que o propósito deste estudo era realizar os experimentos no reator Parr, por ser um reator menor e por conseqüência demandar menores quantidades de reagentes para a consecução dos experimentos, mas, como demonstrado anteriormente o teor de ésteres etílicos do óleo de soja foram mais baixas do que no reator Autoclave Engineers. Optou-se, então por dar continuidade ao presente estudo utilizando este último reator.

## **4.2. Efeito das variáveis de processo sobre a transesterificação de óleo de soja em propano pressurizado**

Nesta etapa do presente trabalho foram avaliadas algumas variáveis que afetam o processo sobre a transesterificação de óleo de soja em propano pressurizado.

### **4.2.1. Temperatura**

Para avaliar o efeito da temperatura, as demais variáveis foram fixadas, como descrito anteriormente: relação mássica de solvente:substrato de 2:1, pressão de 50 bar e razão molar óleo:etanol de 1:6. O tempo de reação foi definido em 8 horas, com amostragens nos tempos de 0,25, 0,5, 0,75 1, 2, 4, 6 e 8 horas de reação. Cabe salientar que devido ao lote da enzima apresentar atividade inicial de 63 U/g os experimentos foram conduzidos com a concentração de enzima de 20% (m/m). A Tabela 4.1 apresenta os resultados do teor em ésteres em cada condição experimental para as diferentes temperaturas estudadas. A Figura 4.5 apresenta os resultados dos teores de TAG, DAG, MAG e FAEE, em função da temperatura. A Tabela 4.1 apresenta os resultados do teor em ésteres em cada condição experimental para as diferentes temperaturas estudadas.

**TABELA 4.1** – Resultados experimentais do teor em ésteres % (m/m), avaliando-se o efeito da temperatura.

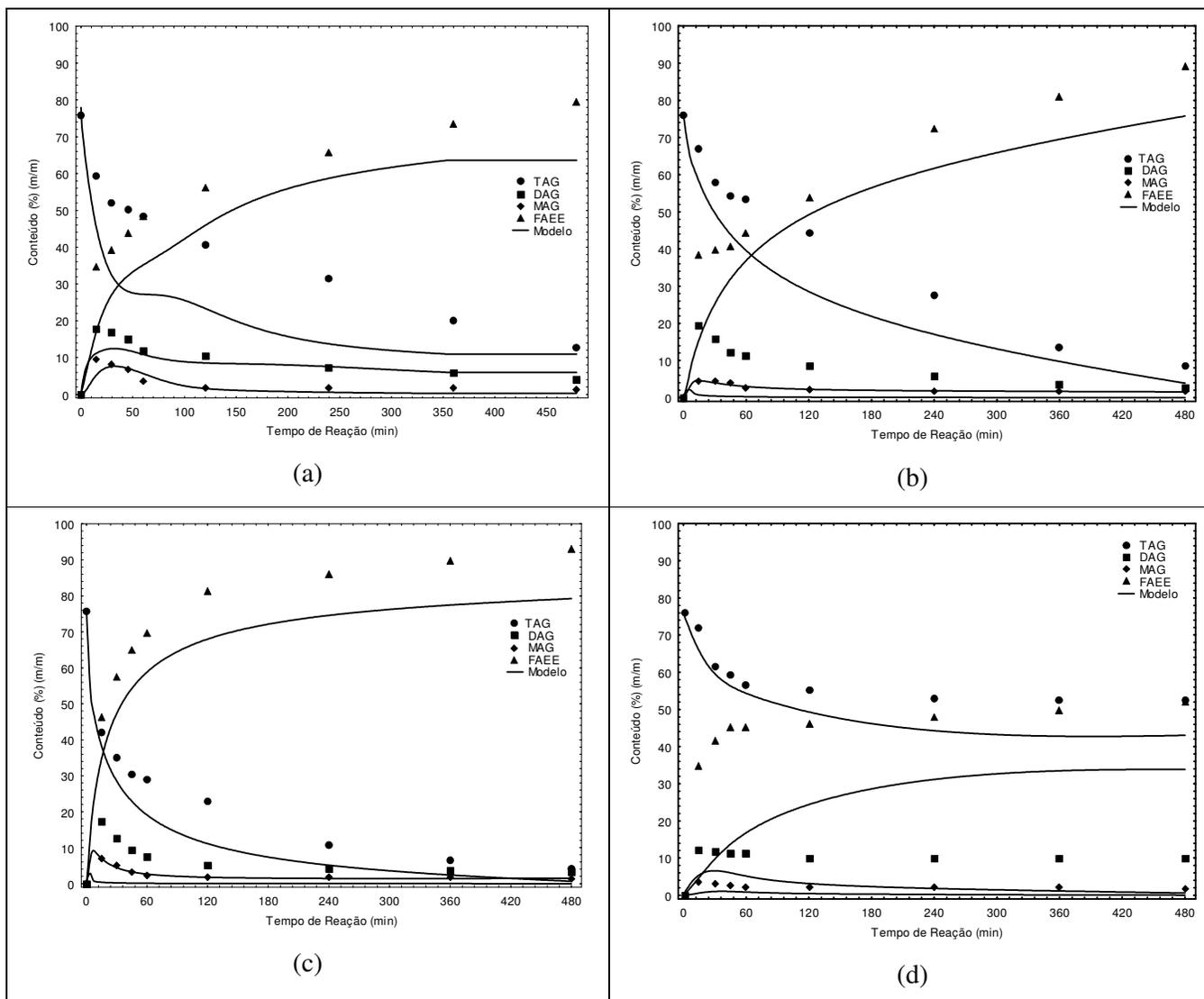
Tempo (h)	Temperatura do reator (°C)			
	45	55	65	70
0,25	34,80	38,53	46,38	34,60
0,5	39,26	39,86	57,54	41,41
0,75	43,71	40,58	65,09	45,00
1	48,18	44,30	69,47	45,20
2	56,22	53,99	81,38	46,04
4	65,60	72,46	86,02	47,81
6	73,28	80,86	89,86	49,78
8	79,23	89,26	92,83	51,80
AR *	91,16%	94,57%	85,07%	21,81%

