

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

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE
SOJA EM REATOR DE LEITO EXPANDIDO EM MODO CONTÍNUO**

THIAGO SAVI COLOMBO

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

ERECHIM, RS - Brasil

FEVEREIRO de 2011

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE
SOJA EM REATOR DE LEITO EXPANDIDO EM MODO CONTÍNUO**

THIAGO SAVI COLOMBO

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:

Débora de Oliveira, D. Sc.

Orientadora

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.

Orientador

Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.

Membro Interno

Altemir José Mossi, D. Sc

Membro Externo

Erechim, 15 de fevereiro de 2011.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais,
que sempre me ajudaram quando precisei,
que me ensinaram o amor e a bondade,
fundamentos que estão comigo até hoje.

A minha companheira e namorada que participou
e me ajudou nos momentos de dúvidas e incertezas,
criando condições para que chegasse até aqui,
tornando esta obra em realidade.

A você Karina!

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta. Esta dissertação é apenas mais uma etapa que se encerra em minha vida, mas não a última.

Aos meus pais, a quem honro pelo esforço com o qual disponibilizaram para mim e para o meu irmão, condições que favoreceram o nosso crescimento pessoal e intelectual.

A minha namorada Karina, minha companheira que esteve sempre presente ao meu lado, proporcionando força e alegria para percorrer este caminho, fossem nos momentos de dúvida, incertezas, de alegria e de comemoração. Sempre me dando um apoio moral e intelectual. Mas que em outros momentos, passava em minha vida, como se fosse um escoamento turbulento, perturbando a minha paciência, resultando em um dia agitado.

Aos pais da Karina que sempre estiveram me apoiando e incentivando.

Ao casal de amigos, Cilda, Joel e sua filhota Julia, por sua hospitalidade, carinho, amizade e principalmente ajuda que nos proporcionaram nos momentos alegres e difíceis durante nossa permanência nesta cidade.

A toda família Esperandio que tive a oportunidade de conhecer e que jamais irei esquecer-los.

Aos meus orientadores Débora de Oliveira e José Vladimir de Oliveira, que disponibilizaram condições para realizar esta dissertação, através das pequenas reuniões sobre os resultados, esclarecendo minhas dúvidas e diversificando as minhas perguntas. Além disso, pelo companheirismo nesta caminhada e pelos momentos que disponibilizaram para conversar sobre diversos assuntos. Obrigado pela dedicação e amizade.

Aos amigos que deixei em Florianópolis – SC, companheiros de sinuca, de festas no JB, dos almoços no RU e nos momentos de estudos (Gustavo, Jaque, Jana, Fernanda, Caco, Luís, Marieli, Gilson, Marta) e a outros colegas que não citei. Também ao meu amigo cearense Jéfferson (“traficante de rapadura”), que apesar da distância ainda mantemos contato.

A todos os meus colegas do Laboratório de Termodinâmica, principalmente a Claudia e o Josemaique, que contribuíram muito nas horas de dificuldade e de dúvidas para manusear o GC, que insistia em não funcionar. Obrigado pelas ajudas e socorros.

Um abraço para Marceli, Juliana, Graci, Tiririca, Stephani, Marcos e outros que não citei, pelas conversas e ajudas no laboratório.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Vegetal, que em alguns momentos autorizavam o empréstimo de reagentes e outros materiais necessários.

A todos os funcionários do Centro Tecnológico, que disponibilizaram a chave dos laboratórios, bem como materiais que insistiam em acabar.

Agradeço a todos que contribuíram de forma indireta na atualização de fofocas que surgiam no departamento.

Aos familiares e amigos que, mesmo de longe, sempre se fizeram presentes.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro.

A todos do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

O problema de morar sozinho é que sempre é a nossa vez de lavar a louça.

(Albert Einstein)

Tudo certo, mas nada resolvido.

(Autor desconhecido)

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.

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA EM REATOR DE LEITO EXPANDIDO EM MODO CONTÍNUO

Thiago Savi Colombo

Orientadores: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

O biodiesel é produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais, sendo considerado um combustível renovável e biodegradável. Vários estudos apresentados na literatura, relacionados à transesterificação enzimática de óleos vegetais utilizando fluidos pressurizados como solventes em modo batelada apresentaram altas conversões, tornando o estudo do processo em modo contínuo um campo de grande interesse de pesquisa. Contudo, poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre a reação enzimática de produção de ésteres em solventes pressurizados em modo contínuo. Essa configuração é preferível do ponto de vista econômico, uma vez que possibilita grande tempo de operação de produção com pequenos intervalos para a manutenção, fornecendo bons rendimentos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja em CO₂ pressurizado em reator de leito expandido em modo contínuo, utilizando a lipase Novozym 435 como catalisador. Um estudo das variáveis do processo, pressão (100–200 bar), quantidade de enzima (10–70 g), razão molar óleo:etanol (1:9–1:21) e razão mássica substratos:solvente (1:1–1:3) permitiu a determinação das melhores condições experimentais para a produção de biodiesel. Os resultados demonstram que o CO₂ candidata-se como solvente potencial para a execução destas reações, pois em condições de pressão e temperatura de operação de 200 bar e 70°C, respectivamente; razão mássica óleo:etanol (1:9) e o emprego de razão mássica substratos:solvente (1:3), conversões acima de 90% foram atingidas neste sistema reacional em modo contínuo.

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

**ENZYMATIC PRODUCTION OF SOYBEAN ETHYL ESTERS
IN EXPANDED BED REACTOR IN CONTINUOUS MODE**

Thiago Savi Colombo

Advisors: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

Biodiesel may be produced from the transesterification of vegetable oils making it a renewable and biodegradable fuel. Several studies presented in the literature through enzymatic transesterification of vegetable oils and pressurized fluids as solvent in batch mode showed high conversions, making the evaluation of continuous mode a field of great research interest. However, just a few works are found in the literature regarding the enzymatic reaction to produce esters in continuous mode. This configuration is preferable from an economic standpoint, since it allows large time production operation at short intervals to and, provides good reaction yields. In this context, the objective of this work was the production of ethyl esters from soybean oil in pressurized CO₂ using an expanded bed reactor in continuous mode, using the lipase Novozym 435 as catalyst. A study of process variables, pressure (100-200 bar), enzyme amount (10-70 g), molar ratio of oil:ethanol (1:9-1:21) and mass ratio of substrate:solvent (1:1-1:3) allowed the determination of the best experimental conditions for biodiesel production. Results show that CO₂ is a good solvent demonstrating acceptable performance for the reactions, leading to conditions of pressure and operating temperature (200 bar and 70°C), mass ratio oil: ethanol (1:9) and the use of mass ratio of substrate: solvent (1:3), reaching conversions above 90%.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 BIODIESEL.....	8
2.2 BREVE HISTÓRICO DO BIODIESEL	10
2.3 ÓLEOS POTENCIAIS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	12
2.4 BIOTRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA	16
2.5 TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL	17
2.5.1 Transesterificação de óleos vegetais.....	17
2.5.2 Transesterificação enzimática	20
2.5.3 Produção de biodiesel em fluidos pressurizados	23
2.5.4 Produção de biodiesel em modo contínuo	27
2.6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 MATERIAIS.....	30
3.2 MÉTODOS.....	31
3.2.1 Descrição do aparato experimental	31
3.2.2 Descrição do reator de leito expandido.....	33
3.2.3 Montagem do aparato experimental	35
3.2.4 Procedimento experimental.....	35
3.2.5 Quantificação de ésteres por cromatografia gasosa.....	36
3.2.6 Avaliação da cinética reacional para produção de ésteres etílicos	37
3.2.7 Estudo das variáveis	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1 DIFICULDADES ENCONTRADAS	39
4.2 REPRODUTIBILIDADE DO SISTEMA.....	40
4.3 EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO SOBRE A TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE SOJA E ETANOL EM CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	41

4.3.1 Efeito da pressão	41
4.3.2 Efeito da quantidade de enzima	44
4.3.3 Efeito da razão molar óleo:etanol.....	49
4.3.4 Efeito da razão mássica substrato:solvente	52
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	55
5.1 CONCLUSÕES	55
5.2 SUGESTÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	65
A.1 ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS	65
A.2 CÁLCULOS DA CONVERSÃO DA REAÇÃO	65
APÊNDICE B – DETALHES DE PROCESSO.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Área colhida e produção de soja no Brasil.	14
Figura 2.2 - Esquema geral da reação de transesterificação.....	18
Figura 2.3 - Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais.	18
Figura 2.4 - Diagrama P-T para o sistema CO ₂ -óleo de soja para diferentes frações mássicas (w) de CO ₂ (Ndiaye et al., 2006a).	27
Figura 3.1 - Diagrama esquemático do aparato experimental: (C1) cilindro de CO ₂ , (CV) “check valve”, (BS1 e BS2) bombas de alta pressão, (BR1 e BR2) banhos termostáticos, (VA1 e VA2) válvulas de alimentação do reator, (RE) reator expandido, (AM) agitador mecânico, (BL) bomba de líquidos, (MM) micromisturador, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (TP) sensor de pressão, (VA3) válvula de amostragem.	31
Figura 3.2 – Diagrama esquemático do reator de coluna encamisado de leito expandido: (ER) entrada do reator, (SR) saída do reator, (EA) entrada de água na camisa, (SA) saída de água da camisa, (LE) leito expandido, (CP) condutor de produto.....	33
Figura 3.3 - Diagrama esquemático do Condutor de Produto (CP) e seus constituintes: Retentor (RE), polca (PO) e tela (TE).....	34
Figura 4.1 - Avaliação do sistema em triplicata de experimentos sobre rendimento em ésteres etílicos utilizando dióxido de carbono como solvente nas seguintes condições: temperatura de 70°C, pressão de 148,22 bar, 30 g de enzima, razão molar óleo:etanol 1:9 e razão mássica substrato:solvente de 1:2.....	41
Figura 4.2 - Efeito da pressão sobre o rendimento em ésteres etílicos de óleo de soja em CO ₂ pressurizado utilizando a lipase Novozym 435. Condições experimentais fixas: Razão molar óleo:etanol de 1:9, 30 g de enzima e temperatura de 70°C.	42
Figura 4.3 - Efeito da quantidade de enzima de 10, 30, 40 e 70 g sobre o rendimento em ésteres etílicos, para a pressão de 200 bar, razão mássica de 1:1, razão molar de 1:9 e temperatura de 70°C.	45
Figura 4.4 - Efeito da quantidade de enzima de 10, 30 e 40 g sobre o rendimento em ésteres etílicos, para a pressão de 200 bar, razão mássica de 1:3, razão molar de 1:9 e temperatura de 70°C	47
Figura 4.5 - Efeito da razão molar óleo:etanol de 1:9; 1:15 e 1:21 sobre o rendimento em ésteres etílicos, para pressão de 200 bar e temperatura de 70°C.	50

Figura 4.6 - Efeito da razão mássica substrato:solvente 1:1 e 1:3 sobre o rendimento em ésteres etílicos para pressão de 200 bar e temperatura de 70°C.	53
Figura A.1 – Cromatograma representativo	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Capacidade nominal e produção de biodiesel B100 no Brasil.	12
Tabela 2.2 - Propriedades físicas e de transporte associadas a diferentes estados do fluido. ..	24
Tabela 3.1 – Propriedades termofísicas das substâncias utilizadas.	30
Tabela 3.2 – Faixa de estudo das variáveis de processo investigadas neste trabalho	38
Tabela A.1 - Composição química em ácidos graxos do óleo de soja (Marca Soya) utilizado como substrato	66
Tabela A.2 - Áreas da amostras obtidas pela injeção em duplicata.....	67
Tabela A.3 – Rendimento em ésteres etílicos das amostras referentes ao experimento em temperatura de 70°C, pressão de 200 bar, razão molar óleo:etanol de 1:9, razão mássica solvente:substrato de 1:1 e 30 g de enzima.	68
Tabela B.1 – Quadro das vazões de dióxido de carbono supercrítico e de substrato.	70

1. INTRODUÇÃO

Desenvolver alternativas renováveis de energia tem se tornado necessário devido à possível escassez de combustíveis fósseis. A crescente demanda mundial de derivados de petróleo, os efeitos ambientais de seu uso nas atividades industriais, de geração de energia e de transporte, além da forte expectativa de desabastecimento futuro de petróleo têm promovido uma verdadeira revolução no desenvolvimento e uso de energias alternativas (O futuro da indústria: Biodiesel, 2006). Dentre os recursos renováveis disponíveis para produção de combustíveis alternativos, a modificação de óleos e gorduras tem sido largamente investigada e bem reportada na literatura (MA e HANNA, 1999; SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; FUKUDA et al., 2001; MEHER et al., 2006) uma vez que se trata do processamento de uma fonte de energia renovável, com crescente disponibilidade, com produção disponível em vários países e por seu uso sustentado não provocar danos ao meio ambiente (RAMOS et al., 2003).

Entre outros processos para modificação de óleos vegetais, a transesterificação tem sido o método mais utilizado atualmente (MA e HANNA, 1999; FUKUDA et al., 2001). Transesterificação, também chamada de alcoólise, refere-se à 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 sub(co)produto.

O biodiesel (alquil éster de ácidos graxos), que pode ser obtido através da reação de transesterificação entre um triglicerídeo e um álcool, atraiu atenção considerável durante a década passada como um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Apresenta características físico-químicas semelhantes as do óleo diesel, podendo ser utilizado em motores do ciclo diesel praticamente sem nenhuma modificação (ALTIN et al., 2001). Diversos processos para a produção desse combustível foram desenvolvidos, entre eles a transesterificação que usa catalisadores alcalinos e promove níveis elevados de conversão dos triglicerídeos em seus correspondentes alquil ésteres em tempos curtos de reação. Esse processo foi utilizado intensamente para a produção de biodiesel em vários países. No entanto, os processos de produção de biodiesel com catalisadores químicos homogêneos, além de requerer o emprego de catalisador, envolvem necessariamente a separação do produto e do catalisador, que resulta em altos custos de processamento e elevado consumo de energia. Tais pontos justificam o crescente interesse no desenvolvimento de tecnologias referentes à produção deste biocombustível.

O processo de transesterificação pode utilizar como fonte de álcool o metanol (processo muito conhecido e aplicado industrialmente em vários países) ou o etanol. A opção estrategicamente mais vantajosa para o Brasil é o etanol, produzido em larga escala, a custos competitivos. O metanol, além de ser tóxico, necessita ser importado ou produzido a partir de gás natural (carbono fóssil) (Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011).

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, vigente no Brasil, 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).

O biodiesel pode, também, ser usado puro ou em misturas com o diesel mineral. A diversidade de matérias-primas, processos e usos se caracterizam como vantajosas, mas cada caso precisa ser analisado de acordo com as suas especificações (CADERNOS - NAE, 2004).

Segundo o Decreto nº 5.448, de 20 de maio de 2005, vigente no Brasil, “pode ser adicionado na proporção de dois por cento, em volume, de biodiesel ao óleo diesel de origem fóssil a ser comercializado com o consumidor final, em qualquer parte do território nacional”. O texto acrescenta ainda que “a adição de biodiesel ao óleo diesel de origem fóssil poderá ser superior a dois por cento, em volume, quando o combustível resultante da mistura for destinado a uso em: I - frotas veiculares cativas ou específicas; II - transporte aquaviário ou ferroviário; III - geração de energia elétrica; e IV - processo industrial específico” (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-006/2005/Decreto/D5448.htm).

Dentro do segmento de combustíveis automotivos, com os recentes avanços no desenvolvimento e implementação dos chamados biocombustíveis, sucedâneos aos clássicos combustíveis fósseis, vem se consolidando a substituição crescente de óleo diesel de origem não renovável.

A elaboração dos programas de desenvolvimento e uso de biodiesel no âmbito governamental em diversos blocos econômicos mundiais, tais como na União Européia, América do Norte e no MERCOSUL, tem promovido massivo investimento em projetos de produção industrial de biodiesel. Visando à maior eficiência desse novo mercado, aproximam-se os segmentos agrícola (produção de grãos), industriais (extração de óleo e de produção de biodiesel) e de distribuição e venda de combustível, integrando-se, assim, a chamada cadeia produtiva do biodiesel (O futuro da indústria: Biodiesel, 2006).

Para o Brasil, os chamados biocombustíveis, produzidos através de óleos vegetais, representam 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.

O Brasil ocupa posição de destaque na produção e exportação de óleo de soja, mostrando seu grande potencial para se tornar produtor e consumidor de biodiesel a partir deste óleo (ALBUQUERQUE, 2006).

Embora algumas plantas nativas apresentem bons resultados em termos de rendimento de biodiesel em escala laboratorial, sua produção ainda é puramente extrativista: não há plantios comerciais que permitam avaliar, com precisão, suas potencialidades. Isso ainda levará certo tempo, uma vez que a pesquisa agropecuária nacional com foco no domínio dos ciclos botânico e agrônômico dessas espécies ainda não possui resultados substanciais (Plano Nacional de Agroenergia, 2006).

A produção e uso do biodiesel representam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social. A dimensão do mercado no Brasil e no mundo assegura uma grande oportunidade para o setor agrícola, assim como contribuirá para o desenvolvimento e a ampliação do parque industrial em consonância com o meio ambiente. O biodiesel apresenta ótimo potencial de ganhos ambientais. Em média, a emissão de poluentes no uso em motores é reduzida em comparação ao diesel. Destaca-se a redução de SO₂, particulados e hidrocarbonetos. Além disso, por ser renovável, contribui positivamente para reduzir o efeito estufa. O CO₂ emitido na queima do biodiesel é absorvido na etapa agrícola de seu ciclo produtivo (O futuro da indústria: Biodiesel, 2006).

Vários estudos têm estimado que o uso de 1 kg de biodiesel contribui para a redução de cerca de 3 kg de CO₂. Assim, a utilização de biodiesel promove uma redução significativa das emissões de CO₂ (65% - 90% menos que o diesel convencional), as emissões de partículas e de outras emissões nocivas. O biodiesel possui baixo teor de enxofre, e tem uma alta lubrificidade e biodegradabilidade rápida. Estas são as principais vantagens que têm sido confirmadas por vários programas da Comissão Européia e testes de institutos de investigação independentes (<http://www.ebb-eu.org/biodiesel.php>).

Um dos grandes responsáveis pelo crescente interesse do emprego dos biocombustíveis reside no aspecto ambiental. O biodiesel pode fornecer reduções significativas no teor de monóxido de carbono e nas emissões de particulados e de hidrocarbonetos (SZYBIST et al., 2005). Por exemplo, tomando-se por base o biodiesel puro (B100) produzido com óleo de soja, seu uso reduz as emissões do monóxido de carbono (CO) em 48%, de material particulado (MP) em 47%, de óxido de enxofre (SO_x) em praticamente

100% e dos hidrocarbonetos totais (HC) em 67%. Por outro lado, em relação ao diesel de origem fóssil, o uso do biodiesel aumenta em aproximadamente 10% as emissões de óxido de nitrogênio (NOx), o que não deve constituir obstáculo para seu uso devido às grandes vantagens em relação aos poluentes. Ademais, há muitos estudos que visam à redução de NOx mediante o emprego de catalisadores adequados (KNOTHE et al., 2006).

Analisando-se apenas as emissões de gases que contribuem para o efeito estufa gerado pelo ciclo de vida do insumo álcool (desconsiderando as emissões de gases de efeito estufa do ciclo de vida da matéria graxa), o uso de biodiesel metílico reduz a emissão de gases causadores do citado efeito em 95% comparado ao diesel. Quanto ao biodiesel etílico, a redução é de 96,2%, em relação ao diesel, havendo, portanto, diferença não significativa (1,2%) entre os dois ésteres (KNOTHE et al., 2006).

Kusdiana e Saka (2001a) e Demirbas (2002) propuseram recentemente a produção de biodiesel a partir de óleo vegetal através da transesterificação não-catalítica com metanol supercrítico. A reação é completada em tempos de residência muito curtos e, quando comparada aos processos catalíticos, 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 excessivos custos iniciais de fabricação, de processamento e de energia (SILVA et al., 2007).

Recentemente, a transesterificação enzimática, utilizando lipases como catalisador, tornou-se uma alternativa atrativa para a produção de biodiesel, uma vez que temperaturas amenas são empregadas, aliadas ao fato de que o glicerol produzido como um subproduto pode facilmente ser recuperado e a purificação dos ésteres é relativamente simples de ser realizada (FUKUDA et al., 2001). Por outro lado, a transesterificação enzimática exige elevadas proporções de solvente orgânico:substratos para que a reação ocorra a contento. Oliveira (1999) e Faccio (2004) utilizaram níveis de solvente (n-hexano:substratos) de 40:1 na transesterificação de óleo de dendê, de mamona e soja utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme IM.

Dados mais recentes 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 líquidos (SAVAGE et al., 1995; MESSIANO et al., 1999; NOYORI, 1999; 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 e estabilidade de algumas lipases neste solvente pressurizado (FEIHRMANN et al., 2006; NDIAYE et al., 2006a).

Recentemente, a transesterificação não catalítica de óleos vegetais usando um álcool em condições supercríticas é estudada, buscando agregar benefícios à qualidade do combustível e ao meio ambiente (DIASAKOU et al., 1998; KUSDIANA e SAKA, 2001a, b, c; DEMIRBAS, 2002; MADRAS et al., 2004; DEMIRBAS, 2007). De acordo com a literatura, reações de transesterificação com solventes pressurizados propiciam maior solubilidade entre possíveis fases heterogêneas (FANG et al., 2007; GLISIC et al., 2007), diminuindo as limitações de transporte entre as mesmas, proporcionando maiores taxas de reação, além de simplificar a purificação e separação dos produtos da reação, o que aumenta o interesse nas pesquisas referentes a esta metodologia (KUSDIANA e SAKA, 2001a). Além disso, foi mostrado que o método denominado de supercrítico é mais tolerante à presença de água e ácidos graxos livres que a técnica convencional utilizando catálise alcalina, e conseqüentemente mais tolerante a vários tipos de óleos vegetais (KUSDIANA e SAKA, 2004), podendo ser utilizadas matérias-primas de baixa qualidade, ou seja, baixo custo sem acarretar prejuízos à qualidade do produto gerado.

