

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LUCAS RAMOS

Produção enzimática de biodiesel a partir do óleo de macaúba
em reatores de leito fixo duplo estágio

Lorena-SP-Brasil

2015

LUCAS RAMOS

Produção enzimática de biodiesel a partir do óleo de macaúba
em reatores de leito fixo duplo estágio

Dissertação de Mestrado submetido à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo no Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química na área de
Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão Original

Lorena

2015

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramos, Lucas

Produção enzimática de biodiesel a partir do óleo da macaúba em reatores de leito fixo duplo estágio / Lucas Ramos; orientadora Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. - Lorena, 2015.
99 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Óleo de macaúba. 2. Lipase. 3. Reator de leito fixo. 4. Transesterificação. 5. Biodiesel. I. Título. II. de Castro, Heizir Ferreira, orient.

*Ao meu filho Guilherme Amorim Ramos
pela presença alegre e carinhosa,
pelo amor que se permite dar e receber,
por ser a justificativa e inspiração
para todo e qualquer trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Cecília e ao meu pai Renaldo, pela profundidade e simplicidade com que preenchem meu caminho e pensamentos. Obrigado por sempre estarem presentes e pela importância imensurável que possuem em minha vida.

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

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

À professora Dra. Larissa Freitas por me auxiliar em todos os momentos do trabalho, pelo exemplo de profissionalismo e conduta ética, pela disponibilidade em ajudar e ensinar nesse período de trabalho.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Aos amigos que me acompanharam nessa fase, Bruno Vidal, Davison, Luiz Fernando, Luiz Gustavo, Filipe Vieira, Danilo, Flávia, Lucas, Rafael, Heitor, Sara, Karine Annie, Renata, Braz, Daniela, William, Weriton, Patrícia, Pedro, Mayara, Emanuelle que serão inesquecíveis em minha vida. Obrigado pelo companheirismo e amizade.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela CAPES.

RESUMO

LUCAS, R. **Produção enzimática de biodiesel a partir do óleo de macaúba em reator de leito fixo duplo estágio.** 2015. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2015.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a potencialidade do óleo de macaúba como matéria-prima para síntese de biodiesel pela rota enzimática. Utilizou-se como proposta a transesterificação do óleo de macaúba com etanol mediada pela enzima lipase em fluxo contínuo empregando reator de leito fixo, visando obter amostras de biodiesel com propriedades adequadas à sua utilização como biocombustível. A enzima selecionada para desenvolvimento experimental foi a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte híbrido não comercial (SiO₂-PVA). Foram testados reatores de leito fixo de um estágio e dois estágios. A primeira etapa do trabalho foi direcionada para testes visando avaliar a influência da razão entre a altura (l) e o diâmetro (d) do reator de leito fixo na etanolise do óleo de macaúba. As reações foram operadas continuamente por 20 dias, utilizando óleo: etanol numa razão molar de 1:12 na ausência de solvente e tempo espacial de 14h. Dois reatores foram testados: Reator A ($l = 55$ mm e $d = 15$ mm) e Reator B ($l = 210$ mm e $d = 14$ mm), apresentando relação geométrica (l/d) de 3,7 e 15, respectivamente. Os dados obtidos indicaram influência das dimensões da coluna empacotada na produção de biodiesel e nas condições testadas, a maior razão altura/diâmetro não interferiu na transferência de massa do fluido através da coluna. O melhor desempenho foi obtido no sistema experimental que empregou o reator B, atingindo $89,7 \pm 4,8\%$ de rendimento e $40,4 \pm 2,2$ mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ de produtividade. Na sequência o trabalho foi direcionado para a execução de testes empregando reatores de leito fixo (Reator B) duplo estágio incorporando uma coluna empacotada com resina catiônica (Lewatit® GF 202) para remover o glicerol formado e proporcionar um incremento na formação de ésteres de etila em relação ao primeiro estágio. O desempenho do reator foi avaliado para diferentes tempos espaciais (10 a 16h), mantendo fixas as demais condições operacionais (substrato constituído de óleo de macaúba e etanol na razão molar óleo: etanol de 1:12 e temperatura de 50 °C). O funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais no sistema igual a 16h, resultando em valores médios de produtividade de $36,7 \pm 2,4$ mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ com perdas mínimas de matéria-prima (rendimento de transesterificação = $96,3 \pm 2,1\%$), sem redução de eficiência durante 25 dias de operação. As amostras de biodiesel purificadas apresentaram baixos teores de monoacilgliceróis (3,8%) ausência de diacilgliceróis e viscosidade cinemática média de $5,8 \pm 0,3$ mm².s⁻¹, atendendo as normas vigentes pela resolução ANP n°14/2012, que estabelece viscosidade cinemática do B100 na faixa entre 3,0 - 6,0 mm².s⁻¹. O biocatalisador foi estável quanto suas características morfológicas e catalíticas, revelando tempo de meia-vida de 423 h. Desta forma, a configuração do sistema reacional constituído por reator de leito fixo duplo estágio com a remoção simultânea de glicerol tem grande potencial para atingir elevado rendimento de transesterificação, aumentando a produtividade de biodiesel e consequentemente diminuindo o custo do processo industrial. Em geral, os resultados foram promissores e mostraram o potencial do óleo de macaúba para ser usado como matéria-prima para a produção de biodiesel em fluxo contínuo.

Palavras-chave: Óleo de macaúba. Lipase. Transesterificação. Reator de leito fixo. Biodiesel. Processo contínuo.

ABSTRACT

RAMOS, L. **Enzymatic biodiesel production from macaw palm oil in a two-stage packed-bed reactor**. 2015. 99 p (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

The present study aimed at assessing the potential of macaw palm oil as a raw material for the synthesis of biodiesel by enzymatic route. The proposed experimental was to develop a process that was able to transesterify the macaw palm oil with ethanol by immobilized lipase in packed bed reactor under continuous flow, in order to obtain biodiesel having suitable properties to be used as a fuel. The enzyme chosen for the development of this work was the microbial lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on non-commercial hybrid matrix SiO₂-PVA. Single and two stages packed bed reactors were tested. Initially the influence of the reactor dimensions and ratio between height (l) and diameter (d) in the performance of the ethanolysis of macaw palm oil was assessed. Tests were carried out using two reactors (A and B) having different geometric relations: Reactor A ($l = 55$ mm and $d = 15$ mm) and Reactor B ($l = 210$ mm and $d = 14$) which corresponded to height/diameter ($l/d = 3.7$ and $l/d = 15$), respectively. Runs were performed continuously for 20 days using substrate containing oil to ethanol molar ratio of 1:12 in a solvent-free system and fixed space time of 14h. Data suggested that the dimensions of the packed column had a slight influence on the biodiesel production and under the conditions tested, the highest relation ($l/d = 15$) did not affect the fluid mass transfer throughout the reactor column. Under these conditions runs carried out in the reactor B provided average yields of $89.7 \pm 4.8\%$ and productivities of 40.4 ± 2.2 mg_{ester}·g⁻¹·h⁻¹. Following this, a two-stage packed bed reactor incorporating a column with cationic resin (Lewatit® GF 202) to remove the glycerol formed as by-product was used. The reactor performance was quantified for four different flow rates corresponded to spatial times from 10 to 16 h. For each condition, the influence of spatial times in the ethyl esters formation, transesterification yields and productivities were determined. The reactor operation was demonstrated for spatial time equal to 16 h, attaining ethyl ester formation of 58.1 ± 2.1 wt%, transesterification yields of $96.3 \pm 2.1\%$ and productivities of 36.7 ± 2.4 mg_{ester}·g⁻¹·h⁻¹ with no significant reduction in the efficiency during 25 days. The purified samples showed residual levels of monoglycerides (3.8 wt %), absence of diglycerides and average viscosity values of 5.8 mm²/s which can be considered appropriated according to Brazilian resolution ANP n° 14/2012. The immobilized lipase on SiO₂-PVA was found to be stable regarding its morphological and catalytic characteristics, showing half-life time ($t_{1/2}$) higher than 423 h. Therefore, the continuous packed-bed reactor connected in series with simultaneous glycerol removal has a great potential to attain high level of transesterification yields, raising biodiesel productivity, consequently decreasing industrial process cost. Overall, the results were promising and showed the potential of macaw palm oil to be used as feedstock for biodiesel production under continuous flow.

Keywords: Macaw palm oil. Lipase. Transesterification. Packed bed reactor. Glycerol removal. Biodiesel. Continuous process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Partes que compõem o fruto de macaúba.....	27
Figura 3.2. Fluxograma mostrando o aproveitamento dos componentes do fruto da macaúba.	28
Figura 3.3. Representação esquemática da reação global de transesterificação.....	32
Figura 3.4. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.	33
Figura 3.5. Classificação dos processos de transesterificação.....	34
Figura 3.6. Exemplos de configurações de biorreatores utilizados na bioconversão de processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reatores (a) leito fixo (PBR - Packed bed reactor), (b) leito fluidizado (FBR - Fluidized bed reactor), (c) batelada tanque agitado (BSTR - Batch stirred tank reactor), (d) contínuo tanque agitado (CSTR - Continuous stirred-tank reactor) e (e) Reator de Membrana (MR - Membrane Reactor). ..	45
Figura 3.7. Representação esquemática da produção enzimática de biodiesel em: (1) Reator de leito fixo simples estágio; (2) Reator de leito fixo quatro estágios em série. (a) tanque de alimentação; (b) bomba peristáltica; (c) reator de leito fixo; (d) tanque coleta de produto.	49
Figura 4.1. Esquema experimental do reator de leito fixo simples estágio (1) $l/d = 3,7$ e (2) $l/d=15$ 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Coluna- 7- Saída do produto.....	55
Figura 4.2. Montagem experimental utilizada na etanólise contínua do óleo de macaúba em reator de leito fixo duplo estágio: (a) Agitador magnético; (b) Vaso de alimentação contendo meio reacional; (c) condensador; (d) Bomba peristáltica; (e) Primeiro estágio empacotado com lipase <i>B.cepacia</i> imobilizada em SiO_2 -PVA; (f) Coluna extratora de glicerol (Lewatit GF 202); (g) Segundo estágio empacotado com lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO_2 -PVA; (h) Saída de produto (Ésteres etílicos).	56
Figura 4.3. Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de macaúba e etanol).....	58
Figura 4.4. Ilustração do sistema durante o teste traçador demonstrando a distribuição do corante no reator.	59
Figura 5.1. Perfil de formação dos ésteres de etila na etanólise contínua do óleo de macaúba em reator de leito fixo, empregando diferentes relações geométricas (l/d): a) Reator A e b) Reator B.	69
Figura 5.2. Rendimento da produção de ésteres de etila em função do tempo reacional na etanólise contínua do óleo de macaúba realizada em reator de leito fixo.....	70
Figura 5.3. Relação entre concentração de ésteres de etila, monoacilglicerol e diacilglicerol quantificados no produto purificado obtido em fluxo contínuo (Reator B). .	72

Figura 5.4. Espalhamento do corante no interior do primeiro reator durante a realização do teste traçador (fotografia referente ao primeiro tempo espacial, 4,85 horas).	75
Figura 5.5. Concentrações reais do traçador na saída do reator em função do tempo.....	76
Figura 5.6. Influência do tempo espacial no rendimento de transesterificação e produtividade da etanolise contínua do óleo de macaúba conduzida em reator de leito fixo duplo estágio acoplado com coluna extratora de glicerol.....	77
Figura 5.7. Perfil de formação dos ésteres de etila na etanolise contínua do óleo de macaúba em reator de leito fixo duplo estágio (a) estágio I, (b) estágio II.	79
Figura 5.8. Concentração total de ésteres de etila e do rendimento de transesterificação no processo conduzido em reator de dois estágios (a- estágio I, b-estágio II).	80
Figura 5.9. Relação entre concentração de ésteres (CE%), monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) quantificados nas amostras obtidas em fluxo contínuo, no segundo estágio.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Especificações para ésteres metílicos e etílicos de acordo com as normas Brasileira, Americana e Européia.	24
Tabela 3.2. Impactos ambientais do uso do biodiesel.....	25
Tabela 3.3. Composição em ácidos graxos presentes na amêndoa e na polpa do fruto de macaúba.	29
Tabela 3.4. Estudos referentes a aplicação do óleo de macaúba para obtenção de compostos de interesse industrial	30
Tabela 3.5. Comparação entre os principais métodos para a produção de biodiesel.....	31
Tabela 3.6. Comparação entre catalisadores homogêneos e heterogêneos usados para produção de biodiesel.	34
Tabela 3.7. Exemplos de catalisadores heterogêneos usados na produção de biodiesel. ...	36
Tabela 3.8. Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras.....	40
Tabela 3.9. Principais variáveis envolvidas na escolha de um reator enzimático	44
Tabela 3.10. Tipos de reatores enzimáticos contínuos e suas características.	47
Tabela 3.11. Sumário dos principais tópicos de experimentos de produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo contínuo (PBR)	51
Tabela 4.1. Equipamentos utilizados nas atividades experimentais.	54
Tabela 4.2. Propriedades catalíticas da lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA. .	57
Tabela 4.3. Condições para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa. .	63
Tabela 5.1. Cálculos dos parâmetros operacionais dos reatores de leito fixo.....	67
Tabela 5.2. Descrição dos experimentos realizados no trabalho	68
Tabela 5.3. Quadro comparativo do desempenho do reator de leito fixo na etanólise contínua do óleo de macaúba mediada por <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	71
Tabela 5.4. Correlação entre as propriedades das amostras de biodiesel obtidas no processo de transesterificação do óleo de macaúba.....	71
Tabela 5.5. Tempo médio de residência, variância e coeficiente de assimetria obtido por meio do teste de traçador tipo pulso para o sistema reacional (reator duplo estágio).	76
Tabela 5.6. Parâmetros do processo na etanólise do óleo de macaúba em reator duplo estágio.	82

ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AGL	cidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
B8	Mistura de biodiesel no diesel (8% de biodiesel 92% petrodiesel)
B20	Mistura de biodiesel no diesel (20% de biodiesel 80% petrodiesel)
BSTR	Reator Batelada de Tanque Agitado
CSTR	Reator de Tanque Agitado Contínuo
CG	Cromatografia Gasosa
DAG	Diacilglicerol
DTR	Distribuio do Tempo de Residência
EE	steres Etílicos
EM	steres Metlicos
EN 14214	Especificaes físico-químicas de qualidade para o biodiesel (Europa)
EtOH	Etanol
k_d	Constante de desativao térmica
MAG	Monoacilglicerol
MeOH	Metanol
NBR	Norma da Associao Brasileira de Normas Técnicas
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio
PBR	Reator de Leito Fixo
PEG	Polietilenoglicol
PNPB	Programa Nacional de Produo e Uso de Biodiesel
PVA	lcool Polivinílico
SiO₂-PVA	Suporte Híbrido Polissiloxano – lcool polivinílico
TAG	Triacilgliceróis
t_(1/2)	Tempo de meia-vida
TEOS	Tetraetilortosilicato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. BIODIESEL E O CENÁRIO ENERGÉTICO	23
3.2. MATÉRIAS-PRIMAS	25
3.3. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	31
3.3.1. <i>Reações de transesterificação</i>	32
3.3.2. <i>Transesterificação enzimática</i>	37
3.4. LIPASES	38
3.5. FATORES QUE INTERFEREM NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIODIESEL.....	41
3.5.1. <i>Teor de água</i>	41
3.5.2. <i>Efeito inibitório do subproduto glicerol</i>	41
3.5.3. <i>Efeito inibidor do agente acilante</i>	42
3.5.4. <i>Solventes orgânicos</i>	43
3.6. BIORREATORES COM LIPASES IMOBILIZADAS.....	43
3.7. REATORES DE LEITO FIXO	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. MATERIAIS	53
4.1.1. <i>Biocatalisador</i>	53
4.1.2. <i>Materiais de partida</i>	53
4.1.3. <i>Adsorvente de glicerol (Resina Lewatit® GF202)</i>	53
4.1.4. <i>Outros reagentes</i>	53
4.2. EQUIPAMENTOS.....	54
4.3. MONTAGEM EXPERIMENTAL DOS REATORES DE LEITO FIXO	54
4.3.1. <i>Reator de leito fixo (um estágio)</i>	54
4.3.2. <i>Reator de leito fixo (duplo estágio)</i>	55
4.4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	56
4.4.1. <i>Imobilização da lipase no suporte SiO₂-PVA</i>	56
4.4.2. <i>Ativação e recuperação da resina Lewatit® GF 202</i>	57
4.4.3. <i>Calibração da bomba peristáltica</i>	57
4.4.4. <i>Função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR)</i>	58
4.4.5. <i>Síntese de biodiesel em reator de leito fixo (simples estágio e duplo estágio)</i>	61
4.4.6. <i>Purificação das amostras de biodiesel</i>	61
4.5. MÉTODOS DE ANÁLISES	61
4.5.1. <i>Atividade hidrolítica do derivado imobilizado</i>	61
4.5.2. <i>Teor de umidade do suporte e do derivado imobilizado</i>	62
4.5.3. <i>Determinação da viscosidade cinemática dos ésteres de etila</i>	62
4.5.4. <i>Massa específica do biodiesel</i>	62
4.5.5. <i>Quantificação dos ésteres de etila</i>	62
4.5.6. <i>Quantificação de mono e diacilgliceróis nas amostras de biodiesel purificadas</i>	63
4.6. CÁLCULOS	64
4.6.1. <i>Rendimentos de transesterificação</i>	64
4.6.2. <i>Tempo espacial (τ)</i>	65
4.6.3. <i>Produtividade em ésteres de etila</i>	65
4.6.4. <i>Tempo de meia-vida do biocatalisador</i>	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1. AJUSTE DA VAZÃO DA BOMBA PERISTÁLTICA E CÁLCULO DO TEMPO DE ESPACIAL	67
5.2. OPERAÇÃO DO REATOR DE LEITO FIXO	67
5.3. ESTUDO DA RELAÇÃO GEOMÉTRICA DO REATOR DE LEITO FIXO EM ÚNICO ESTÁGIO	68
5.4. CARACTERIZAÇÃO HIDRODINÂMICA DO REATOR DE LEITO FIXO EM DOIS ESTÁGIOS	73
5.5. DESEMPENHO DO REATOR EM DUPLO ESTÁGIO NA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MACAÚBA	76

6. CONCLUSÕES.....	85
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES	97

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis, principalmente o petróleo e seus derivados, sustentaram o crescimento industrial e econômico do século XX. As projeções indicam uma expansão acentuada e contínua do consumo mundial de energia para as próximas décadas, sendo estimado, até 2030, um aumento de 53% do consumo global de energia (MOFIJUR et al, 2014). Tal crescimento, aliado às perspectivas de esgotamento das reservas de petróleo em médio prazo, e a necessidade da redução das emissões de carbono responsáveis pelo aquecimento global vem estimulando o mercado mundial de biocombustíveis (MOFIJUR et al, 2014). Entre os combustíveis alternativos, o biodiesel surge como uma das melhores escolhas entre outras fontes, devido ao seu comportamento ambientalmente correto e propriedades funcionais similares com diesel (PEREZ et al, 2014; MOFIJUR et al, 2014).

A produção industrial de biodiesel é baseada na reação de matéria-prima lipídica com metanol mediada por catalisadores homogêneos alcalinos para promover a clivagem das moléculas de triacilgliceróis e gerar uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos. Apesar do elevado rendimento obtido por esta via, o metanol, um produto também fóssil (obtido do petróleo) e o uso de catalisadores homogêneos geram problemas ao meio ambiente, requerendo inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (KNOTHE et al., 2006).

Assim, a substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma opção promissora, pois atende à demanda por processos menos poluentes e mais seletivos, em função das inúmeras vantagens que os processos heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos, tais como pouca ou nenhuma corrosão; fácil separação; poucos problemas com rejeitos; fácil manuseio e possibilidade de reutilização (PINTO et al., 2005). Adicionalmente, catalisadores heterogêneos podem simplificar os processos de produção e purificação, diminuir o volume de águas residuárias, compactar o tamanho dos equipamentos, reduzir impacto ambiental e custo do processo (ZHANG et al., 2010). Várias pesquisas relacionadas à alcoólise de triglicerídeos envolvem o uso de catalisadores heterogêneos, como por exemplo, zeólitas básicas, óxidos e carbonatos de metais alcalino-terrosos e enzimas, em particular lipases (DE CASTRO et al., 2010; YUSUF; KAMARUDIN; YAAKOB, 2011).

Entre os catalisadores heterogêneos, o uso de lipases tem encontrado interesse atual, por se tratar de uma via eficiente, altamente seletiva, baixo consumo de energia (as reações podem ser realizadas em condições brandas de pressão e temperatura) e permitir

fácil recuperação do glicerol, principal subproduto formado na reação (BAJAJ et al., 2010). Após o final do processo, a fase inferior (glicerol) é simplesmente separada da fase superior (biocombustível) por simples decantação (TAN et al, 2010).