\*AR = Atividade residual enzimática (Af/Ai)\*100

A partir da Tabela 4.1 pode ser verificado que na condição experimental de 65°C em um tempo de reação de 8 horas obteve-se o maior teor no produto de interesse. A respeito da atividade enzimática, verifica-se que houve pouca perda da atividade nos três primeiros experimentos, porém no experimento com a temperatura de 70°C verificou-se uma perda abrupta da atividade, na qual o teor no produto de interesse foi de 51,80% (m/m). Tal fato pode ser atribuído a dois fatores, o primeiro a esta faixa de temperatura estar relacionada à zona de temperatura na qual a atividade da Novozym 435 é máxima, e o segundo o sistema de agitação do reator Autoclave possuir uma agitação vigorosa. Nota-se ainda que em tempos reduzidos foram alcançados teores na ordem de 65% nas condições de temperatura de 65°C e 50 bar de pressão. O presente trabalho corrobora com os reportados por Dalla Rosa (2006), no qual em tempos reduzidos foram alcançadas conversões da ordem de 68% nas condições de temperatura de 65°C e 50 bar de pressão e com os de Iso *et al.*(2001), relacionado à produção de

biodiesel utilizando lipases como catalisadores, a onde na temperatura de 60°C uma conversão aproximada de 95% foi obtida.

A Figura 4.5 apresenta os resultados do teor de TAG, DAG, MAG e FAEF utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado.



**FIGURA 4.5** – Efeito da temperatura sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEF utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado. Condições experimentais: Razão mássica de solvente:substrato de 2:1, razão molar óleo:etanol de 1:6, concentração de enzima de 20% (m/m) e temperatura de (a) 45°C, (b) 55°C, (c) 65°C e (d) 70°C.

Pode-se observar na Figura 4.5 (c), que o teor máximo de biodiesel, aproximadamente 92%, foi obtido com a pressão de 50 bar e 65°C. Verifica-se também que os melhores resultados foram obtidos na faixa de temperatura entre 55 - 65°C, onde

a enzima Novozym 435 exibe sua faixa ótima de trabalho (Nordisk,1992). Nota-se ainda que em tempos reduzidos, foram alcançados teores da ordem de 65% nas condições de temperatura de 65°C e 50 bar de pressão. Segundo o estudo de Knez *et al.*(1998), relacionado à síntese de oleil oleato utilizando Lipozyme IM como catalisador, e gases comprimidos como solvente, em várias faixas de temperatura e pressão, taxas iniciais de reação maiores foram obtidas em temperaturas que variam de 40°C à 60°C e condições de pressão amenas. Em contrapartida, observa-se na Figura 4.5 (d) que a temperatura acima dos 70°C sobre a enzima, reduziu drasticamente a eficácia da enzima em relação ao teor de ésteres formado.

Com relação a modelagem matemática, pode-se relatar que em termos do teor de MAG o modelo representa satisfatoriamente os dados experimentais. Para o demais componentes o modelo apresentou desvios significativos, porém deve-se levar em consideração que o modelo proposto é bastante simplificado, em termos da reação de transesterificação sob investigação e nenhum modelo mecanístico foi considerado.

#### **4.2.2. Concentração de enzima**

Os experimentos para avaliação do efeito da variável concentração de enzima [E] foram realizados na condição de temperatura e pressão que conduziu ao melhor resultado de conversão (65°C e 50 bar). As concentrações de enzima testadas foram de 1, 5, 10 e 20 % (m/m). Para este estudo, a relação mássica solvente:substrato foi fixada em 2:1 e a razão molar óleo:etanol em 1:6. A Tabela 4.2 apresenta os resultados do teor em ésteres em cada condição experimental para as diferentes concentrações de enzima estudadas. A Figura 4.6 apresenta os resultados do teor de TAG, DAG, MAG e FAEE.