Geralmente, a maioria dos relatos na literatura utilizando a transesterificação supercrítica adota o modo batelada para produção de biodiesel. As perspectivas para a produção de biodiesel no Brasil são favoráveis, no entanto, em termos tecnológicos, a aplicação de um processo em modo contínuo é desejada, e neste contexto, o método supercrítico é eficiente no que diz respeito às elevadas conversões obtidas em baixos tempos de reação tornando atrativa a aplicação contínua, uma vez que possibilita melhor controle das variáveis de processo, garantindo um efetivo controle de qualidade dos produtos gerados; além da possibilidade de reciclo do álcool utilizado em excesso no processo com reaproveitamento energético e do projeto de reator em série e/ou reciclo visando maiores rendimentos de processo. Desse modo, a transesterificação supercrítica apresenta-se como uma alternativa aos métodos convencionais para produção de biodiesel.

Observando os aspectos de transesterificação enzimática utilizando solventes pressurizados 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, e ainda a inexistência de dados sobre reações de transesterificação enzimática em propano, Dalla Rosa et al. (2008), investigaram a produção de biodiesel a partir de óleo de soja e etanol em propano pressurizado, utilizando uma lipase comercial como

catalisador em sistema batelada, além de condições amenas de operação sem penalizar a conversão da reação.

Geralmente, o biodiesel é produzido em modo batelada. Como principais desvantagens deste processo destacam-se: o tempo total de processamento longo, custo do processo elevado e problemas no controle de qualidade do produto (HE et al., 2007).

O reator de coluna fixa de leito expandido é indicado para o uso de sistemas contínuos que contenham catalisador heterogêneo, uma vez que: (I) facilita o contato e a separação subsequente, (II) e a remoção contínua de inibidores; (III) permite o reuso da enzima sem a necessidade de uma separação prévia; (IV) permite o uso de grandes volumes de substratos de baixa solubilidade; (V) conduz a uma qualidade de produto mais consistente e a estabilidade da enzima é melhorada devido à facilidade de automatização e do controle; (VI) é apropriado para a produção em longo prazo e em escala industrial, diferentemente de um reator em batelada, onde os grânulos de enzimas (suportadas/imobilizadas) são susceptíveis à quebra por causa do estresse da agitação mecânica. Um aspecto bastante relevante trata-se da relação entre o substrato e a enzima que é muito maior em um reator de leito empacotado do que em reatores convencionais em batelada, resultando em um elevado desempenho da reação (LAUDANI et al., 2007).

A fim de minimizar desvantagens pela produção de biodiesel por alcoólise supercrítica de óleos vegetais, o presente trabalho propõe o estudo da estabilidade dos constituintes do meio reacional e a investigação de modificações na condução da alcoólise enzimática em meio pressurizado, objetivando o estabelecimento de condições amenas de operação e garantia de qualidade do produto gerado.

1.1 Objetivos

Nesse contexto, vislumbra-se como objetivo geral deste trabalho a produção de ésteres de ácidos graxos por transesterificação enzimática de óleos vegetais e etanol utilizando dióxido de carbono em condições pressurizada como solvente em um reator de leito expandido de modo contínuo.

Especificamente, os objetivos deste trabalho podem ser sumarizados em:

1. Montagem do aparato experimental para condução de reações enzimáticas de óleos vegetais em fluidos pressurizados em modo contínuo;

2. Checagem e validação do aparato experimental;
3. Estudo do efeito das variáveis do processo, como pressão, razão molar óleo:etanol, razão mássica solvente:óleo e quantidade de enzima sobre a produção de ésteres etílicos de soja em dióxido de carbono em modo contínuo.
4. Otimização da produção de ésteres neste sistema.

Para melhor apresentação deste trabalho, primeiramente no Capítulo 2 será apresentada uma breve revisão bibliográfica, com ênfase aos resultados apresentados na literatura referentes ao tema deste trabalho, procurando evidenciar e justificar os objetivos do mesmo. O Capítulo 3 apresenta os métodos analíticos utilizados no decorrer deste trabalho bem como a montagem do aparato experimental e o procedimento utilizado para realização dos experimentos. No Capítulo 4 e 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos na presente investigação e, como forma de finalizar o trabalho, as conclusões, bem como sugestões para trabalhos futuros. Maiores detalhes em relação às análises cromatográficas utilizadas para quantificação dos produtos da reação são encontrados no Apêndice A.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir é apresentada como forma de fundamentação teórica deste trabalho uma breve explanação sobre o contexto do biodiesel como alternativa ao diesel de petróleo e sua conjuntura no Brasil e no mundo, bem como um histórico sucinto sobre o tema e um breve apontamento dos óleos vegetais potenciais na produção de biodiesel. O presente capítulo contempla também alguns conceitos e métodos utilizados para produção de biodiesel. A leitura do estado da arte mostra a existência de trabalhos versando sobre o emprego de catalisadores homogêneos e heterogêneos (ácidos/bases, enzimas) e a produção de biodiesel em fluidos pressurizados, bem como informações de caráter fundamental para o escopo deste trabalho, a saber: formas de condução da reação de transesterificação com ênfase na utilização de fluidos em condições sub e supercríticas em reações catalíticas e informações disponíveis na literatura a respeito destas reações.

2.1 Biodiesel

O combustível diesel tem função essencial na economia industrial de um país pelo seu uso no transporte de bens industriais e agroindustriais. Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP) no ano de 2008, o óleo diesel representa 55,7% na matriz de combustíveis veiculares no Brasil. A elevada demanda de energia no mundo industrializado, assim como no setor doméstico, e os problemas de poluição, causados 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. Esta constatação estimulou o interesse recente na busca de fontes alternativas para combustíveis derivados do petróleo (MEHER et al., 2006).

Os combustíveis alternativos ao diesel devem ser técnica e economicamente competitivos, ambientalmente aceitáveis e facilmente disponíveis. 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 motores 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 depleção dos recursos não renováveis do mundo, proveram os incentivos para a busca de alternativas aos combustíveis convencionais a base de petróleo. Nesse contexto, retomaram-se os estudos referentes ao emprego de óleos vegetais

como combustíveis para motores 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).

Dentre os recursos renováveis para a produção de combustíveis alternativos, as gorduras e os óleos vegetais têm atraído atenção considerável como alternativa de uso no motor diesel. Entretanto, o uso direto dos óleos vegetais é geralmente considerado insatisfatório e pouco prático para o uso em motores de injeção direta dentre outros tipos de motores diesel (RATHORE e MADRAS, 2007).

Os óleos vegetais ocupam uma posição de grande importância no desenvolvimento de combustíveis alternativos, embora haja muitos problemas associados ao uso destes diretamente no motor diesel, principalmente devido ao fato dos óleos vegetais possuírem viscosidade elevada, baixa volatilidade e reatividade das cadeias de hidrocarbonetos insaturados (MEHER et al., 2006; BALAT e BALAT, 2010), o que pode acarretar (RAMOS, et al., 2003): i) depósitos de carbono nos motores devido à combustão incompleta; ii) obstrução nos filtros de óleo e bicos injetores; iii) diluição parcial do combustível no lubrificante; iv) alteração do comportamento da durabilidade do motor; e v) aumento de custos de manutenção.

Conseqüentemente, outras formas vêm sendo consideradas para reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, tais como a diluição, pirólise, microemulsificação e transesterificação. Entre todas essas alternativas, a transesterificação parece ser o melhor método, dado que as características físicas dos ácidos graxos e os alquil ésteres (biodiesel) são similares ao combustível diesel existente. A alcoólise dos óleos vegetais produz os alquil ésteres dos ácidos graxos. A viscosidade dos alquil ésteres é cerca de duas vezes maior do que o combustível diesel enquanto a do óleo vegetal puro é de 10 a 20 vezes maior que o biodiesel correspondente (RATHORE e MADRAS, 2007).

A diferença nas propriedades entre o diesel e os óleos vegetais resulta, principalmente, da diversidade molecular entre estes dois tipos de substâncias. O diesel é constituído de hidrocarbonetos com número médio de carbonos em torno de quatorze. Os óleos vegetais são triésteres da glicerina, ou seja, produtos naturais da condensação da glicerina com ácidos graxos, cujas cadeias laterais de ácidos graxos têm números de carbonos entre dez e dezoito, com valores médios de quatorze e dezoito, para os tipos de óleos mais abundantes (RAMOS, et al., 2003).

Altin et al. (2001) avaliaram o desempenho de motores a diesel, utilizando como combustível biodiesel derivado de óleos vegetais e constataram que o desempenho do motor não é afetado pela utilização de biocombustível oriundo das diversas fontes vegetais.

A maior razão para que óleos vegetais devam ser convertidos em alquil ésteres é a viscosidade cinemática que, no biodiesel é muito mais próxima daquela do diesel de petróleo. A alta viscosidade de matérias graxas não transesterificadas conduz a sérios problemas operacionais nos motores diesel, tais como a ocorrência de depósitos em várias partes do motor. Apesar de alguns tipos de motores e sistemas de injeção (“queimadores”) poder utilizar óleos vegetais não transesterificados, a maior parte dos motores hoje disponíveis exige a utilização de combustíveis com viscosidade inferior às dos óleos vegetais (KNOTHE et al., 2006).

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 lubricidade em comparação com o combustível derivado do petróleo. Em função dessas vantagens técnicas e ambientais, vislumbra-se o biodiesel como um combustível substituto ou pelo menos como aditivo ao diesel convencional, caso sua produção se viabilize economicamente (MACEDO e MACEDO, 2004; MAMURO et al., 2001).

2.2 Breve histórico do biodiesel

Em nível mundial, a ideia da utilização dos óleos vegetais como combustível foi retomada em escala comercial no início da década de 90, onde pressões a favor de um “desenvolvimento limpo” adquiriram mais força (Conferência das Nações Unidas, Rio de Janeiro, 1992). Tal aspecto reflete a preocupação com a preservação ambiental e com o previsível esgotamento das jazidas de petróleo. O desenvolvimento econômico calçado na utilização extensiva de óleos minerais é claramente insustentável e temporário. As emissões dos motores de veículos constituem uma das principais fontes dos gases causadores do “efeito estufa”, que resulta no aquecimento planetário e nas mudanças climáticas.

Os países que iniciaram o desenvolvimento da produção de biodiesel foram a Alemanha e a França. Atualmente, a Alemanha é responsável por mais da metade da produção Européia com um produto mais barato que o óleo diesel, já que há completa isenção de tributos em toda a cadeia produtiva deste biocombustível. Possui 30 unidades industriais voltadas à produção de biodiesel e cerca de 800 postos de venda, sendo a maior produtora de biodiesel do mundo, com uma capacidade de produção de 1 milhão de toneladas anuais (www.biodiesel.org).

De acordo com o estudo de Balat e Balat (2010), canola e girassol são utilizados na União Européia, o óleo de palma predomina na produção de biodiesel em países tropicais e o óleo de soja é a principal matéria-prima nos Estados Unidos. O óleo de canola tem 59% do total mundial das fontes de matérias-primas de biodiesel, seguido pela soja (25%), óleo de palma (10%), óleo de girassol (5%) e outros (1%).

Nos Estados Unidos, os estados de Minnessota e Carolina do Norte aprovaram uma lei que obriga a adição de 2% de biodiesel no óleo diesel desde 2002, porém a capacidade nacional instalada está entre 210 e 280 milhões de litros anuais, insuficiente para atender a prerrogativa legal. Gradativamente o país dá atenção aos biocombustíveis. O Programa Americano de Biodiesel é baseado em pequenos produtores e consumidores. Existem cerca de 15 empresas não especializadas que produzem biodiesel para uso próprio ou para a comercialização em todo o país (ALBUQUERQUE, 2006).

A Argentina iniciou seu programa de biodiesel com o estabelecimento de padrões para o combustível em 2001. O Decreto governamental 1396 de novembro de 2001 isenta de impostos por 10 anos toda a cadeia produtiva de biodiesel (ALBUQUERQUE, 2006).

No Brasil, o histórico de uso de óleos vegetais aponta que ao longo das últimas décadas houve tentativas para implementar o uso de óleos vegetais como combustíveis sucedâneos ao diesel derivado de petróleo (CÂMARA, 2006).

A primeira crise mundial do petróleo em 1973 motivou por parte do governo brasileiro à época, a ideia de desenvolver um Programa Nacional do Álcool Combustível (Pró-Álcool) a partir da sacarose extraída dos colmos de cana-de-açúcar. Ao final dos anos 70 uma segunda crise mundial do petróleo viabilizou o lançamento do Pró-Álcool, atualmente de sucesso estratégico, tecnológico e comercial consagrado (CÂMARA, 2006).

Paralelamente ao surgimento do Pró-Álcool cogitou-se sobre o lançamento de um programa paralelo com o intuito de se produzir outro combustível proveniente de fontes renováveis, porém, à base de matérias-primas oleaginosas visando à substituição parcial do diesel de petróleo, na matriz veicular de combustíveis (CÂMARA, 2006).

Na época, muitos estudos e projetos de pesquisas foram desenvolvidos em institutos e universidades brasileiras, com destaque para o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) do estado de São Paulo e para a Universidade Federal do Ceará, focando matérias-primas potenciais para a produção de biodiesel (PARENTE, 2003).

Entretanto, como efetiva política pública federal, o “PRÓÓLEO” permaneceu apenas como um projeto ou ideia para o futuro. Recentemente, o atual governo federal decidiu pelo

relançamento do antigo “Pró-Diesel”, denominando-o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (CÂMARA, 2006).

A partir de 24 de novembro de 2004, a ANP editou as Resoluções ANP nº41 e nº42, as quais estabeleceram, respectivamente, a obrigatoriedade de autorização da ANP para a atividade de produção do biodiesel, e as especificações técnicas para a produção e comercialização do biodiesel. Em 13 de janeiro de 2005, o Governo Federal promulgou a Lei do Biodiesel, que introduz o biodiesel na matriz energética brasileira e amplia o escopo de atuação da ANP, que passou a regulamentar também as atividades de produção e comercialização de biocombustíveis. Além disso, essa lei fixou percentuais mínimos obrigatórios de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado aos consumidores finais, determinando que o percentual de adição mínimo deverá ser de 2,0% (v/v) de 2008 a 2012, atingindo 5,0% (v/v) até 2013. Atualmente o Brasil conta com diversas empresas produtoras de biodiesel em todas as regiões do país, e sua produção vem aumentando consideravelmente ano a ano, conforme dados da ANP apresentados na Tabela 2.1 (www.anp.gov.br).

A produção de biodiesel cresceu 37,7%, em relação a 2008, em virtude das políticas de incentivo a este combustível, que viabilizaram o aumento de 3% para 4% do mesmo na mistura com o óleo diesel no ano de 2009 (Balanço Energético Nacional, 2010).

Tabela 2.1 - Capacidade nominal e produção de biodiesel B100 no Brasil.

Ano	Produção ¹ (m ³)
2005	736,2
2006	69.002
2007	404.329
2008	1.167.128
2009	1.608.053

Fonte: ANP/SRP, conforme a Portaria ANP nº 54/01.

2.3 Óleos potenciais na produção de biodiesel

Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, é de fundamental importância que se tenha uma visão geral acerca dos óleos vegetais potenciais na produção de biodiesel.

¹ A partir de 2008, a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória. Entre janeiro e junho de 2008, a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel foi de 2%, entre julho de 2008 e junho de 2009 foi de 3% e entre julho e dezembro de 2009 foi de 4%, exceto o óleo diesel para uso aquaviário que só deverá conter biodiesel a partir de 01/01/2011. Dados atualizados em 09 de setembro de 2010.

A escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel depende largamente de fatores geográficos. Dependendo da origem e da qualidade da matéria prima, mudanças no processo de produção podem ser necessárias. Apesar da riqueza e da diversidade de oleaginosas no país, o desenvolvimento tecnológico para elas é muito variável. Podem-se citar como principais oleaginosas o amendoim, algodão, mamona, soja, girassol, gergelim, canola e dendê. Como as principais oleaginosas com baixíssimo domínio tecnológico e/ou com exploração extrativista, têm-se: o pinhão-manso, macaúba, babaçu, etc. (O Futuro da Indústria: Biodiesel, 2006). No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor em óleo vegetal, produtividade e adaptação territorial (RAMOS et al., 2003). Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, é importante que se tenha uma visão geral da potencialidade dos óleos vegetais na produção de biodiesel, no âmbito nacional cada região apresenta potencialidade para diferentes tipos de oleaginosas.

Para cumprir as metas legais, seria preciso produzir cerca de 800 milhões de litros anuais de biodiesel em 2008, na fase inicial do Programa. Com a autorização das usinas, cuja solicitação tramita na Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a capacidade de produção do País seria suficiente para 2008, mas terá que aumentar significativamente até 2013 para atender à exigência legal de adicionar 5% de biodiesel ao petrodiesel (Plano Nacional de Agroenergia, 2006-2011).

Segundo o relatório publicado, em 20 de julho de 2010, pelo IBGE (www.ibge.gov.br), a Sétima Estimativa da Safra Nacional de Cereais, Leguminosas e Oleaginosas, indica uma produção da ordem de 146,4 milhões de toneladas, superior em 9,2% à obtida em 2009 (134,0 milhões de toneladas), e 0,3% superior à safra recorde de 2008 (146,0 milhões de toneladas). Comparativamente à área plantada em 2009, a atual estimativa apresenta decréscimo de 0,9%, situando-se em 46,8 milhões de hectares. As três principais culturas, que somadas representam 90,9% da produção de cereais, leguminosas e oleaginosas, o arroz, o milho e a soja, respondem por 83,1% da área plantada e registram, em relação ao ano anterior, variações de -5,9%, -6,5% e +7,2%, respectivamente. No que se refere à produção, o milho e a soja apresentam, nessa ordem, acréscimos de 4,4% e 19,8%, enquanto que o arroz decréscimo de 10,3%.

Entre as Grandes Regiões, esse volume da produção de cereais, leguminosas e oleaginosas, apresenta a seguinte distribuição: Região Sul, 63,1 milhões de toneladas; Centro-Oeste, 50,9 milhões de toneladas; Sudeste, 16,5 milhões de toneladas; Nordeste, 12,0 milhões de toneladas e Norte, 3,9 milhões de toneladas. Comparativamente à safra passada, houve decréscimo na produção apenas na Região Sudeste (4,0%), enquanto as demais mostram os

seguintes incrementos: Norte, 1,7%, Nordeste, 2,3%, Sul, 20,3% e Centro-Oeste, 4,3% (www.ibge.gov.br).

A respeito da cultura da soja, pode-se dizer que o Brasil apresenta tradição neste cultivo, além de uma boa estruturação nas fases da cadeia produtiva. A Figura 2.1 apresenta a área colhida e a produção de soja no Brasil.

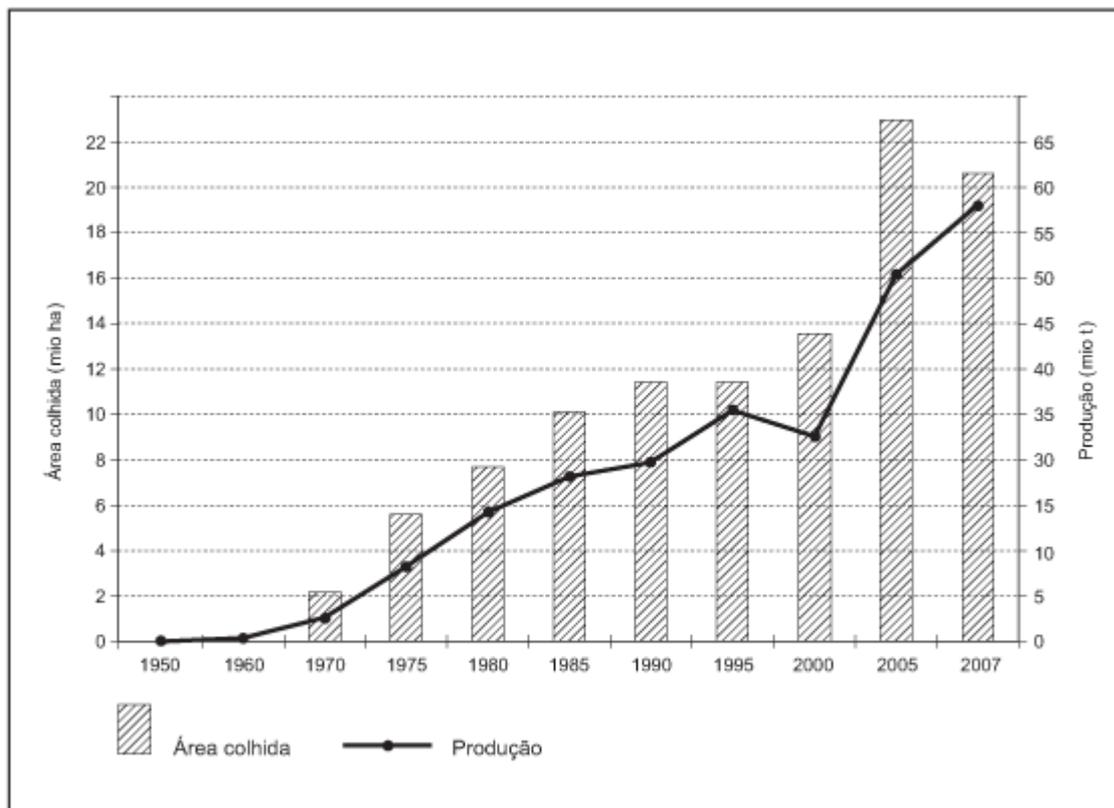


Figura 2.1 - Área colhida e produção de soja no Brasil.