Em função das vantagens oferecidas, a via enzimática tem sido a mais empregada em trabalhos de pesquisa nos últimos anos. Isso é comprovado pelo número de artigos e patentes referentes ao uso de lipase na produção de biodiesel que, de acordo com estimativa publicada supera numericamente a soma dos artigos e patentes referentes à obtenção deste combustível por todos os outros processos (ZHAO et al, 2015; PINTO et al., 2005).

O desenvolvimento de um sistema operacional com enzima imobilizada envolve análise criteriosa de uma série de fatores, entre os quais se destacam: seleção do suporte de imobilização da enzima; natureza do substrato; requisitos operacionais da reação; cinética da reação; características de transferência de massa externa e interna; facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração; facilidade de construção do biorreator e custo do biorreator (POPPE et al, 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Várias configurações de reatores têm sido usadas em estudos com lipases imobilizadas. Duas fases estão invariavelmente presentes - uma sólida (isto é, o suporte no qual a enzima esta imobilizada) e uma ou duas fases líquidas, a fase sólida, em reatores trifásicos, pode aparecer com uma fase dispersa ou uma fase contínua (ZANIN, MORAES, 2004; POPPE et al, 2015). O leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação. Ele requer um mínimo de equipamentos auxiliares e é muito eficiente. Esse tipo de reator usualmente proporciona maior área superficial para a reação, por unidade de volume (POPPE et al, 2015).

Em trabalhos anteriormente desenvolvidos envolvendo reatores enzimáticos constatou-se que é possível obter biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol na ausência de solventes em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo (SIMÕES, 2011; SIMÕES et al, 2015). Entretanto, o processo necessita de um controle permanente de temperatura nas conexões para evitar solidificação do substrato em função da elevada proporção de ácidos graxos saturados (83%) presente nesta matéria-prima graxa. Desta forma, a opção de usar outros tipos de óleos vegetais pode viabilizar esta configuração de reator proporcionando uma operação estável sem gastos energéticos adicionais. Entre as alternativas de óleos vegetais para produção de biodiesel com potencial de exploração comercial no Brasil, destaca-se o óleo de macaúba que apresenta composição

predominantemente láurica em ácidos graxos como o óleo de babaçu, porém menor grau de insaturação (<70%) o que facilita a operação desta configuração de biorreator e supera as dificuldades anteriormente descritas (COSTA-SILVA et al, 2014).

Deve ser ainda destacado que a macaúba apresenta grande vantagem competitiva frente a outras oleaginosas devido a elevada produção de óleo/ha e rentabilidade agrícola. O potencial da macaúba tem sido sugerido para utilização no mercado de bioenergia, incluindo a produção de biodiesel, bioquerosene de aviação e carvão ativado (ACROTEC, 2015). A possibilidade de se utilizar todas as partes da palmeira também se torna interessante para a indústria química, de alimentos e cosméticos. Esta versatilidade estimula o desenvolvimento sustentável da região, trazendo benefícios para a população e o meio ambiente (ACROTEC, 2015).

O processamento do fruto da macaúba gera dois tipos de óleos: óleo da polpa e óleo da amêndoa. O óleo extraído da polpa, que corresponde a 18,2% do peso do fruto seco é constituído predominantemente de ácidos graxos insaturados (74-81%), sendo o ácido oleico (55-65%) o seu principal constituinte, enquanto o óleo extraído da amêndoa tem elevado teor de ácido láurico (38-45%) (DUARTE et al., 2010).

Desta forma, o presente projeto teve como objetivo determinar as condições operacionais da etanólise do óleo da amêndoa de macaúba, em fluxo contínuo, em meio isento de solvente, empregando reator de leito fixo empacotado com lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte não comercial constituído de polissiloxano álcool polivinílico (SiO₂-PVA). Esse derivado imobilizado tem sido empregado com sucesso em reações de etanólise de diferentes matérias-primas lipídicas em regime descontínuo (DA ROS et al, 2014; CARVALHO et al., 2013; DA ROS et al., 2010) e em fluxo contínuo (SIMÕES, 2011; COSTA-SILVA, 2013; COSTA-SILVA et al, 2014), fornecendo base de comparação para os resultados descritos no presente trabalho.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo verificar a potencialidade do óleo de macaúba como matéria-prima para síntese de biodiesel pela rota enzimática. Para tanto, foi proposto o estudo das condições operacionais da etanólise do óleo de macaúba em fluxo contínuo em reator de leito fixo duplo estágio, empregando lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte não comercial (SiO₂-PVA) como biocatalisador. Para alcançar esse objetivo foram executadas as seguintes etapas:

1. Avaliação da influência da relação geométrica (razão entre a altura (l) e o diâmetro (d)) do reator de leito fixo único estágio na etanólise do óleo de macaúba catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA;
2. Avaliação da influência do tempo espacial no desempenho do sistema de produção contínua de biodiesel enzimático a partir do óleo de macaúba, empregando reator de leito fixo duplo estágio na relação geométrica selecionada incorporando uma coluna extratora de glicerol;
3. Avaliação do desempenho e estabilidade do sistema de produção contínua de biodiesel enzimático a partir do óleo de macaúba, empregando reator de leito fixo duplo estágio, operando no fluxo anteriormente estabelecido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiesel e o cenário energético

Biodiesel é um combustível renovável, não tóxico e biodegradável, com emissões significativamente menores de materiais particulados e gases de efeito estufa, tais como CO, CO₂ e SO_x. Conseqüentemente, é ambientalmente favorável e demonstra grande potencial como um combustível líquido alternativo ao petrodiesel (PINTO et al., 2005; ATABANI et al., 2012). O biodiesel é produzido comercialmente em muitos países, como Estados Unidos da América, Malásia, Indonésia, Brasil, Alemanha, França, Itália, entre outros (ATABANI et al., 2012). O Brasil está no ranking dos maiores produtores mundiais tendo alcançado a colocação de 2º lugar, em 2014, contabilizando a produção e consumo de 3,4 bilhões de litro, enquanto os EUA produziram e consumiram 4,8 bilhões de litro. Entretanto, deve ser destacado que a capacidade de produção atual de biodiesel no país é da ordem de 7,74 bilhões de litro, o que corresponde a 56% de ociosidade do setor industrial registrado em 2014. A retomada do mercado é estimada para o corrente ano (2015) alicerçada na supersafra de soja, principal matéria-prima, e na lei que ampliou a adição de biocombustível no diesel para 8% (RETOMADA..., 2015).

Biodiesel é a denominação de ésteres alquílicos de ácidos graxos desde que atenda certos parâmetros de qualidade (KNOTHE, 2010). A determinação da qualidade do biocombustível é um aspecto de grande importância para a comercialização do biodiesel. Portanto, é importante monitorar as propriedades físico-químicas por meio de normas estabelecidas, tais como na Europa (EN 14214); e nos Estados Unidos (ASTM D6751) que limitam a quantidade de contaminantes permitida no biodiesel (KNOTHE et al, 2006). No Brasil as normas de qualidade são descritas na Resolução 14/2012 da ANP, a especificação brasileira é similar a europeia e americana, com alguma flexibilidade para atender às características das matérias-primas nacionais. Alguns itens a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo (Tabela 3.1).

O objetivo da Resolução N°14/2012 da ANP é adequar o produto às necessidades do mercado, visando a sua comercialização e contribuição para a seleção da matéria-prima mais adequada na produção de biodiesel de qualidade.

Apesar de apresentar vantagens, o biodiesel possui menor poder calorífico (cerca de 10% no caso do biodiesel puro), emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NO_x) e possui maior densidade que o petrodiesel em regiões de clima frio (BASHA; GOPAL; JEBARAJ, 2009).

Tabela 3.1. Especificações para ésteres metílicos e etílicos de acordo com as normas Brasileira, Americana e Européia.

Características	Unidade	Normas
		ANP/ASTM/ EN ISO
Densidade à 20°C	kg.m ⁻³	850-900/-/860-900 ^a
Viscosidade cinemática à 40°C	mm ² .s ⁻¹	3,0-6,0/1,9-6,0/3,5-5,0
Teor de água, máx.	mg/kg	500/-/500
Contaminação total, máx.	mg/kg	24/-/24
Ponto de fulgor, mín.	°C	100/130/120
Teor de éster, mín.	% (m/m)	96,5/-/96,5 ^b
Teor de enxofre, máx.	mg/kg	50/15(500)/10
Número de cetano, mín.	-	Anotar/47/51
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50/0,50/0,50
Glicerol livre, máx.	% (m/m)	0,02/0,02/0,02 ^b
Glicerol total, máx.	% (m/m)	0,25/0,24/0,25 ^b
Metanol ou etanol, máx.	% (m/m)	0,2/-/0,2 ^b
Índice de iodo, máx.	g/100g	Anotar/-/120
Estabilidade oxidativa (110°C) min.	horas	6/-/6

ANP- Norma Brasileira; ASTM-Norma americana; EN ISO- Norma européia
(Fonte: Adaptado de BRUNCSHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

Na Tabela 3.2, são mostrados resumidamente os impactos, em forma de vantagens e desvantagens do ponto de vista ambiental, que podem ser quantificados, como por exemplo: o efeito estufa por meio das emissões de CO₂, efeitos de acidificação por meio das emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x) e a destruição da camada de ozônio devido às emissões de óxido nitroso (N₂O).

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

Tabela 3.2. Impactos ambientais do uso do biodiesel

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

(Fonte: Adaptada de RIBEIRO; PEIXOTO; SOUZA, 2008).

3.2. Matérias-primas

O Brasil apresenta ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel, como a soja, o girassol, a mamona, o milho, o pinhão-manso, o algodão, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, a macaúba, o amendoim, dentre outras. Óleos de descarte, gorduras animais e óleos usados para cocção de alimentos também são utilizados como matérias-primas alternativas (PEREZ et al, 2014). No entanto, é importante ressaltar que as propriedades químicas e físicas das matérias-primas estão diretamente associadas à tecnologia e ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, à qualidade do produto final (SARAF; THOMAS, 2007). Os ácidos graxos mais comuns encontrados naturalmente nos óleos e gorduras são: láurico (C12:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2).

A escolha da matéria-prima mais apropriada para a produção de biodiesel pode ser um dos principais problemas no setor. No Brasil, 90% de biodiesel produzido utiliza soja

como principal matéria-prima, umas das matérias-primas mais caras deste mercado. Além disso, a soja é uma das oleaginosas que menos rende óleo por hectare cultivado (BIODIESELBR, 2011).

Mais de 95% das matérias-primas empregadas na produção do biodiesel provem de óleos vegetais comestíveis, uma vez que as propriedades dos seus derivados ésteres (biodiesel) atendem as especificações para serem utilizados como substituto ao óleo diesel e a cadeia de produção das oleaginosas já é bem estabelecida. Entretanto, a utilização de óleos comestíveis pode ocasionar competição entre a cadeia alimentícia e de biocombustíveis, o que implicaria na elevação do preço de ambos os produtos (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Para contornar tais limitações, pesquisas têm sido direcionadas para uso de óleos não comestíveis, os quais não são aptos para a alimentação humana devido ao elevado teor de ácido graxo saturado (considerados prejudiciais a saúde) ou à presença de componentes tóxicos, como os contidos nos óleos de mamona e colza (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Diante das diversas fontes de óleos e gorduras com potencial para produzir um combustível que venha a substituir parcial ou totalmente o diesel fóssil, três aspectos devem ser atendidos: viabilidade técnica e econômica para a produção e obtenção do óleo ou gordura em escala suficiente para atender à demanda pelo biocombustível; viabilidade técnica e econômica para transformá-lo em biocombustível; e, garantias de que a qualidade do biocombustível produzido seja compatível com o seu uso em motores veiculares ou estacionários. Caso um desses três aspectos não seja contemplado, certamente não se deve considerar a fonte lipídica como matéria-prima potencial para programas energéticos (SUAREZ et al., 2009).

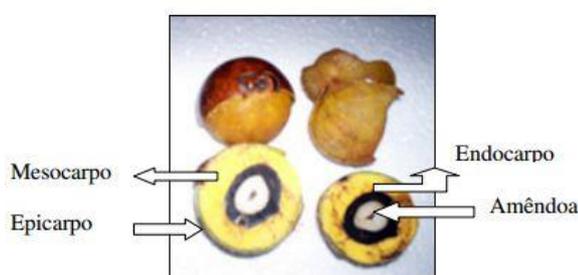
Recentemente, a cultura da macaúba tem revelado grande potencial para produção de óleo com vasta aplicação nos setores industriais e energéticos, com vantagem sobre outras oleaginosas, principalmente, com relação a sua maior rentabilidade agrícola e produção total de óleo. Desta forma, a macaúba ganha impulso na busca por matérias-primas alternativas em face da crise energética (NAVARRO-DÍAZ et al., 2013).

Macaúba (*Acrocomia aculeate*) é uma palmeira nativa das florestas tropicais da América do Sul. Uma importante quantidade de óleo é obtida a partir dos cocos desta palmeira, seus rendimentos de produtividade estão entre 1500 e 5000 kg de óleo por hectare/ano, que é a segunda maior produtividade depois de óleo de palma (*Elaeis guineensis*). A palmeira de Macaúba atinge alta produtividade após 4 anos de crescimento e pode manter a produção por mais de 100 anos. Outras características importantes da

palmeira de macaúba são a elevada resistência a pragas e variações de temperatura, bem como a possibilidade de cultivo em áreas de baixa pluviosidade (NAVARRO-DÍAZ et al., 2013).

O fruto de macaúba apresenta forma esférica, ligeiramente achatada com um diâmetro na faixa de 3 a 6 cm. O fruto é composto por epicarpo (casca), mesocarpo (polpa), um núcleo (castanha) envolvendo uma ou duas amêndoas, conforme ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1. Partes que compõem o fruto de macaúba



Fonte: Macaubabrasilvendas (2013).

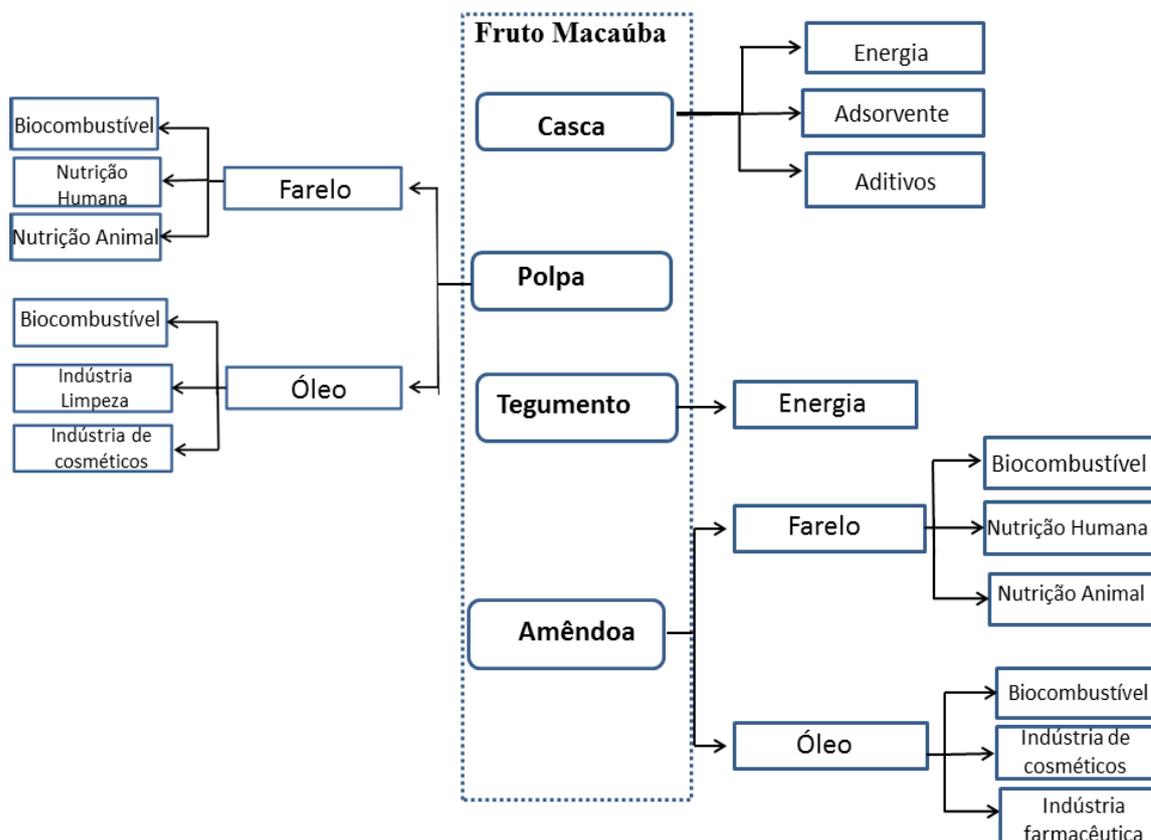
A Macaúba pode ser utilizada para diferentes finalidades. As folhas podem ser usadas na alimentação animal, os frutos são usados para consumo humano (alimentação) e o endocarpo (casca) e epicarpo (casca) podem ser usados como fonte de biomassa para diferentes usos, como o carvão ou briquetes. No Pantanal, a farinha da polpa da fruta é usada para preparar sorvetes, bolos e outros produtos comestíveis. Em outras áreas do Brasil há um uso incipiente do óleo para fins industriais, como fabricação de sabão e revestimento de superfície para a produção de cerâmica. No Paraguai, há uma indústria de grande porte relacionada à extração e exportação do óleo do fruto para diversos fins (POETSCH et al., 2012).

Do processo de extração dos óleos são gerados também subprodutos, como carvão de alta qualidade para siderurgia, torta da polpa com 9% de proteína que pode ser usada na alimentação animal ou queimada para geração de energia elétrica, e torta da amêndoa, com 32% de proteína, que pode ser usada na alimentação animal.

A Figura 3.2 ilustra o esquema dos componentes do fruto Macaúba e suas respectivas aplicações após o processamento (NOBRE et al, 2014). Como pode ser verificado, a macaúba apresenta grande potencial para utilização no mercado de

bioenergia, incluindo a produção de biodiesel, bioquerosene de aviação e carvão ativado (ACROTECH, 2015).

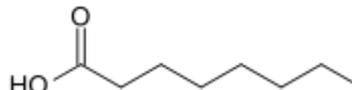
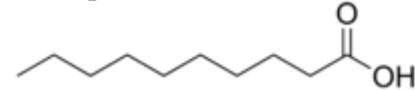
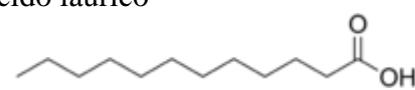
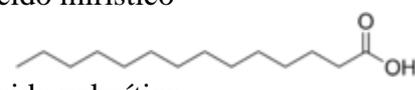
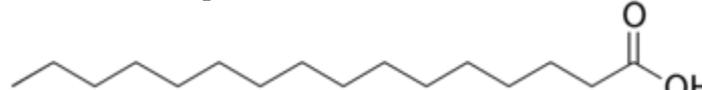
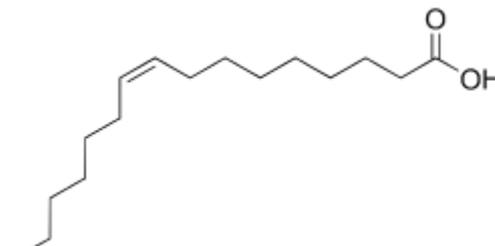
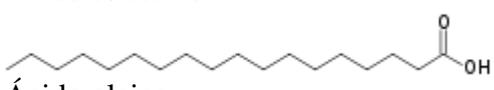
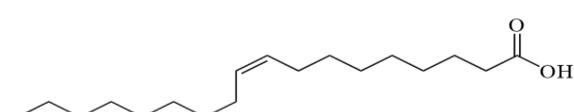
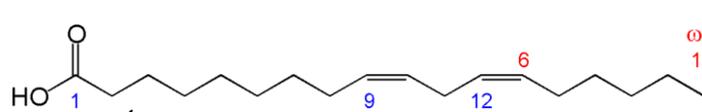
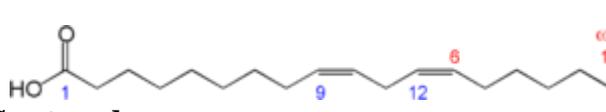
Figura 3.2. Fluxograma mostrando o aproveitamento dos componentes do fruto da macaúba.



Fonte: Adaptado de (MELO, 2012).

Tanto a polpa quanto a amêndoa têm elevada proporção de óleo, contudo, a composição química em ácidos graxos é diferente. A polpa apresenta alto conteúdo de ácidos graxos livres, por isso, é normalmente empregada na produção de sabão (NOBRE et al, 2014). A Tabela 3.3 mostra a distribuição dos ácidos graxos presentes no fruto da macaúba e a respectivas fórmulas estruturais.

Tabela 3.3. Composição em ácidos graxos presentes na amêndoa e na polpa do fruto de macaúba.