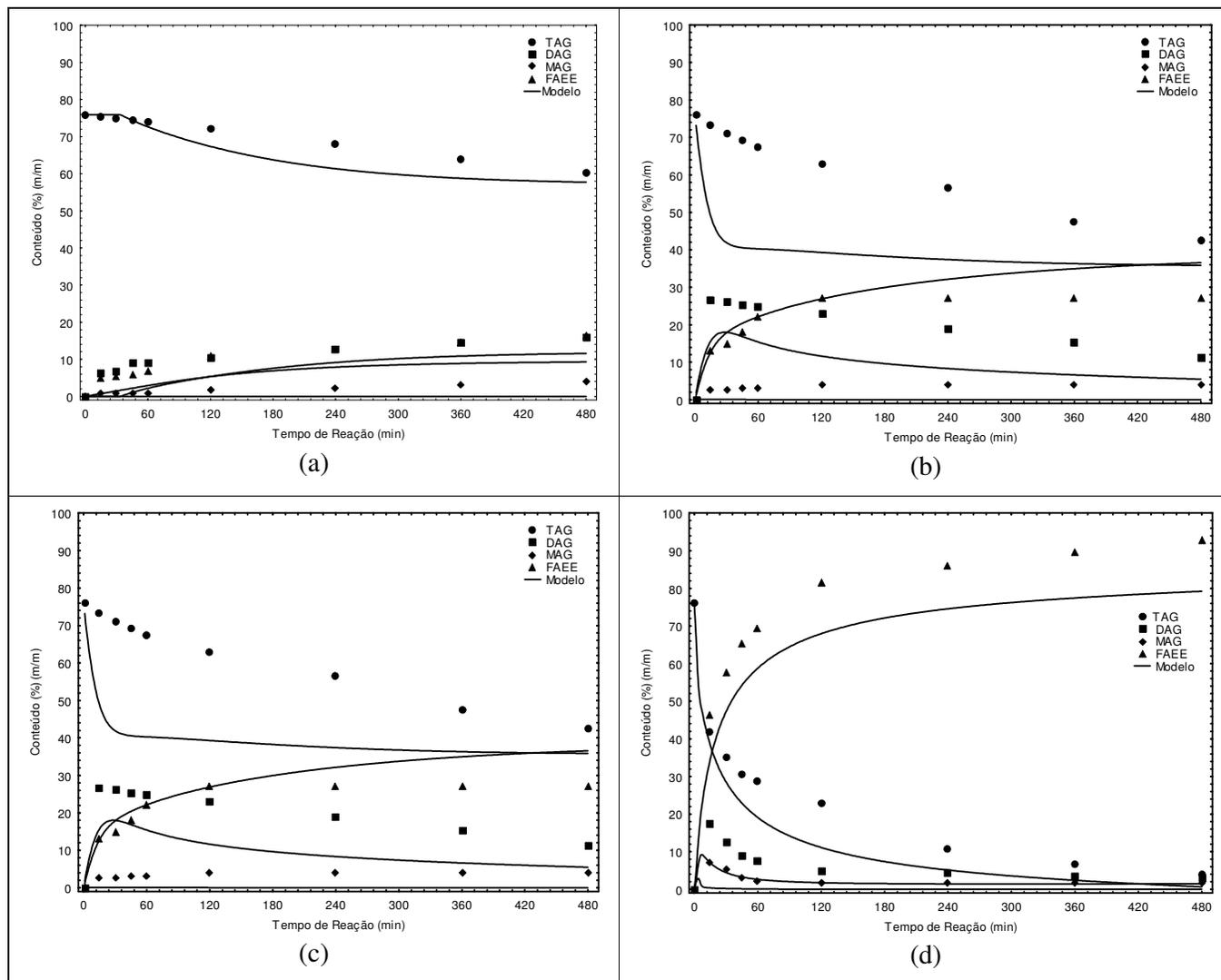
**TABELA 4.2** – Resultados experimentais da concentração em ésteres (%) para o estudo com diferentes concentrações de enzima.

Tempo (h)	Concentração de Enzima [E] %, (m/m)			
	1	5	10	20
0,25	5,07	12,85	29,96	46,38
0,5	5,52	15,04	34,79	57,54
0,75	5,94	18,13	35,1	65,09
1	6,93	22,23	35,42	69,47
2	10,94	26,91	36,68	81,38
4	12,70	27,03	39,20	86,02
6	14,50	27,15	41,72	89,86
8	16,30	27,27	44,24	92,83
AR <sup>*</sup>	7,02%	15,35%	31,40%	87,81%

A Tabela 4.2 mostra que quanto maior a concentração de enzima presente no meio reacional menor será a perda de sua atividade. Em tempos reduzidos de reação (2 horas) com uma concentração de enzima de 20% (m/m) é possível obter teores de ésteres satisfatórios. É importante também mencionar o fato da atividade inicial do lote utilizado não ser satisfatório, uma vez que no trabalho de Dalla Rosa *et al.*(2006) com uma concentração de enzima de 5% (m/m) foram obtidos teores da ordem de 88% (m/m) ao final de 8 horas de reação. Em contrapartida, no presente trabalho, foram obtidos teores de ésteres etílicos de 27,27% (m/m). Oliveira *et al.* (2004, 2005), ao realizar testes na produção de ésteres etílicos a partir de óleo de mamona e de soja com duas enzimas comerciais, Lipozyme IM e Novozym 435, em solvente orgânico (n-hexano), observaram que um dos parâmetros que afetam de forma positiva o processo de conversão é a concentração de enzima. Para uma maior concentração de enzima, tem-se uma maior disponibilidade dos centros ativos das enzimas, incrementando as taxas de reação e diminuindo, conseqüentemente, o tempo de reação. Estes aspectos

também foram verificados por Oliveira e Oliveira (2000, 2001), que realizaram reações catalisadas por lipases usando óleo de palma e de palmiste, fazendo uso de lipases comerciais, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente em reator pressurizado.

A Figura 4.6 apresenta os resultados do teor de TAG, DAG, MAG e FAEE.