Fonte: Banco de dados do IBGE.

Segundo dados da ABIOVE (Associação Brasileira de Óleos vegetais) em relação à produção brasileira de grãos e óleos vegetais no ano de 2008, pode-se observar a tendência do Brasil em adotar a soja como matéria-prima para produção de biodiesel, visto que a produção desta oleaginosa representa 95% da produção nacional de grãos e 90% da produção de óleos vegetais, apresentando o maior potencial para servir de modelo para o desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel. Além disso, a cadeia produtiva da soja no Brasil é bem estudada e desenvolvida, acreditando-se que a produção do óleo desta oleaginosa é necessária para atender a demanda brasileira de biodiesel. Em termos mundiais, o Brasil se encontra como o segundo maior produtor desta oleaginosa (www.conab.com.br).

As áreas ocupadas pela cultura de soja crescem significativamente a cada safra, principalmente na região centro-oeste e sul do país. Este crescimento também é observado quanto à produtividade da cultura da soja, consequência do melhoramento das espécies cultivadas bem como o emprego e desenvolvimento de tecnologias sobre o tema. Ressalta-se ainda que as regiões produtoras apresentam capacidade de esmagamento instalado e em funcionamento.

Paralelamente ao excedente de óleo de soja no mercado, verifica-se a crescente demanda de óleo para a produção de combustíveis alternativos, devido à necessidade emergente de implantação de unidades produtoras de biodiesel, a fim de que se cumpra o projeto de Lei 6983/2002, que institui a adição de biodiesel ao diesel. Diante deste cenário, o uso de óleo de soja para a produção de biodiesel torna-se a alternativa interessante no contexto nacional atual (Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011).

Um fato a ser considerado para baixar custos de fabricação e tornar o biodiesel competitivo, é a utilização de óleos degomados que apresentam menor custo que óleos refinados, além da possibilidade da reciclagem de óleos de fritura na produção deste biocombustível (AKGUN e IYSCAN, 2007). Em relação ao álcool a ser utilizado como agente de transesterificação, podem ser utilizados metanol, etanol, propanol ou butanol; sendo o metanol e etanol utilizados mais frequentemente (MACEDO e MACEDO, 2004). Em termos nacionais, o etanol destaca-se como forte candidato para ser utilizado como substrato, devido à grande disponibilidade deste produto e por ser obtido de fontes renováveis. Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), o Brasil está entre os principais produtores de etanol, com tecnologia de produção bem estabelecida, sendo a produção expressiva em praticamente todas as regiões do país.

Segundo a ANP, do ponto de vista econômico, a viabilidade do emprego do biodiesel está relacionada com o estabelecimento de um equilíbrio favorável na balança comercial brasileira, visto que o diesel é o derivado de petróleo mais consumido no Brasil, e que uma fração crescente desse produto vem sendo importada anualmente. A entrada do novo combustível no mercado permitiria a redução da importação do diesel, a criação de empregos no meio rural, por meio da agricultura familiar, e o incentivo no desenvolvimento da pesquisa e da indústria nacional de equipamentos. Em termos ambientais, a adoção do biodiesel, mesmo que de forma progressiva, ou seja, em adições de 2% a 5% no diesel de petróleo, resultará em uma redução significativa no padrão de emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa (RAMOS et al., 2003).

2.4 Biotransformação enzimática

Biocatalisadores ou catalisadores biológicos são proteínas cuja principal função é catalisar reações nos organismos. Os biocatalisadores são utilizados em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas se destacam: utilização de condições brandas; compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES e MACEDO, 2006).

Enzimas isoladas ou purificadas possuem um número de propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação, tais como alta eficiência catalítica (podem elevar significativamente a velocidade de uma reação); seletividade; atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70°C) e em pressão atmosférica. Com um mercado crescente e promissor, a maior parte da produção de enzimas ainda é destinada às indústrias de detergente e amido (CASTRO et al., 2004).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse, estão às reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídios por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa classe de enzima incluem fatos relacionados: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de cofatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem alta enantioseletividade (COSTA e AMORIN, 1999).

As lipases (EC 3.1.1.3) são biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. Um elevado número de compostos de alta e baixa massa molecular também pode ser substrato dessa enzima, tais como tioésteres, amidas, poli-hidroxiésteres/hidroxiácidos, etc. Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (VILLENEUVE et al., 2000).

Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Esses dois processos básicos podem ser combinados numa

sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados.

2.5 Técnicas de produção de biodiesel

Na atualidade, o biodiesel é produzido mundialmente em larga escala através da transesterificação de óleos vegetais empregando catalisadores químicos homogêneos (ácidos e bases). Porém, as exigências de remoção do catalisador e a quantidade excessiva de energia empregada são as principais desvantagens de tal processo químico (MAMURO et al., 2001).

Dentre os processos para produção de biodiesel, há uma intensa investigação na tentativa de superar tais desvantagens e permitir a utilização de óleos vegetais como matéria-prima, destacando-se, atualmente, as seguintes técnicas de produção de biodiesel: pirólise, microemulsificação e a transesterificação enzimática e supercrítica (FUKUDA et al., 2001). Dentre todas essas técnicas, a transesterificação parece ser a melhor escolha, como as características físicas dos ésteres de ácidos graxos são muito próximas às do óleo diesel e o processo é relativamente simples (BALAT e BALAT, 2010). Dentro desse contexto, neste trabalho será enfatizado o processo de transesterificação de óleos vegetais.

2.5.1 Transesterificação de óleos vegetais

Dentre as técnicas de produção de biodiesel, a conversão química (transesterificação) do óleo para seus ésteres graxos correspondentes é a mais promissora solução para o problema de alta viscosidade (BALAT e BALAT, 2010).

O surgimento da transesterificação pode ser 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).

De acordo com Meher et al. (2006), a transesterificação completa consiste na reação de um mol de triglicerídeo (TG) com três mols de álcool, resultando na produção de 3 mols de ésteres e 1 mol de glicerol (GL), conforme apresentada na Figura 2.2. A mesma é uma reação reversível que ocorre em três etapas reacionais com formação de produtos intermediários: diglicerídeos (DG) e monoglicerídeos (MG), como mostra a Figura 2.3.

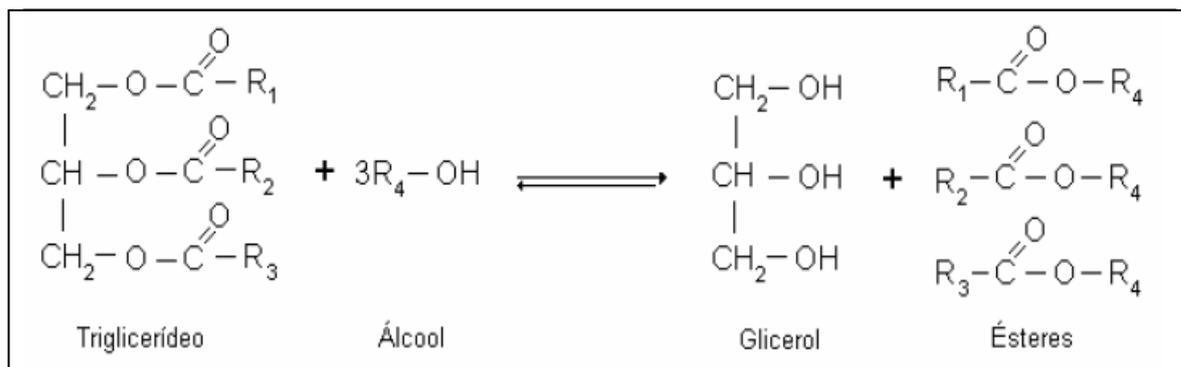


Figura 2.2 - Esquema geral da reação de transesterificação.

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; BALAT e BALAT, 2010), conforme representado na Figura 2.3.

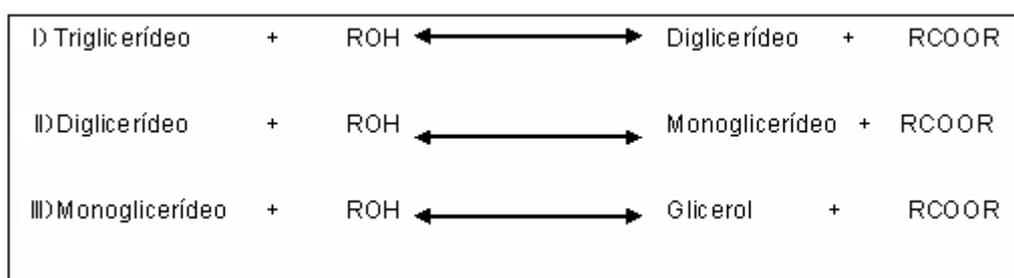


Figura 2.3 - Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais.

Os ésteres formados são relativos à conformação da cadeia do triglicerídeo. Por exemplo, uma trioleína poderá formar uma dioleína, uma monooleína ou etil oleato. Os triglicerídeos possuem cadeia de ácidos graxos de 8 a 20 átomos de carbono.

Alguns parâmetros são de fundamental importância na reação de transesterificação. No entanto, o efeito destas variáveis dependerá necessariamente da metodologia empregada (MARCHETTI et al., 2007), entre eles destacam-se:

- o teor de ácidos graxos livres nos óleos é fator importante na reação catalisada por bases (por exemplo, NaOH). O conteúdo de água dos reagentes deve ser muito baixo, pois pode alterar a rota da reação (hidrólise), o que aumentaria a viscosidade final do produto, dificultando o processo de separação (BALAT e BALAT, 2010).

- o efeito da razão molar entre os reagentes está associado ao tipo de catalisador e ao tipo de óleo que é empregado na reação. Na catálise alcalina, utilizando óleo de soja e

butanol, por exemplo, é requerida uma razão óleo:etanol de 1:6, enquanto para atingir a mesma conversão com catalisador ácido, necessita-se de uma razão molar óleo:etanol de 1:30 (FUKUDA et al., 2001).

- o tempo é outro parâmetro importante e que, em geral, tem efeito positivo sobre a conversão da reação. As reações são rápidas se a dispersão for boa e atingem conversões superiores a 95% em cerca de 30 minutos quando catalisadas por álcalis (OLIVEIRA et al., 2005a).

- o efeito da temperatura é variável em função do tipo de óleo e do catalisador empregado, situando, em geral, o valor ótimo próximo à temperatura normal de ebulição do álcool, no caso das reações catalisadas por ácidos e bases.

A catálise química homogênea (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; NOUREDDINI e ZHU, 1997; DARNOKO e CHERYAN, 2000; FACCIO, 2004; FERRARI et al., 2005; MARTINEZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005a; MARTINEZ et al., 2006; MENEGHETTI et al., 2006; LIMA et al., 2007). Geralmente, as indústrias utilizam hidróxido de sódio ou potássio ou metóxido de sódio ou potássio como catalisador, pois estes são relativamente baratos e bastante ativos para essa reação (BALAT e BALAT, 2010).

Nesse sentido, alguns estudos são encontrados na literatura a respeito dos fatores que influenciam a reação de produção de ésteres etílicos, utilizando NaOH como catalisador, dentre eles pode-se citar a investigação de Oliveira et al. (2005a), tendo encontrado conversão de até 96,2% para óleo de mamona. No emprego desse óleo, os parâmetros otimizados foram: temperatura de 70°C, 0,5 % (m/m) de catalisador e razão molar óleo:etanol de 1:3. Já para o emprego de óleo de soja nas reações de produção alcalina de ésteres, os mesmos autores reportam 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 utilizando catalisadores homogêneos, embora de concepção simples, rápido e com altos rendimentos apresenta vários inconvenientes, tais como: custos com separação do catalisador e 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 sabões que é uma reação indesejável, que ocorre devido ao consumo parcial do catalisador, diminuindo o rendimento da reação, além de tornar as etapas de separação e purificação dos produtos complexa (PINTO et al., 2005), devido à

restrição do método ao teor de água e ácidos graxos livres. O teor de água deve ser inferior a 0,06% (m/m) e de ácidos graxos livres menores que 0,5% (m/m) na transesterificação catalisada por bases (MA e HANNA, 1999).

A transesterificação com um catalisador homogêneo ácido é preferível para processos onde o triglicerídeo apresenta elevado nível de ácidos graxos livres, uma vez que o catalisador ácido pode promover a simultânea transesterificação do triglicerídeo e esterificação dos ácidos graxos livres para ésteres de ácidos graxos (PINNARAT e SAVAGE, 2008). O rendimento obtido é elevado (99%), mas a cinética de reação é lenta, sendo necessárias temperaturas elevadas (acima de 100°C) e mais de 24 horas para alcançar o referido rendimento (KNOTHE et al., 2005).

Visando superar os inconvenientes da transesterificação via catálise alcalina e ácida, Kusdiana e Saka (2001b) propuseram a produção de biodiesel a partir da transesterificação não catalítica de óleos vegetais 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 na faixa de 350-400°C e pressões de 450-650 bar, que não são atualmente viáveis no contexto industrial. Além disso, tais temperaturas e pressões elevadas conduzem a elevados custos iniciais de fabricação, processamento e de energia (SILVA et al., 2007).

2.5.2 Transesterificação enzimática

Embora a transesterificação química utilizando um processo de catálise alcalina ofereça níveis elevados de conversão de triglicerídeos aos seus correspondentes alquil ésteres de ácidos graxos em tempos curtos de reação, ela sofre várias desvantagens: energia intensiva, difícil recuperação do glicerol, o catalisador ácido ou alcalino tem de ser removido do produto, as águas residuais alcalinas requerem tratamento, e os ácidos graxos livres e água interferem na reação. Os catalisadores enzimáticos, como lipases, são efetivamente capazes de catalisar a transesterificação de triglicerídeos em sistemas aquosos ou não aquosos (BALAT e BALAT, 2010).

Em particular, deve notar-se que o subproduto glicerina, pode ser facilmente recuperado com o simples processo de separação. No entanto, os catalisadores enzimáticos são frequentemente mais caros do que os catalisadores químicos, de modo que a reciclagem e a reutilização são muitas vezes indispensáveis para a viabilidade comercial. Apesar de

atualmente o alto custo de produção da enzima ser o maior obstáculo à comercialização de processos catalisados por enzimas, os recentes avanços na tecnologia de enzimas, tais como o uso de solventes tolerante à lipases e lipases imobilizadas - sendo possível a reutilização do catalisador, têm sido realizados para desenvolver sistemas de baixo custo. Além disso, a possibilidade de utilização de lipases não comerciais, obtidas com custo relativamente baixo através do processamento de matéria-prima renovável, é uma importância adicional para a realização de estudos sobre a produção de catálise enzimática de biodiesel (BALAT e BALAT, 2010).

As reações catalisadas por enzimas têm a vantagem de reagir à temperatura próxima à ambiente. No entanto, um sistema catalisado por enzima exige um tempo maior de reação do que os outros sistemas. A alcoólise de triacilglicerol com lipase é considerada uma das reações mais eficazes para a produção de biodiesel (BALAT e BALAT, 2010).

Embora o processo de transesterificação catalisado por enzimas ainda não seja comercialmente desenvolvido, novos resultados foram reportados na literatura. Esses estudos consistem principalmente na otimização das condições de reação (temperatura, solvente, pH, razão molar óleo:álcool, o tipo de micro-organismo que produz a enzima, etc.) a fim de estabelecer as características adequadas para uma aplicação industrial. A síntese de biodiesel utilizando enzimas, tais como de *Candida antarctica* (WATANABE et al., 2001; DALLA ROSA et al., 2009a), *Candida rugosa* (SHAO et al., 2008), *Pseudomonas cepacia* (SHAH e GUPTA, 2007) e *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (BERNARDES et al., 2007), é bem abordado na literatura.

Van Gerpen et al. (2004), obtiveram na reação de transesterificação enzimática com óleo de soja em reator de modo batelada rendimento de 93,8% com a utilização de 4% (m/m) de *Candida antarctica* imobilizada em temperatura de 303K com tempo de reação de 48 horas. De forma semelhante, Reyes-Duarte et al. (2005), utilizaram óleo de girassol com 3% (m/m) de *Candida antarctica imobilizada* em temperatura de 318K com tempo de reação de 50 horas obtendo rendimento maior que 99%.

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 micro-organismos produtores 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, razão molar óleo:metanol de 1:7,5, 0,5 g de água e 0,475 g de lipase nas reações com metanol e 35°C, razão molar óleo:etanol de 1:15,2, 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 ciclos.

Ognjanovic et al. (2009) utilizaram metanol como acceptor acila para produção de biodiesel de óleo de girassol catalisada por lipase comercial imobilizada de *C. antarctica* (Novozym 435). Os autores utilizaram 3% do peso do óleo de enzima, a razão óleo:álcool de 1:3. Nessas condições, altos rendimentos (> 99%) foram obtidos em 318 K após 50 h de reação. Bernardes et al. (2007) investigaram a alcoólise enzimática de óleo de soja com metanol e etanol, utilizando uma lipase comercial imobilizada (Lipozyme RMIM). Nesse estudo, as melhores condições foram obtidas em um sistema de solvente com uma razão molar de óleo:etanol de 1:3, a temperatura de 323 K e concentração de enzima de 7,0% (m/m). Nessas condições, o rendimento do éster etílico obtido foi acerca de 60% após 4 h de reação.

Shimada et al. (2002) apresentaram uma revisão apontando para a dificuldade de reutilização de enzimas na transesterificação e observaram que um excesso de metanol inativa irreversivelmente a lipase. Os autores avaliaram a reação de metanólise realizada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada, e óleos residuais (normalmente óleos de fritura) em batelada de duas etapas, com variação das razões de enzima e metanol, obtendo conversões superiores a 90% em biodiesel.

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

Entre os diversos estudos que relatam a influência do álcool, o de Abigor et al. (2000) descreveu 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.

A respeito da aplicação 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 inclui 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 iônicas e de hidrogênio. 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).

Um estudo comparativo a respeito da utilização ou não de solventes foi realizado por Dossat et al. (2002) utilizando um sistema contendo o solvente n-hexano e um sistema sem solvente. Os autores utilizaram óleo de girassol como substrato e lipase imobilizada (Lipozyme IM) como catalisador. O meio reacional sem solvente foi caracterizado por uma conversão de 60% em éster do ácido oléico, enquanto 95% de conversão foram obtidas na presença de solvente.

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, 2005b). 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 elevada relação é, sem dúvida, uma das principais desvantagens do uso de enzimas como catalisadores da transesterificação de óleos vegetais em solventes orgânicos. Relações inferiores à apresentada ou mesmo a ausência de solvente têm se mostrado inadequadas à reação de transesterificação enzimática, possivelmente dado à significativa resistência à transferência de massa (DALLA ROSA et al., 2009a).

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

2.5.3 Produção de biodiesel em fluidos pressurizados

A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (MCHUGH e KRUKONIS, 1994).

Nessas condições, passa-se diretamente do estado gasoso a um estado denominado supercrítico, onde as propriedades do fluido são intermediárias entre as do estado líquido e as do gasoso. No caso do CO₂, o ponto crítico é alcançado sobre a curva líquido - gás à temperatura de 31,3°C e pressão aproximada de 73 bar.

A combinação das propriedades das fases líquida e vapor (Tabela 2.2) pode ser extremamente vantajosa para a utilização dos fluidos supercríticos (FSC) como solventes. O FSC nas vizinhanças do ponto crítico possui densidade próxima a do líquido (o que fortalece as suas propriedades de solvente). Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo de extração. Todas estas propriedades singulares fazem dos FSC um meio bastante interessante para reações químicas. Tais propriedades de transporte, semelhantes a dos gases, facilitam as taxas de transferência de massa entre reagentes e catalisadores. Em reações limitadas pela difusão, a cinética, em geral, será mais favorecida em fluidos supercríticos do que em solventes líquidos convencionais (MESSIANO et al., 1999).

Tabela 2.2 - Propriedades físicas e de transporte associadas a diferentes estados do fluido.

Propriedades	Líquido	Supercrítico	Gás
Densidade (g/cm ³)	1	0,2 - 0,9	0,001
Viscosidade (cP)	0,5 – 1	0,05 - 0,1	0,01
Difusividade (cm ² /s)	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻¹

Outras vantagens adicionais do uso de FSC como meio para reações químicas é que suas propriedades são sensíveis a variações de pressão e temperatura próximas ao ponto crítico. Segundo Mchugh e Krukoni (1994), o poder solvente dos fluidos supercríticos está relacionado principalmente à sua densidade.

O uso de fluidos comprimidos como solventes para reações de catálise enzimática, foram investigados primeiramente por Randolph et al. (1985), Hammond et al. (1985) e Nakamura et al. (1985), é uma área de pesquisa muito fértil que teve grande destaque na década de 80.

Marchetti e Errazu (2008) avaliaram diferentes processos para produção de biodiesel utilizando óleos vegetais com alto teor de ácidos graxos livres, inclusive o método supercrítico. Os autores relatam que o método supercrítico é uma alternativa do ponto de vista

tecnológico, no entanto, do ponto de vista econômico necessita de alto consumo de energia nas etapas do processo, porém ocorre menor geração de efluentes e é relatada a alta qualidade da glicerina gerada como subproduto.

Dessa 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 que conduzem a reação. 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).