Ácido graxo (AG)	% (g/g)	
	Amêndoa	Polpa
(C8:0) Ácido caprílico		
	4,1	--
(C10:0) Ácido cáprico		
	3,9	--
(C12:0) Ácido láurico		
	37,8	--
(C14:0) Ácido mirístico		
	9,7	--
(C16:0) Ácido palmítico		
	7,9	17,6
(C16:1) Ácido palmitoleico		
	--	3,5
(C18:0) Ácido esteárico		
	3,6	2,5
(C18:1) Ácido oleico		
	28,5	58,6
(C18:2) Ácido linoleico		
	4,4	16,1
(C18:3) Ácido linolênico		
	--	1,7
AG saturados	67,1	20,1
AG insaturados	32,9	79,9

Fonte: Adaptado de (DUARTE et al., 2010)

O óleo da macaúba poderá atender a demanda diversificada do mercado de ácidos graxos pelas diferentes composições de óleos encontradas na polpa e na amêndoa e devido aos padrões diferenciados conforme origem geográfica. Além disso, a variabilidade de composição em ácidos graxos da polpa é favorável para aplicações em alimentos, para cosméticos e como matéria-prima para obtenção de ácidos graxos destilados, biodiesel e biolubrificantes, como indicam as pesquisas publicadas na literatura pertinente (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Estudos referentes a aplicação do óleo de macaúba para obtenção de compostos de interesse industrial

Produto	Catalisador	Condições	Observações	Referência
Biodiesel	Novozym 435	Reações conduzidas sob irradiação de micro-ondas. As condições foram otimizadas por planejamento fatorial	Máximo rendimento (45%) a 30°C em 5 min de reação.	NOGUEIRA et al., 2010
Biodiesel	Isento	Acetato de metila Razão molar 5:1 Reator de leito fixo Fluxo (1 mL/min), a 325°C Supercrítico	Rendimento de 83% em 45 min de reação	DONÁ et al., 2013
Ácidos graxos destilados	Lipozyme RM IM	Hidrólise enzimática do óleo de macaúba para obter ácidos graxos livres (AGL)	Grau de hidrólise máximo (50%) a 60°C/ 6h/ 250 rpm	TRENTINI; RASPE; SILVA, 2014.
Ésteres	Lipase pancreática suína imobilizada em PHB	Síntese de ésteres de etila utilizando óleo de macaúba e etanol em meio isento de solvente. Razão molar 5:1	Rendimento: 50% em 48 h (óleo da amêndoa) 35% em 48 h (óleo da polpa)	SILVA et al., 2014
Biolubrificante	<i>Termomyces lanuginosus</i> imobilizada em PHB	As condições otimizadas foram determinadas por planejamento experimental	Conversão de 92,4% em AG destilados usando hexanol como agente acilante	BRESSANI et al., 2014

PHB: polihidroxibutirato

AG: ácidos graxos

Fonte: próprio autor

3.3. Processos de produção de biodiesel

A redução da viscosidade de óleos e gorduras para sua utilização como combustível pode ser efetuada empregando-se diferentes métodos, tais como: uso direto e/ou misturas de matérias-primas com óleo diesel, microemulsão, craqueamento térmico (pirólise) e transesterificação (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Transesterificação é o método mais comumente utilizado no processo de obtenção de biodiesel (LEUNG; WU; LEUNG, 2010) e apresenta inúmeras vantagens sobre os outros processos, em função de baixo custo, simplicidade e boas taxas de conversão em biodiesel de melhor qualidade (ATANABI et al., 2012). As vantagens e desvantagens dos principais métodos de obtenção de biodiesel são apresentadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Comparação entre os principais métodos para a produção de biodiesel

	Vantagem	Desvantagem
Pirólise	Processo simples Sem poluição	Requer elevadas temperaturas Custo elevado dos equipamentos Baixa pureza
Transesterificação	Propriedades do combustível próximas ao diesel Baixo custo Elevada eficiência de conversão Adequado para escala industrial	Requer baixo teor de AGL e água (na catálise alcalina) Geração de poluentes, devido a etapa de neutralização e lavagem Formação de subprodutos Dificuldade de separação de produtos
Metanol supercrítico	Sem catalisadores Reação rápida Elevada conversão Boa adaptação	Exige elevada temperatura e pressão Custo elevado do equipamento Elevado consumo de energia

Fonte: Adaptado de (ATANABI et al., 2012)

A produção de biodiesel é acompanhada pela formação de glicerol que não requer nenhum processo adicional de recuperação, exceto purificação. Aplicações clássicas do glicerol incluem produtos para cuidados pessoais (sabonetes, cosméticos, produtos para cabelo, creme dental), produtos farmacêuticos e adoçantes para doces e bolos. Parece improvável que o glicerol adicional relativo à produção de biodiesel possa encontrar aplicação nestes domínios, fazendo-se necessária a busca por outras aplicações. Estas

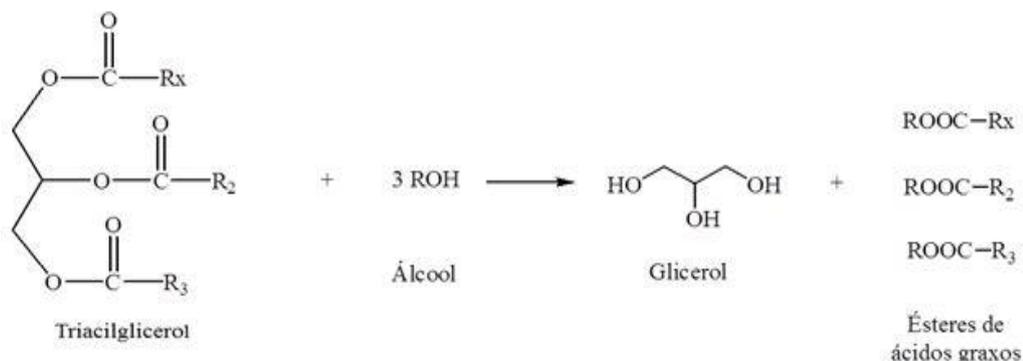
aplicações incluem ésteres e éteres de glicerol, acetais e cetais, epóxidos, aldeídos, cetonas, produtos de oxidação e desidratação, bem como 1,2 - e 1,3-propanodiol (KNOTHE, 2010).

3.3.1. Reações de transesterificação

As matérias-primas graxas, quando submetidas ao processo de transesterificação, sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido (biodiesel) ser queimado diretamente em motores diesel sem necessidade de adaptação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Desta forma, os motores que foram projetados para combustíveis a diesel podem ser operados sem modificação nenhuma utilizando biodiesel (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

A equação geral da reação de transesterificação está representada na Figura 3.3. Para que a reação ocorra de forma adequada é importante que as três etapas consecutivas sejam monitoradas, bem como a reversibilidade da reação, conforme mostrado na Figura 3.4.

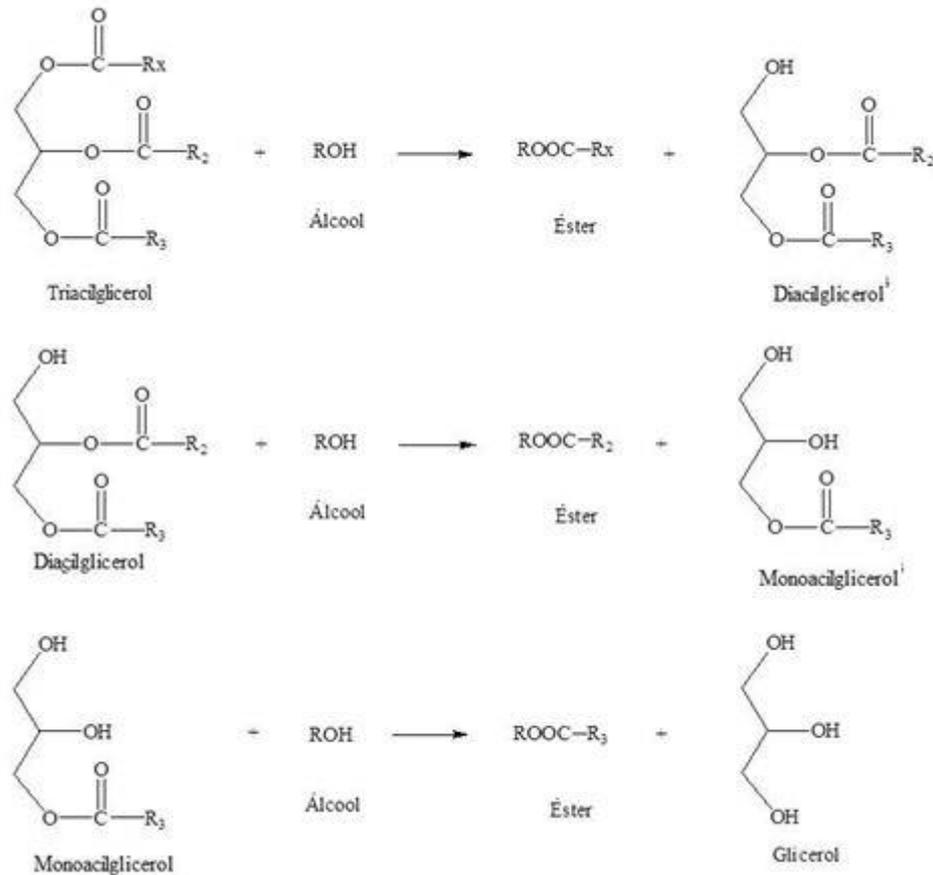
Figura 3.3. Representação esquemática da reação global de transesterificação.



Fonte: (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

Na primeira etapa, os triacilgliceróis são convertidos para diacilgliceróis, os quais são convertidos a monoacilglicerol na etapa posterior. Por último, monoacilglicerol liberam glicerol como subproduto. Em cada etapa da reação, ocorre a liberação de uma molécula do éster de interesse (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006). O biodiesel formado deve ser purificado antes de sua utilização em motores e a glicerina reaproveitada, aumentando o lucro inerente ao processo (KNOTHE et al., 2006).

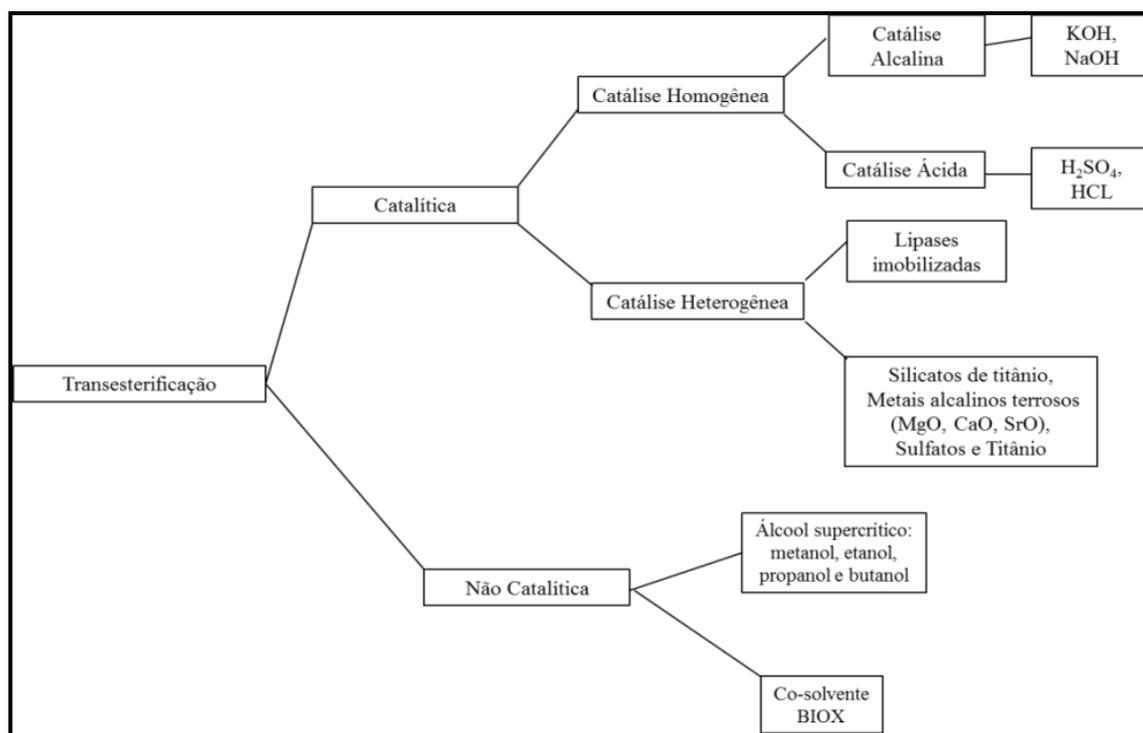
Figura 3.4. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.



Fonte: (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

Os catalisadores usados na reação de transesterificação podem ser homogêneos ou heterogêneos. A Figura 3.5 mostra a classificação dos diferentes sistemas da reação de transesterificação, bem como os tipos de catalisadores empregados (SHAHID; JAMAL, 2011).

Embora a transesterificação química, empregando catálise homogênea alcalina, resulte em altas taxas de conversão dos triacilgliceróis em seus respectivos ésteres, existem alguns inconvenientes que devem ser considerados, como listado na Tabela 3.6 (CHOUHAN; SARMA, 2011) que apresenta uma comparação entre alguns fatores essenciais da reação de transesterificação empregando catalisadores homogêneos e heterogêneos. Considerando as vantagens apresentadas na Tabela 3.6, a catálise heterogênea foi selecionada como rota catalítica para mediar a síntese de biodiesel do óleo de macaúba.

Figura 3.5. Classificação dos processos de transesterificação.

Fonte: Adaptado (ATANABI et al., 2012).

Tabela 3.6. Comparação entre catalisadores homogêneos e heterogêneos usados para produção de biodiesel.

Homogêneo	Heterogêneo
Catalisadores alcalinos são facilmente manipuláveis	Podem ser utilizados para transesterificar óleos que possuem elevados teores de ácidos graxos livres
Requer maior número de etapas na produção de biodiesel	Redução significativa do número de etapas de purificação
Não podem ser reutilizados	Podem ser reutilizados
Maior produção de resíduos provenientes da neutralização do catalisador, purificação do produto e recuperação da glicerina.	Evita a corrosão da planta Facilita a purificação do biodiesel

Fonte: Adaptada (CHOUHAN; SARMA, 2011).

Na Tabela 3.7 são apresentados exemplos de catalisadores heterogêneos mais utilizados na síntese de biodiesel, bem como as vantagens e desvantagens associadas ao emprego dos mesmos.

A potencialidade dos catalisadores heterogêneos químicos para a produção de biodiesel foi publicada numa ampla revisão bibliográfica por Cordeiro, Silva e Ramos, 2011, incluindo as seguintes classes: zeólitas, óxidos e sais inorgânicos, compostos de coordenação e líquidos iônicos, resinas trocadoras de íons, ácidos e bases orgânicos e materiais lamelares.

Alguns exemplos listados como eficientes e bastante aceitáveis em nível ambiental destacados por Suarez et al., 2007, são as resinas de troca iônica (Amberlyst 15, Smopex-101 e Purolite 35CT-175), zeólitas do tipo titanossilicato ou titano-aluminossilicado, como as comerciais ETS- 4 e ETS-10, óxidos de alumínio dopados com hidróxido de sódio (Na/NaOH/ γ -alumina 57) ou óxidos de estanho e zinco ((γ -Al₂O₃)X(SnO)Y(ZnO)Z), óxidos sulfatados e ácido nióbbico (Nb₂O₅. nH₂O).

Na classe dos biocatalisadores, outro catalisador heterogêneo que vem sendo empregado com sucesso na síntese de biodiesel, são as lipases imobilizadas. A rota enzimática é bastante atrativa por se tratar de uma via eficiente e altamente seletiva, envolvendo menor consumo de energia e maior facilidade na etapa de recuperação do glicerol, subproduto formado na reação (TAN et al., 2010).

Tabela 3.7. Exemplos de catalisadores heterogêneos usados na produção de biodiesel.

Tipo	Exemplo	Vantagem	Desvantagem
Alcalinos	CaO, CaTiO ₃ , KOH/NaY, zeólitas, alumina/sílica	Não são corrosivos, ambientalmente favoráveis; reutilizáveis; fácil separação; alta seletividade; maior tempo de vida útil do catalisador	Requerem baixos níveis de ácidos graxos livres (AGL), condições anidras; Requer alta proporção molar de álcool e óleo; Requer alta temperatura e pressão de reação; Limitação de difusão e alto custo
Ácidos	Nb ₂ O ₅ , ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ₄ ²⁻ , TiO ₂ /SO ₄ ²⁻ , zircônia sulfatada, fosfato de vanádio, ácido nióbio	Catalisa transesterificação e esterificação simultaneamente; reutilizável; ecofavoráveis	Baixas concentrações locais de ácido; Baixa microporosidade; Limitações de difusão e alto custo
Enzimas	Lipases, referencialmente, na forma imobilizada	Evita a formação de sabão; fácil purificação; não poluente; especificidade; reutilizável	Custo elevado; Sensibilidade à desnaturação

Fonte: Adaptada (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

3.3.2. Transesterificação enzimática

O mérito do método da catálise bioquímica inclui: (a) operar em condições amenas, isso implica um menor consumo de energia; (b) maior diversidade na seleção da matéria-prima, incluindo óleos residuais com elevado teor de acidez; (c) maior facilidade de separação do meio reacional; (d) facilidade nas etapas subsequentes de separação e purificação do biodiesel; e (e) menor emissão de poluição sendo o processo ambientalmente favorável (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; BAJAJ et al., 2010).

As lipases utilizadas nesses processos podem ser obtidas de diferentes fontes, porém as lipases microbianas são mais empregadas devido aos baixos custos de produção e a possibilidade de modificação das propriedades (DE CASTRO et al., 2010).

A síntese enzimática de biodiesel ocorre geralmente em temperaturas amenas, na faixa de 20 a 60 °C (RIBEIRO et al., 2011). Um pequeno excesso de álcool proporciona elevados rendimentos na síntese do biodiesel e o biocatalisador pode ser usado várias vezes, especialmente na forma imobilizada (ZHANG et al., 2012).

A transesterificação catalisada por lipases é aplicável aos óleos vegetais refinados e brutos contendo ácidos graxos livres, resíduos de gorduras de fritura, sebo e outros resíduos de gorduras, e a diversos álcoois, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol (RIBEIRO et al., 2011). Além disso, não há a necessidade de utilizar álcool anidro, pois uma mínima concentração de água no meio reacional pode ter um impacto positivo sobre a produtividade de biodiesel, uma vez que a camada de hidratação necessária à atividade enzimática é mantida (SALIS et al., 2008).

A concentração de AGLs na matéria-prima pode ser muito maior do que na rota química catalisada por álcalis (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Matéria-prima lipídica e AGLs são facilmente convertidos em biodiesel porque a lipase catalisa tanto as reações de transesterificação como de esterificação. Para assegurar a viabilidade econômica desta rota, devem ser escolhidas apropriadas matérias-primas e preparações enzimáticas (RIBEIRO et al., 2011). O biocatalisador pode ser modificado para aumentar a sua estabilidade e reatividade. As demais etapas são seguidas pela seleção do solvente (opcional), otimização da razão molar óleo/álcool, temperatura, atividade de água e pH do microambiente da enzima (ANTCZAK et al., 2009).

Em sistemas isentos de solventes, o álcool deve ser adicionado gradualmente para manter níveis baixos de concentração e evitar a inativação da enzima (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Esta estratégia é amplamente empregada quando se utiliza metanol como doador de grupo acila, o que não é observado para os outros tipos de alcóois (LU et al., 2007). Entretanto, reações de biotransformação catalisadas em meios isentos de solventes são recomendadas na síntese de biodiesel, pois a elevada toxicidade, inflamabilidade e recuperação final do solvente são as suas principais desvantagens (RIBEIRO et al., 2011).

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

3.4. Lipases

As lipases constituem o grupo de biocatalisadores mais importante para aplicações biotecnológicas. Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (AGL) (DE CASTRO et al., 2004). Estes biocatalisadores são comumente encontrados na natureza, podendo ser obtidos a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas (LOTTI; ALBERGHINA, 2007; RIBEIRO et al., 2011). As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento e por serem mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as de outras fontes (DE CASTRO et al., 2004). Estas enzimas não requerem cofatores, são regioespecíficas, atuam em larga faixa de pH e apresentam a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água (DE CASTRO et al., 2010).