**FIGURA 4.6** – Efeito da concentração de enzima sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEE utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado. Condições experimentais: Razão mássica de solvente:substrato de 2:1, razão molar óleo:etanol de 1:6, temperatura de 65°C e concentração de enzima: (a) 1% (m/m), (b) 5% (m/m), (c) 10% (m/m), (d) 20% (m/m).

Pode-se constatar através da Figura 4.6 (d) que nas primeiras horas de reação foram observados teores significativos de ésteres etílicos, sendo que a condição de 20% (m/m) de concentração de catalisador foi a que apresentou os melhores resultados. No trabalho de Richetti (2009), no qual um estudo da esterificação enzimática de palmitato

de 2-etilexila em sistema livre de solvente foi realizado testes com as lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM. Em baixos tempos de reação foram obtidos elevados teores de éster para a enzima Novozym 435.

Os resultados obtidos para as concentrações de enzima de 1, 5 e 10% (m/m) significaram taxas iniciais de reação diferentes. Ao final da reação, o teor de ésteres para as concentrações de enzima de 1% (m/m) e 5% (m/m) foram próximas, o que pode indicar a utilização de uma quantidade menor de enzima, desde que a enzima apresente uma atividade inicial satisfatória, na qual esta incrementa consideravelmente a taxa de reação, conduzindo assim à concentrações satisfatórias na produção de ésteres. Em relação à concentração de 20% (m/m) de catalisador, pode-se ressaltar que tal quantidade de enzima pode ser benéfica quando se avalia o baixo tempo de reação, o que pode ser de grande interesse para os processos industriais.

Com relação a modelagem matemática, pode-se relatar que o modelo apresentou desvios significativos para todos os componentes do meio reacional, porém o modelo proposto foi apto a representar satisfatoriamente a tendência do processo.

#### **4.2.3. Efeito da razão molar óleo:etanol**

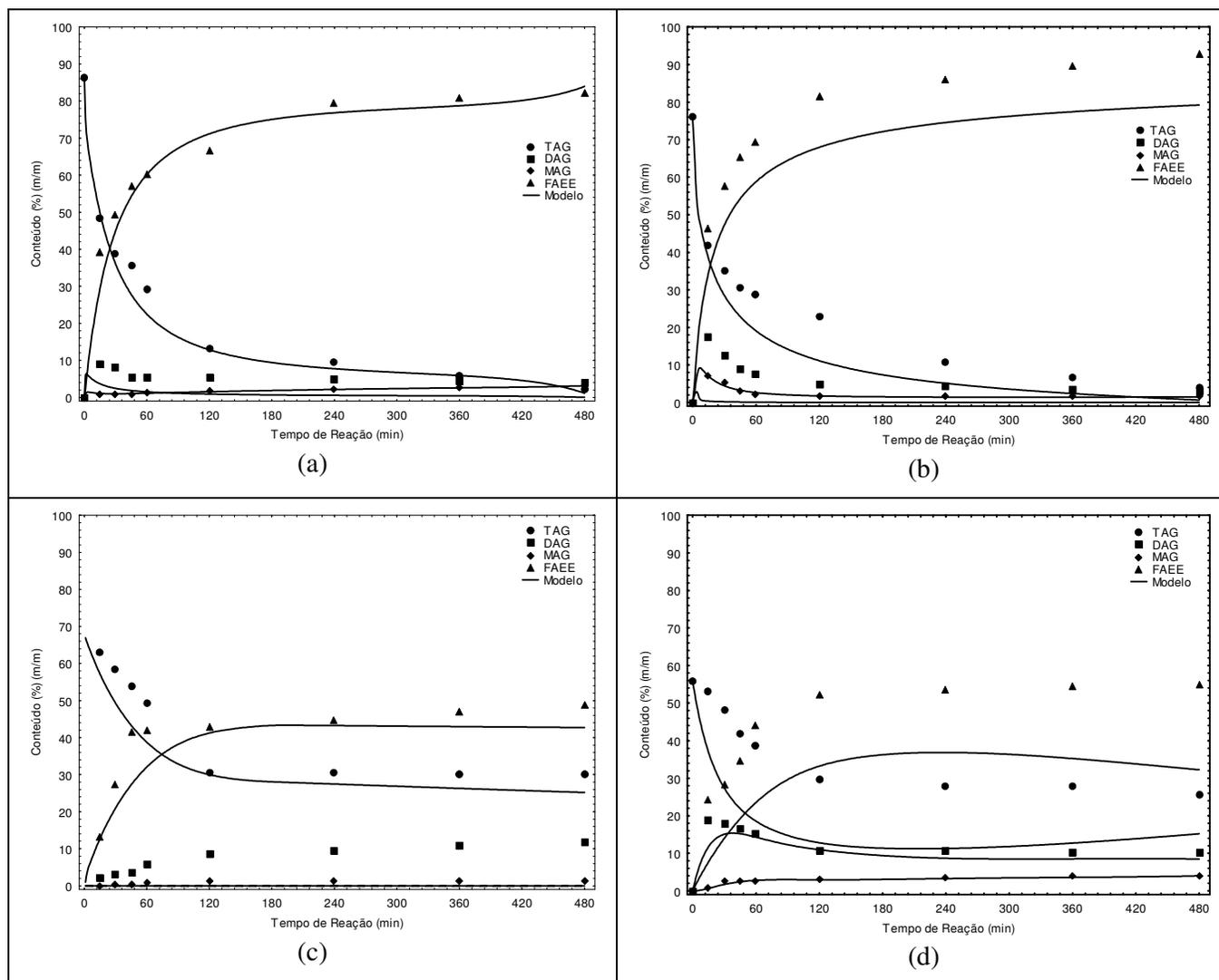
O efeito da razão molar óleo:etanol (R) na cinética da reação foi avaliado adotando-se os seguintes valores para esta variável: 1:3, 1:6, 1:9 e 1:15, mantendo fixas as demais variáveis: pressão de 50 bar, temperatura de 65°C, razão mássica solvente:substrato 2:1 e concentração de enzima de 20% (m/m). A Tabela 4.3 apresenta os resultados do teor de ésteres para o estudo de diferentes razões molares óleo:etanol.