Dentre os diversos fluidos supercríticos, o dióxido de carbono tem sido apontado como o mais adequado, pois as escalas de temperatura usadas no emprego deste solvente são compatíveis com o uso das enzimas como catalisadores. Além disso, ele é o solvente mais aceito para aplicações industriais, uma vez que oferece algumas vantagens sobre os solventes orgânicos, quais sejam: substituição total dos solventes orgânicos, atoxicidade, não inflamabilidade, baixo custo, facilidade de recuperação do produto, maior difusividade, resistência reduzida à transferência de massa e elevadas taxas de reações. Além disso, o poder de diluição do dióxido de carbono facilita uma separação relativa de reagentes após a reação (catalisadores e produtos), enquanto que uma eventual separação do produto da reação com solvente orgânico é caro e demorado, portanto, não adequado para a produção industrial (LAUDANI et al., 2007).

A alcoólise de óleos vegetais em CO₂ supercrítico a partir do óleo de milho e a utilização do glicerol (subproduto da reação) para a obtenção de mono e diglicerídeos foi relatada por King et al. (1995).

Taxas de reação em CO₂ supercrítico e em solvente orgânico têm sido comparadas por alguns autores (MARTY et al., 1990; KAMAT et al., 1992; PASTA et al., 1989). No caso de reações de alcoólise de óleos vegetais em solventes orgânicos, poucos resultados são encontrados na literatura, dentre eles cita-se o de Oliveira e Oliveira (2001), que comparam os resultados obtidos pela alcoólise de óleo de palma em dióxido de carbono supercrítico e n-hexano, fazendo uso de duas enzimas comerciais, obtendo conversões de 77,5% com a enzima Lipozyme IM e 58,3% com a enzima Novozym 435 para o sistema contendo n-hexano numa razão mássica de solvente:substrato de 40:1. Os resultados obtidos neste estudo para as reações utilizando dióxido de carbono supercrítico foram de até 26,4% de conversão utilizando a enzima Lipozyme IM e até 63,2% de conversão utilizando a enzima Novozym 435 para o sistema contendo CO₂ numa razão mássica de substrato:solvente de 1:2.

Em outro estudo, Oliveira e Oliveira (2000) otimizaram as condições de produção de ésteres de óleo de palma e obtiveram conversões de 100% para as reações catalisadas pela Novozym 435 e conversões de 31% com a enzima Lipozyme IM.

Das reações que fazem uso do dióxido de carbono como solvente, pode-se apontar que uma limitação de tal técnica reside na não polaridade deste e sua característica hidrofílica. Dessa forma, para reações que utilizam óleos vegetais como substrato, torna-se interessante o emprego de solventes que tenham em suas propriedades a capacidade de dissolver compostos hidrofóbicos, como é o caso do propano.

Acerca das reações de biocatálise em meio supercrítico, alguns estudos prévios vêm a corroborar para o desenvolvimento destas reações, e estes, quando antecedem as reações, conduzem a uma visão dos parâmetros que envolvem tais reações e as quais as faixas que merecem ser investigadas.

Em se tratando de biodiesel, o comportamento de fases a alta pressão de óleos vegetais em solventes pressurizados é um aspecto importante. Lanza (2004) investigou o comportamento de fases a alta pressão do óleo de soja em solventes pressurizados, com o propano e dióxido de carbono. Os resultados obtidos mostraram que o tipo de equilíbrio observado depende do sistema e que para o sistema óleo de soja - propano foi identificado uma ampla região em composição contendo uma única fase, com pressões de transição inferiores a 40 bar em toda a faixa composicional, indicando um meio propício para as reações de transesterificação enzimática. Por outro lado, o estudo do sistema dióxido de carbono - óleo de soja revelou a existência de elevadas pressões de transição de fase, segundo Ndiaye et al. (2006a), conforme apresentado na Figura 2.4.

Cao et al. (2005) relataram a produção de 98% do rendimento em ésteres metílicos através da transesterificação não-enzimática do óleo de soja com metanol supercrítico e propano como co-solvente, em 250 mL de volume do reator de modo batelada com agitador. Além disso, relatam que a aplicação da técnica de fluido supercrítico proporciona a diminuição dos parâmetros operacionais (temperatura em 280°C, pressão em 128 bar, razão molar óleo:metanol de 1:24 e tempo de reação de 10 minutos), favorecendo a diminuição dos custos de produção. Han et al. (2005) obtiveram o mesmo resultado utilizando CO₂ como co-solvente em 143 bar de pressão.

Wang et al. (2007) atingiram 97% de rendimento em ésteres metílicos na transesterificação do óleo bruto de canola usando 0,5% (m/v) de NaOH como catalisador em metanol supercrítico e subcrítico em um volume de 200 mL do reator de modo batelada com agitador. Além disso, reportam que a técnica de fluido supercrítico possibilita a diminuição

dos parâmetros operacionais (temperatura em 250°C, pressão em 60 bar, razão molar óleo:metanol de 1:24 e tempo de reação de 10 minutos).

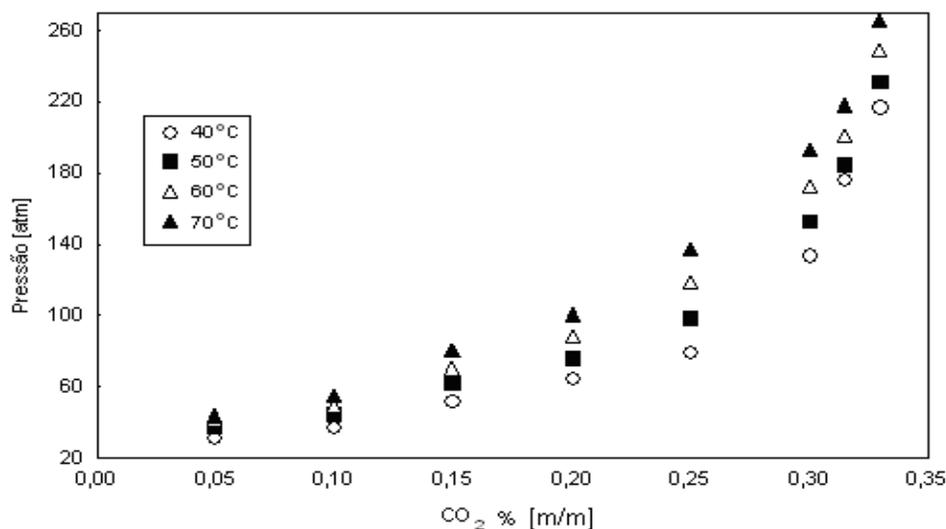


Figura 2.4 - Diagrama P-T para o sistema CO₂-óleo de soja para diferentes frações mássicas (w) de CO₂ (Ndiaye et al., 2006a).

2.5.4 Produção de biodiesel em modo contínuo

A maioria da produção de biodiesel através de transesterificação supercrítica baseia-se no processo em modo batelada. À medida que o método de metanol supercrítico exige uma temperatura elevada de 350°C e pressão de 450 bar. Desse modo, teria maiores benefícios se operar em condições de produção contínua. Alguns sistemas de produção contínua foram desenvolvidos para processos de transesterificação catalítica, cujo resultaram em aumento na eficiência da produção e qualidade do biodiesel (HARVEY et al., 2009).

Recentemente, He et al. (2007a) relataram um processo de produção contínua para conversão de óleo de soja em biodiesel através do método de metanol supercrítico. Os experimentos foram operados em um reator de tubo de 75 ml que forneceu fluxo contínuo de metanol e óleo de soja em razão molar de 1:6 a 1:80. Após a reação, o produto foi resfriado à temperatura ambiente, e, em seguida, os ésteres metílicos bruto foram obtidos em um recipiente separado. Semelhante ao processo supercrítico em modo batelada observou-se que o aumento da razão molar, pressão e temperatura da reação provocam o rendimento da produção de forma eficaz.

Vários trabalhos têm sido relatados na literatura para a produção de biodiesel em modo contínuo (LAUDANI et al., 2007; CHEN et al., 2009). Entretanto, nenhum deles

ênfatiza o uso do processo em modo contínuo em leito expandido. Dessa forma, optou-se em enfatizar o conhecimento teórico a partir do reator de leito empacotado (PBR), bem como de reatores em modo batelada. A única diferença entre os métodos é o catalisador estar livre ou fixado no leito do reator, como o próprio nome sugere.

Entre os reatores contínuos, biorreatores de leito empacotado têm sido amplamente estudados para uso em aplicações em escala industrial. O reator de leito empacotado (PBR) é um dos mais comumente empregados para o contato de sólido-líquido em catálise heterogênea, por que: (i) facilita o contato e posterior separação; (ii) remoção contínua de substâncias inibidoras; (iii) permite a reutilização da enzima sem a necessidade de uma separação prévia; (iv) permite lidar com substratos de baixa solubilidade, utilizando grandes volumes contendo baixas concentrações de substrato; (v) eleva a qualidade do produto consistente e estabilidade da enzima, melhorados devido à facilidade de automatização e de controle; (vi) é adequado para a produção de longo prazo e em escala industrial, diferentemente de um reator tanque agitado, onde grânulos de enzimas são susceptíveis de serem quebrados por causa da tensão de cisalhamento mecânico; (vii) é mais rentável que a operação em batelada.

A razão entre substrato e enzima está muito menor em um PBR do que em reatores em batelada convencional, o que resulta em maior desempenho de reação. Um reator tanque agitado tem de ser esvaziado e enchido novamente no fim de cada batelada, conhecido como tempo de manutenção, levando à inatividade e a diminuição de produtividade e, além disso, os produtos de cada batelada podem sofrer variações. Assim, um PBR, comparado ao processo de batelada, propicia um produto mais puro, reproduzível com uma produtividade maior a partir de uma quantia fixa de enzima (LAUDANI et al., 2007).

Anistescu et al. (2008) obtiveram conversão de 98% de ésteres metílicos através da transesterificação do óleo de soja em metanol supercrítico em um reator tubular com volume de 7 ml em temperatura de 400°C, pressão de 200 bar, com razão molar óleo:metanol de 1:6 com tempo de reação de 1,6 minutos. De forma similar, Wang et al. (2008) relataram conversão de 96% de ésteres metílicos em temperatura de 310°C, pressão 130 bar, razão molar óleo:metanol de 1:40 com tempo de reação de 12 minutos. Marulanda et al. (2009) obtiveram conversão de 99% de ésteres metílicos através da transesterificação a partir da gordura de frango em um reator tubular com volume de 2 ml, em temperatura de 400°C, pressão de 300 bar, razão molar óleo:metanol de 1:9 com tempo de reação de 6 minutos.

2.6 Considerações parciais

A literatura aponta que o Brasil possui tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecida. Avalia-se que paralelo ao excedente do óleo de soja no mercado, verifica-se a crescente demanda de óleos vegetais para a produção de combustíveis alternativos, devido à necessidade emergente de implantação de unidades produtoras de biodiesel. Diante desse 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 muitas vantagens em relação aos catalisadores químicos homogêneos. Vários pesquisadores relatam o uso de enzimas aplicadas às reações de transesterificação em solventes orgânicos, processo esse 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 refere-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.

Diante desse cenário, e da relevância científica e tecnológica, nos círculos acadêmicos e industriais, é que se alicerça o presente trabalho, que refere-se à produção de biodiesel a partir do óleo vegetal de soja em reator de leito expandido em modo contínuo utilizando lipase como catalisador em meio pressurizado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais, a descrição das metodologias e os procedimentos experimentais adotados para a obtenção dos dados. Em seguida, uma explanação sobre a metodologia utilizada para análise quantitativa dos produtos gerados pela alcoólise supercrítica enzimática de óleos vegetais, bem como o planejamento experimental realizado serão também apresentados.

3.1 Materiais

Para a realização das reações foi utilizado óleo de soja refinado comercial marca SOYA, álcool etílico Merck (99,9% de pureza), lipase *Candida antarctica* (Novozym 435), com atividade inicial de 59 U/g, imobilizada em resina de éster metacrílico, gentilmente cedidas pela Intecnia S.A., Erechim - RS, Brasil.

O solvente utilizado foi o dióxido de carbono de procedência White Martins S.A. (com 99,5% pureza, fase líquida). Na Tabela 3.1 são apresentadas as propriedades termofísicas do etanol e do óleo de soja utilizados como substratos e do dióxido de carbono empregado como solvente.

Para as análises cromatográficas foi utilizado como padrão interno o ácido heptadecanoato de metila (C17:0), de procedência Sigma-Aldrich. Para o preparo das soluções foi utilizado como solvente n-heptano marca Merck, de pureza 99,9%, cuja análise segue a Norma Européia EN14103.

Tabela 3.1 – Propriedades termofísicas das substâncias utilizadas.

Substância	Peso molecular (g/gmol)	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (MPA)	Densidade (g/cm ³)
Etanol	^a 46,10	^a 240,80	^a 6,14	^b 0,7900
Óleo de Soja	^c 871,91	^c 969,82	^c 0,33	^d 0,8825
CO ₂	^a 44,00	^a 31,05	^a 7,32	^a 0,22

Fonte: ^aReid et al. (1987); ^bEspecificado pelo fabricante à temperatura de 25°C; ^cNdiaye (2004); ^dBrock (2006).

3.2 Métodos

3.2.1 Descrição do aparato experimental

O sistema experimental utilizado neste trabalho foi baseado no trabalho de Dalla Rosa et al. (2008). As principais modificações referem-se à adição de uma bomba de alta pressão para alimentação de CO₂ como solvente, um banho termostático e o reator de leito expandido. O processo como um todo, consistia na alimentação do solvente de CO₂ adicionado com o substrato (mistura reacional de óleo de soja com álcool etílico) num reator de leito expandido, com uso de enzima, em diferentes condições de vazão e pressão. A Figura 3.1 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

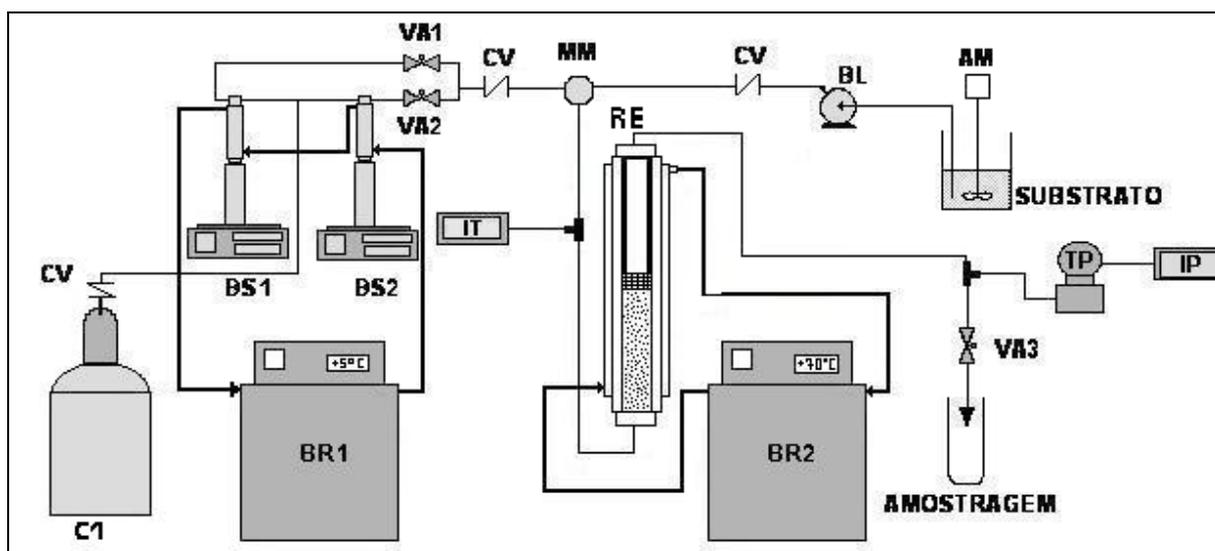


Figura 3.1 - Diagrama esquemático do aparato experimental: (C1) cilindro de CO₂, (CV) “check valve”, (BS1 e BS2) bombas de alta pressão, (BR1 e BR2) banhos termostáticos, (VA1 e VA2) válvulas de alimentação do reator, (RE) reator expandido, (AM) agitador mecânico, (BL) bomba de líquidos, (MM) micromisturador, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (TP) sensor de pressão, (VA3) válvula de amostragem.

onde:

C1 – Cilindro de gás, com CO₂ liquefeito sob alta pressão, utilizado como solvente nas reações de transesterificação.

CV - Válvula de Via Única (check-valve, Marca HIP, Modelo 15-41 AF2). A função desta válvula é permitir o fluxo em apenas um sentido.

BS1 e BS2 - Bombas Seringa ISCO da SÉRIE-D (MODEL 500D - Marca ISCO) de alta pressão. As bombas operam em modo de fluxo constante (0,01 mL/min a 204 mL/min) ou pressão constante (0 a 258,6 bar), com capacidade de 500 ml de gás liquefeito. A bomba é para deslocar o CO₂ até a zona reacional e determinar a pressão no sistema reacional.

BR1 - Banho de Recirculação (Marca NOVA ÉTICA, Modelo 521-2D). Utilizado para manter a temperatura constante no cilindro da bomba.

BR2 - Banho de Recirculação (Marca NOVA ÉTICA, Modelo 521-2D). Utilizado para manter a temperatura constante no reator de coluna encamisado.

VA1 e VA2 - Válvulas métricas tipo agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação de até 1034 bar). As válvulas servem para alimentação do solvente ao reator de coluna encamisado.

RE – reator expandido de aço inoxidável.

AM - Agitador mecânico (Marca Fisatom, Modelo 712). Inserido no frasco contendo o substrato (mistura reacional constituída de óleo de soja e álcool etílico em proporções molares determinadas previamente para cada condição reacional), para manter sob agitação constante durante o período da reação.

BL - Bomba de alta pressão de líquidos (HPLC) Digital Série III (Marca Acuflo). Este tipo de bomba opera com vazão constante (0,1 mL/min a 10 mL/min) e pressão de trabalho de 0 a 414 bar. A bomba desloca o substrato para a zona de reação.

MM – Micromisturador de aço inoxidável. Misturar o substrato com o CO₂.

IT – Indicador de temperatura (marca NOVUS, Modelo N1500). Acoplado na entrada do reator, por conexão tipo T (marca Swagelok), com o termopar de isolamento mineral tipo K (Marca Salcas).

IP - indicador de pressão (marca NOVUS, Modelo N1500).

TP - Sensor de pressão, da marca SMAR (Modelo A5), que atua na faixa de 30 a 3600 psi. O sensor de pressão está conectado na saída do sistema reacional por uma conexão do tipo T (Marca Swagelok), a fim de transmitir a pressão da linha para o **IP**.

VA3 – Válvulas métricas tipo agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação de até 1034 bar). A válvula propicia o controle do fluxo da reação, a pressão do sistema, amostragem e a despressurização do sistema.

3.2.2 Descrição do reator de leito expandido

A partir da Figura 3.1 observa-se que o reator de leito expandido é onde ocorre a reação. Dessa forma, para facilitar a compreensão do procedimento experimental, serão visualizados nas Figuras 3.2 e 3.3, o diagrama esquemático do reator e os seus componentes internos, respectivamente.

A coluna encamisada é constituída de aço inoxidável fabricada pela empresa MIP – Tecnologia em Usinagem, Erechim-RS, Brasil. A Figura 3.2 apresenta o reator de leito expandido. Com relação ao espaço interno da coluna (linha tracejada), denominar-se-á de Cilindro Interno o local onde se procede a conversão do substrato em produto. Possui 62,2 cm de altura e 2,44 cm de diâmetro, totalizando um volume de 290,83 cm³.

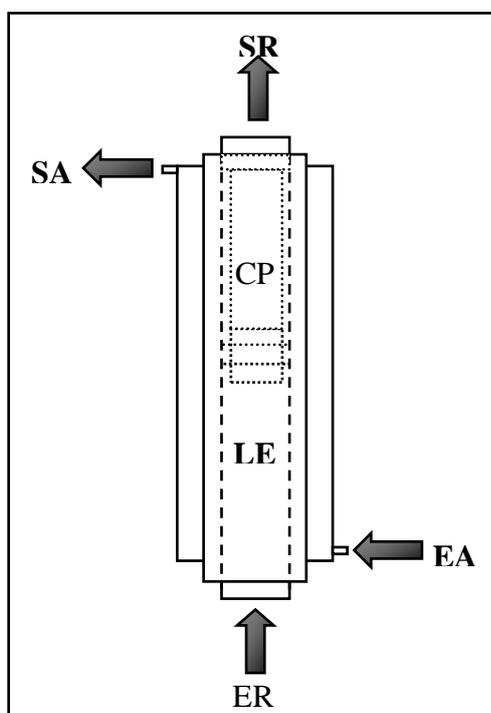


Figura 3.2 – Diagrama esquemático do reator de coluna encamisado de leito expandido: (ER) entrada do reator, (SR) saída do reator, (EA) entrada de água na camisa, (SA) saída de água da camisa, (LE) leito expandido, (CP) condutor de produto.

Por sua vez, o volume total do cilindro interno distribui - se em: Leito Expandido (LE) e Condutor de Produto (CP), na parte inferior e superior, respectivamente. O Leito Expandido (LE) é o local onde se deposita a quantidade de enzima. O LE possui altura de 45,2 cm totalizando um volume de 211,34 cm³.

Através da passagem do fluxo de alimentação na ER, provocando uma expansão e agitação do catalisador no LE, proporcionando uma maior eficiência na interação com o substrato. Para evitar o arraste da lipase pelo fluxo de solvente mais substrato e permitir a passagem de ésteres etílicos, o Condutor de Produto (CP) foi introduzido pela extremidade superior do reator. O CP é constituído pelas peças mostradas na Figura 3.3.