As lipases vêm sendo utilizadas em diversos ramos industriais, tais como indústrias de modificação de óleos vegetais, cosméticas, farmacêutica, detergente, têxtil, biodiesel, síntese de produtos para a química fina, agroquímica e indústria de novos materiais poliméricos (DE CASTRO et al., 2004). Na última década, uma atenção particular vem sendo direcionada ao uso de lipases como biocatalisadores na síntese de biodiesel (GOG et

al., 2012; RIBEIRO et al, 2011; NARWAL; GUPTA, 2013; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Nas reações de transesterificação de óleos e gorduras, as lipases são empregadas preferencialmente na forma imobilizada, pois permitem a reutilização do biocatalisador e reduzem o efeito de inativação da enzima na presença de álcoois de cadeia curta, o que pode reduzir o custo global do processo. Neste caso, a produção de biocatalisadores na forma imobilizada com elevada atividade catalítica e estabilidade térmica podem tornar o processo enzimático viável técnica e economicamente em comparação aos processos químicos (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Nos trabalhos desenvolvidos no Brasil, preferencialmente tem sido empregado etanol como doador do grupo acila por ser proveniente de biomassa, o que torna o processo totalmente independente do petróleo. A substituição da rota metílica pela etílica é bastante atrativa devido à grande capacidade agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país. Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica (mais lenta, maior consumo de álcool e maior dificuldade de separação), o biodiesel etílico possui viscosidade mais elevada que o biodiesel metílico promovendo maior lubrificidade em relação ao biodiesel metílico. O biodiesel obtido pela rota etílica gera menor opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, o que reduz as emissões de NO_x (BRUNSCHWIG, MOUSSAVOU, BLIN, 2012). Deste modo, é válido e estratégico qualquer esforço para aperfeiçoar a rota etílica na produção de biodiesel como demonstram os resultados descritos na Tabela 3.8 empregando diferentes matérias-primas lipídicas e lipases de diferentes fontes imobilizadas.

Tabela 3.8. Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras

Lipase	Suporte	Método de Imobilização	Óleo/gordura	Álcool/Reator	Solvente	Conversão (%)	Referência
Pâncreas de porco	SiO ₂ -PVA ativado com glutaraldeído	Covalente	Babaçu	Etanol STR	Isento	75,0	PAULA et al., 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SiO ₂ -PVA epoxilado	Covalente	Palma	Etanol/STR Micro-ondas	Isento	97,5	DA ROS et al., 2013
<i>B. cepacia</i>	SiO ₂ -PVA epoxilado	Covalente	Sebo bovino	Etanol STR	Isento	96,3	SILVA et al., 2012
<i>B. cepacia</i>	SiO ₂ -PVA magnetizado	Covalente	Coco	Etanol STR	Isento	>98,0	MIJONE, 2014
<i>P. fluorescens</i>	SiO ₂ -PVA epoxilado	Covalente	Palma	Etanol PBR	t-butanol	88,0	DORS et al., 2012
<i>Mucor circinelloides</i>	Espumas de poliuretano	<i>in situ</i>	Coco	Etanol PBR	t-butanol	92,7	CARVALHO et al., 2015
<i>B. cepacia</i>	SiO ₂ -PVA epoxilado	Covalente	Babaçu	Etanol PBR	Isento	95,0	SIMÕES et al., 2015
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435	Adsorção	Babaçu	Etanol FBR	Isento	98,3	FIDALDO, 2014
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435	Adsorção	Babaçu andiroba, pinhão manso	Etanol STR	Isento	98,5	TIOSSO et al., 2014
<i>B. cepacia</i>	SiO ₂ -PVA epoxilado	Covalente	Babaçu andiroba, pinhão manso, macaúba, sebo bovino	Etanol STR	Isento	> 92,5	CARVALHO et al., 2013

STR (reator de tanque agitado); PBR (reator de leito fixo); FBR (reator de leito fluidizado)

Fonte: próprio autor

3.5. Fatores que interferem na síntese enzimática de biodiesel

3.5.1. Teor de água

Na produção enzimática de biodiesel a lipase exerce sua ação catalítica em meio predominantemente não aquoso. Desta forma, é necessário um baixo teor de água na fase oleosa para promover a reação de transesterificação com elevada conversão. Entretanto, a remoção de água do meio reacional deve ser equilibrada, pois um teor de água muito baixo pode acarretar a inativação do biocatalisador (TAN et al., 2010). A propriedade mais marcante das lipases é a sua capacidade de atuar na interface entre uma fase orgânica e uma fase aquosa, assim, a atividade da lipase é geralmente dependente da área interfacial. A água auxilia no aumento da área de interfacial disponível; portanto, auxilia na manutenção da atividade da lipase. Por outro lado, em meio reacional contendo excesso de água a estrutura da lipase se torna mais flexível e isso pode acarretar reações paralelas não desejáveis como hidrólise, sobretudo na transesterificação. Portanto, o conteúdo de água ideal para maximizar a atividade enzimática deve ser determinado caso a caso, observando que a quantidade de água para uma determinada reação depende da natureza da matéria-prima, a fonte de lipase, suporte de imobilização e o solvente orgânico usado (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). Rendimentos elevados foram obtidos com comercial lipase Novozym 435 sem necessidade de adicionar água extra ao sistema reacional (TAN et al., 2010). Enquanto, a quantidade ótima de água necessária para lipase de *Candida* sp. 99 para manter a maior atividade de transesterificação é 10-20% com relação a massa de óleo (GOG et al., 2012). Em estudos de síntese de biodiesel utilizando lipase microbiana de *B. cepacia* imobilizada em suporte híbrido foi determinado que o derivado imobilizado requer um teor máximo de 10% de água. Teores superiores a este nível direcionam a ação da lipase para reação inversa (DA RÓS et al, 2011; SIMÕES et al, 2015).

3.5.2. Efeito inibitório do subproduto glicerol

O glicerol é um subproduto da reação de transesterificação que tem um efeito inibidor sobre a atividade da lipase, além de deslocar o equilíbrio da reação no sentido inverso. É um líquido viscoso de caráter hidrofílico, que adsorve na superfície da enzima

imobilizada, formando uma camada hidrofílica, limitando a atuação da enzima em substratos hidrofóbicos, e por consequência prejudica o rendimento de transesterificação (GULDHE et al., 2014). O efeito indesejável do glicerol leva a diminuição da estabilidade operacional do biocatalisador, impactando na viabilidade econômica do processo (LAI et al., 2005).

A fim de minimizar a inibição da enzima pelo glicerol, várias estratégias têm sido testadas, incluindo a remoção contínua do glicerol do meio reacional e utilização de solventes orgânicos (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). A produção de biodiesel em Reatores de Leito Fixo (PBR) proporciona a vantagem da remoção contínua de glicerol (GULDHE et al., 2014).

Visando amenizar os efeitos negativos do glicerol, Dossat et al. (1999) utilizaram sílica gel e outras substâncias adsorventes na extração do glicerol. Royon et al. (2007) e Li et al. (2006) investigaram a adição de solventes orgânicos (*n*-hexano ou terc-butanol) para assegurar a homogeneidade da mistura reacional, consequentemente, reduzir a viscosidade do meio reacional. Entre os métodos anteriormente citados existe uma tendência de usar adsorventes comercializados especificamente para a purificação de biodiesel, como o Magnesol e as resinas Purolite PD206, Amberlite BD10 Dry e Lewatit GF202 (DIAS et al, 2014).

No caso particular da resina Lewatit GF202 pesquisas tem demonstrado elevada eficiência de sua aplicação para extração do glicerol formado na reação de transesterificação (FIGALDO, 2014; COSTA-SILVA, 2013).

Lewatit GF202 é uma resina de troca catiônica desenvolvida especificamente para a purificação de biodiesel removendo glicerol, monoacilgliceróis, sabão e sais. Um litro de Lewatit GF202 pode purificar entre 11 a 14 toneladas de biodiesel/ ano e pode ser reutilizado várias vezes, minimizando custos de reposição da resina (LENNTECH, 2015).

3.5.3. Efeito inibidor do agente acilante

Nas reações de transesterificação, alcoóis de cadeia curta tem um impacto negativo na estabilidade das lipases, e este efeito inibidor aumenta com o incremento da temperatura. Em função de seu preço e disponibilidade, metanol e etanol vêm sendo os álcoois mais empregados na produção industrial de biodiesel, entretanto eles apresentam forte ação de desnaturação, comparativamente com os álcoois alifáticos de cadeia longa (GOG et al., 2012).

Watanabe et al. (2002) demonstraram o efeito negativo do metanol, etanol e *n*-propanol em diferentes temperaturas para Novozym® 435. Os resultados apontaram que a utilização de metanol em temperaturas superiores a 30°C a enzima foi parcialmente inativada, enquanto que etanol e especialmente *n*-propanol forneceram melhores resultados. O efeito inibidor dos álcoois na atividade das lipases parece diminuir com o aumento da massa molecular do álcool e tem sido relatada uma aparente relação entre a solubilidade do álcool no óleo e o efeito desestabilizante do óleo (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Três estratégias têm sido desenvolvidas para minimizar a inibição do álcool: (1) adição gradual de álcool; (2) o uso de solventes; e (3) utilização de um agente acilante alternativo, tais como alcoóis de cadeia mais longa e ésteres de alquilas (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

3.5.4. Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos mais utilizados para síntese enzimática de biodiesel são os solventes hidrofóbicos, tais como o isooctano, *n*-heptano, éter de petróleo, *n*-hexano e ciclohexano. No entanto, a utilização de solventes hidrofóbicos não solubiliza o glicerol, e este permanece no reator onde é adsorvido pela lipase imobilizada tendo os mesmos problemas que ocorrem em meios isentos de solventes. Os solventes orgânicos hidrofílicos são bem menos utilizados na produção de biodiesel enzimático, devido a forte interação com a camada de água que reveste a molécula de enzima (GOG et al., 2012). Outra abordagem consiste na utilização de solvente orgânico moderadamente hidrofílico, como o *tert*-butanol, que é considerado um bom solvente para o glicerol e facilita a dissolução do agente acilante (álcool) no meio reacional, como demonstrado por Carvalho et al, 2015 no estudo referente a habilidade da lipase intracelular de *Mucor circinelloides* em sintetizar ésteres de etila a partir de diferentes matérias-primas lipídicas em regime descontínuo e contínuo.

3.6. Biorreatores com lipases imobilizadas

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

(KENNEDY; ROIG, 1995; ZANIN; MORAES, 2004; POPPE et al, 2015).

Diversos são os tipos de reatores que têm sido relatados para uso com enzimas imobilizadas. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de prever qual o melhor biorreator para um dado processo. A seleção do reator mais apropriado para um determinado bioprocessamento depende das características da bioconversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo, como ilustrado na Tabela 3.9 (POPPE et al, 2015; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Podem abranger desde grandes colunas industriais com diversos metros cúbicos de capacidade, a pequenos eletrodos que incorporam microgramas de enzima. Embora haja essa amplitude de possíveis escalas os mesmos princípios básicos são aplicados em todos os casos (KENNEDY; CABRAL, 1983).

Tabela 3.9. Principais variáveis envolvidas na escolha de um reator enzimático

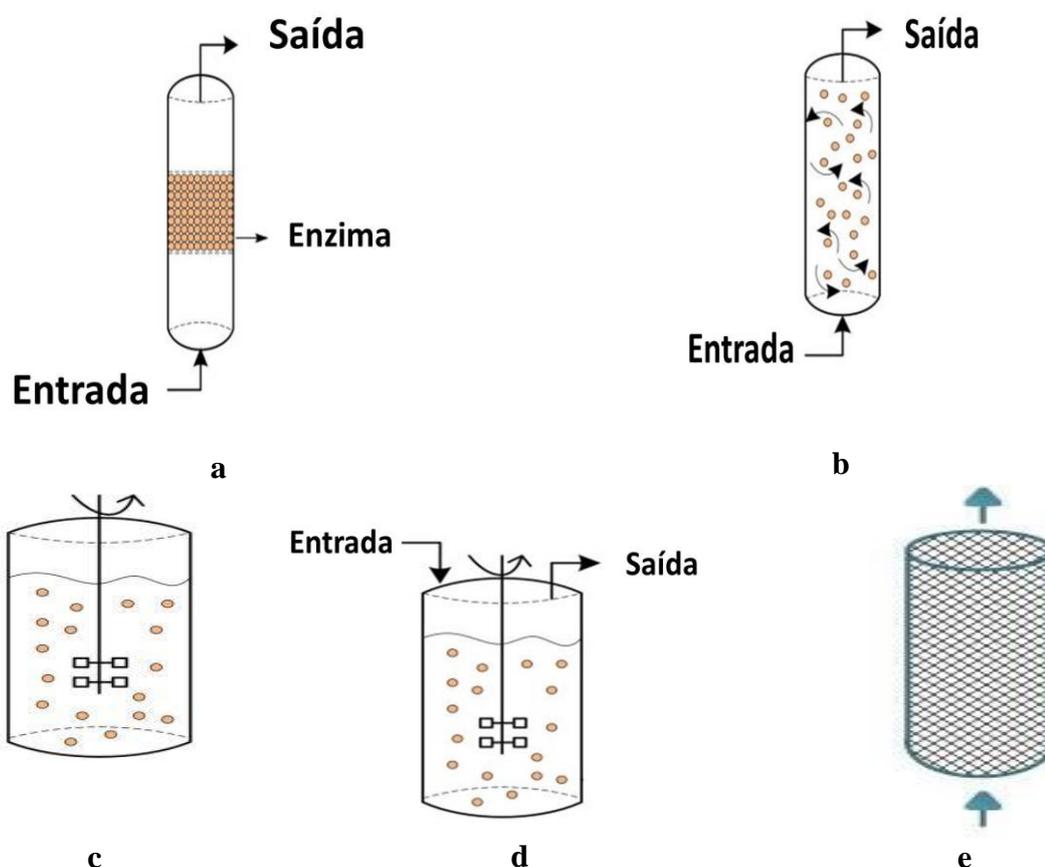
Fatores	Características
Forma da enzima imobilizada	Partículas, membranas, fibras, sólidos suspensos ou coloides
Natureza de substrato	Possibilidade de inibição pelo substrato, produto ou ambos
Condições reacionais e características cinéticas;	Controle de temperatura e do fluxo
Superfície catalítica por unidade de volume	Efeitos difusionais internos e externos ao biocatalisador
Biocatalisador	Possibilidade de substituição e regeneração do biocatalisador
Construção do biorreator	Geometria, características hidrodinâmicas do fluido e condições operacionais
Custo operacional do biorreator	Energia e manutenção
Modo de operação	Descontínuo ou contínuo

Fonte: Poppe et al., 2015; Zanin e Moraes, 2004

Os biorreatores podem ser classificados em reatores para sistemas particulados, reatores tipo placas e reatores lineares, podendo operar em modo batelada ou contínuo. Os reatores para sistemas particulados compreendem os tipos (Figura 3.6): tanque agitado em batelada (BSTR), tanque agitado contínuo (CSTR), membrana (MR), leito fixo (PBR) e leito fluidizado (FBR) (ZANIN; MOARES, 2004). No reator de tanque agitado (STR), as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato, sendo a agitação

promovida por agitadores mecânicos ou por agitadores orbitais. Nos reatores de leito fixo e fluidizado, o biocatalisador é mantido no interior do reator enquanto o fluído é passado através do leito. Estes são os tipos de reatores preferidos para as aplicações em larga escala (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Figura 3.6. Exemplos de configurações de biorreatores utilizados na bioconversão de processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reatores (a) leito fixo (PBR - Packed bed reactor), (b) leito fluidizado (FBR - Fluidized bed reactor), (c) batelada tanque agitado (BSTR - Batch stirred tank reactor), (d) contínuo tanque agitado (CSTR - Continuous stirred-tank reactor) e (e) Reator de Membrana (MR - Membrane Reactor).



Fonte: (POPPE et al., 2015).

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

2004). Apesar de sua flexibilidade, pois podem ser empregados em uma variada gama de bioconversões, os biorreatores STR apresentam certas desvantagens, como: (i) grande demanda de energia, para agitação mecânica; (ii) tendem a afetar a morfologia celular; (iii) difícil escalonamento, e tem de ser cuidadosamente projetados para produzir adequada mistura e aeração (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). Deve-se destacar, ainda, que os reatores de tanque agitado (STR) podem ser operados em modo contínuo (CSTR) ou descontínuo (BSTR), apresentando, este último, a desvantagem da imposição de tempos mortos de operação, relativos à carga, descarga e limpeza do sistema (BALCÃO et al., 1996; ZANIN; MOARES, 2004).

Uma opção que poderia ser usada em processos em escala industrial seria o biorreator de leito empacotado. Embora em escala de laboratório os reatores STR sejam bastante comuns, o leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala, controle automático e menor grau de força de cisalhamento, conseqüentemente, evitando-se a ruptura das partículas do biocatalisador (AL-ZUHAIR et al., 2011; POPPE et al, 2015). Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e fluxos de calor e massa ineficientes (ZANIN; MORAES, 2004).

Outra opção que permitiria melhorar as características de mistura do sistema quando comparado ao leito fixo, evitando a formação de caminhos preferenciais, é o reator de leito fluidizado. Sob o aspecto hidrodinâmico, este biorreator é um intermediário entre a mistura completa do CSTR ideal e o reator tubular do leito fixo ideal (BALCÃO et al., 1996). Conforme se aumenta a velocidade ascendente do fluido reacional, atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito torna-se equivalente ao peso deste por unidade de superfície, fazendo com que as partículas percam o contato entre si e movimentem-se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização), acima do qual as partículas são arrastadas para fora do reator (ZANIN, MOARES, 2004). Na Tabela 3.10 são apresentadas, resumidamente, as características de alguns tipos de reatores enzimáticos para processos contínuos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Tabela 3.10. Tipos de reatores enzimáticos contínuos e suas características.

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

* Exceto para casos de inibição

Fonte: Adaptada (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

3.7. Reatores de leito fixo

Esta configuração de biorreator consiste em uma coluna cilíndrica que suporta um leito empacotado de biocatalisador no qual os substratos entram ascendente/descendente e os produtos são recolhidos na outra extremidade do reator de forma contínua. Atenção especial deve ser dada às partículas sólidas do biocatalisador que precisam ter dimensões adequadas, a fim de controlar a queda de pressão através da passagem do fluxo de alimentação. O fluxo deve possuir velocidade baixa, o que aumenta o tempo de contato entre enzima e substrato e resulta em conversões elevadas (POPPE et al, 2015; FERNANDES, 2010).

O leito fixo de um reator não é homogêneo, mas a variação de concentração ao longo do leito pode ser diminuída aumentando a taxa de fluxo. Gradientes de pH podem ocorrer se a reação consumir ou produzir H^+ ou OH^- . Em função da mistura não ideal, o controle de pH por adição de ácido ou base é quase impossível. Leitos com maior volume de poros vazios permitem maiores velocidades de fluxo através deles, entretanto a concentração do biocatalisador em um dado volume do leito diminui à medida que a porosidade é aumentada. Se o leito catalítico (suporte e biocatalisador) é compressível, e

possui um alto carregamento, o leito pode ser comprimido, dificultando o fluxo, portanto a altura do leito deve ser pequena para evitar a obstrução. É difícil o fluxo através de um leito fixo do reator com a porosidade reduzida. Reatores de leito fixo são amplamente utilizados em reatores com enzimas imobilizadas (CHISTI, 2006).

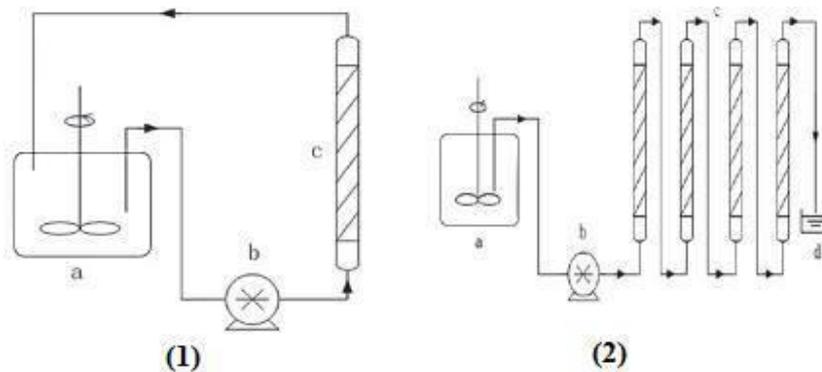
O reator de leito fixo pode operar em fluxo contínuo ou descontínuo por meio da recirculação do substrato. O método de reciclagem é vantajoso, pois permite que a solução de substrato passe através da coluna na velocidade desejada. Para aplicações industriais, o fluxo ascendente do substrato é preferível ao fluxo descendente porque não comprime o leito de enzima resultando em obstrução do leito, limitações difusionais e quedas de pressão (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Ele requer um mínimo de equipamentos auxiliares e é muito eficiente. Neste caso, as tensões de cisalhamento impostas ao sistema imobilizado são menores e um reator ideal deste tipo opera, ao contrário do STR, como um reator tubular. Isto, mesmo em reatores não ideais, resulta em altas taxas de conversão no reator. Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito e aparecimento de caminhos preferencias (ZANIN; MORAIS, 2004). No entanto, essa configuração, pode ser mais influenciada por limitações de transferência de massa e calor, refletida, por exemplo, pela relação geométrica do reator (XU et al., 2000).

Diversos estudos relatados na literatura mencionam a implementação com sucesso dos reatores de leito fixo na produção enzimática de biodiesel usando diferentes configurações: PBR simples estágio com alimentação gradual de metanol (SHIMADA et al., 2002); PBR de simples estágio com sistema de remoção de glicerol integrado ao reator (HAMA et al., 2011); PBR de dois estágios dispostos em série, com remoção intermediária de glicerol (COSTA-SILVA, 2013); PBR nove estágios em série com um hidrociclone posterior ao PBR para separação do glicerol (NIE et al., 2006).