**TABELA 4.3** – Resultados experimentais do teor de ésteres % (m/m) para o estudo com diferentes razões molares óleo:etanol.

Tempo (h)	Razão Molar óleo:etanol (R)			
	1:3	1:6	1:9	1:15
0,25	39,38	46,38	13,06	24,29
0,5	49,42	57,54	27,31	28,46
0,75	57,20	65,09	41,52	34,43
1	60,18	69,47	41,78	44,06
2	66,75	81,38	42,80	52,32
4	73,11	86,02	44,84	53,70
6	80,65	89,86	46,88	54,3
8	81,97	92,83	48,92	54,9
AR <sup>*</sup>	75,23%	85,07%	39,94%	50,27%

Os resultados apresentados na Tabela 4.3 e a Figura 4.7, demonstram que os melhores teores de ésteres foram obtidos nas condições de razão molar 1:3 e 1:6. Os experimentos com razão molar 1:3 apresentaram teores em produto de até 81,97% e com razão molar de 1:6 teores em produto de até 92,83%.

A Figura 4.7 apresenta o efeito da razão molar óleo:etanol sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEE utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado.



**FIGURA 4.7** - Efeito da razão molar óleo:etanol sobre o teor de TAG, DAG, MAG e FAEE utilizando a lipase Novozym 435 em propano pressurizado. Condições experimentais: Razão mássica de solvente:substrato de 2:1, temperatura de 65°C, concentração de enzima: 20% (m/m) e razão molar óleo:etanol de: (a) 1:3, (b) 1:6, (c) 1:9, (d) 1:15.

Os resultados obtidos nesta etapa sugerem que a razão molar óleo:etanol de 1:3 à 1:6 conduzem a bons teores de produto, mas para a razão molar de 1:9 e 1:15, a reação parece passível de inibição por excesso de etanol, o que corrobora os dados experimentais obtidos por Dalla Rosa *et al.* (2008). Ao final de 8 horas, para os experimentos utilizando relações de 1:6, 1:9 e 1:15, verifica-se uma menor quantidade de substrato no reator, em função da produção dos ésteres e da retirada de amostra, em

relação à quantidade de etanol excessiva para a estequiometria da reação. Contudo, para a razão 1:3, verifica-se que a quantidade de etanol adicionada foi consumida totalmente pela reação e por esta razão, no tempo de 8 horas, não haveria redução da conversão.

Nelson *et al.* (1996) realizaram a catálise enzimática com diferentes óleos vegetais, álcoois e também diferentes tipos de lipases em n-hexano como solvente, obtendo maior rendimento com a Lipozyme IM 60. A lipase de *M. miehei* foi a mais eficiente para converter triglicerídeos em ésteres utilizando álcool primário, ao passo que a lipase de *C. antarctica* foi a mais eficiente utilizando álcool secundário. Conversões máximas de 94,8 – 98,5% foram obtidas para as reações com álcoois primários, como metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol e 2-butanol na presença de n-hexano como solvente, sem, no entanto, avaliar a variação da quantidade de álcool no meio reacional.

Dentre os diversos estudos que relatam a influência de álcoois em reações não pressurizadas com lipases, encontra-se o de Abigor *et al.* (2000), que descrevem as conversões de ésteres obtidas a partir de óleo de palma usando a lipase de *P. cepacia*, obtendo 72% de conversão fazendo uso de etanol e 15% de conversão fazendo uso de metanol, na presença e ausência de solvente.

Poucos trabalhos são apresentados na literatura no que diz respeito ao efeito do etanol em reações em sistemas pressurizados. Dentre eles, destaca-se o estudo de Oliveira e Oliveira (2000, 2001), que realizaram reações com a Novozym 435 utilizando como substrato óleo de palma e CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que a variável estudada afeta positivamente a conversão do processo, no intervalo investigado de concentração de 1:3 à 1:12, demonstrando não haver inibição por excesso de álcool. Este fato pode ser atribuído às características hidrofílicas do dióxido de carbono que não proporciona boas condições de solubilidade às reações com óleos vegetais, formando diferentes fases no sistema reacional, fazendo com o que o álcool da reação permaneça em parte no meio reacional e em parte disperso no solvente, necessitando assim de grandes quantidades para desempenhar sua função de substrato.

Com relação a modelagem matemática, pode-se relatar que o modelo representou satisfatoriamente os dados experimentais, porém é importante ressaltar que o modelo proposto é bastante simplificado em termos da reação de transesterificação sob investigação e nenhum modelo mecanístico foi considerado neste trabalho.