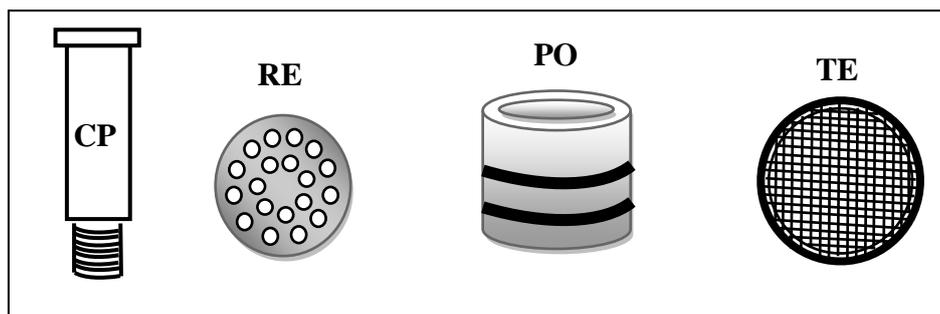


Figura 3.3 - Diagrama esquemático do Condutor de Produto (CP) e seus constituintes: Retentor (RE), polca (PO) e tela (TE).

O CP é formado de politetrafluoretileno (PTFE), um polímero resistente e leve. Possui 16,5 cm de altura e diâmetro interno de 1,63 cm. Com a junção da polca (PO), através do rosqueamento nas estrias localizadas na parte inferior, o conjunto resulta em uma altura de 17 cm.

Este artifício de rosqueamento da polca tem como objetivo de formar um conjunto de contenção de enzima. O mecanismo funciona da seguinte forma: A polca de aço inox (PO), com 3 cm de altura e 2,41 cm de diâmetro, possui soldada em seu interior na parte inferior a tela (TE), de aço inox, com a função de impedir a passagem das enzimas. Com o intuito de aumentar essa eficiência, coloca-se um chumaço de algodão em seu interior ficando compactado com o retentor (RE), de aço inox, de 1,98 cm de diâmetro e 0,36 cm de altura, semelhante à Figura 3.3. Após a formação desse conjunto (Re, algodão, PO), rosqueava-se ao CP, provocando maior compressão do algodão e tornando-o mais denso.

Para diminuir o risco da passagem de enzimas ou até mesmo do produto em torno do CP, a PO acoplada ao CP era constituída em seu exterior de duas gaxetas (borrachas). Essas, pressionadas pela parede do CI, bloqueavam a passagem de qualquer fluxo.

3.2.3 Montagem do aparato experimental

A montagem do aparato experimental consistiu nas seguintes etapas: primeiramente o banho termostático (BR1), conectado às bombas de alta pressão (BS1 e BS2), era acionado na temperatura de 5°C. Após atingir a temperatura estabelecida, o cilindro de CO₂ (C1) era aberto, passando pela “check valve”, e adicionava-se uma carga nas BS1 e BS2. Essa operação tinha como função liquefazer o gás, necessitando de cerca de 2 horas. Durante esse tempo, executavam-se as seguintes etapas:

Na segunda etapa, a enzima era ativada. Com auxílio da balança (marca Gibertini, modelo E154), quantificava a massa de enzima conforme apresentado na Tabela 3.2. Logo em seguida, colocava - se na estufa (marca Quimis, Modelo Q819V2), a 40°C por 1 hora.

Na terceira etapa era formada a mistura reacional. O álcool etílico e óleo de soja eram pesados na balança (marca Gibertini, modelo E154), conforme apresentado na Tabela 3.2. O agitador mecânico (AM), que aplicava a rotação de 700 rpm, era acoplado no frasco contendo o substrato para provocar a homogeneização.

Na quarta etapa, configurava-se a vazão da bomba líquida (BL). Após conectar a BL com a mistura reacional através de um tubo, bombeava-se o substrato até a entrada do reator (ER), ainda não conectado, para verificar se havia obstrução da linha. E por fim, realizava-se a purga para retirada do ar na linha.

Na quinta etapa, acionava-se o banho termostático (BR2) para atingir a temperatura de 70°C para proceder a reação, necessitando aproximadamente de 20 minutos.

Na sexta etapa, acoplavam-se as extremidades do reator ao sistema. Conectava-se a linha de alimentação à entrada do reator (ER). Por outra extremidade, na saída do reator (SR), ainda aberta, depositava-se a enzima, com auxílio de um funil de vidro. Em seguida, introduzia-se o Condutor de Produto (CP), já com o Redutor, Algodão e a Polca, como foram relatados no item 3.2.1. Para finalizar a instalação do reator de leito expandido, acoplava-se o sistema a SR, para conduzir o produto até a válvula de amostragem (VA3).

3.2.4 Procedimento experimental

Após realizar os procedimentos descritos no item 3.2.3 iniciava-se as seguintes etapas:

Primeiramente realizava-se a pressurização do reator. Após fechar o C1 para evitar o risco de acidentes, acionava-se lentamente a elevação da pressão das BS1 e BS2 através dos seus respectivos controladores. Após estabilizar a pressão desejada a VA1 era lentamente

aberta para provocar a vazão do solvente ao reator. Paralelamente, acionava-se a BL para promover a interação do solvente com o substrato através do MM, conseqüentemente, promovia-se a razão mássica substrato:óleo como previamente determinado em cada experimento. Conforme as interações das variáveis em cada experimento, a etapa de pressurização do reator demandava em média de 20 minutos. Dessa forma, essa etapa não é considerada e representada nas figuras no Capítulo 4.

Na segunda etapa inicia-se a reação. Após o reator pressurizado e a vazão do solvente estagnada, abria-se totalmente a VA1 e em seguida, lentamente a VA3 com intuito de promover a vazão desejada do sistema, que era visualizado pelo controlador da bomba em uso. A partir desse instante, iniciava-se a contagem do tempo de reação considerando o tempo zero da mesma, conforme é representado no minuto zero das figuras no Capítulo 4.

Quando ocorria o fim do solvente contido na BS1, abria-se a VA2 e posteriormente fechava-se a VA1. Dessa forma, utilizava-se o solvente contido na BS2 para manter a alimentação constante. Através desse artifício, o tempo total de reação que poderia ser realizado era em torno de 180 minutos.

A coleta de amostra era realizada em intervalos de 30 minutos. Eram coletados em frascos, previamente identificados, que em seguida colocados na estufa para a evaporação do etanol não reagido, até peso constante.

Ao término da reação, realizava-se a limpeza das enzimas e do reator através do bombeamento de n-hexano durante 5 minutos numa vazão de 10 mL/min, mantendo a VA3 aberta. Cessava a alimentação do solvente e provocava a despressurização total do sistema.

O reator era aberto com desconexão da linha e procedia-se a limpeza do mesmo.

3.2.5 Quantificação de ésteres por cromatografia gasosa

Após coletar as amostras nos frascos, eram colocados na estufa a 65°C até peso constante, provocando a evaporação do etanol não reagido. Uma alíquota de 0,250 g da amostra era transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com solvente de n-heptano. Após a agitação, transferia-se uma alíquota de 50 µL dessa solução para um balão volumétrico de 1 mL, a fim de obter uma concentração de 1000 mg/L e adicionava-se 50 µL de padrão interno de heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 250 mg/L e completava-se o volume com n-heptano. A amostra era agitada e transferida para os vials, dando seqüência à análise cromatográfica.

A solução era então injetada (1 μ L) em duplicata em um cromatógrafo gasoso nas condições cromatográficas conforme EN 14103 (2001), descritas no Apêndice A, possibilitando a determinação do percentual de ésteres etílicos nas amostras e conseqüentemente o valor do rendimento da reação, cujos cálculos também são descritos no Apêndice A.

3.2.6 Avaliação da cinética reacional para produção de ésteres etílicos

Com a finalidade de avaliar a cinética da produção de ésteres etílicos ao longo do tempo, e por se tratar de um processo contínuo, estipulou-se coletar as amostras durante 10 minutos em intervalos de 30 minutos (30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos). Como o sistema é um processo contínuo não houve necessidade de coleta em duplicata.

3.2.7 Estudo das variáveis

O estudo das variáveis tem como intuito de avaliar o efeito da pressão, quantidade de enzima, razão molar óleo:etanol e o efeito da razão solvente:substrato sobre a transesterificação de óleo de soja. Optou-se fixar a temperatura dos experimentos em 70°C, pois, essa é a faixa ótima de operação da Novozym 435 (DALLA ROSA et al., 2008).

He et al. (2007) citam que a pressão exerce efeito positivo no rendimento da reação contínua não catalítica de óleo de soja em metanol. A faixa de estudo do efeito da variável pressão neste trabalho foi estabelecida em 100, 148,22 e 200 bar.

A quantidade de enzima estudada foi determinada através da proporção da massa de enzima utilizada com o espaço existente no Leito Expandido (LE) do reator, sendo assim, determinado em 10, 30, 40 e 70 grama de catalisador.

A razão molar (óleo:álcool) apresenta influência marcante no rendimento em ésteres em reações de transesterificação. A estequiometria da reação indica uma razão mínima de 1:3 (óleo:álcool), porém a utilização dessa razão desfavorece o rendimento da reação, considerando que o excesso de álcool desloca o equilíbrio da reação no sentido de favorecer a formação de produtos. Neste trabalho estudou-se o efeito da razão molar de óleo de soja para álcool etílico na faixa de 1:9, 1:15 e 1:21.

Nesse sentido, as condições experimentais que foram definidas podem ser observadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Faixa de estudo das variáveis de processo investigadas neste trabalho

Variável	Faixa
Pressão (bar)	100; 148,22; 200
Massa de enzima (g)	10; 30; 40; 70
Razão molar (álcool etílico:óleo)	1:9; 1:15; 1:21
Razão mássica (substrato:solvente)	1:1; 1:2; 1:3

Para reproduzir as razões das variáveis no aparato experimental, como apresentado na Tabela 3.2, era controlada a vazão de dióxido de carbono supercrítico em mL por minutos, através do controlador da bomba de alta pressão, e a vazão de substrato em mL por minuto, através da bomba de líquido conforme pode ser observado no Apêndice B.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foi investigada a reação de produção enzimática de biodiesel em leito expandido em modo contínuo a partir de óleo de soja e etanol empregando dióxido de carbono supercrítico como solvente. Os efeitos da pressão, razão molar óleo:etanol, razão mássica substrato:solvente e quantidade de enzima foram avaliados em termos de rendimento em ésteres etílicos.

Os resultados que serão apresentados neste capítulo foram obtidos através do emprego das metodologias descritas no capítulo anterior. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com duplicata de injeção. Os resultados referentes à reação são apresentadas em termos de rendimento em ésteres etílicos em função do tempo de reação. Também para ajudar na análise dos resultados realizou-se o cálculo da média aritmética para todos os pontos coletados. Os cálculos detalhados para determinação do rendimento em ésteres etílicos são apresentados no Apêndice A, juntamente com um cromatograma ilustrativo.

4.1 Dificuldades encontradas

Por ser uma pesquisa inovadora e promissora no ramo da transesterificação de óleos vegetais em um reator de leito expandido em modo contínuo, enfrentou-se empecilhos em encontrar embasamento literário (teórico e prático) relacionados aos procedimentos necessários para executar as reações e para realizar as comparações dos resultados.

Entretanto, por ser uma pesquisa promissora, inovadora bem como inédita no ramo acadêmico, as dificuldades relevantes observadas e encontradas foram as seguintes:

- As dimensões e configuração do reator utilizado neste trabalho (apresentado no capítulo anterior) foram adaptadas a partir da coluna de extração de outro projeto desenvolvido nesta universidade. Por sua vez, a enzima depositada em seu interior era carregada pela mistura provocando a obstrução do sistema, impedindo a realização do experimento. Dessa maneira, para solucionar esse problema, foi desenvolvido o aparato nomeado de Condutor de Produto (CP), Figura 3.3, que impedia o arraste do catalisador.

- Com o depósito da enzima através da extremidade superior, ocorria o alojamento da mesma na entrada do reator (ER), que dificultava a passagem da alimentação. Dessa forma, por procedimento análogo ao item anterior, foi introduzida a tela (TE), Figura

3.3, na parte inferior do reator. Com intuito de aumentar essa eficiência, foi colocado um chumaço de algodão na parte inferior da TE.

- Por ser um reator com volume elevado necessitando de grande quantidade de solvente pressurizado, houve a necessidade de instalar outra bomba seringa (BS).

Dessa forma, os problemas apresentados durante os experimentos não permitiram a execução das reações por completo, sendo necessários os seus devidos reparos. Em seguida, para verificar a veracidade dos resultados fornecidos pela unidade experimental investigada, realizou-se a reprodutibilidade do sistema.

4.2 Reprodutibilidade do sistema

A reprodutibilidade é um dos mais importantes princípios do método científico e se refere à capacidade de um teste ou experiência ser fielmente reproduzidos ou replicados, por alguém que esteja trabalhando de forma independente (www.wikipedia.org).

Os resultados de um experimento realizado por um pesquisador ou grupo de pesquisadores são geralmente avaliados por outros pesquisadores independentes que queiram repetir a mesma experiência, baseada na descrição original do experimento (www.wikipedia.org).

A repetibilidade, neste contexto, é também relevante visando atestar a qualidade dos dados, a confiabilidade no aparato e procedimentos utilizados. Dessa forma, realizou-se a reação em triplicata nas seguintes condições: temperatura de 70°C, pressão de 148,22 bar, 30 gramas de enzima, razão molar óleo:etanol de 1:9 e razão mássica substrato:solvente de 1:2.

Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Figura 4.1, onde é possível observar uma reprodutibilidade satisfatória dos dados obtidos. Do ponto de vista operacional, o sistema montado e testado apresentou praticidade na montagem e desmontagem, na adição de enzima, manutenção/estabilidade da vazão, estabilidade da temperatura e pressão no sistema. Entretanto, pelo fato de o reator possuir um elevado volume interno, o mesmo necessitou de grandes quantidades de solvente e enzima, sendo assim, as faixas das variáveis estudadas tiveram de ser pequenas.

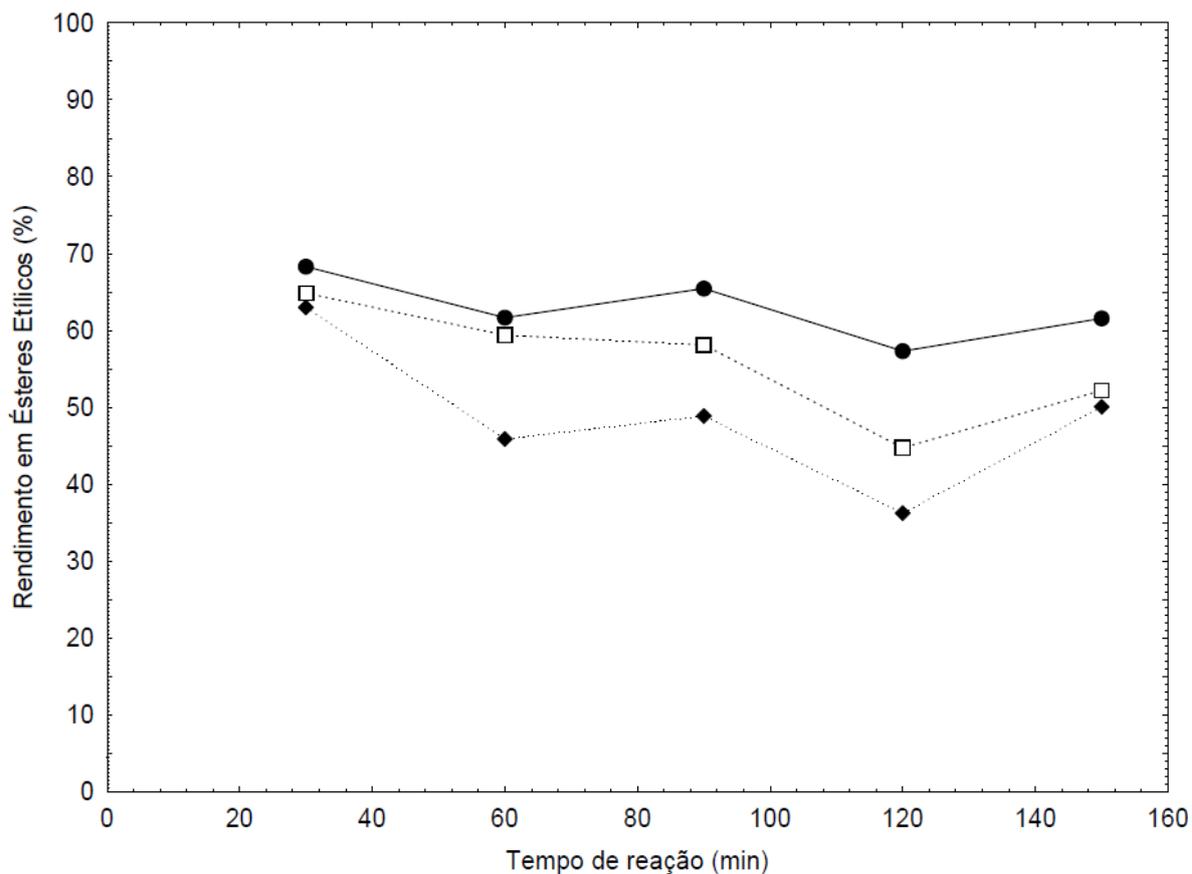


Figura 4.1 - Avaliação do sistema em triplicata de experimentos sobre rendimento em ésteres etílicos utilizando dióxido de carbono como solvente nas seguintes condições: temperatura de 70°C, pressão de 148,22 bar, 30 g de enzima, razão molar óleo:etanol 1:9 e razão mássica substrato:solvente de 1:2.

4.3 Efeito das variáveis de processo sobre a transesterificação enzimática de óleo de soja e etanol em CO₂ supercrítico

A transesterificação enzimática do óleo de soja e etanol foi realizada com objetivo de alcançar o máximo percentual em rendimento em ésteres etílicos. Dessa forma, os efeitos da pressão, razão molar álcool:óleo vegetal, quantidade de enzima e razão mássica substrato:solvente foram avaliados e determinados neste trabalho.

4.3.1 Efeito da pressão

A pressão (densidade) e a temperatura são os dois fatores mais importantes quando um fluido supercrítico é utilizado como solvente. Entre eles, a pressão tem um grande impacto

sobre as propriedades dos fluidos supercríticos, tais como a densidade e a intensidade da ligação de hidrogênio (HE et al., 2007).

Os experimentos realizados para o estudo do efeito da pressão foram variados de 100, 148,22 e 200 bar e razão mássica substrato:solvente de 1:2 a 1:3, mantendo as seguintes condições: razão molar óleo:etanol de 1:9, 30 g de enzima e temperatura de 70°C (Figura 4.2).

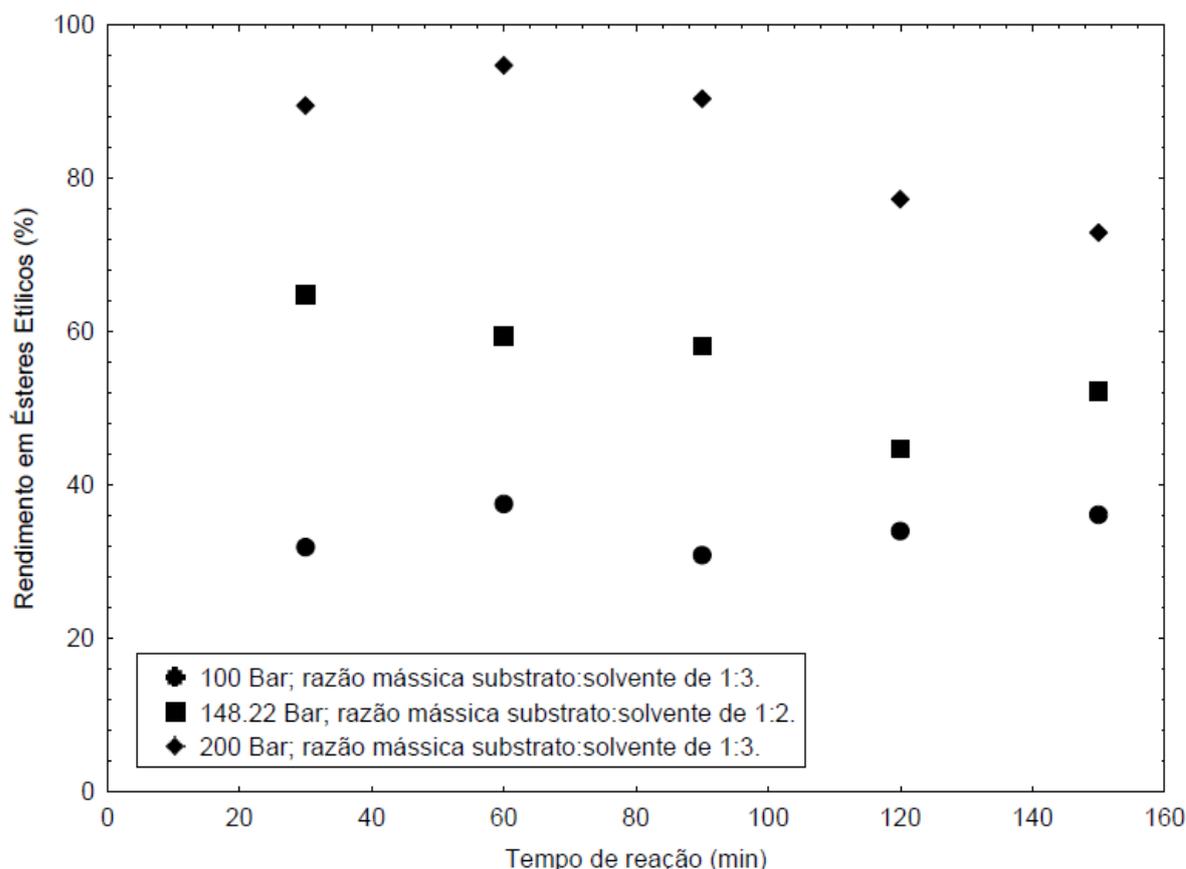


Figura 4.2 - Efeito da pressão sobre o rendimento em ésteres etílicos de óleo de soja em CO₂ pressurizado utilizando a lipase Novozym 435. Condições experimentais fixas: Razão molar óleo:etanol de 1:9, 30 g de enzima e temperatura de 70°C.