Wang et al. (2011) estudaram a metanólise do óleo de soja catalisada por lipase imobilizada em nanopartículas de Fe_3O_4 , e avaliaram dois tipos diferentes de configuração: um PBR simples de um estágio, e um PBR de quatro estágios em série. A Figura 3.6 ilustra a montagem de reatores simples de um estágio e quatro estágios em série. Os resultados obtidos indicam que o PBR apresenta grande potencial no desenvolvimento e funcionamento em larga escala na produção de biodiesel.

Figura 3.7. Representação esquemática da produção enzimática de biodiesel em: (1) Reator de leito fixo simples estágio; (2) Reator de leito fixo quatro estágios em série. (a) tanque de alimentação; (b) bomba peristáltica; (c) reator de leito fixo; (d) tanque coleta de produto.



Fonte: Adaptado (Wang et al.,2011).

A Tabela 3.11 sumariza exemplos de estudos relatos na literatura, enfocando os principais parâmetros e resultados alcançados.

Hsu et al. (2004) investigaram a produção contínua de ésteres etílicos de ácidos graxos, utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* (IM BS-30) em filossilicato como catalisador, em reator PBR (135 mm de altura e 25 mm de diâmetro interno) operando em regime contínuo. Cada ciclo experimental de reação teve 18 horas de duração, sendo a transesterificação realizada com etanol e óleo residual em razão molar de 4:1, respectivamente, em meio isento de solvente. Para rendimentos de 97% em massa, a vazão de fluxo foi determinada em $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura, em 50°C e o tempo espacial em 48 horas.

Nie et al. (2006) otimizaram a transesterificação de óleo vegetal e óleo residual de fritura em reator de leito fixo em série com 3 estágios operando em regime contínuo na presença de solvente. As dimensões dos reatores foram de 1 m de altura por 18 cm de diâmetro interno. O meio reacional foi composto de uma razão molar álcool/óleo de 1:1 e de uma mistura de éter de petróleo/água como solvente, com uma razão de éter de petróleo/óleo de 1:1 (v/v) e 10% v/v, de água/óleo. A temperatura reacional foi mantida em 40°C e a vazão adequada, estabelecida em $15 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. A lipase utilizada foi de *Candida* sp. 99-125, imobilizada em membrana têxtil. A conversão a partir de óleo vegetal comestível e de óleo residual foi de 93% e de 92%, respectivamente. A lipase teve estabilidade operacional num tempo maior do que 500 horas, não havendo redução notável na formação de ésteres neste intervalo.

Chang et al. (2009) otimizaram, por metodologia de superfície de resposta (MSR), a reação de alcoólise contínua com isopropanol e óleo de soja em um reator PBR contínuo de 25 cm de altura e 0,46 cm de diâmetro interno. Os experimentos foram conduzidos com Novozym 435, sendo o meio reacional isento de solvente. A metodologia indicou, a partir dos resultados, que as condições ideais foram as seguintes: taxa de fluxo de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de $51,5^\circ\text{C}$ e razão molar álcool/substrato de 4,14:1. A conversão molar experimental atingiu o valor de $75,62 \pm 0,81\%$. Além disso, no intervalo de tempo do processo, sete dias, não houve diminuição na eficiência de conversão.

Wang et al. (2011) realizaram a metanólise do óleo de soja usando lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em nanopartículas de Fe_3O_4 numa matriz de algodão. O meio reacional foi composto de uma mistura de óleo de soja, água destilada, metanol, e *n*-hexano, numa razão volumétrica de 6:3:1:0,2, respectivamente, a taxa de fluxo adequada foi de $0,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a temperatura, de 40°C . Duas configurações diferentes de reator PBR foram utilizadas: simples de um estágio e de quatro estágios em série. O raio interno de cada reator foi de 1,6 cm e a altura, de 20 cm. No sistema de estágio único, uma conversão de 75% foi observada em 12 horas de operação, este valor sendo mantido em 132 horas. Após 240 horas, a taxa de conversão decaiu para 45%. No sistema de quatro estágios, a conversão de biodiesel se manteve em 88% para 192 horas. Após 240 horas de reação, a taxa de conversão decresceu para 75%.

Tabela 3.11. Sumário dos principais tópicos de experimentos de produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo contínuo (PBR)

Biocatalisador	Substrato	Solvente	Sistema e dimensões	Condições e resultados	Referência
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em filossilicato	Etanol/óleo residual; razão molar de 4:1	Isento	Único estágio: $l=135$ mm, $d=25$ mm	Fluxo: $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; T: 50°C ; Rendimento: 97%	HSU et al., 2004.
Lipase de <i>Candida</i> sp. imobilizada em membrana têxtil	Metanol/óleo residual; razão molar de 1:1	Éter de petróleo/água	3 estágios em série $l=1$ m, $d=180$ mm	Vazão: $15 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; T: 40°C ; Conversão: 93%	NIE et al., 2006.
Lipase de <i>C. antarctica</i> Novozym 435	Metanol/óleo de semente de algodão; razão molar de 6:1	<i>tert</i> -butanol	Único estágio: $l=180$ mm, $d=60$ mm	Fluxo: $9,6 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$; T: 50°C ; Conversão: 95%.	ROYON et al., 2007.
Lipase de <i>C. antarctica</i> Novozym 435	Metanol/óleo de soja; razão molar de 4,3:1	<i>n</i> -hexano/ <i>tert</i> -butanol	Único estágio: $l=250$ mm, $d=25$ mm	Fluxo: $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; T: 52°C ; Conversão: 75,2%	SHAW et al., 2008.
Lipase de <i>C. antarctica</i> Novozym 435	Isopropanol/óleo de soja; razão molar de 4,14:1	Isento	Único estágio: $l=250$ mm, $d=46$ mm	Fluxo: $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; T: $51,5^\circ\text{C}$; Conversão: 75,6%	CHANG et al., 2009.
Lipase de <i>C. antarctica</i> Novozym 435	Metanol/óleo residual de palma; razão molar de 4:1	<i>tert</i> -butanol	2 estágios em série: $l=180$ mm, $d=10$ mm	Fluxo: $0,57 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; T: 40°C ; Rendimento: 79,1%	HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009.
Lipase de <i>C. antarctica</i> Novozym 435	Metanol/óleo de soja; razão molar de 4:1	<i>tert</i> -butanol	Único estágio: $l=250$ mm, $d=46$ mm	Fluxo: $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; T: $52,1^\circ\text{C}$; Conversão: 82,8%	CHEN et al., 2011.
Lipase de <i>P. cepacia</i> imobilizada em nanopartículas de Fe_3O_4 em matriz de algodão	Metanol/óleo de soja; razão volumétrica de 6:1	<i>n</i> -hexano/ água	Único estágio; 4 estágios em série: $l=135$ mm, $d=25$ mm	Fluxo: $0,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; T: 40°C ; Conversão em estágio único: 75%; Conversão em 4 estágios: 88%	WANG et al., 2011.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Biocatalisador

Os experimentos foram realizados empregando uma preparação comercial de lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* manufaturada pela Amano Farmacêutica (Nagoya, Japão), adquirida na forma de extrato enzimático em pó da Sigma-Aldrich e posteriormente imobilizada em matriz híbrida constituída de polissiloxano álcool polivinílico (SiO₂-PVA) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). A matriz apresentava as seguintes propriedades: diâmetro médio de poros de 22,9 Å, área de superfície (BET) de 461,0 m². g⁻¹ e volume de poros de 0.275 cm³.g⁻¹ (SIMÕES, 2011).

4.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados etanol anidro (99%, Cromoline) e óleo da amêndoa de macaúba adquirido da Paradigma Óleos Vegetais Ltda (Minas Gerais), tendo a composição aproximada em ácidos graxos: 6,2% Octanóico, 5,3% Decanóico, 43,6% Láurico, 8,5% Mirístico, 5,3% Palmítico, 2,4% Esteárico, 25,5% Oleico e 3,3% Linoleico e Massa molecular de 716,47 g.mol⁻¹. Outras propriedades da amostra do óleo de macaúba incluem: índice de acidez menor que 3,0%, índice de saponificação 238 mg KOH.g⁻¹, índice de iodo 25 g I₂.g⁻¹, massa específica 0,85 g.cm⁻³, ácidos graxos livres 0,33%, índice de peróxido 4,5 mEq.kg⁻¹ e viscosidade 35,2 cSt.

4.1.3. Adsorvente de glicerol (Resina Lewatit® GF202)

Para extração de glicerol do meio reacional foi utilizada a resina macroporosa de troca catiônica Lewatit® GF 202, gentilmente doada pela empresa Lenntech, com granulometria das partículas em tamanho uniforme (0,65 mm), possuindo densidade de 1,24 g.mL⁻¹. Informações adicionais são fornecidas no Apêndice A de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante (<http://www.lenntech.com/Data-sheets/Lewatit-GF-202-L.pdf>).

4.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona mín. 99,5%, Cinética), (terc-

butanol e hexano, Cromoline), álcool polivinílico (MM 78000 com grau de hidrólise de 88%, Polysciences, Inc), Corante lipossolúvel CI 61554 (pigmento orgânico sintético manufaturado por Glitter Ind. Com. Imp. Exp. Ltd., Carapicuíba – SP), HCl (mínimo 36%, Isofar), epícloridrina (99%, Aldrich), polietilenoglicol (MM 1500, Synth), tetraetilortossilicato (98%, Aldrich), goma arábica em pó pura (Synth) e óleo de oliva comercial com baixo teor de acidez (Carbonell), fosfato de sódio monobásico anidro (mín. 99%, Synth), hidróxido de sódio (mín. 97%, Isofar) e hidróxido de potássio (mín. 85%, Cromoline).

4.2. Equipamentos

Na Tabela 4.1 são listados os principais equipamentos utilizados no presente trabalho.

Tabela 4.1. Equipamentos utilizados nas atividades experimentais.

Equipamento	Especificação
Balança analítica	Modelo SHIMADZU
Balança analítica acoplada com IV	Modelo ID 50, Marte [®]
Banho Maria Dudnoff	Marconi
Bomba de vácuo	Modelo RV3, BOC Edwards
Bomba peristáltica	Bomba Peristáltica SJ-1211 Atto
Banho termostatzado	Banho Ultratermostato Criostato
Centrífuga	Modelo 206 BL, Excelsa [®] II
Cromatografo de fase gasosa	Modelo GC-3800, Varian
Densímetro digital	Modelo DMA 35N EX, Anton Paar
Espectrofotômetro UV-Visível	Modelo Cary 50 Conc, Varian
Cromatógrafo de fase líquida (CLAE)	Modelo Agilent 1200, Agilent Technologies
Estufa de secagem e esterilização	Modelo TE-393/2, Tecnal
Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal
Reator de leito fixo encamisado	D= 15 mm, h = 55 mm, V= 10mL D= 14 mm, h = 210 mm, V = 32mL
Rotaevaporador	Modelo 801, Fisatom
Viscosímetro	Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield

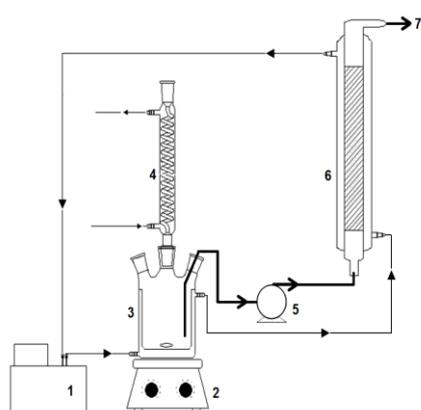
4.3. Montagem experimental dos reatores de leito fixo

4.3.1. Reator de leito fixo (um estágio)

As reações de transesterificação para a síntese de biodiesel em reator de leito fixo foram conduzidas num aparato experimental, conforme ilustrado no esquema da Figura

4.1, composto de colunas de vidro encamisadas com capacidade de 10 mL (diâmetro interno = 15 mm e comprimento = 55 mm) e 32 mL (diâmetro interno = 14 mm e comprimento = 210 mm), designadas como Reator A e Reator B, respectivamente. O substrato era alimentado por meio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto), com fluxo ascendente na vazão estabelecida. A temperatura do sistema foi mantida constante (50 °C) e controlada por banho termostático. Para evitar perda de etanol no sistema, foi acoplado um condensador de refluxo ao vaso de alimentação.

Figura 4.1. Esquema experimental do reator de leito fixo simples estágio (1) $l/d = 3,7$ e (2) $l/d=15$ 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Coluna- 7- Saída do produto.



Dimensões dos reatores:

1) Reator A (relação l/d) = $55/15=3,7$

2) Reator B (relação l/d) = $210/14=15$

Fonte: (DORS et al.,2012).

4.3.2. Reator de leito fixo (duplo estágio)

A representação esquemática dos ensaios é ilustrada na Figura 4.3, sendo composto de duas colunas dispostas em série, conectadas com uma coluna extratora empacotada com Lewatit para remoção do glicerol formado na primeira coluna. A síntese de biodiesel foi realizada nas colunas de vidro encamisadas com capacidade nominal de 32 mL e empacotadas com lipase de *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA. O substrato foi alimentado por meio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto), com fluxo ascendente na vazão estabelecida. A temperatura do sistema foi mantida constante (50 °C) e controlada por banho termostático. Para evitar perda de etanol no sistema, foi acoplado um condensador de refluxo ao vaso de alimentação.

Figura 4.2. Montagem experimental utilizada na etanólise contínua do óleo de macaúba em reator de leito fixo duplo estágio: (a) Agitador magnético; (b) Vaso de alimentação contendo meio reacional; (c) condensador; (d) Bomba peristáltica; (e) Primeiro estágio empacotado com lipase *B.cepacia* immobilizada em SiO₂-PVA; (f) Coluna extratora de glicerol (Lewatit GF 202); (g) Segundo estágio empacotado com lipase *B. cepacia* immobilizada em SiO₂-PVA; (h) Saída de produto (Ésteres etílicos).



Fonte: Próprio autor

4.4. Metodologia experimental

4.4.1. Imobilização da lipase no suporte SiO₂-PVA

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) foi sintetizado e ativado com epicloridrina, conforme metodologia descrita por Da Rós et al. (2010). A imobilização da lipase consistiu do contato da enzima com o suporte (250 mg/g suporte) juntamente com 100 µL de solução aquosa de 5mg/ mL de polietilenoglicol (MM 1500) por grama de suporte, por um período de 24 h a 4°C. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo e o sistema imobilizado lavado com hexano. Adotando essa metodologia foram preparadas 20 bateladas do derivado imobilizado com atividade hidrolítica média de 1933 ± 115 U/g suporte. A Tabela 4.2 apresenta as propriedades catalíticas da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA estabelecidas por Da Rós et al (2010).

Tabela 4.2. Propriedades catalíticas da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA.

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

Fonte: (Da Rós et al.,2010).

4.4.2 Ativação e recuperação da resina Lewatit® GF 202

A resina de troca iônica (Lewatit® GF 202) foi, inicialmente, pré-condicionada pela lavagem com metanol, e em seguida levada a secagem à temperatura ambiente. A resina ativada foi acondicionada em uma coluna de vidro de 12 mL, através da qual o efluente do primeiro reator PBR permeava em fluxo descendente na coluna extratora que foi mantida na temperatura ambiente. O fluxo foi controlado pela bomba peristáltica, na vazão requerida do processo. A massa da resina adsorvente contida na coluna foi trocada a cada 7 dias para a regeneração da resina com metanol. A recuperação da resina, após o processo, ocorreu por meio de lavagens sucessivas com metanol e secagem à temperatura ambiente de acordo com informações fornecidas pela Lenntech (Apêndice A) e que se encontram disponíveis em sua página na internet (<http://www.lenntech.com/Data-sheets/Lewatit-GF-202-L.pdf>).

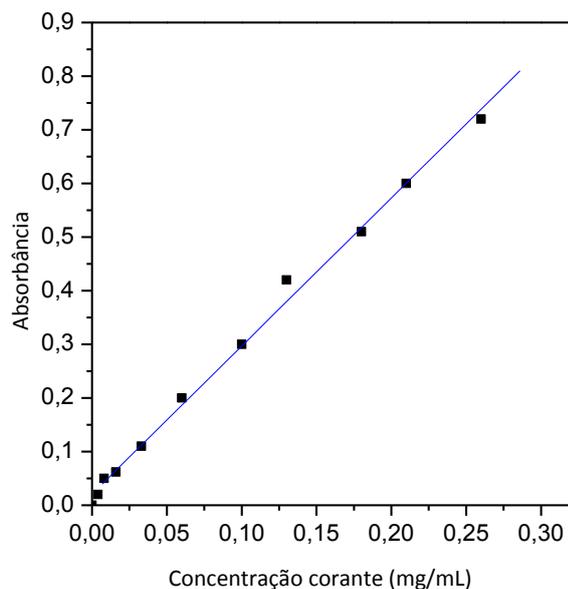
4.4.3. Calibração da bomba peristáltica

A bomba peristáltica foi calibrada sob os mesmos parâmetros utilizados nos ensaios de síntese de biodiesel, com relação à razão molar álcool: óleo do meio reacional e a temperatura. A mangueira utilizada foi de marprene 1,6 mm X 0,5 mm (WATSON – 913. AJ05.016). O ajuste inicial da bomba foi feito levando em consideração a calibração do fabricante da bomba que utiliza água para fazer a curva de calibração. A partir desta informação, realizou-se o ajuste manual na bomba para alcançar os valores das vazões utilizados nos testes. Este teste consistiu na coleta 10 mL de meio reacional, cronometrando-se o tempo.

4.4.4. Função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Para o cálculo da DTR no reator de leito fixo, foi realizado um teste traçador (corante lipossolúvel CI 61554) tipo pulso. Inicialmente, foi efetuada uma varredura de frequências em espectrofotômetro na faixa da luz visível (UV-Visível Varian modelo Cary 50), empregando-se uma concentração de traçador (15%) diluída no meio reacional óleo de macaúba e etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12), visando determinar o comprimento de onda no qual a absorbância era máxima. Em seguida, empregando-se o comprimento de onda determinado (646 nm), foi construída a curva de calibração “absorbância X concentração de traçador”, para determinação da concentração do traçador na saída do reator. Na Figura 4.3 é mostrado o comportamento da absorbância em função da concentração do traçador. A reta que ajusta os dados experimentais é apresentada na Equação 4.1.

Figura 4.3. Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de macaúba e etanol).



Fonte: Própria

$$\begin{aligned} \text{Equação da reta: } & y = 0,02 + 2,76 x \\ \text{Coeficiente de correlação} & = 0,9978 \end{aligned} \quad (4.1)$$

No ensaio de Distribuição do Tempo de Residência foram utilizados dois reatores de capacidade nominal de 32 mL, cada um, empacotado com 21,9 gramas de lipase

imobilizada em SiO₂-PVA previamente inativada, por aquecimento em estufa a 100 °C por 2 horas e uma coluna extratora com volume de 12 mL empacotada com 4,7 gramas da resina Lewatit GF 202. O traçador (corante lipossolúvel CI 61554) na concentração de 15% em meio reacional foi injetado com o auxílio de uma seringa de 5,0 mL, tendo sido injetado 0,9296 g da mistura. O reator foi alimentado com meio reacional numa vazão fixa de 10,00 mL.h⁻¹, sendo retiradas amostras na saída da segunda coluna a cada 30 minutos por um período total de 12,5 h, considerando-se como tempo inicial do ensaio o momento da injeção do traçador (Figura 4.4).

Figura 4.4. Ilustração do sistema durante o teste traçador demonstrando a distribuição do corante no reator.



Fonte: Próprio autor.

Os valores de concentração do corante na saída do reator foram calculados segundo equação obtida na curva de calibração. Por meio dos valores determinados, foi plotado um gráfico de concentração do corante (mg.mL⁻¹) em função do tempo e um modelo matemático exponencial foi ajustado aos pontos obtidos. A função da DTR, E(t) foi calculada pela equação 4.2, considerando a constante de vazão volumétrica utilizada.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (4.2)$$

Em que: $C(t)$ = a concentração do corante no tempo t (g.mL^{-1}) e t = tempo (h). Para determinar o valor do denominador da equação 4.1, foi construído um gráfico de $C(t)$ versus t e com o auxílio do software OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724), a função da DTR, $E(t)$, foi determinada e o tempo médio de residência, t_m , que corresponde ao tempo espacial, τ , foi calculado pela equação 4.3.

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt \quad (4.3)$$

É muito comum comparar-se as DTRs usando os seus momentos em vez de tentar comparar as distribuições em sua totalidade. O primeiro momento é o tempo médio de residência. O segundo momento comumente usado é relacionado a média e é denominado de variância (ou quadrado do desvio-padrão), σ^2 , sendo definido pela Equação 4.4.