Com relação ao modelo da cinética onde a lipase *Candida antarctica* é empregada, advém do mecanismo de Ping Pong Bi Bi, na qual a inibição pelo álcool pode ser levado em consideração no modelo, fazendo com que este tipo de modelo seja mais representativo ao sistema, na literatura a maior parte dos trabalhos encontrados são do uso do mecanismo de Ping Pong Bi Bi.

#### 4.4. Referências Bibliográficas

ABIGOR, R.; UADIA, P.; FOGLIA, T., HASS, M.; JONES, K.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J.; BAFOR, M. **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils**. Biochemical Society, v. 28, p. 978-981, 2000.

DALLA ROSA, C. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja utilizando lipase em propano**. Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2006.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane**. Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 49–53, 2008.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 16, p. 53-58, 2001.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. **Production of flavour esters by immobilized *Sthaphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system**. Process Biochemistry, v. 41, p.1692-1698, 2006.

KNEZ, Z.; HABULIM, H.; KRMELJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases**. Journal of Supercritical Fluids, v. 14, p. 17-29, 1998.

NELSON, L.A.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. **Lipase catalyzed production of biodiesel**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 78, p. 1191-1195, 1996.

NOVO NORDISK. **Characteristics of Immobilized Lipase in Ester Synthesis and Effects of Water and Temperature in Various Reactions**; Technical Report A-05948,1992.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 39, p. 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>**. Journal of Supercritical Fluids, v. 19, p. 141-148, 2001.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, J. V. **Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 115, p. 771-780, 2004.

OLIVEIRA, D.; NASCIMENTO FILHO, I.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 231-242, 2005.

RICHETTI, A.. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.** Dissertação de M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil, 2009.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1. Conclusões

Neste trabalho foram avaliados os efeitos de algumas variáveis de processo no teor de TAG, DAG, MAG e FAEE obtidos pela reação de transesterificação enzimática de óleo soja em propano pressurizado usando Novozym 435 como catalisador.

Em relação ao aparato experimental utilizado para condução das reações neste trabalho, testes preliminares demonstraram a confiabilidade do mesmo frente a outro sistema reacional estudado nos ensaios preliminares e frente a literatura.

Resultados mostraram que a reação catalisada por lipase em propano pressurizado pode se constituir em um processo potencial para substituir catalisadores químicos, obtendo-se boas conversões de FAEE em condições brandas de operação.

O presente estudo permitiu avaliar a influência da temperatura, razão molar óleo:etanol, concentração de enzima, e o desenvolvimento de um modelo matemático simplificado para a reação de transesterificação, sendo possível concluir que:

- À condição de temperatura de 65°C apresentou melhores teores % (m/m) de ésteres etílicos de soja, devido à faixa ótima de temperatura de trabalho da Novozym 435 (50°C - 70°C);
- A razão molar óleo:etanol de 1:6 apresentou melhor resultado para a conversão da reação. A razão de 1:9 e 1:15, conduziu a provável inibição por excesso de substrato;
- Quando avaliados sobre o aspecto de quantidade de enzima utilizada, a concentração de 1 e 5% (m/m) de enzima propiciaram baixos teores de ésteres etílicos de soja, devido a sua atividade enzimática, mas quando visto pelo aspecto de baixo tempo de reação (taxa inicial), a concentração de 20% (m/m) de catalisador torna-se apreciável;
- O modelo proposto foi capaz de fornecer uma representação satisfatória dos resultados experimentais.

### 5.2 Sugestões

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões podem ser delineadas:

- Implementação de um modelo da reação baseado em modelos mecanísticos, como por exemplo o modelo cinético de Ping Pong Bi Bi;
- Ampliação do estudo realizado neste trabalho para outros óleos vegetais, tais como mamona e dendê, com sua respectiva modelagem cinética de produção enzimática de biodiesel em fluidos pressurizados;
- Estudo da viabilidade econômica da produção enzimática de biodiesel em fluidos pressurizados;
- Aplicação de técnicas de controle automático no reator, visando melhorar a retirada de amostra bem como um maior controle das variáveis envolvidas no processo.

## APÊNDICE A - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste capítulo são apresentadas as análises cromatográficas, a calibração do método cromatográfico para quantificação de TAG, DAG, MAG e de FAEE e a metodologia de cálculo adotada para determinação da concentração da reação em termos de ésteres etílicos.

### A.1 Procedimentos realizados para análise de TAG, DAG e MAG

A determinação do teor de MAG, DAG, TAG nas amostras coletadas foi realizada a fim de conhecer o comportamento da reação ao longo do tempo.

#### A.1.1 Condições cromatográficas

As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *e on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (J e W Scientific, nº de série: US7162944H), de 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm. As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50°C/1 min, 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C, e 10°C/min até 380°C, permanecendo por 8 min. A temperatura do detector era 380°C, pressão do gás de arraste (hidrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 µL.

#### A.1.2 Preparação e análise das soluções de calibração

Preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo (monooleína, dioleína, trioleína e ácido oléico), e a partir destas preparou-se, cuidadosamente, 8 soluções de calibração em diferentes concentrações, para os glicérides, conforme a Tabela 1. Para a calibração do ácido oléico, fez-se outras 7 soluções só com este padrão (Tabela A.1), pelo fato de que este foi adquirido após realizada a calibração para os demais padrões.