Observa-se, na Figura 4.2, que a pressão de 200 bar conduziu os rendimentos em ésteres com 89,51%, 94,77% e 90,41%, respectivamente, aos três primeiros pontos de coletas, tornando a técnica bastante atraente do ponto de vista tecnológico. Além disso, os rendimentos de ésteres etílicos obtidos em 148,22 bar apresentaram produção considerável, como pode ser observado em 30 minutos de reação, com rendimento em ésteres etílicos de aproximadamente 64,88%.

O efeito da pressão sobre o sistema de transesterificação de óleo de soja usando metanol supercrítico a 280°C em um reator tubular contínuo foi relatado por He et al. (2007a). O efeito da referida variável empregando metanol supercrítico foi investigado em uma razão molar de óleo:metanol de 1:42, com tempo total de reação de 30 min. As experiências mostraram que a pressão afeta significativamente no rendimento na faixa de pressão que vai da pressão ambiente até 250 bar. Na faixa de pressão abaixo de 155 bar, a pressão teve um impacto considerável sobre o rendimento da reação. Para a pressão de 87 bar, o rendimento em ésteres metílicos de óleo de soja era apenas de 56,1%. Quando a pressão foi aumentada para 155 bar, o rendimento em ésteres aumentou para 81,7%. De 155 a 250 bar, a influência da pressão sobre o rendimento foi menor, o rendimento aumentou cerca de 9%. Acima de 250 bar, a influência da pressão na produtividade foi insignificante. Quando a pressão aumentou de 250 para 360 bar, houve apenas 1% de aumento no rendimento em ésteres (HE et al., 2007a). Em outro relato da literatura (HE et al., 2007b), os mesmos autores mostram que, para o mesmo tempo de reação e com mesmo solvente, o rendimento em ésteres metílicos de ácidos graxos aumentou de 43% para 77% quando a pressão variou de 100 para 400 bar. No entanto, a influência da pressão não se tornou significativa à pressões superiores e o aumento da pressão não melhorou, obviamente, a conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos. Em sua experiência, a pressão ótima foi considerada 350 bar.

Laudani et al. (2007) constatam que a reação alcançou rendimento máximo em cerca de 90% para a pressão de 100 bar na esterificação de ácidos graxos de cadeia longa com lipase imobilizada com dióxido de carbono denso em um reator de leito empacotado em escala de bancada. O aumento da pressão levou à maior densidade do fluido, melhorando o poder de diluição do fluido. A solubilidade do CO₂ denso na fase líquida do substrato aumentou significativamente até 100 bar, as pressões próximas da pressão crítica do CO₂, a fase líquida em uma mistura bifásica continha até 70% mol/mol de CO₂. Como a taxa global da reação foi limitada pela difusão dos substratos do volume líquido através da camada limite para formar pares de encontro à superfície biocatalisadores, os quais subsequentemente reagiram para formar produtos. No entanto, as pressões superiores a esse valor, a conversão dos ácidos graxos inicialmente alimentados ao reator diminuiu. Em 300 bar o curso de tempo de conversão diminuiu cerca de 20%, quase sobrepondo os rendimentos da curva em 80 bar, apesar do fato de que apenas uma fase supercrítica esteve presente durante todo o teste. Isso deve ser atribuído ao fato de que a pressões superiores a 100 bar a solubilidade do CO₂ denso na fase líquida do substrato alterou ligeiramente e, assim, maior densidade líquida foi contrabalançada pela diminuição da fração molar do substrato na fase de enzima, que a

catálise realizou no lugar. Assim, em 100 bar, o CO₂ expandido reage com a mistura apresentando um aumento significativo da sua difusividade e diminuição da sua tensão superficial e viscosidade, evitando a necessidade de gerar uma única fase supercrítica.

Em temperaturas mais elevadas, nas proximidades do ponto crítico, a densidade do álcool pode ser facilmente aumentada pelo aumento da pressão, que também leva ao aumento da concentração volumétrica do álcool. De acordo com a Lei da Ação das Massas², a taxa de reação e equilíbrio é diretamente proporcional às concentrações dos reagentes. Por isso, elevada concentração volumétrica do álcool é favorável para a reação de transesterificação. Em segundo lugar, a pressão elevada aumenta a solubilidade de triglicerídeos, assim, o nível de contato/interação intermolecular entre o álcool e triglicerídeos é incrementado (LEE e SAKA, 2010).

Neste trabalho, pode-se verificar também que a pressão teve efeito sobre o rendimento em ésteres etílicos e no comportamento da reação, como observa-se através do aumento dos ésteres produzidos para a reação realizada a 200 bar. Além disso, durante os experimentos em laboratório, notou-se que a vazão de alimentação de CO₂ sofreu poucas variações, consequentemente, o sistema entrava em estado estacionário em menor tempo de reação, resultando em um comportamento da reação mais estável, já que com aumento da pressão, o CO₂ torna-se mais denso.

De modo geral, o rendimento médio em ésteres etílicos obtidos para 100, 148,22 e 200 bar foram de 34,05%, 55,88% e 84,98%, respectivamente. Afirmando que o efeito da pressão no sistema foi positivo.

4.3.2 Efeito da quantidade de enzima

As características mais desejadas da lipase é a sua capacidade de converter todos os mono, di e triglicerídeos, bem como os ácidos graxos livres de transesterificação, a baixa inibição pelos produtos, elevada atividade, propiciar altos rendimentos em meios não aquosos, curto tempo de reação, reutilização da enzima imobilizada, a temperatura e a resistência ao álcool (BAJAJ et al., 2010).

Em vários trabalhos publicados têm sido relatado que a lipase de *Candida antarctica* proporciona rendimentos em ésteres superiores a 95%. Como o custo da lipase contribui

² O Conceito que descreve o equilíbrio químico em termos quantitativos foi proposto pelos noruegueses Cato Guldberg e Peter Waage em 1864

significativamente para o custo total da produção de biodiesel (TONGBORIBOON et al., 2010), o estudo do efeito dessa variável é de grande importância para minimizar tanto quanto possível a quantidade de enzima sem comprometer o rendimento da reação.

Na etapa anterior os resultados mostraram que a pressão mais adequada para a reação de transesterificação enzimática em CO₂ supercrítico no sistema investigado foi de 200 bar. Assim, nesta etapa do trabalho, a pressão foi fixada em 200 bar, a razão molar óleo:etanol em 1:9, a razão mássica substrato:solvente em 1:1, enquanto a quantidade de enzima foi variada de 10, 30, 40 e 70 gramas (Figura 4.3).

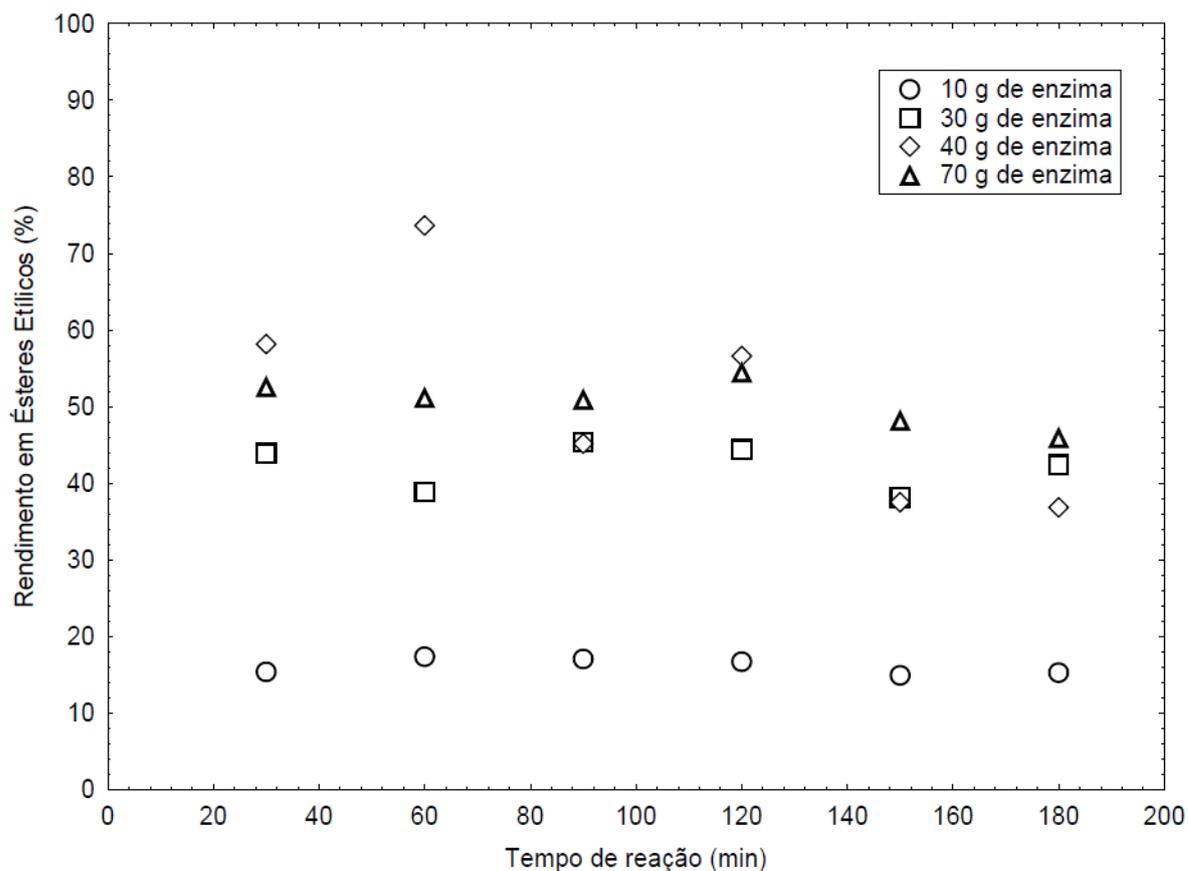


Figura 4.3 - Efeito da quantidade de enzima de 10, 30, 40 e 70 g sobre o rendimento em ésteres etílicos, para a pressão de 200 bar, razão mássica de 1:1, razão molar de 1:9 e temperatura de 70°C.

Com o aumento da quantidade de enzima, houve aumento da produção de ésteres (Figura 4.3), na faixa entre 10 a 40 gramas. Observa-se que para a quantidade de 10 gramas de enzima todos os pontos coletados da reação apresentaram um rendimento em ésteres etílicos menores que 20%. Com a utilização de quatro vezes mais a quantidade de enzima houve uma produção máxima de 73,63% em 60 minutos, no qual, o mínimo alcançado foi de 36,86%, para o último ponto coletado. Também pode-se notar que nos tempos de reação em

90 e 150 minutos, a produção de ésteres com aplicação de 40 gramas de enzima foram de 45,19% e 37,54%, semelhantes ao resultado da reação que foi realizada com 30 gramas de enzima, 45,4% e 38,18%.

Em outra comparação, o aumento da enzima para 70 gramas não apresentou aumento considerável na produção de ésteres. Nota-se que nos tempos de 90, 150 e 180 minutos, houve uma produção de 50,95%, 48,21% e 45,94%, respectivamente, maiores que a produção de ésteres para a quantidade de 40 gramas de enzima, que foi de 45,19%, 37,54% e 36,86%.

De modo geral, o rendimento médio em ésteres etílicos foi de 16,14%, 42,21%, 51,34, 50,56% para os respectivos experimentos contendo 10, 30, 40 e 70 gramas. Dessa forma, indicando que a quantidade de enzima a 40 gramas apresenta melhor condição para a produção de biodiesel investigada neste trabalho.

Oliveira et al. (2004, 2005b) realizaram 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). Os autores observaram que um dos parâmetros que afeta 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, 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 CO₂ como solvente em reator pressurizado em modo batelada.

Tongboriboon et al. (2010) realizaram testes na produção de ésteres etílicos com óleo de palma usado cinco lipases imobilizadas (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* e *Candida antarctica*), em um reator contínuo livre de solvente. Os autores relatam, que o aumento da produção de biodiesel é proporcional ao aumento da quantidade de enzima. Contudo, reportam que, a partir de 10% de enzima, essa proporção tende a ser inversa. Isso, pode ser devido ao aumento do grau de agregação, que reduz a taxa de reação à medida que um número adicional de quantidade de enzima não proporcione efeito positivo ao sistema reacional.

Maceiras et al. (2009) relataram que o efeito da concentração de Novozym 435 a partir de resíduos de óleos de fritura em metanólise em modo batelada demonstra um aumento gradual na produção de ésteres metílicos com a concentração de lipase abaixo de 10% (% wt/wt óleo), e uma diminuição com concentrações mais elevadas. Esse resultado sugere a utilização de uma quantidade de enzima maior que o necessário, onde o volume de líquido é insuficiente para realizar a reação. Além disso, observações visuais durante os ensaios com

concentrações de enzima superiores a 10% indicaram que a fase líquida não apresentava volume reacional suficiente para suspender completamente o catalisador sólido. Nessas circunstâncias, a resistência à transferência externa de massa torna-se a etapa limitante para a transesterificação de óleo, tornando a produção em modo contínuo mais atraente pelo fato de diminuir a resistência à transferência externa de massa.

Portanto, pode-se deduzir que para esse grupo de tratamentos realizado para a razão mássica solvente:substrato de 1:1, a quantidade de enzima que apresentou efeito positivo para a produção de ésteres é de 40 gramas. Assim, optou-se em realizar outro conjunto de tratamentos nas seguintes condições: pressão de 200 bar, razão molar óleo:etanol de 1:9, razão mássica substrato:solvente de 1:3, variando a quantidade de enzima de 10, 30 e 40 gramas, obtendo os resultados mostrados na Figura 4.4.

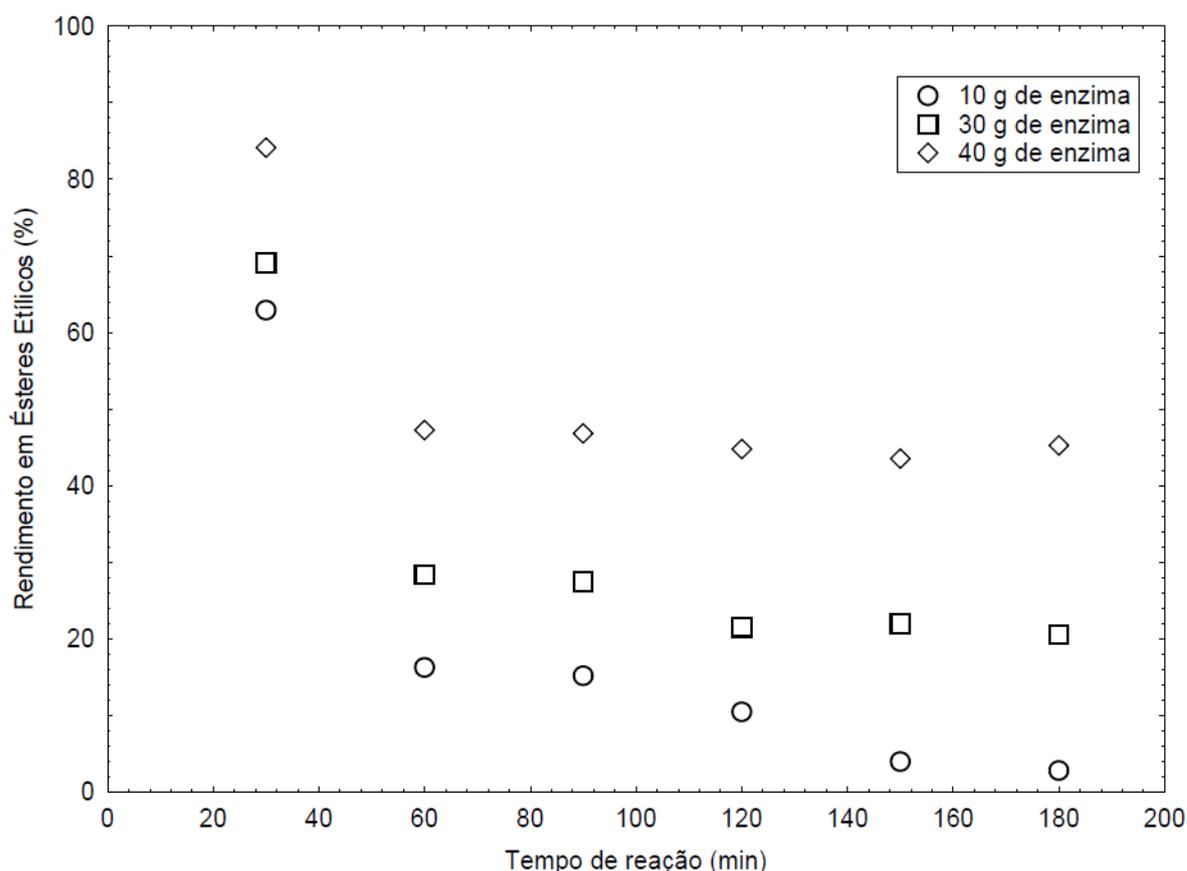


Figura 4.4 - Efeito da quantidade de enzima de 10, 30 e 40 g sobre o rendimento em ésteres etílicos, para a pressão de 200 bar, razão mássica de 1:3, razão molar de 1:9 e temperatura de 70°C

Com relação à Figura 4.4, o rendimento em ésteres etílicos em modo contínuo apresentou influência com o aumento da quantidade de enzima, como a literatura apresenta para o modo batelada. Assim, a porcentagem de rendimento em ésteres etílicos para o tempo

de reação de 30 minutos foi de 62,92% para a quantidade de 10 gramas, 69,11% para a quantidade de 30 gramas e 84,11% para a quantidade de 40 gramas.

Realizando uma comparação dos resultados apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4, desconsiderando os pontos de 30 minutos, pode-se fazer as seguintes analogias: para a quantidade de 10 gramas de enzima, não houve mudança na produção de ésteres etílicos, cujo valor não ultrapassou 20% e obtendo 2,84% para o último ponto da reação; para a quantidade de 30 gramas de enzima, houve uma queda de produção ficando em torno de 20 a 40%, mas apresentou 20,58% para o último ponto de coleta. Para a quantidade de 40 gramas, conversões acima da faixa de 40% foram obtidas.

De modo geral, os rendimentos médios em ésteres etílicos dos experimentos com 10, 30 e 40 gramas de enzimas obtiveram 18,62%, 31,52 e 51,96%, respectivamente.

Pode-se, de forma geral, observar que o comportamento das reações apresentou elevada produção de ésteres etílicos para o tempo de 30 minutos, e em seguida, apresentaram uma queda abrupta até o instante de 60 minutos, mantendo esse comportamento até o final da reação.

Marchetti et al. (2007) relataram em seus testes de esterificação direta de ácidos graxos em modo batelada com catalisador sólido a partir do óleo de fritura e etanol que, apesar de maior quantidade de catalisador utilizado, a reação ocorre em menor tempo, mas atinge a mesma conversão em relação a outras quantidades.

Trubiano et al. (2007), ao realizarem testes de síntese de biodiesel a partir de etil oleato em modo batelada, constataram que a conversão de equilíbrio não foi afetada pela quantidade de catalisador, o que sugere que a atividade dos componentes da mistura não muda com o percentual da enzima, mas que antes de atingir as condições de equilíbrio, a taxa de reação inicial aumenta à medida que aumenta a quantidade de enzima. Uma relação não linear foi estabelecida entre as taxas inicial de reação e a porcentagem de enzima no intervalo de estudo. Um valor ideal de razão molar inicial foi detectado, o que confirma a existência de um efeito de inibição.

Dalla Rosa et al. (2008) constataram em modo batelada, que o aumento da concentração de enzima leva a um aumento na conversão da reação, especialmente em tempos mais curtos, refletindo a enorme disponibilidade de catalisador para substratos no meio reacional.

Para alcançar maiores taxas de reação inicial em modo batelada, elevados níveis de enzima são necessários. Para o modo contínuo, em reatores de leito empacotado, a razão entre substrato e enzima é menor do que em reatores em batelada convencional, o que resulta em

melhor desempenho de reação, tornando atrativo no ambiente industrial (LAUDANI et al., 2007).

Pode-se constatar a partir dos resultados abordados nesse item com relação aos de outros autores, que o efeito da quantidade de enzima sobre a produção de ésteres apresenta semelhança, ou seja, tanto a reação em modo batelada como em modo contínuo, como o estudo presente, apresenta uma quantidade de enzima ótima que proporciona máxima produção de ésteres. Também pode-se deduzir que, em modo contínuo de leite expandido, o efeito de aglomeração de enzima pode ser amenizado pelo fato do processo ocorrer no sentido vertical, no qual a passagem dos fluidos (CO_2 , substrato, álcool) provoca a agitação e homogeneização do meio reacional, impedindo a aglomeração da enzima.

Tendo em vista os gastos advindos do uso excessivo de enzima, bem como uma melhor base para análise dos efeitos das demais variáveis para os experimentos que seguem neste estudo, empregou-se a quantidade de 40 gramas de Novozym 435 nos experimentos posteriores.