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - t_m)^2 \cdot E(t) dt \quad (4.4)$$

A magnitude desse momento é um indicativo do alargamento da distribuição de forma que quanto maior seu valor maior será o alargamento da distribuição. O terceiro momento é também tomado em torno da média e é denominado coeficiente de assimetria, sendo definido pela Equação 4.5.

$$\sigma^3 = \frac{1}{\sigma^{\frac{3}{2}}} \cdot \int_0^{\infty} (t - t_m)^3 \cdot E(t) \cdot dt \quad (4.5)$$

A magnitude desse momento mede a extensão em que a distribuição é assimétrica em uma ou outra direção em relação à média (FOGLER, 2009). Para esse modelo, analisa-se a DTR para determinar o número de tanques ideais, n , em série que corresponderá aproximadamente à mesma DTR do reator não ideal utilizado. De posse dos dois primeiros momentos da DTR, pode-se determinar o parâmetro n pela Equação 4.6.

$$n = \frac{\tau^2}{\sigma_2} \quad (4.6)$$

4.4.5. Síntese de biodiesel em reator de leito fixo (simples estágio e duplo estágio)

A mistura reacional contendo óleo da amêndoa de macaúba e etanol preparado na razão molar de 1:12 (óleo: etanol) foi mantida em um frasco de alimentação, sob agitação magnética (150 rpm) e temperatura de 50 °C. O substrato foi bombeado com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto) na vazão desejada. Em cada experimento a coluna ou as colunas foram empacotadas com suspensão do derivado imobilizado no meio reacional e em seguida estabilizada pela circulação do substrato através da coluna por um período equivalente a 2 tempos espaciais. Amostras diárias foram recolhidas e estocadas a -2°C, para realização de análises cromatográficas, de viscosidade e densidade. Ao final dos experimentos a enzima foi recuperada e lavada com terc-butanol para a remoção de substrato e produtos eventualmente retidos nas partículas da matriz para determinação da atividade hidrolítica residual do derivado imobilizado (SOARES et al, 1999).

4.4.6. Purificação das amostras de biodiesel

Para a separação da glicerina formada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a lavagens sucessivas com água destilada. Em cada lavagem, foi utilizado aproximadamente o mesmo volume de água em relação ao volume de amostra. A mistura foi transferida para um funil de decantação, agitada e deixada em repouso por 30 min para a separação das fases. A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior, por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à centrifugação (1569g /15 min) e posteriormente à evaporação em rota-evaporador (70 °C por 30 min) a vácuo para a retirada de etanol e água remanescentes. Para finalizar a etapa de secagem, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro e o biodiesel foi armazenado em frascos de vidro para as análises posteriores.

4.5. Métodos de análises

4.5.1. Atividade hidrolítica do derivado imobilizado

A atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi determinada pela reação de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). As condições da reação de hidrólise foram: pH 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) e temperatura de 37 °C. Os ácidos graxos livres liberados na reação foram titulados com solução de KOH (0,025 mol/L) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de

enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de teste. As atividades foram calculadas de acordo com a Equação 4.7 e expressa em μmol.g⁻¹.min⁻¹ (U/g).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (4.7)$$

em que: V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra em mL, V_b = volume do KOH gasto na titulação do branco em mL, M = concentração molar da solução de KOH em mol/L, t = tempo de reação em min, m = massa da amostra seca, em gramas.

4.5.2. Teor de umidade do suporte e do derivado imobilizado

Os teores de água nos suportes puro e ativado, bem como nos sistemas imobilizados foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50).

4.5.3. Determinação da viscosidade cinemática dos ésteres de etila

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40 °C, com a utilização de 1,0 mL de amostra. A viscosidade cinemática (mm²/s) foi obtida pela razão entre a viscosidade absoluta (cP) e a massa específica do biodiesel (g/mL).

4.5.4. Massa específica do biodiesel

Os valores da massa específica foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35n EX (Anton Paar). As medidas foram realizadas a 20 °C, empregando-se 2,0 mL da amostra purificada.

4.5.5. Quantificação dos ésteres de etila

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

fluxo de 25 mL/min. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 90 °C (3 min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min), a uma taxa de aquecimento de 25 °C/min. Os dados coletados foram processados utilizando o software Galaxie Chromatography Data System versão 1.9. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL em hexano e padrão interno e a quantificação foi realizada pela calibração interna apresentada na Tabela 4.3 conforme estabelecido por URIOSTE et al. (2008).

Tabela 4.3. Condições para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.

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

4.5.6. Quantificação de mono e diacilgliceróis nas amostras de biodiesel purificadas

Mono e diacilgliceróis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Inc. SP, Brasil), com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Fenomenex Gemini C18 110 A (150 x 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 40 °C e do detector de 70 °C. Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (J. T. Baker). As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila (A) e metanol (B) numa proporção de 80% A e 20% B por 35 min. A taxa de fluxo de 1 mL/min foi mantida durante os seis primeiros minutos: 1,5 mL/min durante os 24 min seguintes e 3,0 mL/min durante os cinco minutos restantes. Todas as amostras foram dissolvidas em acetato de etila-hexano (1:1, v/v) e o volume de injeção foi de 10 µL. Os

padrões utilizados foram a monolaurina, monomiristina, monopalmitina, monoestearina, monoleína, dilaurina, dipalmitina, dimiristina, diestearina, dioleína. Os teores de mono e diacilgliceróis foram calculados nas amostras de biodiesel purificadas complementando as análises dos ésteres alquílicos presentes nas amostras analisadas por CG.

4.6. Cálculos

4.6.1. Rendimentos de transesterificação

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila (ΣM_e). M_e é determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo vegetal (M_o), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação (4.8) em que M_o corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) (Equação 4.9). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (M_t) pela massa total teórica de ésteres de etila (ΣM_e), conforme mostrado na Equação (4.10).

$$M_e = \frac{(M_o \cdot MM_e)}{MM_a} \quad (4.8)$$

$$M_o = C_a \cdot M_i \quad (4.9)$$

$$R = \frac{M_t}{\Sigma M_e} \cdot 100 \quad (4.10)$$

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

4.6.2. Tempo espacial (τ)

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (1972), conforme as Equações 4.11 (a), (b) e (c):

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (4.11a)$$

$$V = V_{reator} - V_{catalisador} \quad (4.11b)$$

$$V_{catalisador} = \frac{w}{\rho} \quad (4.11c)$$

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

4.6.3. Produtividade em ésteres de etila

A produtividade foi calculada de acordo com a Equação 4.12:

$$P = \frac{C}{\tau} \quad (4.12)$$

Em que: P = produtividade (mg_{éster}. g_{meio}⁻¹.h⁻¹); C = concentração de ésteres etílicos na saída do reator (mg_{éster}.g_{meio}⁻¹); τ = tempo espacial (h).

4.6.4. Tempo de meia-vida do biocatalisador

A atividade hidrolítica inicial e residual dos derivados imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (item 4.4.1). Empregando o modelo de inativação de primeira ordem foram calculados a constante de inativação (K_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), pelas equações 4.13 e 4.14, respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d.t} \quad (4.13)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4.14)$$

Em que A_0 e A referem-se, respectivamente, às atividades hidrolíticas inicial e final do biocatalisador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ajuste da vazão da bomba peristáltica e cálculo do tempo de espacial

Para o ajuste da vazão da bomba peristáltica foram utilizados: bomba peristáltica, mangueira de marprene com diâmetro interno de 0,5 mm e vaso de alimentação aquecido na temperatura de reação, com agitação e condensador para evitar a perda de etanol por evaporação. O ajuste foi efetuado nas condições estabelecidas para condução dos experimentos: temperatura de 50 °C, razão molar 1:12 (óleo de macaúba: etanol). O ajuste foi feito manualmente no botão de controle de rotação do motor da bomba e a vazão foi ajustada por meio da medição de um determinado volume em proveta cronometrando-se o tempo. O cálculo do tempo espacial está apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Cálculos dos parâmetros operacionais dos reatores de leito fixo.

Experimento	Cálculo			
	Volume da enzima (mL)	Volume útil do leito (mL)	Vazão média (mL.min ⁻¹)	Tempo espacial (h)
	$V_{enzima} = \frac{m_{enzima}}{d_{cristalina}}$	$V_{útil} = V_{reator} - V_{enzima}$	Ajuste	$\tau = \frac{V_{útil}}{vazão}$
1	4,4	5,48	0,006	14,42
2	12,9	19,13	0,023	13,91
3	25,3	38,75	0,04 -0,06	10 -16
4	24,1	39,95	0,04	15,85

Após o ajuste da vazão requerida, fixou-se o ponto exato com uma marca no painel controle de rotação do motor da bomba para possibilitar a reprodução destas vazões durante a execução dos experimentos.

5.2. Operação do reator de leito fixo

Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 50 °C, de acordo com as condições descritas no item 4.3 e listadas na Tabela 5.2.

Os experimentos 1 e 2 foram direcionados para o levantamento de dados operacionais e avaliação do desempenho PBR em um único estágio utilizando reatores com diferentes relações geométricas altura/diâmetro (l/d). Os experimentos subsequentes (3 e 4) foram conduzidos em reatores duplo estágio utilizando o reator na relação geométrica altura/diâmetro (l/d) que forneceu melhor desempenho.

Tabela 5.2. Descrição dos experimentos realizados no trabalho

Experimento	Número de estágios	Volume do reator (mL)	Tempo espacial (h)	Objetivo
1	único	10	14	Estudo da relação geométrica do reator (l/d)
2		32		
3	duplo	64	10-16	Estudo da influência do tempo espacial
4			16	Teste de desempenho e estabilidade do sistema

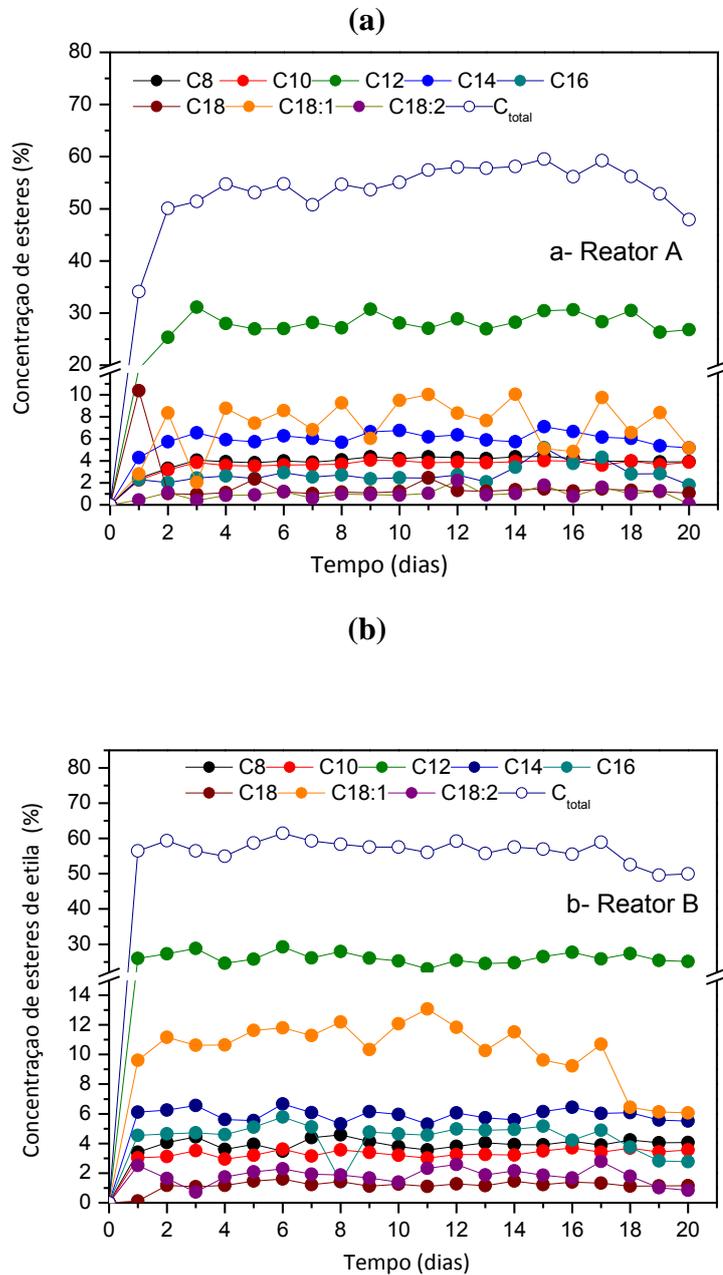
5.3. Estudo da relação geométrica do reator de leito fixo em único estágio

Estudos de reações catalisadas por lipases imobilizadas em reator de leito fixo têm mostrado que a taxa de reação é afetada pela variação de fluxo linear do fluido. Assim, limitações de transferência de massa, seja entre os reagentes do meio reacional para o sítio ativo da lipase ou do transporte ineficiente do produto para a mistura, são fatores plausíveis de investigação nesta configuração de reator (XU et al., 2000). Trabalhos descritos na literatura indicam menor limitação à transferência de massa em colunas que apresentam maior relação altura/diâmetro (l/d) (DAMSTRUP et al., 2007).

Nesse contexto, visando verificar a influência da relação geométrica (l/d) da coluna de leito fixo na síntese de biodiesel contínua do óleo de macaúba empregando lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, foram efetuados testes em dois reatores apresentando as seguintes dimensões: Reator A ($l = 55\text{mm}$ e $d = 15\text{ mm}$) e Reator B ($l = 210\text{mm}$ e $d = 14\text{ mm}$), expressando relação geométrica l/d de 3,7 e 15, respectivamente. Buscou-se manter um carregamento constante entre a massa de biocatalisador (g)/volume total do reator (mL), sendo constatado carregamento de 75% no Reator A e 82% no Reator B.

O perfil de formação dos ésteres de etila em função do tempo de reação está ilustrado nas Figuras 5.1 (a, b). Verifica-se que em ambos os testes, a formação dos ésteres de etila apresentou correlação com os principais ácidos graxos presentes na composição do óleo de macaúba, evidenciando os valores mais elevados do éster laurato de etila (C12:0). O valor médio obtido em concentração mássica de ésteres foi de $52,8 \pm 5,9$ e $56,6 \pm 3,0\text{ m/m\%}$, respectivamente, para o Reator A e B.

Figura 5.1. Perfil de formação dos ésteres de etila na etanolise contínua do óleo de macaúba em reator de leito fixo, empregando diferentes relações geométricas (l/d): a) Reator A e b) Reator B.

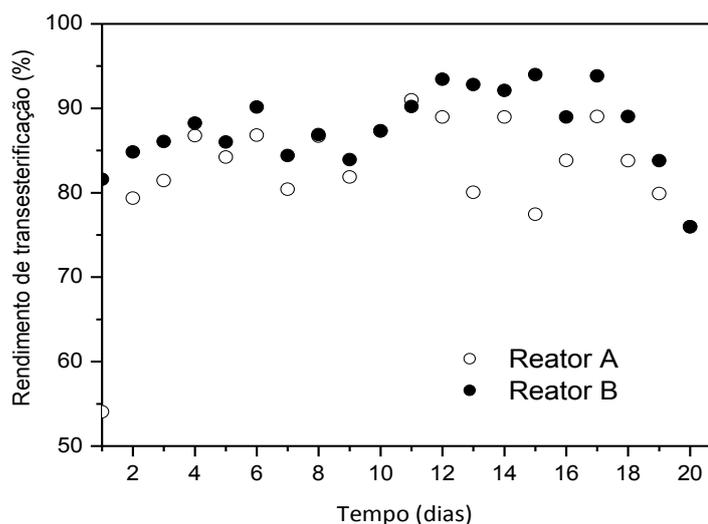


Fonte: Próprio autor.

A Figura 5.2 ilustra que a alteração da relação geométrica (l/d) nos reatores de leito fixo influenciou no rendimento de transesterificação que variou, após o alcance do estado estacionário, de 75,9 a 91,0% para o teste que empregou razão de 3,7 e de 89,1 a 94,0% para a razão de 15. Os sistemas contínuos foram operados por 20 dias, sendo o regime estacionário alcançado em 72 h (5 tempos espaciais) no sistema experimental que

empregou o Reator A e em 48h (3 tempos espaciais) no Reator B, demonstrando melhor estabilidade operacional. Além disso, nessa condição, foi alcançada produtividade média de $40,4 \pm 2,2 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meio}} \cdot \text{h}^{-1}$, superior a obtida no Reator A ($37,7 \pm 4,2 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meio}} \cdot \text{h}^{-1}$).

Figura 5.2. Rendimento da produção de ésteres de etila em função do tempo reacional na etanolise contínua do óleo de macaúba realizada em reator de leito fixo.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos, sumarizados na Tabela 5.3, sugerem a viabilidade técnica de aplicação da lipase *B. cepacia* imobilizada em partículas de SiO_2 -PVA para mediar a síntese enzimática de biodiesel em meio isento de solventes, em função da satisfatória estabilidade operacional. Verifica-se ainda que o Reator B apresentou melhor desempenho, provavelmente porque os problemas de transferência de massa entre enzima e substrato foram minimizados pela adequada relação geométrica ($l/d = 15$).

Com o intuito de verificar se o produto obtido atendia as especificações da ANP, as amostras de biodiesel coletadas foram purificadas e submetidas a análises adicionais, como viscosidade e teores residuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis.

Viscosidade é uma medida da resistência ao fluxo de um líquido, devido ao atrito interno de uma das partículas movendo-se em relação a outra. Certamente é uma das propriedades mais importantes do biodiesel, devido ao seu grande efeito sobre o desempenho do motor. A viscosidade do biodiesel é maior que a do diesel fóssil podendo favorecer a pressões excessivas de injeção do combustível, que conduz a uma fraca atomização, resultando em uma combustão incompleta, maiores níveis de emissão de

poluentes e deposição de carbono sobre os bicos injetores (CHAVARRIA-HERNANDEZ; PACHECO-CATALÁN, 2014). Alguns pesquisadores relataram que a viscosidade do biodiesel pode ser de até 1,6 vezes superior à do petrodiesel a 40 °C. Esta relação aumenta especialmente quando a temperatura é inferior a 25 °C (TESFA et al., 2010).

Tabela 5.3. Quadro comparativo do desempenho do reator de leito fixo na etanólise contínua do óleo de macaúba mediada por *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA

Parâmetros	Reator A (<i>l/d</i> =3,7)	Reator B (<i>l/d</i> =15)
Atividade inicial do biocatalisador (U.g ⁻¹)	1655 ± 52	2155±63
Atividade residual do biocatalisador (U.g ⁻¹)	613 ± 39	856 ±25
Constante de desativação (k _d , h ⁻¹) x10 ³	1,7	1,9
Tempo de meia-vida (h)	402	358
Concentração de ésteres de etila (g.g ⁻¹)	52,8 ± 5,9	56,6 ± 3,0
Produtividade (mg éster.g _{meio} ⁻¹ . h ⁻¹)	37,7± 4,2	40,4 ± 2,1
Rendimento de transesterificação (%)	83,9± 4,4	89,7 ± 4,8
Viscosidade cinemática 40°C (mm ² /s)	5,3 ± 0,63	5,6 ± 0,62

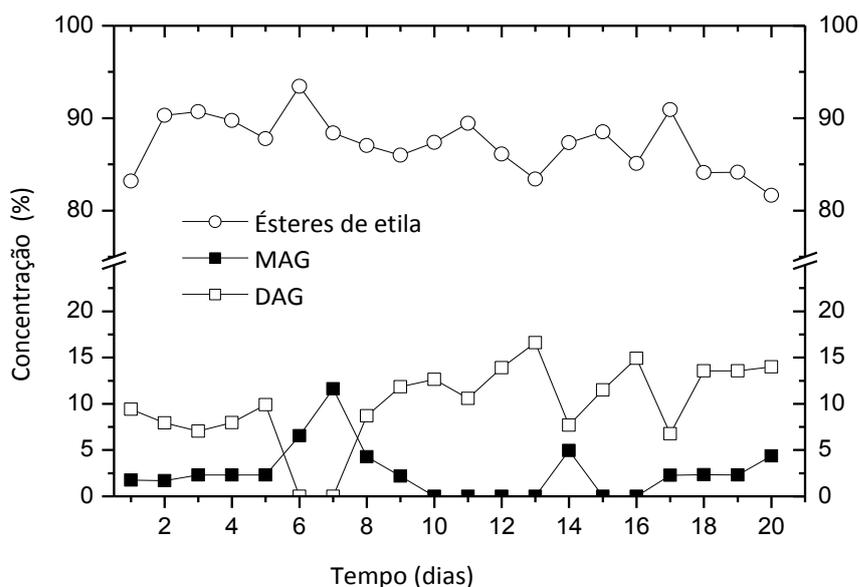
O monitoramento da viscosidade durante o processo de transesterificação serve de indicativo da conversão dos triacilgliceróis em ésteres alquílicos, e por consequência, da gradual redução da viscosidade do produto transesterificado, ou seja, a viscosidade é um parâmetro de qualidade do biodiesel. A Tabela 5.4 apresenta a correlação dos valores médios de viscosidade e rendimento de transesterificação das amostras de biodiesel obtidas durante o processo conduzido nos reatores A e B em fluxo contínuo. De acordo com as especificações americana da ASTM (D6751) e da brasileira pela resolução ANP n°4/2012 (HOEKMAN et al., 2012), a viscosidade cinemática do biodiesel (B100) deve estar na faixa de 3,0–6,0 mm².s⁻¹.