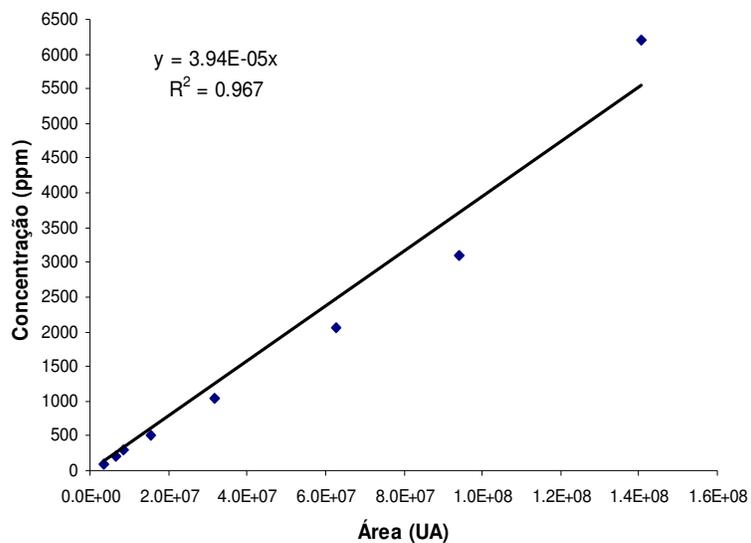
**TABELA A.1** – Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos.

<b>Padrão externo</b>	<b>Solução de calibração</b>							
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Monooleína (ppm)	100	500	1000	2000	3100	200	300	6200
Dioléina (ppm)	890	2100	530	1000	1400	200	730	50
Trioléina (ppm)	500	5000	3000	50	10	7500	200	300

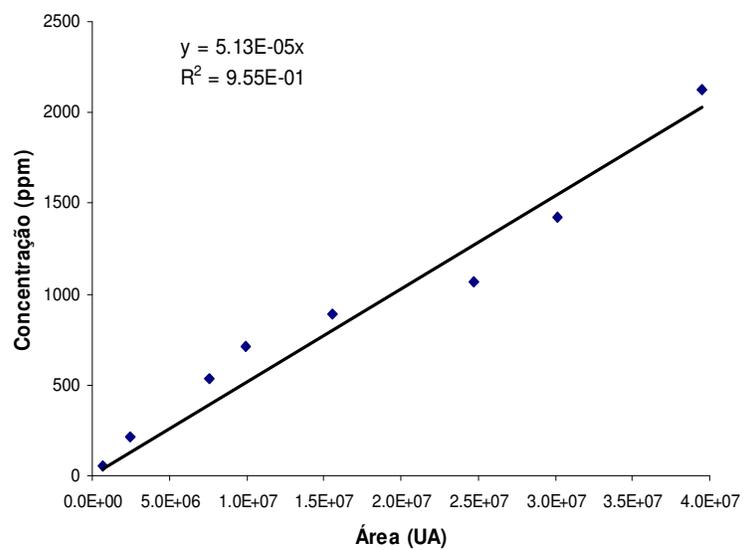
As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos, pelo fato de que ampliou-se as faixas de calibração sugeridas pelo método, que era de somente quatro pontos e assim teve-se dificuldade de encontrar as concentrações dos padrões internos que acompanhassem toda a faixa de abrangência escolhida. Optou-se então pela calibração somente com os padrões externos.

Em cada solução de calibração foi adicionado 100 µL do derivatizante MSTFA, após a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 minutos para que o derivatizante reagisse. Em seguida, completou-se o volume (10 mL) com n-heptano. As soluções foram transferidas para os frascos de amostragem e levadas ao GC-FID para análise.

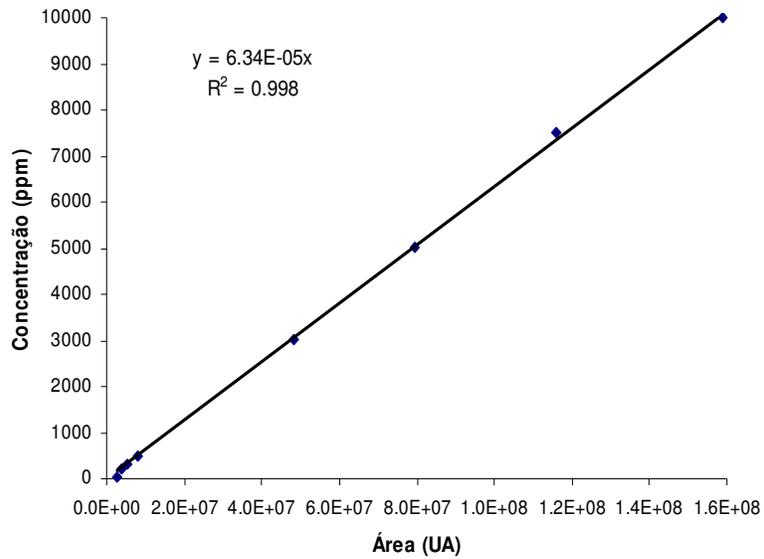
As equações obtidas com as curvas de calibração (concentração versus área) para cada composto podem ser observadas nas Figuras A.1 à A.4.