4.3.3 Efeito da razão molar óleo:etanol

Outro parâmetro importante que afeta a produção de ésteres é a razão molar de álcool:óleo vegetal. A estequiometria da reação de transesterificação requer razão molar óleo:álcool de 1:3 para produzir 3 moles de éster e 1 mol de glicerol, no entanto a reação de transesterificação pode ser favorecida pelo deslocamento de seu equilíbrio em direção a formação dos produtos ésteres pelo aumento da razão molar de álcool para óleo. Razões molares elevadas resultam em maior produção de éster em menor tempo (KEERA et al., 2011).

A razão molar do substrato (óleo:etanol) foi variada de 1:9, 1:15 e 1:21, com variação de enzima de 10 a 40 gramas e razão mássica de 1:1 e 1:3, mantendo a pressão em 200 bar e a temperatura em 70°C (Figura 4.5).

Podemos observar na Figura 4.5, que com a variação das razões molares de 1:9, 1:15 e 1:21 apresentaram diferença para os rendimentos em ésteres etílicos. Os pontos coletados dos experimentos utilizando 10 gramas de enzima e razão mássica 1:1 obtiveram rendimento menores que 20%. Mas especificamente para a condição com razão molar de 1:9 (representado pelo triângulo aberto) que obteve rendimento médio de 16,14% quatro vezes maior que para a razão molar de 1:21 (representado pela cruz) que foi de 4,32%. Outra comparação que podemos efetuar é para os experimentos contendo 40 gramas de enzima, com

razão molar de 1:1 que obtiveram rendimento menor que 20% para todos os pontos coletados. Para a condição com razão molar de 1:9 obteve-se rendimento médio de 51,33% (representado pelo losango fechado) comparado para o experimento com razão molar de 1:15 (representado pelo quadrado aberto) que obteve rendimento médio de 2,67%. Em outra comparação, para o experimento contendo 40 gramas de enzima, razão mássica de 1:3 e razão molar de 1:9 obteve-se rendimento maior de 84,11% nos 30 minutos iniciais de reação totalizando rendimento médio de 51,97%. Se aumentarmos a razão molar para 1:15 (representado pelo círculo aberto), o rendimento é menor que 10% para todos os pontos coletados mais resultando no rendimento médio de 4,17%. Todas essas relações evidenciam que o aumento da razão molar provoca uma queda na produção de ésteres, assim, comprovando que o sistema apresenta uma inibição para quantidade de álcool superior a 1:9.

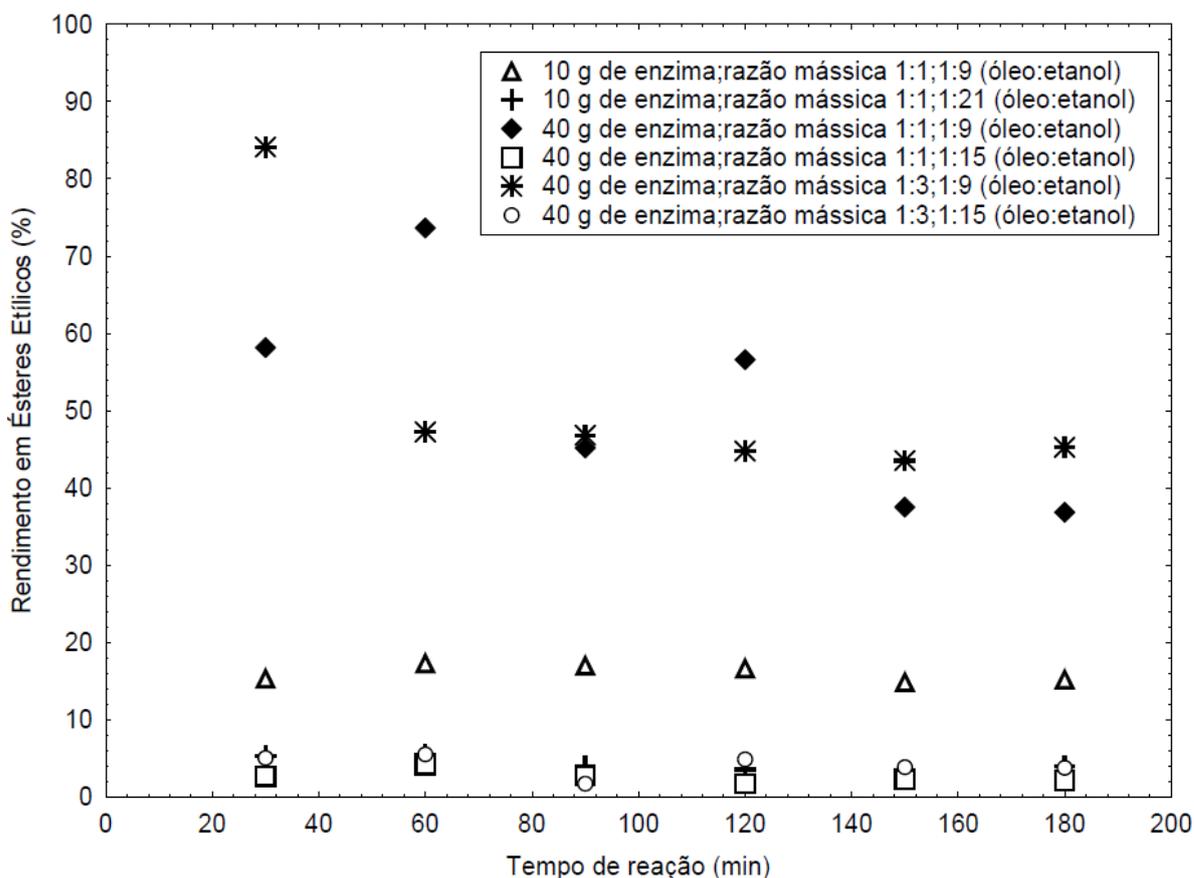


Figura 4.5 - Efeito da razão molar óleo:etanol de 1:9; 1:15 e 1:21 sobre o rendimento em ésteres etílicos, para pressão de 200 bar e temperatura de 70°C.

Poucos trabalhos são apresentados na literatura referentes ao efeito do etanol para reações em sistemas pressurizados em modo contínuo. Dentre eles, destacam-se os estudos de Oliveira e Oliveira (2000, 2001), que realizaram reações com a Novozym 435 utilizando

como substrato óleo de palma em modo batelada. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que a variável estudada afeta positivamente a conversão do processo, no intervalo investigado de razão molar de 1:3 a 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.

Trubiano et al. (2007) também atribuíram ao efeito de inibição causado pelo álcool no catalisador as menores conversões obtidas quando excesso de álcool etílico foi utilizado na síntese de ésteres de ácidos graxos (principalmente o ácido oléico) através da lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* em reator em modo batelada em ausência de solvente. Primeiramente, quando o álcool é adicionado ao sistema e devido à sua elevada polaridade, ele sofre interações hidrofílicas com a camada limite aquosas sobre a superfície da lipase, causando modificações da estrutura terciária das proteínas e, portanto, inibição da atividade da enzima. Por outro lado, o fenômeno de inibição é dado pela formação de complexos binários entre a enzima livre e o álcool (ou éster), bem como a formação de complexos ternários inativos entre o ácido graxo ou o éster e o complexo ácido-enzima.

A razão molar de 6:1 é normalmente utilizada em processo industrial, porque o rendimento do éster é superior a 98% em peso. No entanto, a alta razão molar de óleo vegetal:álcool interfere na separação da glicerina, pois há um aumento da solubilidade. Quando a glicerina permanece em solução, ajuda a impulsionar o equilíbrio no sentido da reação de hidrólise, diminuindo o rendimento em ésteres. A transesterificação de óleo de *Cynara* com o etanol foi estudado na razão molar de 1:3-1:15. O rendimento em éster aumentou com o uso da razão molar até 1:12. Os melhores resultados foram para a razão molar de 1:9-1:12. Para a razão molar menor que 1:6, a reação foi incompleta. Para uma razão molar de 1:15 a separação da glicerina é difícil e a produtividade aparente do éster diminuiu porque uma parte do glicerol permanece na fase do biodiesel. Portanto, a razão molar 1:9 parece ser o mais aproximado (MURUGESAN et al., 2009).

Avaliando o efeito da razão molar óleo:etanol para temperatura de 70°C e pressão de 200 bar, pode-se notar que a razão molar óleo:etanol de 1:9 é a condição mais adequada para a condução da reação para produção enzimática de biodiesel, para o sistema investigado, dentro do intervalo de estudo das variáveis.

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 *Candida 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.

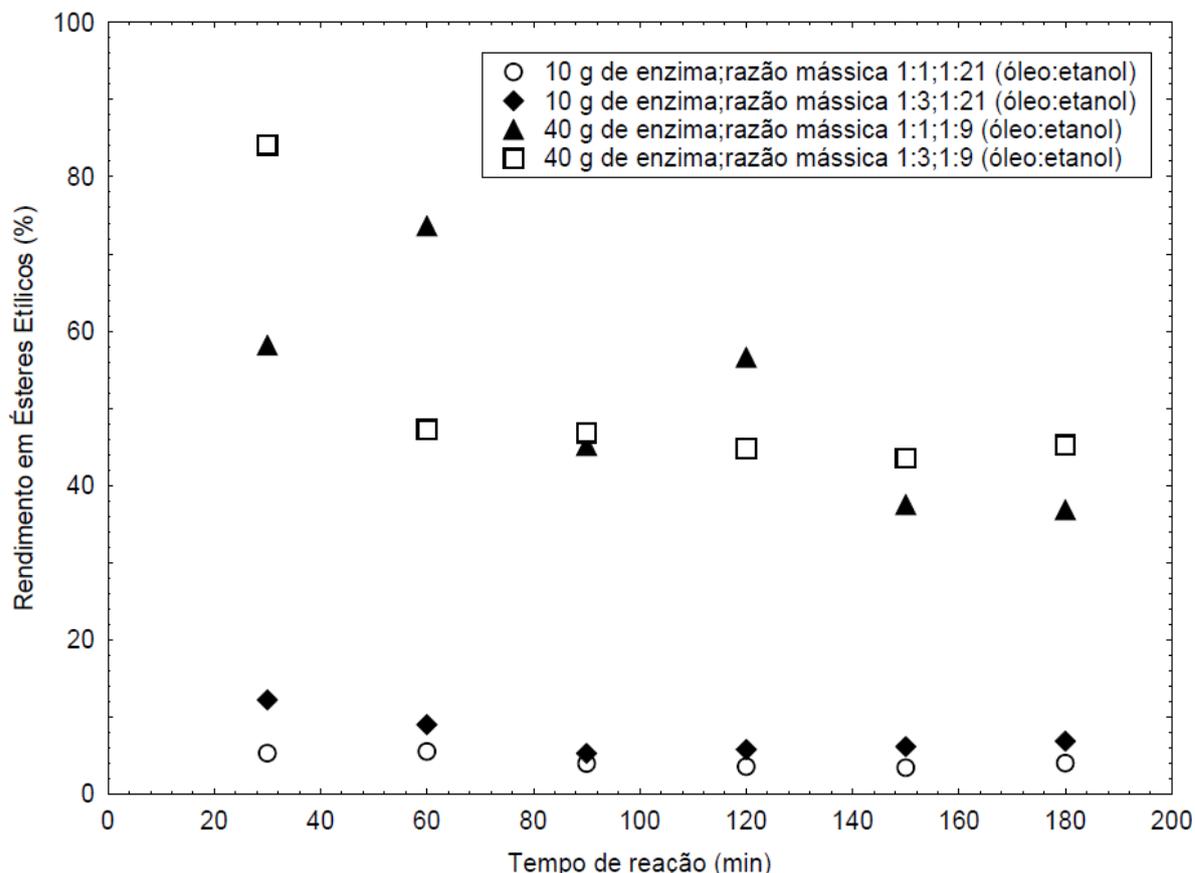
Oliveira et al. (2010) realizaram testes para produção de biodiesel por esterificação a partir de óleo de resíduos de coco com etanol e metanol, constatando que o efeito do tipo de álcool (metanol ou etanol) apresenta os mesmos valores de conversão. Este experimento pode ser interessante para aplicações industriais, já que o etanol obtido a partir da biomassa, talvez, o que torna renovável e biodegradável, onde, como metanólise normalmente obtido a partir recursos fósseis.

4.3.4 Efeito da razão mássica substrato:solvente

O efeito da razão mássica substrato:solvente nas proporções de 1:1 e 1:3 foram avaliados na pressão de 200 bar, temperatura de 70°C, razão molar óleo:etanol de 1:9 e 1:21 e quantidade de enzima de 10 e 40 gramas. Tais resultados encontram-se apresentados na Figura 4.6, onde se observa o efeito de diferentes razões mássicas substrato:solvente no intervalo definido. A análise dessa figura permite verificar, precisamente nos tempos de 60 e 120 minutos, que os pontos representados em triângulo fechado estão fora da tendência da reação, devido ao sistema apresentar pequenas instabilidades no momento da alimentação, ou seja, ocorriam pequenas variações na vazão do fluxo, conseqüentemente, acarretando mudanças na razão mássica. De forma geral, os resultados revelam produções pequenas quando o meio reacional é submetido à pequena quantidade de solvente e quantidade de enzima, mas apresenta elevado rendimento em ésteres etílicos, da ordem de 80%, quando o meio reacional dispõe de uma maior quantidade de CO₂ e enzima.

A Figura 4.6 aponta que os experimentos com a elevação da razão mássica de 1:3 conduzem ao rendimento em ésteres etílicos de 84,11%, para 30 minutos, comparado à 58,19% com razão mássica de 1:1, ambos utilizando 40 gramas de enzima. Em outra comparação, o experimento utilizando 10 gramas de enzima, o rendimento em ésteres etílico é de 5,33% com razão mássica de 1:1 e 12,24% para a razão mássica de 1:3.

Realizando uma comparação através do rendimento médio em ésteres etílicos, para a reação que utilizou 10 gramas de enzima sobre a condição de 1:1 foi de 4,32% contra 7,57% para o experimento com condição de razão molar de 1:3. Já para o experimento com 40 gramas de enzima, a condição de 1:1 proporcionou um rendimento médio de 51,33%



comparado com 51,97% para a condição de 1:3.

Figura 4.6 - Efeito da razão mássica substrato:solvente 1:1 e 1:3 sobre o rendimento em ésteres etílicos para pressão de 200 bar e temperatura de 70°C.

Conforme atesta a literatura, possivelmente, as interações da enzima com os substratos são facilitadas com o excesso de solvente, ou seja, quanto maior a quantidade de solvente empregada no sistema, mais facilitado será o contato da enzima com o substrato, promovendo bom desempenho da enzima no meio reacional (LAUDANI et al. 2007). Dalla Rosa et al. (2009a), realizaram produção de biodiesel etílico em modo contínuo com uso de propano como solvente e que esse fato pode ser explicado porque essas interações com o solvente podem afetar a atividade da lipase. Também é possível que razões de solvente mais elevadas auxiliem a remoção de glicerol (subproduto inibidor da reação) no reator de leito empacotado,

evitando que a enzima seja recoberta pelo glicerol. Através desses resultados, pode-se inferir que o CO₂ não apresenta efeito nocivo à lipase Novozym 435, para esta faixa da variável estudada, possivelmente devido a sua característica hidrofóbica, interagindo menos intensamente com a monocamada de água necessária para a ativação da enzima.

Para Knez e Habulin (2001), que utilizaram as lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* e lipase extraída de pâncreas suíno em CO₂ supercrítico e propano a 300 bar, a atividade das enzimas em propano foi maior do que em CO₂ supercrítico, possivelmente devido às diferentes partições de água no solvente. Comparando sistemas sem a utilização de solventes com sistemas que utilizam propano como meio de reação, os autores observaram, respectivamente, uma taxa de reação 4 (para lipase extraída de pâncreas suíno) a 9 (*Rhizopus javanicus*) vezes maior do que em meios aquosos.

Conforme citado no Capítulo 3, o sistema montado em escala de bancada possui duas bombas de alta pressão, totalizando uma capacidade de 1 litro de gás pressurizado, indisponibilizando, desta forma, a realização de reações com razão mássica maiores que 1:3.

Portanto, como o rendimento médio em ésteres etílicos entre a razão mássica de 1:1 e 1:3 apresentaram pouca diferença, mas as reações sob a condição de 1:3 apresentarem melhor estabilidade durante a realização dos experimentos optou-se em trabalhar com razão mássica de 1:3.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Avaliando a perspectiva da utilização de fluidos pressurizados como solventes para reações enzimáticas de interesse e devido a uma carência encontrada na literatura no que se refere à produção enzimática de ésteres em modo contínuo, um estudo sobre reações de transesterificação enzimática de óleos vegetais, bem como a influência das variáveis do processo e cinética de reação foram realizados neste trabalho.

Para a consecução das reações em meio pressurizado, vários testes foram realizados, tornando possível a montagem e utilização do aparato experimental para a reação de transesterificação de óleos vegetais. Comprovando a veracidade dos resultados através da reprodutibilidade do sistema investigado, que apresentou-se satisfatório.

O presente estudo produziu resultados relevantes que podem incentivar, auxiliar e até mesmo serem tomados como base para futuros estudos de pesquisas científicas no ramo da transesterificação enzimática em meio pressurizado em modo contínuo, em escala laboratorial para posterior avaliação do "scale-up" do processo.

Avaliando-se a cinética do processo e os efeitos das variáveis estabelecidas pelo estudo, conclui-se que:

- A pressão de 200 bar apresentou influência nas reações, possivelmente devido à variação da densidade do CO₂.
- A razão molar óleo:etanol de 1:9 apresentou melhor resultado para a conversão da reação. A razão de 1:15 e 1:21 mostraram inibição por excesso de substrato.
- A razão mássica substrato:solvente de 1:3 foi suficiente para promover conversão de até 82%, sendo que a quantidade de solvente apresentou influência sobre a reação.
- A quantidade de enzima em 40 gramas proporcionou um rendimento de aproximadamente 84,22% em ésteres etílicos para 30 minutos de reação.

5.2 Sugestões

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, bem como os problemas observados em laboratório, as seguintes sugestões podem ser delineadas:

- diminuição do volume do reator, assim, favorecendo a utilização de menor quantidade de enzima e gás pressurizado;
- utilização de equipamento que proporcione pressurização de gás de modo contínuo;
- emprego de outros solventes, como por exemplo, o propano, e/ou mistura de solventes pressurizados para a condução de reações enzimáticas de transesterificação de óleos vegetais;
- emprego de diferentes fontes de óleo (vegetal, animal e de fritura);
- investigação do comportamento da enzima em tempos mais longos de reação;
- emprego de outras enzimas, não comerciais "home-made";
- aprimoramento e desenvolvimento de técnicas analíticas visando à caracterização química e quantificação dos compostos envolvidos;
- estudo da viabilidade econômica da produção enzimática de biodiesel em fluidos pressurizados em modo contínuo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE: **Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais**. www.abiove.com.br. Acessado em setembro de 2010.
- ANP: **Agência Nacional de Petróleo**. www.anp.gov.br. Acessado em Novembro de 2010.
- 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, pp. 978-981, 2000.
- AKGUN, N., IYSCAN E. **Effects of process variables for biodiesel production by transesterification**. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.109, pp.486-492, 2007.
- ALBUQUERQUE, G. A. **Obtenção e Caracterização Físico-química do Biodiesel de Canola** (*Brassica napus*). Dissertação de Ms., Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brasil, 2006.
- 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, pp.529-538, 2001.
- ANITESCU, G.; DESHPANDE, A.; TAVLARIDES, L. L. **Integrated technology for supercritical biodiesel production and power cogeneration**. *Energy and Fuels* 22, pp. 1391–1399, 2008.
- BAJAJ, A., LOHAN, P., JHA, P. N., & MEHROTRA, R. **Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 9-14, 2010.
- Balanco Energético Nacional 2010**. Ministério de Minas e Energias. 2010.
- BALAT, M., & BALAT, H. **Progress in biodiesel processing**. *Applied Energy*, Volume 87, pp. 1815-1835, 2010.
- BERNARDES O.L, BEVILAQUA JV, LEAL MCMR, FREIRE DMG, LANGONE MAP. **Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*; 137–140:105–14, 2007.
- BROCK, J. **Determinação de propriedades termofísicas e de transporte de óleos vegetais**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai - URI, Erechim, RS, Brasil. 2006.
- CADERNOS NAE – NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA**. Biocombustíveis. N.2, 2004.
- CÂMARA, G. M. S. **Potencial da cultura da soja como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel**. In: CÂMARA, G. M. S. & HEIFFIG, L. S. (coord.): *Agronegócio de Plantas Oleaginosas: Matérias-Primas para Biodiesel*. Piracicaba: ESALQ, pp.123–153, 2006.
- CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. **Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and co-solvent**, v. 84, pp. 347-351, 2005.

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

CHEN Y, XIAO B, CHANG J, FU Y, LV P, WANG X. **Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor**. Energy Conversion and Management; 50:668–73,2009.

COSTA, V. E. U; AMORIM, H. L. N. **O emprego de lípases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente**. Química Nova, v. 22, p. 863 - 873, 1999.

DALLA ROSA, C. D.; 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, pp. 49-53, 2008.

DALLA ROSA, C D; MORANDIM, M B; NINOW, J L; OLIVEIRA, D; TREICHEL, H; OLIVEIRA, J V. **Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids, v.100, pp. 5818-5826, 2009a.

DALLA ROSA, C., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V.; **The role of organic solvent amount in the lipase-catalyzed biodiesel production**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, pp. 76-78, 2009b.