Tabela 5.4. Correlação entre as propriedades das amostras de biodiesel obtidas no processo de transesterificação do óleo de macaúba.

Reator	Rendimento de transesterificação (%)	Viscosidade cinemática 40°C (mm².s⁻¹)
Reator A	82,3 ± 7,5	5,67 ± 0,52
Reator B	89,7 ± 4,8	5,60 ± 0,62

A Figura 5.3 mostra o perfil da concentração de ésteres de etila, monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG) no produto purificado, obtido a partir da etanólise contínua do óleo de macaúba no reator B.

Figura 5.3. Relação entre concentração de ésteres de etila, monoacilglicerol e diacilglicerol quantificados no produto purificado obtido em fluxo contínuo (Reator B).



Fonte: Próprio autor

Embora promissores, os resultados mostram que a qualidade do produto final não atendeu a todos os parâmetros exigidos pelas normas competentes, visto que, o Regulamento Técnico da ANP (nº 14/2012), especifica um valor mínimo de 96,5% em massa de ésteres e valores máximos de 0,8 e 0,2% em massa de MAG e DAG, respectivamente.

Esses resultados podem ser creditados, provavelmente, a adsorção do glicerol na superfície da lipase imobilizada, reduzindo a atividade catalítica da lipase ao longo do tempo, como verificado na Figura 5.2. Este comportamento é descrito na literatura por diversos pesquisadores para diferentes preparações de lipase imobilizada (POPPE et al, 2015).

No que se refere a lipase imobilizada em suporte híbrido formado por SiO₂-PVA Costa-Silva (2013) adotou o método de tingimento pelo corante Amarantho para verificar a afinidade do glicerol pelo suporte e derivado imobilizado. Essa técnica mostrou-se adequada para elucidar o comportamento do glicerol na etanólise do óleo de coco, sendo

verificada a partição do glicerol *in situ* e seu acúmulo sobre a lipase imobilizada. Foi ainda verificado que o glicerol apresentou afinidade tanto para o suporte híbrido (SiO₂-PVA), quanto para a lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA (indicado pelo tingimento das matrizes na cor vinho). Os resultados alcançados demonstram que o suporte à base de sílica apresentou intensa afinidade pelo glicerol, em razão das propriedades hidrofílicas desse material. Enquanto que, a lipase de *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA demonstrou afinidade moderada, sugerindo que a imobilização da lipase na matriz reduziu o caráter hidrofóbico do suporte, em função dos grupos polares presentes na enzima (COSTA – SILVA, 2013).

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

5.4. Caracterização hidrodinâmica do reator de leito fixo dois estágios

Em um reator ideal de escoamento uniforme, todas as moléculas que saem do reator permaneceram dentro dele exatamente o mesmo tempo. Da mesma forma, em um reator ideal operando em regime descontínuo, todos os átomos dos materiais dentro do reator estiveram dentro dele por um idêntico período de tempo. O período que os átomos permaneceram no reator é denominado de tempo de residência dos átomos no reator (FOGLER, 2009).

Os reatores ideais de escoamento uniforme e o descontínuo são os dois únicos tipos de reatores nos quais todos os átomos têm o mesmo tempo de residência. Em todos os outros tipos de reatores, os vários átomos da alimentação permanecem tempos diferentes dentro do reator; isto é, há uma distribuição dos tempos de residência do material dentro do reator (FOGLER, 2009).

A Distribuição do Tempo de Residência (DTR) de um reator é uma característica da mistura que ocorre no reator. Não há mistura axial no reator de escoamento uniforme e esta omissão é refletida na DTR que é exibida por esta classe de reatores. O CSTR é completamente misturado e possui uma DTR de natureza muito diferente daquela de um reator de escoamento uniforme. A DTR exibida por um determinado reator fornece

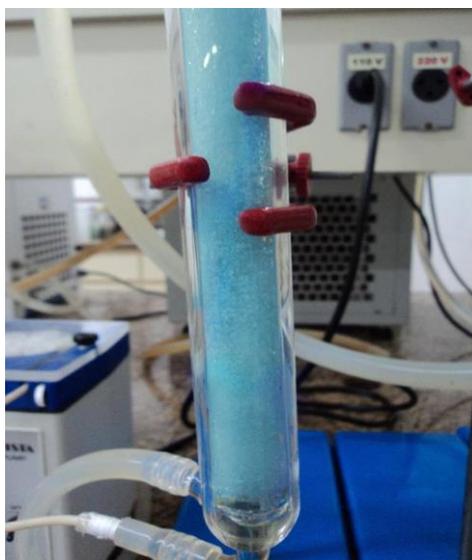
indícios claros do tipo de mistura que ocorre dentro do mesmo, e é uma das formas de caracterização mais informativas do reator (FOGLER, 2009).

Para o cálculo experimental do tempo médio de residência do substrato no biorreator de dois estágios, bem como para a caracterização da mistura no leito reacional, foi realizado o teste traçador tipo pulso. Em reatores ideais, sem caminhos preferenciais ou zonas mortas, o tempo médio de residência (t_m), calculado em função da distribuição do tempo de residência, deve coincidir com o tempo espacial (τ - tempo necessário para se processar um volume de reator), calculado conforme equação 4.3. Quanto maior for o número de caminhos preferenciais e de zonas mortas no empacotamento maior será a diferença entre os valores de tempo médio de residência (t_m) e o tempo espacial (τ).

No presente trabalho, a função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) foi determinada experimentalmente injetando-se 0,9296g da solução de corante lipossolúvel azul (15%) em meio reacional (óleo de macaúba/etanol na proporção molar de 1:12) no tempo $t = 0$ e, medindo-se a concentração, C , do traçador na saída do reator em função do tempo. O teste foi realizado por 13 h, efetuando amostragens a cada 30 min. A Figura 5.4 ilustra o espalhamento do corante no interior do primeiro estágio durante o primeiro tempo espacial (4,85 horas).

Para efeito de cálculo foram adotados os valores de $1,865 \text{ g.mL}^{-1}$ para densidade cristalina da lipase imobilizada em SiO_2 -PVA (inativada) e de $1,24 \text{ g.mL}^{-1}$ para densidade da resina Lewatit GF 202. Estes valores são correspondes às densidades dos sólidos, desconsiderando-se os espaços intraparticulares. Deve-se observar que, após o carregamento do reator com o suporte sólido, o mesmo foi preenchido com meio reacional. Assim, o valor da densidade do sólido foi considerado adequado para a determinação do volume de líquido no reator e, conseqüentemente, do tempo espacial.

Figura 5.4. Espalhamento do corante no interior do primeiro reator durante a realização do teste traçador (fotografia referente ao primeiro tempo espacial, 4,85 horas).

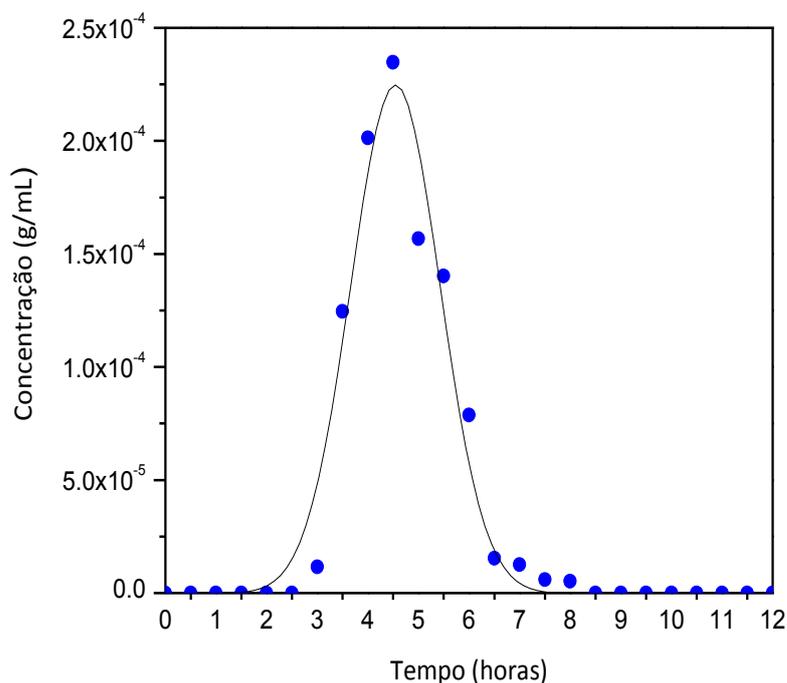


Fonte: Próprio autor

Os valores de absorvância das amostras (reator B dois estágios) previamente diluídas em terc-butanol apresentados no Apêndice B, serviram de base para calcular a concentração do corante na saída do reator por meio da equação obtida na curva de calibração (Figura 4.3). As concentrações do traçador na saída do reator foram plotadas em função do tempo (Figura 5.5) e para cada valor de tempo, a função da DTR, $E(t)$ foi determinada, conforme dados coletados resultando no tempo de residência real do experimento. Conhecendo-se o volume de líquido do reator, obtido por meio da diferença entre o volume total e o ocupado pelo suporte no empacotamento, e a vazão volumétrica empregada ($10 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$), obteve-se tempo espacial de 4,69 h calculado pela equação 4.3.

Comparando-se este tempo com o correspondente tempo de residência (4,85 h), tem-se uma diferença de 0,16 h (9,6 min), considerada aceitável neste tipo de ensaio em função dos erros experimentais envolvidos. O valor determinado experimentalmente para a variância, σ^2 , foi $0,7868 \text{ h}^2$, correspondendo a um desvio-padrão de 0,887 h. Para o coeficiente de assimetria, s^3 , o valor obtido foi de $0,5783 \text{ h}^{3/2}$ (Tabela 5.5).

Figura 5.5. Concentrações reais do traçador na saída do reator em função do tempo.



Fonte: Próprio autor

Tabela 5.5. Tempo médio de residência, variância e coeficiente de assimetria obtido por meio do teste de traçador tipo pulso para o sistema reacional (reator duplo estágio).

Parâmetro	Valor
Tempo médio de residência, t_m (h)	4,69
Variância σ^2 (h ²)	0,7868
Coeficiente de assimetria s^3 (h ^{3/2})	0,5783

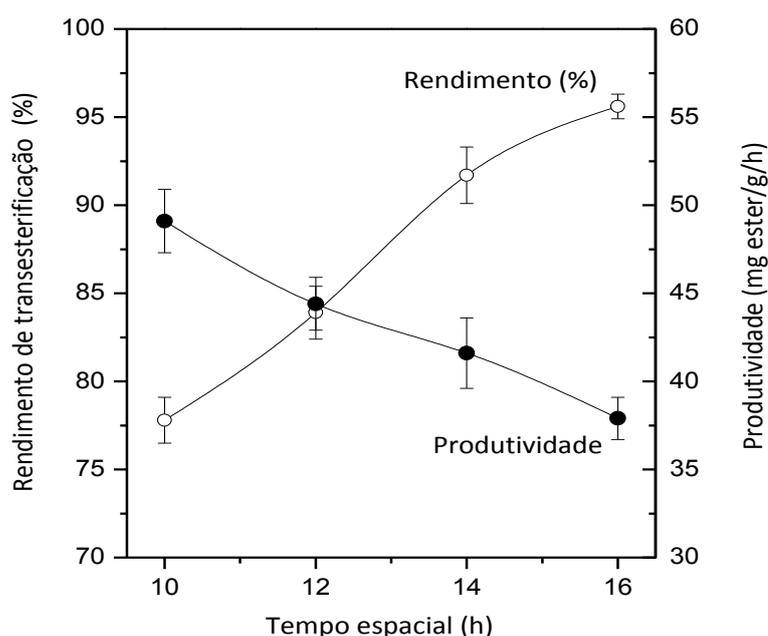
5.5. Desempenho do reator duplo estágio na transesterificação do óleo de macaúba

5.5.1. Influência do tempo espacial no desempenho do sistema

O desempenho da montagem experimental consistindo de reatores de leito fixo duplo estágio incorporando uma coluna extratora de glicerol foi testado na etanólise do óleo de macaúba, em meio isento de solventes. Inicialmente foi verificada a influência do tempo de espacial com relação a produtividade do sistema e rendimento de transesterificação.

A mistura reacional óleo e etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12) foi bombeada através dos reatores contendo cada um 21,1g e 19,5 g da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto) na vazão adequada. Na saída do primeiro estágio foi acoplada uma coluna contendo 4,7g da resina Lewatit GF202 para adsorção do glicerol formado. O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2009) e o desempenho do sistema operacional foi avaliado para diferentes vazões volumétricas correspondendo a tempos espaciais entre 10 a 16 h. Neste experimento foi considerado como parâmetro de avaliação as concentrações em ésteres de etila na saída do segundo estágio (Apêndice C). Esses dados permitiram calcular os valores médios de rendimentos de transesterificação e produtividade para cada tempo espacial testado, conforme mostrado na Figura 5.6.

Figura 5.6. Influência do tempo espacial no rendimento de transesterificação e produtividade da etanolise contínua do óleo de macaúba conduzida em reator de leito fixo duplo estágio acoplado com coluna extratora de glicerol



Fonte: Próprio autor

A alteração do tempo espacial ao longo do processo interferiu na formação de ésteres de etila, nas condições testadas verifica-se que para um tempo espacial inicial de 10 h, foram obtidos valores médios de rendimento de $77,8 \pm 1,3\%$ e produtividade de $49,1 \pm 1,8 \text{ g}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{meio}}/\text{h}$. Pode-se observar que os valores de rendimento acompanharam o

aumento nos tempos espaciais, chegando a valores adequados de concentração de ésteres para uso como combustível ($\approx 96\%$), que correspondeu a um acréscimo de 15% em relação ao valor inicial. Por outro lado, a produtividade sofreu um decréscimo final de 25%, mostrando uma tendência de queda à medida que o tempo espacial era aumentado.

Na faixa de variação do fluxo de alimentação estudada, verifica-se que o melhor desempenho do sistema foi constatado para tempo espacial de 16 h (vazão volumétrica = $1,04 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$). Nessa condição $95,6 \pm 0,7\%$ dos ácidos graxos presentes no óleo de macaúba foram convertidos nos ésteres de etila correspondentes, alcançando uma produtividade média de $37,9 \pm 1,2 \text{ mg}_{\text{éster}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{meio}}\cdot\text{h}^{-1}$. Esses resultados se comparam favoravelmente aos dados descritos na literatura, principalmente se for considerado que os experimentos foram efetuados em meio reacional isento de solventes. O valor médio de viscosidade cinemática obtido nessa condição foi de $5,85 \text{ mm}^2/\text{s}$.

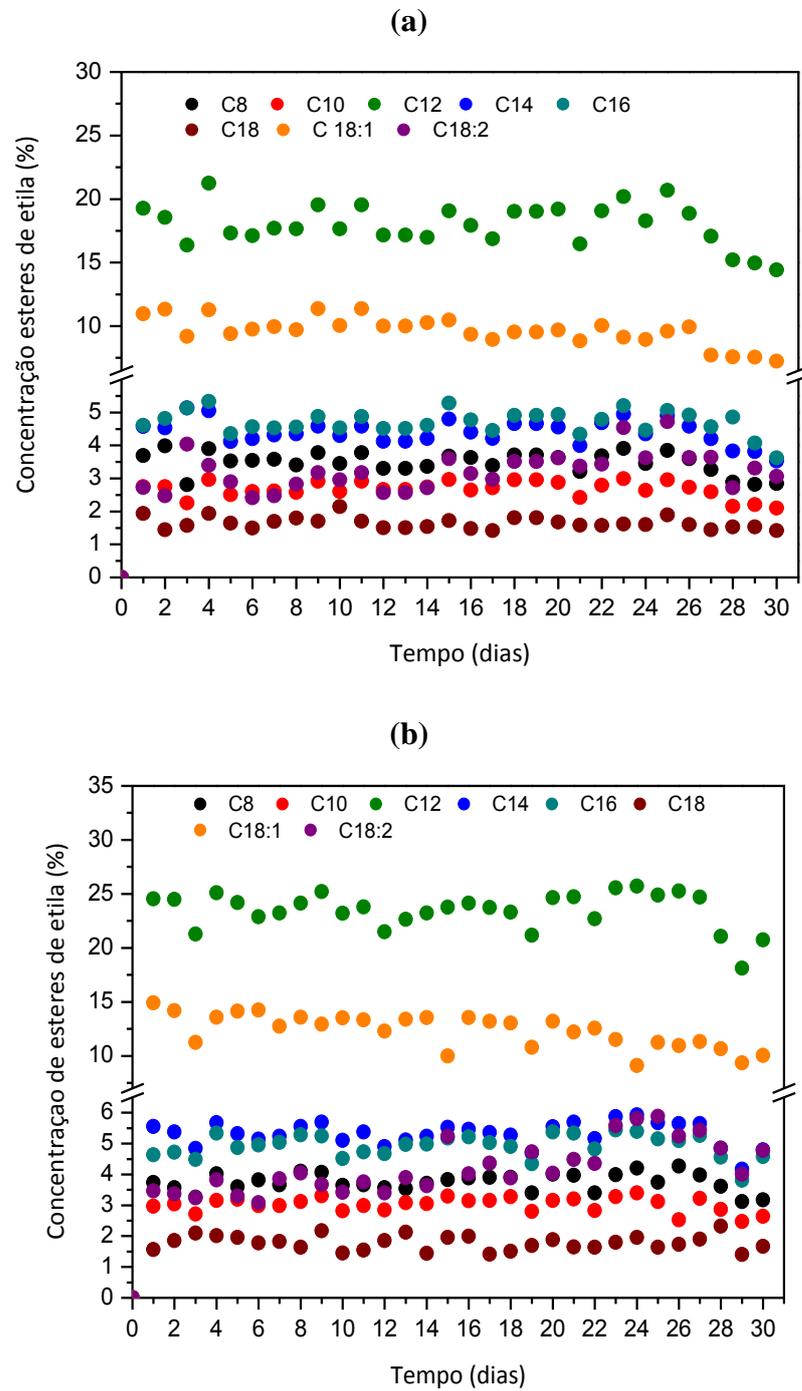
Considerando que no caso do biodiesel os parâmetros de qualidade estão associados aos teores de ésteres e valores de viscosidade, no experimento subsequente foi investigado o perfil de desempenho do sistema reacional operando num tempo espacial de 16 horas mantendo fixas as demais variáveis (razão molar óleo de macaúba: etanol (1:12) e temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$), por um período de 30 dias.

5.5.2. Desempenho e estabilidade do reator por longo período de tempo

As Figuras 5.7 (a,b) mostram o perfil de formação dos ésteres de etila (C8:0 a C18:2) em função do tempo de operação do processo na saída de cada estágio. Verifica-se que os ésteres formados foram correspondentes aos ácidos graxos presentes no óleo de macaúba. Em ambos os estágios as proporções de ésteres mais elevadas foram obtidas para o laurato de etila (C12:0) e oleato de etila (C18:1).