**FIGURA A.1** – Curva de calibração para monooleína.



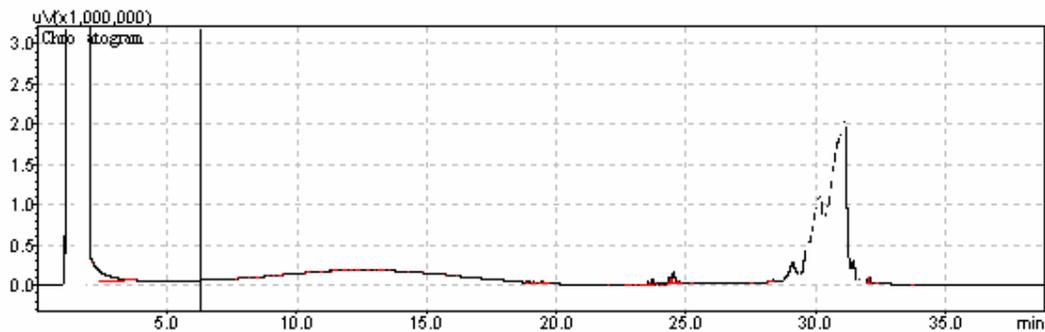
**FIGURA A.2** – Curva de calibração para dioleína.



**FIGURA A.3** – Curva de calibração para trioleína.

Um cromatograma típico obtido nas análises de MAG, DAG e TAG utilizando a Norma Européia de Padronização nº 14105. A Figura 4 corresponde ao tempo zero de uma determinada reação.

As áreas entre 4,5 à 5,5 minutos corresponde a região de glicerol, de 10,5 à 12,5 minutos corresponde a região de ácidos graxos livres, de 15 à 19 minutos corresponde a região de MAGs, de 23 à 28 minutos corresponde a região de DAGs e de 31 à 34 minutos corresponde a região de TAGs.



**FIGURA A.4** – Perfil cromatográfico de uma amostra de óleo de soja.

### A.1.3 Cálculos das concentrações de TAG, DAG e MAG

Os cálculos das concentrações de TAG, DAG e MAG são obtidos conforme a curva de calibração mencionada anteriormente. Como exemplo, o cálculo de TAG é dado pela seguinte equação:

$$\%CTAG = \frac{((6,34 * 10^{-5}) * A) * 100}{C} \quad (A.1)$$

Onde:

CTAG = Concentração do componente (%)

A – Área do componente.

C- Concentração do componente (mg/L).

Para os outros componentes fazemos apenas a alteração do valor de y obtido em cada equação da curva de calibração, obviamente teremos novos valores para as áreas dos outros componentes.

## **A.2 MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES**

Princípio: determinação do teor de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos pela evaporação do álcool da amostra mediante corrente de nitrogênio e logo se lava com água para eliminação da glicerina. Finalmente, analisa-se por GC mediante o uso de padrão interno (C17:0). Referencias normativas: EN ISSO 5508 ou NE 14103.

### **A.2.1 Método**

- Sobre a amostra coletada se passa um fluxo de nitrogênio até peso constante para eliminação de álcool.

- Posteriormente, adiciona-se 2 mL de água (para eliminação do glicerol) e 2 ml de hexano, se agita suavemente e se transfere a um tubo de centrifuga com uma pipeta Pasteur.

- Centrifuga-se a 3000 rpm durante 10 minutos.

- Transfere-se a camada orgânica superior com uma pipeta de Pasteur a um vial (com tampa de rosca) e se elimina o solvente mediante uma corrente de nitrogênio até peso constante.

OBS 1: para evaporar hexano é necessário um tempo de 15 minutos e para evaporar etanol um tempo de 1 hora e meia.

OBS 2: o procedimento para retirada de glicerina não é realizado quando queremos determinar a porcentagem de ésteres. Então a amostra de biodiesel é analisada integralmente, sem a retirada de glicerina, eliminando a etapa citada acima.

- Coloca-se em um balão volumétrico de 25 mL (previamente pesado) aproximadamente 100mg de amostra.

- Completa-se o volume do balão volumétrico com hexano.

- Adiciona-se em um vial: 250 µL da amostra contida no balão volumétrico e 50 µL de uma solução de padrão interno (ésteres metílicos do ácido graxo palmitato) de concentração de 4 mg/mL (diluição em hexano)

- Injeta-se 1 µL no GC.

### A.2.2 Cromatografia

- A análise por GC se realiza em equipamento Shimadzu CG – 2010, equipado com FID e coluna capilar Rtx – WAX de 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno. O programa de temperaturas se inicia em 50°C com rampa de aquecimento de 15°C/min até temperatura de 280°C.

- O cálculo do teor de ésteres da amostra é realizada por Padrão Interno, a partir da massa de biodiesel e das áreas correspondentes a cada composto.

### A.2.3 Cálculo do teor em ésteres: com base a EN 14103

$$\% \text{Ésteres} = \left( \frac{\Sigma A - API}{API} * \frac{CPI}{C_{amostra}} \right) * 100 \quad (\text{A.2})$$

Onde:

$\Sigma A$  = Somatório das áreas dos componentes majoritários do biodiesel e do padrão interno.

API = Área do padrão interno (C17:0 – Heptadecanoato de metila);

CPI = Concentração de padrão interno na amostra injetada (aprox. 250 mg/L);

Camostra = Concentração da amostra injetada (aprox. 1000 mg/L).