DARNOKO, D., CHERYAN, M. **Kinetics of palm oil: Transesterification in a Batch Reactor**. JAOCS, v. 77, pp.1263-1266, 2000.

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

DEMIRBAS, A., **Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterification and other methods: a survey**. Energy Conversion and Management, v. 44, pp. 2093 - 2109, 2003.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide**. Energy Conversion and Management, v. 48, pp. 937-941, 2007.

DIASAKOU, M., LOULOU DI, A., PAPAYANNAKOS, N. **Kinetics of the non-catalytic transesterification of soybean oil**. Fuel, v.77, pp.1297-1302, 1998.

DOSSAT, V.; COMBES, D. MARTY, A. **Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil**. Enzyme and Microbial Technology, v. 30, pp. 90-94, 2002.

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

FANG, T., WAHYUDIONO, AL-DURI, B., SHIMOYAMA, Y., IWAI, Y. **Supercritical methanol process of modifying oil byproduct for concentrating natural tocopherols**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v.46, pp. 5325-5332, 2007.

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

FERRARI, R. A., SILVA V., OLIVEIRA E, A. S. **Biodiesel de soja: Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia.** Química. Nova, v. 28, pp. 19-23, 2005.

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

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. **Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 92, pp. 405-416, 2001.

GLISIC, S., MONTOYA, O., ORLOVIC, A., SKALA, D. **Vapor-liquid equilibrium of triglycerides-methanol mixtures and their influence on the Biodiesel synthesis under supercritical conditions of methanol.** J. Serb. Chem. Soc., v.72, pp.13-27, 2007.

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

HAN, H.; CAO, W.; ZHANG, J. **Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO₂ as co-solvent,** Process Biochemistry 40, pp. 3148–3151, 2005.

HARVEY, AP.; MACKLEY, MR.; SELIGER, T. **Process intensification of biodiesel production using a continuous oscillatory flow reactor.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology 2003;78:338–41. D. Wen et al. / Progress in Natural Science 19, pp. 273–284 283, 2009.

HE, H., WANG, T., ZHU, S.; **Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process,** v. 86, pp. 442–447, 2007a.

HE, H., SUN, S., WANG, T., ZHU, S.; **Transesterification kinetics of soybean oil for production of biodiesel in supercritical methanol.** Journal of American Oil Chemistry Society, v.84, pp. 399–404, 2007b.

KAMAT, S.V.; BARRERA, J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluid.** Biotechnology and Bioengineering, v.40, pp.158, 1992.

KEERA, S. T., EL SABAGH, S. M., & TAMAN, A. R. **Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst.** v. 90, pp. 42-47, 2011.

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

KNEZ, Z.; HABULIM, H. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids, v. 23, pp. 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.

KNOTHE, G.; J.V. Gerpen, J. Krahl (Eds.), **The Biodiesel Handbook,** AOCS Press, Illinois, pp. 4–16, 2005.

- KNOTHE G, SHARP CA, RYAN TW. **Exhaust emissions of biodiesel, petrodiesel, neat methyl esters, and alkanes in a new technology engine.** *Energy Fuels*, 20:403–8, 2006.
- KUSDIANA, D., SAKA, S. **Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol.** *Fuel*, v.80, pp. 225-231, 2001a.
- KUSDIANA, D., SAKA, S. **Kinetics of transesterification in rapeseed oil to Biodiesel fuel as treated in supercritical methanol.** *Fuel*, v.80, pp. 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, pp. 383-387, 2001c.
- KUSDIANA, D., SAKA, S. **Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment.** *Bioresource Technology*, v.91, pp.289-295, 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.
- LAUDANI, C. G., HABULIN, M., KNEZA, Z., PORTA, G. D., & REVERCHON, E. **Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study.** *Journal of Supercritical Fluids*, v.41, pp.74–81, 2007.
- LEE, J. S., & SAKA, S. **Biodiesel production by heterogeneous catalysts and supercritical technologies.** *Bioresource Technology*, v.101, pp. 7191-7200, 2010.
- LIMA, J. R. O., SILVA, R. B., SILVA, C. C. M., SANTOS, L. S. S., SANTOS JR. J.R., MOURA, E.M., MOURA, C.V. R. **Biodiesel de babaçu (Orbignya Sp.) obtido por via etanólica.** *Química Nova*; vol. 30, pp.600-603, 2007.
- MA, F., HANNA, M. **Biodiesel production: a review,** *Bioresource Technology*, v.70, pp.1-15, 1999.
- MACEDO, G. A., MACEDO, J. A. **Biodiesel: Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.32, pp.38-46, 2004.
- MACEIRAS, R. VEGA, M., COSTA, C., RAMOS, P., & MÁRQUEZ, M. **Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil.** *Fuel*, pp. 2130–2134, 2009.
- MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. **Synthesis of biodiesel in supercritical fluids.** *Fuel*, v. 83, pp. 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, pp. 53-58, 2001.
- MARCHETTI, J. M., MIGUEL, V. U., & ERRAZU, A. F. **Heterogeneous esterification of oil with high amount of free fatty acids.** *Fuel*, pp. 906 - 910, 2007.
- MARCHETTI, J.M., ERRAZU, A.F. **Esterification of free fatty acids using sulfuric acids as catalyst in the presence of triglycerides.** *Biomass and Bioenergy*; v.32, pp. 892–895, 2008.

- MARTINEZ, M., VICENTE, G., ARACIL, J., ESTEBAN, A. **Kinetics of Sunflower oil methanolysis**. *Industrial Engineering Chemistry Research*; v. 44, pp. 5447-5454, 2005.
- MARTINEZ, M., VICENTE, G., ARACIL, J. **Kinetics of *Brassica carinata* oil methanolysis**. *Energy & Fuels*, v.20, pp.1722-1726, 2006.
- MARTY, A.; CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; WILLEMOT, R. M. e DURANG, G. **Comparison of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in-hexane**. *Biotechnology Letters*, v. 12, n. 1, pp. 11-16, 1990.
- MARULANDA, V. F.; ANITESCU, G.; TAVLARIDES, L. L. **Biodiesel fuels through a continuous flow process of chicken fat supercritical transesterification**. *Energy & Fuels*, 2009.
- MCHUGH, M., KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.
- 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, pp. 248–268, 2006.
- MENEGHETTI, P.S.M., MENEGHETTI, M.R, WOLF, C.R., SILVA, E.C., LIMA, G.E.S., COIMBRA, D.A., ET. AL. **Ethanolysis of castor and cottonseed oil: a systematic study using classical catalysts**. *Journal of American Oil Chemists Society*; 83:819–22, 2006.
- MESSIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Supercritical Biocatalysis**. *Chemical Reviews*, v. 99, pp. 623-633, 1999.
- MURUGESAN, A., UMARANI, C., & CHINNUSAMY, T. R. **Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils—A review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* , pp. 825-834, 2009.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **O Futuro da Indústria de Biodiesel**. Coletânea de Artigos. Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior, nº 14. Brasília – DF, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, SECRETARIA DA PRODUÇÃO E AGROENERGIA. **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011**. Brasília – DF, 2006.
- NAKAMURA, K.; CHI, Y.M.; YAMADA, Y.; YANO, T. **Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide**. *Chemical Engineering Community*, v.45, pp.207, 1985.
- NDIAYE, P. M. **Equilíbrio de fases de óleos vegetais e de biodiesel em CO₂, propano e n-butano**. Tese de D. Sc. Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE, RJ, Brasil, 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. 3, 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., ZHU, D. **Kinetics of transesterification of Soybean Oil**. JAOCS, v. 74, pp.1457-1461, 1997.

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

NOYORI, R. **Special Issue on Supercritical Fluids**. Chemical Reviews, v. 99, n.2, pp. 353-634, 1999.

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (**Method AOCS 965.33**), 4th ed., edited by R.E. Walker, American Oil Chemists' Society, Champaign, 1990. (s.d.).

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (**Method AOCS Ce 2-66**), 4th ed., edited by R.E. Walker, American Oil Chemists' Society, Champaign, 1990. (s.d.).

OGNJANOVIC N, BEZBRADICA D, KNEZEVIC-JUGOVIC Z. **Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability**. Bioresource Technology; v. 100:5146–54, 2009.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO₂ supercrítico**. Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO₂**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 39, n. 12, p. 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA, D., & OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO₂**. Journal of Supercritical Fluids, v. 19, 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., DI LUCCIO, M., FACCIO, C., ROSA, C. D., BENDER, J. P., LIPKE, N., AMROGINSKI, C., DARIVA, C., OLIVEIRA, J. V. **Optimization of alkaline transesterification of soybean oil and castor oil for biodiesel production**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 553 – 559, 2005a.

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, 2005b.

OLIVEIRA, J. F., LUCENA, I. L., SABOYA, R. M., RODRIGUES, M. L., TORRES, A. E., FERNANDES, F. A., ET AL. **Biodiesel production from waste coconut oil by esterification with ethanol: The effect of water removal by adsorption**. Renewable Energy, pg. 2581-2584, 2010.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Lipases de Látex vegetal: propriedades e aplicações industriais.** Química Nova, v.29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARENTE, E.J.S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado.** FORTALEZA: UNIGRÁFICA, 2003.

PASTA, P.; MAZZOLA, G.; CARREA, G.; RIVA, S. **Subtilising catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide.** Biotechnology Letters, v.2, p. 643, 1989.

PINNARAT, T., SAVAGE, P. **Assessment of non-catalytic biodiesel synthesis using supercritical reaction conditions.** Industrial Engineering Chemistry Research, v. 47, pp. 6801-6808, 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 of Brazilian Chemistry Society, v. 16, pp. 1313-1330, 2005.

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, pp.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.

RATHORE, V., MADRAS, G.; **Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide.** Fuel; v. 86, pp. 2650–2659, 2007.

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

REYES-DUARTE, D; LOPEZ-CORTES, N; FERRER, M; PLOU, JF.; BALLESTEROS, A. **Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate.** Biocatal Biotransfor, 19-27, 2005.

REZAEI, K.; TEMELLI, F. **On-line extraction-reaction of canola oil using immobilized lipase in supercritical CO₂.** Journal of Supercritical Fluids; v. 19, pp. 263-274, 2001.

SAVAGE, P., GOPALAN, S., MIZAN, T., MARTINO, C., BROCK, E. **Reactions at Supercritical Conditions: Applications and Fundamentals.** Reactors, Kinetics and Catalysis, v. 41, pp. 1723-1756, 1995.

SHAH S, GUPTA MN. **Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system.** Process Biochemistry; v. 42:409–14, 2007.

SHAO P, MENG X, HE J, SUN P. **Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soap stock.** Food and Bioproduct Processing; v. 86:283–2899, 2008.

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

SILVA, C.; WESCHENFELDER, T. A.; ROVANI, S.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; J. V. OLIVEIRA. **Continuous production of fatty acid ethyl esters**

from soybean oil in compressed ethanol, Industrial Engineering Chemistry Research, v.46, p. 5304-5309, 2007.

SILVA, C. **Produção de Ésteres Etilicos por Transesterificação não Catalítica de Óleo de Soja**. Universidade Estadual de Maringá, Brazil. 2009.

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

STANDARD UNE - **EN 14103**. Fat and oil derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. (Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid, 2001).

SZYBIST, J. P.; BOEHMAN, A. L.; TAYLOR, J. D.; McCORMICK, R. L. **Evaluation of formulation strategies to eliminate the biodiesel NOx effect**. Fuel Processing Technology, v.86, p. 1109-1126, 2005.

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

TRUBIANO, G., BORIO, D., & ERRAZU, A. **Influence of the operating conditions and the external mass transfer**. Enzyme and Microbial Technology, pg. 716-722, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J., HAAS, M. J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches** Review. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, v. 9, p. 113-148, 2000.

VAN GERPEN J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel analytical methods: August 2002-January 2004**. National renewable energy laboratory, NREL/SR-510-36240, Colorado; July 2004

WANG, C. W.; ZHOU, J. F.; CHEN, W.; WANG, W. G.; WU, Y. X.; ZHANG, J. F.; CHI, R. A.; YING, W. Y. **Effect of weak acids as a catalyst on the transesterification of soybean oil in supercritical methanol**, Energy & Fuels 22, 3479- 3483, 2008.

WANG, L.; HE, HE.; XIE, Z.; YANG, J.; ZHU, S. **Transesterification of the crude oil of rapeseed with NaOH in supercritical and subcritical methanol**, Fuel Processing Technology 88, 477-481, 2007.

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.biodiesel.org – Acessado em outubro de 2010.

APÊNDICE A - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste capítulo são apresentadas as condições cromatográficas utilizadas para as análises cromatográficas e a metodologia empregada para determinação da conversão da reação em termos de rendimento em ésteres etílicos de ácidos graxos.

A.1 Ésteres de Ácidos Graxos

O método cromatográfico utilizado para quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi estipulado pela norma EN 14103 (2001). A solução era então injetada (1 µL) em duplicata em um cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), equipado com injetor automático AOC – 20i e uma coluna capilar RTX – WAX (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 120°C, permanecendo por 2 min nessa condição, aumentando - se a temperatura a uma taxa de 10°C/min até 180°C, permanecendo assim por 2 min, e aumentando novamente a uma taxa de 5°C/min até 230°C permanecendo por 2 min nessa condição. Ar sintético e nitrogênio eram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250°C e a taxa de split de 1:50.

A.2 Cálculos da conversão da reação

As amostras foram preparadas após evaporação do etanol conforme apresentado no capítulo 3. A solução preparada em duplicata era então injetada no cromatógrafo gasoso e o cálculo do percentual de ésteres etílicos da amostra era obtido através da Equação A.1, com base na EN 14103 (2001) modificada.

$$Esteres(\%) = \left(\frac{\sum A - API}{API} \frac{CPI}{C_{amostra}} \right) * 100 \quad A.1$$

onde:

$\sum A$ = Somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14:0 à C24:0) e do padrão interno (C17:0);

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

CPI = Concentração do Padrão Interno na amostra injetada [mg/L];

$C_{amostra}$ = Concentração da amostra injetada [mg/L].

Com base na composição química (Tabela A.1) obtida pela derivatização do óleo de soja com BF₃/MetOH conforme AOCS (1990), o peso molecular médio do óleo de soja é de 871,91 g/gmol e 306,9 g/gmol para seus ésteres etílicos.

Tabela A.1 - Composição química em ácidos graxos do óleo de soja (Marca Soya) utilizado como substrato

Componente	Percentual médio (%)
C16:0 (ácido palmítico)	10,08 ± 0,08
C18:0 (ácido esteárico)	3,80 ± 0,01
C18:1 (ácido oléico)	27,70 ± 0,02
C18:2 (ácido linoléico)	52,70 ± 0,13
C18:3 (ácido linolênico)	5,00 ± 0,03

Desta forma, com a conversão completa da reação, para cada mol de triglicerídeo reagido, serão produzidos: 1010,9 g de produtos, dos quais 918,9g são ésteres e 92g é glicerol.

Considerando a estequiometria de uma reação com 100% de conversão, cerca de 91% dos produtos correspondem à mistura de ésteres.

$$\begin{array}{l}
 1010,9 \text{ g produtos} \longrightarrow 100\% \\
 918,9 \text{ g ésteres} \longrightarrow X \\
 X = 91\%
 \end{array}$$

Considerando 91% da massa de amostra coletada, obtém-se a massa referente ao rendimento em ésteres teórico que deveriam estar presentes na amostra se a conversão da reação atingisse 100%.

$$\begin{array}{l}
 \text{massa coletada (g)} \longrightarrow 100\% \\
 \text{massa teórica (g)} \longrightarrow 91\% \text{ são ésteres}
 \end{array}$$

Logo, à conversão em ésteres da reação é obtida substituindo a C_{amostra} na equação A.1 pela $C_{\text{teórica}}$, deste modo:

$$\text{Conversão em Esteres (\%)} = \left(\frac{\sum A - API}{API} \frac{CPI}{C_{\text{teórica}}} \right) * 100 \quad (\text{A.2})$$

onde:

$C_{\text{teórica}}$ = Concentração da amostra teórica em ésteres considerando a reação completa [mg/L].

A seguir é apresentado um exemplo dos resultados obtidos para o experimento com as seguintes condições experimentais: temperatura de 70°C, pressão de 200 bar, razão molar óleo:etanol de 1:9, razão mássica solvente:substrato de 1:1 e 30 g de enzima. Primeiramente na Tabela A.2 são apresentados os resultados das análises cromatográficas referentes aos pontos de coletas em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min, em relação às áreas obtidas das injeções das amostras.

Tabela A.2 - Áreas da amostras obtidas pela injeção em duplicata.

Tempo de coleta	M amostra (mg)	ΣA	API
30	268,6	332807,8	111936,0
	280,0	341605,3	109526,7
60	265,4	324849,4	121063,2
	254,0	330996,6	120589,5
90	251,6	336670,2	113767,6
	261,6	354652,3	118389,9
120	267,0	377704,3	124913,7
	272,5	376895,1	123705,0
150	265,7	313621,1	114910,3
	268,6	328004,1	119967,8
180	264,4	363743,5	122035,1
	258,3	325501,1	116713,3

As amostras foram injetadas na concentração de aproximadamente 1000 mg/L, o que corresponde a uma massa de 0,01 g de amostra em 0,001 L de solução. Como apresentado anteriormente dessa massa total pela estequiometria da reação apenas 91% pode ser considerada como sendo biodiesel (em conversão completa), ou seja, 0,0091g. Pela área dos ésteres e do padrão interno em cada amostra e da massa das mesmas apresentadas nas Tabelas A.2, obtém-se pela equação A.2 a conversão da reação. Como a injeção é realizada em duplicata, realiza - se a média dos resultados de rendimento em ésteres. A seguir é apresentado um exemplo de cálculo de conversão para a amostra do ponto de 30 minutos da Tabela A.2 juntamente com o cromatograma similar (Figura A.1). Na Tabela A.3 estão apresentadas às conversões obtidas em todos os pontos do experimento, apresentados na Tabela A.2.

Exemplo: Amostra do ponto de 30 minutos da Tabela A.2.

Amostra	M amostra (mg)	ΣA	API
30	268,6	332807,8	111936,0
	280,0	341605,3	109526,7

A massa da amostra era diluída em um balão de 10 ml com n-heptano resultando em:

$$C_{\text{amostra}}=26860 \text{ mg/L}$$

Em seguida, retirava 50 μL da amostra para colocar no balão de 1,0 mL.

$$C_{\text{teórica}}=1343*0,91 = 1222,13 \text{ mg/L}$$

$$C_{\text{PI}}=268 \text{ mg/L}$$

$$\text{Teor em Ésteres (\%)} = \left(\frac{332807,8 - 111936}{111936} \frac{268}{1222,13} \right) * 100$$

$$\text{Teor em Ésteres (\%)} = 43,27(\%)$$

Tabela A.3 – Rendimento em ésteres etílicos das amostras referentes ao experimento em temperatura de 70°C, pressão de 200 bar, razão molar óleo:etanol de 1:9, razão mássica solvente:substrato de 1:1 e 30 g de enzima.

Coleta	$C_{\text{teórica}}$ (mg/L)	Rendimento em Ésteres etílicos (%)	Média do Rendimento em Ésteres etílicos (%)
30	1343	43,27	43,92
	1400	44,57	
60	1327	37,35	38,90
	1270	40,46	
90	1258	45,86	45,40
	1308	44,93	
120	1335	44,64	44,44
	1362	44,24	
150	1328	38,33	38,18
	1343	38,02	
180	1322	44,12	42,45
	1291	40,79	

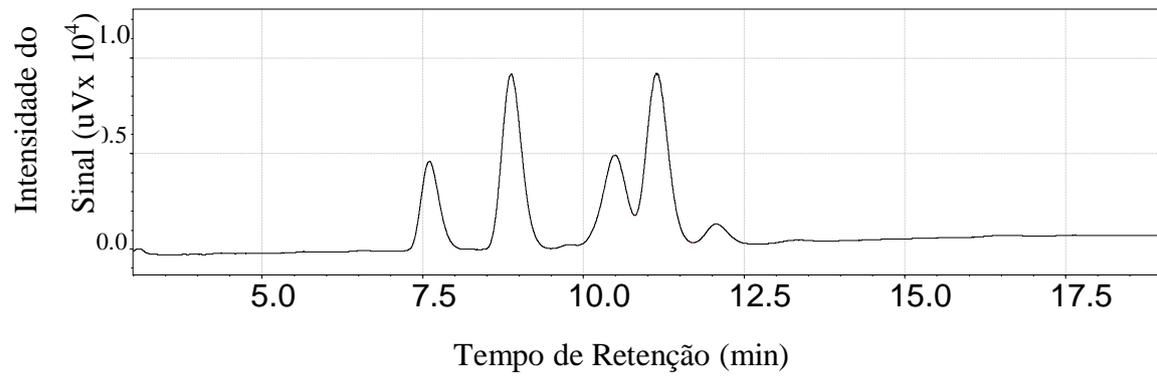


Figura A.1 – Cromatograma representativo

APÊNDICE B – DETALHES DE PROCESSO

Tabela B.1 – Quadro das vazões de dióxido de carbono supercrítico e de substrato.

Pressão (bar)	100 (bar)			148.22 (bar)			200 (bar)		
Substrato:Solvente	01:01	01:02	01:03	01:01	01:02	01:03	01:01	01:02	01:03
Vazão da bomba de líquido (ml/min)	Vazão de Solvente na Bomba de Alta Pressão (ml/min)								
1	0,888	1,777	2,665	0,862	1,725	2,587	0,841	1,683	2,524
3	2,665	5,331	7,996	2,587	5,174	7,761	2,524	5,049	7,573
5	4,442	8,884	13,327	4,312	8,623	12,935	4,207	8,415	12,622