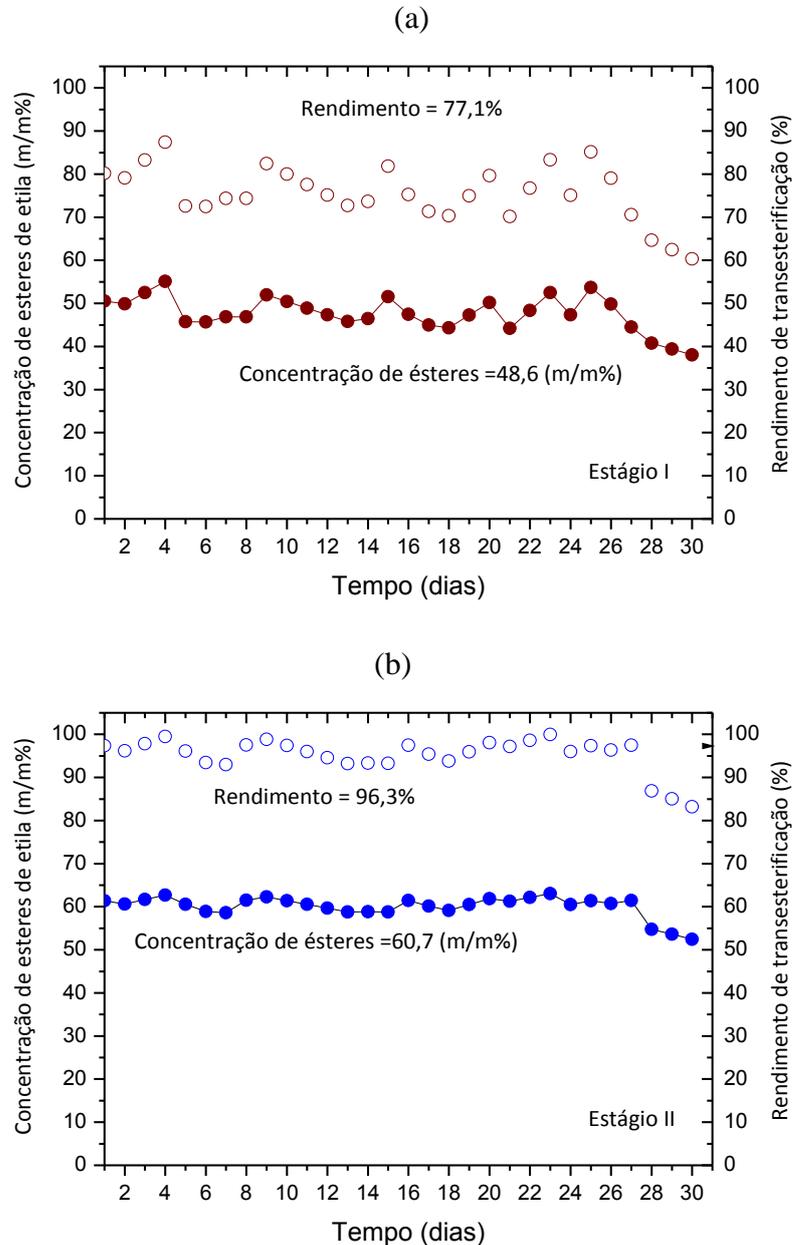
As Figuras 5.8 (a,b) apresentam a concentração total de ésteres de etila e rendimento de transesterificação obtidos em cada estágio. No primeiro estágio verifica que a concentração em ésteres de etila variou de 44,2 a 55,1 $\% \text{ m}\cdot\text{m}^{-1}$ correspondendo a rendimentos de transesterificação de 70,1 a 87,4 % (Figura 5.8a), enquanto no segundo estágio a concentração total em ésteres de etila variou entre 58,6 a 63,0 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, correspondendo a rendimentos de transesterificação, respectivamente, entre 92,9 a 99,1% e produtividade na faixa de 36,6 a 39,4 $\text{mg}_{\text{éster}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{meio}}\cdot\text{h}^{-1}$.

Figura 5.7. Perfil de formação dos ésteres de etila na etanólise contínua do óleo de macaúba em reator de leito fixo duplo estágio (a) estágio I, (b) estágio II.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.8. Concentração total de ésteres de etila e do rendimento de transesterificação no processo conduzido em reator de dois estágios (a- estágio I, b-estágio II).

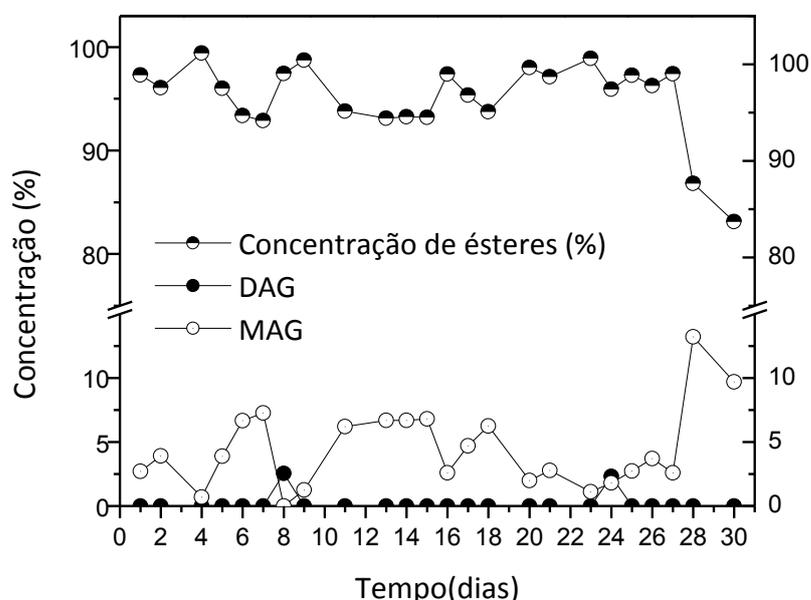


Fonte: Próprio autor

Os valores obtidos no segundo estágio foram 15% superiores aos alcançados no primeiro estágio (Figura 5.8a). A eficiência da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA foi comprovada pelo alcance do estado estacionário em apenas 2 tempos espaciais (36 h) permanecendo estável por um período de 25 dias. Após esse período foi constatado declínio da conversão, atingindo valores inferiores a 88%.

A Figura 5.9 mostra o perfil da concentração de ésteres (CE%), monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) no produto obtido a partir da etanólise contínua do óleo de macaúba em duplo estágio. Verifica-se que o produto após purificação era praticamente isento de diacilgliceróis muito embora os teores de monoacilgliceróis residuais (3,8 m/m%) ainda apresentassem valores superiores aos requeridos pela resolução ANP nº14/2012. Entretanto, os valores de viscosidade média de $5,8 \pm 0,3 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, atendem os critérios vigentes, que estabelece viscosidade cinemática do B100 na faixa entre 3,0 - 6,0 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Figura 5.9. Relação entre concentração de ésteres (CE%), monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) quantificados nas amostras obtidas em fluxo contínuo, no segundo estágio.



Fonte: Próprio autor

Ao final do experimento, a enzima foi recuperada e lavada com terc-butanol para a remoção de substrato e produtos eventualmente retidos nas partículas da matriz. A atividade hidrolítica residual do derivado imobilizado no estágio II foi de $582 \pm 25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, o que correspondeu a uma perda de atividade da ordem 54% em relação à atividade inicial. Empregando o modelo de inativação de primeira ordem foram calculados a constante de inativação (K_d) $1,17 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) 423 horas.

Os resultados obtidos sumarizados na Tabela 5.6 demonstraram que é possível operar um sistema contínuo para produção enzimática de biodiesel a partir do óleo de

macaúba empregando uma configuração de reatores PBR conectados em série na ausência de solventes. Devido a menor porcentagem de ácidos graxos saturados ($\approx 67\%$) em relação a outros óleos vegetais láuricos como óleo de babaçu e óleo de coco, o sistema operacional foi estável e não necessitou de requerimentos adicionais de aquecimento nas conexões como os utilizados nos trabalhos desenvolvidos por Simões, 2011 e Costa-Silva, 2013.

Além disso, a estratégia de incorporação de um sistema para remoção do glicerol no efluente do primeiro estágio minimizou os problemas de limitação difusional e inativação da lipase imobilizada no segundo estágio. Esta estratégia contribuiu para que o derivado imobilizado atingisse elevada estabilidade operacional, possibilitando a obtenção de um produto final adequado, apresentado rendimento em ésteres de etila médio de $96,3 \pm 2,1\%$ e viscosidade média de $5,8 \pm 0,3 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Tabela 5.6. Parâmetros do processo na etanólise do óleo de macaúba em reator duplo estágio.

Parâmetro	Estágio I	Estágio II
Atividade hidrolítica inicial lipase (U/g)	2027 ± 115	1894 ± 54
Atividade hidrolítica residual lipase (U/g)	786 ± 59	582 ± 44
Razão molar (óleo:álcool)	1:12	1:12
Tempo espacial (h)	8	16
Constante de inativação térmica ($K_d \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$)	1,3	1,2
Tempo de meia-vida (h)	527	423
Produtividade ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meio}} \cdot \text{h}^{-1}$)	$59,6 \pm 5,0$	$36,7 \pm 2,4$
Rendimento da transesterificação (%)	$77,1 \pm 4,8$	$96,3 \pm 2,1$

De acordo com os resultados apresentados, o desempenho global do sistema operacional se compara favoravelmente aos dados descritos na literatura. Em trabalho realizado por Hama et al. (2011) foram reportados valores de rendimento máximos de 90% na metanólise enzimática do óleo de soja em reatores PBR, conectados em série, ao longo de 550 h de operação.

Utilizando uma montagem experimental similar a descrita no presente trabalho, Costa-Silva, 2013 reportou rendimentos médios de 98,4% ao longo de 144 horas de reação, na etanólise do óleo de coco em reatores PBR, conectados em série. Após esse período, foi constatado instabilidade do sistema resultando na redução da conversão para valores

inferiores a 94%, provavelmente em função das características da matéria-prima (óleo de coco) que possui elevado grau de saturação superior a 90%.

Verifica-se, portanto, que a operação do reator utilizando óleo de macaúba permitiu manter mais estável o sistema reacional, não sendo detectada nenhuma evidência de problemas de perda de desempenho do reator em função da atividade catalítica do leito por um longo período (25 dias), mantendo o rendimento médio em ésteres de 96,3%.

As características globais do desempenho do sistema proposto tornam atrativa a continuidade dos estudos em escala ampliada de processo.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema eficiente para obtenção de biodiesel a partir do óleo de macaúba pela rota enzimática em meio isento de solvente. A proposta consistiu na transesterificação do óleo de macaúba com etanol conduzida em reatores de leito fixo conectados em série (dois estágios) integrado a um sistema de remoção do glicerol, utilizando como catalisador a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte híbrido (SiO₂-PVA). Os resultados alcançados demonstraram que:

- ✓ É possível operar um sistema contínuo para produção enzimática de biodiesel empregando uma configuração de reatores PBR conectados em série, com substrato contendo óleo de macaúba e etanol na ausência de solventes, sem necessidade de incluir sistema de aquecimento adicional, como reportado para óleos ricos em ácidos láuricos, como óleo de babaçu e óleo de coco;
- ✓ A relação geométrica entre altura (l) e diâmetro (d) da coluna do sistema reacional foi um parâmetro relevante na obtenção de elevados rendimentos, sendo que o melhor desempenho foi alcançado no Reator B com relação (l/d) = 15, reduzindo os problemas de transferência de massa entre enzima e substrato. Esse fato foi comprovado pelas concentrações mais elevadas de ésteres de etila, da ordem de $56,6 \pm 3,0$ m/m%, correspondendo a rendimentos médios de $89,7 \pm 4,8\%$ e produtividade de $40,4 \pm 2,2$ mg_{éster}·g⁻¹_{meio}·h⁻¹;
- ✓ A estratégia de incorporação de um sistema para remoção do glicerol no efluente do primeiro reator PBR, contribuiu na redução do glicerol no segundo reator, amenizando problemas de inativação da lipase imobilizada.
- ✓ O funcionamento do reator em duplo estágio foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais de 16h, resultando em produtividades médias da ordem de $36,7 \pm 2,4$ mg_{éster}·g⁻¹_{meio}·h⁻¹, e correspondendo a rendimentos de transesterificação de $96,3 \pm 2,1$ %, não sendo detectada nenhuma evidência de problemas de perda de desempenho do reator em função da atividade catalítica do leito por um longo período (25 dias).

- ✓ A lipase de *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA foi estável quanto a suas características morfológicas e catalíticas apresentando tempo de meia-vida médio da ordem de 423 horas;
- ✓ Nas condições estabelecidas, a amostra de biodiesel purificada apresentou valores de viscosidade cinemática média de $5,8 \pm 0,3 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ que atende a norma ASTM 6751-02, que estabelece a viscosidade cinemática na faixa entre 1,0-6,0 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$;
- ✓ Os resultados apresentados demonstram a viabilidade técnica da síntese enzimática de biodiesel a partir do óleo de macaúba em reatores de leito fixo conectados em série, incorporando uma coluna extratora de glicerol.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- ✓ Empregando o óleo de macaúba estudos adicionais são pertinentes, visando aumentar os valores de produtividade volumétrica em ésteres e reduzir os teores dos produtos intermediários. Alternativas como novas estratégias para remoção de glicerol, taxa de empacotamento do biocatalisador no leito e sistemas multienzimáticos (associação de lipases com diferentes especificidades) devem ser investigados.

- ✓ Com relação a coluna extratora de glicerol, recomenda-se efetuar estudos com outros tipos de adsorventes comerciais ou alternativos como Amberlite, Purolite e casca de arroz.

REFERÊNCIAS

- ACROTECH. Acrotech. Disponível em: <http://www.acrotech.com.br/?p=1092>. Acesso em 14 maio. 2015.
- AL-ZUHAIR, S.; ALMENHALI, A.; HAMAD, I.; ALSHEHHI, M.; ALSUWAIDI, N.; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: design of pilot plant. **Renewable Energy**, v. 36, p. 2605-2614, 2011.
- ANP-AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Resolução ANP nº14/2012**. Disponível em: http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml. Acesso em 02 jun. 2014
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review: enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- ATABANI, A. E; SILITONGA, A. S; BADRUDDIN, I. A; MAHLIA, T. M. I; MASJUKI, H. H; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2070-2093, 2012.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392 – 416, 1996.
- BASHA, S. A; GOPAL, K. R; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1628-1634, 2009.
- BERGMANN, J.C.; TUPINAMBÁ, D.D.; COSTA, D.O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.
- BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: a case study in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p.372–396, 2008.
- BIODIESELBR. Biodiesel Brasil. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/biodiesel-dominado-soja-150611.htm>> acesso em 15 maio. 2015.
- BRESSANI, A. P. P.; GARCIA, K. C. A.; CUCATTI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J. Produção de biolubrificantes por reação de hidroesterificação catalisada por lipases vegetal e microbiana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20.,2014.
- BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 283-301, 2012.

CARVALHO, A. K. F.; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRADE, G. S. S.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485-493, 2013.

CARVALHO, A. K. F., FARIA, E. L.P., RIVALDI, J. D., ANDRADE, G. S. S., OLIVEIRA, P. C., DE CASTRO, H. F. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. **Industrial Crops and Products**. v.67, p.287 - 294, 2015.

CHAVARRIA-HERNANDEZ, J. C.; PACHECO-CATALÁN, D. E. Predicting the kinematic viscosity of FAMES and biodiesel: empirical models. **Fuel**, v. 124, p. 212–220, 2014.

CHISTI, Y. Bioreactor design. In: RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic biotechnology**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University press, 2006. p.181-200.

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

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

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

CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores homogêneos para a produção de monoésteres graxos (Biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-486, 2011.

COSTA-SILVA, W. **Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto**. 2013. 120p Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

COSTA- SILVA, W., TEIXEIRA, L. F., CARVALHO, A. K. F., MENDES, A. A., DE CASTRO, H. F. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.881 - 886, 2014.

DAMSTRUP, M. L; KIIL, S; JENSEN, A. D; SPARSO, F. V; XU, X. Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7786-7792, 2007.

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

DA RÓS, P. C. M., FREITAS, L., PEREZ, V. H., DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, p.443 - 451, 2013.

DA RÓS, P. C. M., SILVA, W. C., GRABAUSKAS, D., PEREZ, V. H., DE CASTRO, H.F. Biodiesel from babassu oil: characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p.313 - 320, 2014.

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

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

DIAS, J. M.; SANTOS, E.; SANTO, F.; CARVALHO, F.; ALVIN-FERRAZ, M. C. M.; ALMEIDA, M. F. Study of an ethylic biodiesel integrated process: Raw materials, reaction optimization and purification methods. **Fuel Processing Technology**, v. 124, p. 198–205, 2014.

DORS, G., TEIXEIRA, L. F., MENDES, A. A., FURIGO JR, A., DE CASTRO, H. F. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. **Energy and Fuels**, v.26, p.5977 - 5982, 2012.

DUARTE, I. D; ROGERIO, J. B; ANTONIASSI, R; BIZZO, H. R; JUNQUEIRA, N. T. V. Variação da composição de ácidos graxos de óleos de polpa e amêndoa de macaúba. In: 4º CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL. 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 4., 2010.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

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

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

GOG, A; ROMAN, M; TOSA, M; PAIZS, C; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012.

GULDHE, A; SINGH, B; MUTANDA, T; PERMAUL, K; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 41, p. 1447-1464, 2015.

HAMA, S.; TAMALAPUNDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMANDANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 66–71, 2011.

HOEKMAN, S. K.; BROCH, A.; ROBBINS, C.; CENICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 143-169, 2012.

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

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

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

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

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2000. Cap. 5, p. 74-98.

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

LU, J; CHEN, Y; WANG, F; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp 99-125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 56, p. 122-125. 2009.

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

MACAUBABRASILVENDAS. **Macaúba Brasil**. Disponível em <http://macaubabrasilvendas.blogspot.com.br/>. Acesso em 03 de maio de 2015.

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

MARKEVIČIUS, A. KATINAS, V. PEREDNIS, E. TAMAŠAUSKIENĖ, M. Trends and sustainability criteria of the production and use of liquid biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.14 p. 3226-3231, 2010.

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

MELO, P. G. **Caracterização e produção de biodieseis a partir da oleaginosa macaúba (*Acrocomia aculeata*)**, 2012. 80p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MOFIJUR, M.; MASJUKI, H.H.; KALAM, M.A.; ATABANI, A.E.; HAHABUDDIN, M.; PALASH, S.M.; HAZRAT, M.A. Effect of biodiesel from various feedstocks on combustion characteristics, engine durability and materials compatibility: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 28, p. 441–455, 2013.

NARWAL, S. K; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letter**, v. 35, p. 479-490, 2013.

NAVARRO-DÍAZ, H. J.; GONZALEZ, S. L.; IRIGARA, B.; VIEITEI, I.; JACHMANIÁH, I.; HENSE, H.; OLIVEIRA, J. V. Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: characterization and ester conversion by the supercritical method. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 130-137, 2013.

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

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692-700, 2008.

NOBRE, D. A. C.; TROGELLO, E.; BORGUETTI, R. A.; DAVID, A. M. S. S. Macaúba: palmeira de extração sustentável para biocombustível. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n. 2, p. 92-105, 2014.

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

PEREZ, V. H., SILVEIRA JR, E. G., CUBIDES, D. C., DAVID, G. F., JUSTO, O. R., CASTRO, M. A P. P., SHEL, M. S., DE CASTRO, H. F. Trends in Biodiesel Production: Present Status and Future Directions In: **BIOFUELS in Brazil**.1 ed.: New York: Springer International Publishing, 2014, v.1, p. 281-302.

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

POETSCH, J.; LEWANDOWSKI, D.H.I.; OBERLÄNDER, D.; HILGER, T. *Acrocomia aculeata*-a sustainable oil crop. **Rural** 21, v. 21, n. 3. p. 41–44, 2012.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, 2014 doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.011.

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

RETOMADA do mercado, 2015. Disponível em: <http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/campo-e-lavoura/noticia/2015/04/producao-de-biodiesel-deve-crescer-25-no-brasil-em-2015-4731798.html>. Acesso em 16 de maio, 2015.

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

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE D. M. A. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 615-803, 2011.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.

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

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

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

SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. Production of biodiesel: a technical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4732-4745, 2011.

SIMÕES, A. S. **Síntese enzimática de biodiesel a partir do óleo de babaçu pela rota etílica em reator de leito fixo: estabelecimento das condições operacionais em meio isento de solvente**. 2011. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SIMÕES, A. S.; RAMOS, L.; FREITAS, L. T.; SANTOS, J. C.; ZANIM, G. M., DE CASTRO, H. F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v.6 p.242-247, 2015.

SILVA, G A M, DA RÓS, P. C. M., SOUZA, L. T. A., COSTA, A. P. O., DE CASTRO, H. F. Physico-chemical, spectroscopical and thermal characterization of biodiesel obtained by enzymatic route as a tool to select the most efficient immobilized lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, p.39 - 47, 2012.

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

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

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

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: review. **Biotechnology Advances**, v.28, p. 628-634, 2010.

TESFA, B.; MISHRA, R; GU, F; POWLES, N. Prediction models for density and viscosity of biodiesel and their effects on fuel supply system in CI engines. **Renewable Energy**, v. 35, n. 12, p. 2752-2760, 2010.

TIOSSO, P. C., CARVALHO, A. K. F., DE CASTRO, H. F., MORAES, F. F. ZANIN, G. M. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.31, p.839 - 847, 2014.

TRETINI, C. P.; RASPE, D. P.; SILVA, C. D. Obtenção de ácidos graxos livres do óleo de macaúba (*Acrocomia Aculeata*) em sistema livre de solvente orgânico. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 35, n. 1, p. 15, 2014.

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

WANDECK, F. A.; JUSTO, P. G. **A macaúba, fonte energética e insumo industrial: sua significação econômica no Brasil**. Brasília: [s.n.], 1988.

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

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

XU X.; FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 48, p. 287–303, 2000.

XU, Y.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M. A two-enzymatic ethanol-based biodiesel production in a packed bed reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 407-414, 2012.

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

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

ZHANG, J; CHEN, S; YANG, R; YAN, Y. Biodiesel production from vegetable oil using heterogeneous acid and alkali catalyst. **Fuel**, v. 89, p. 2939-2944, 2010.

ZHANG, B; WENG, Y; XU, H; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 61-70, 2012.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Ficha técnica da Resina Lewatit GF 202

Descrição Geral	
Forma iônica (tal como fornecida)	Neutro
Grupo funcional	Ácido
Estrutura	Macroporosa
Aparência	Opaca
Propriedades Físicas e Químicas	
Capacidade absorção de glicerol (g.L ⁻¹)	250
pH	6 - 10
Tamanho de poros (mm)	0,65 ±0,05
Densidade (g.mL ⁻¹)	1,24
Temperatura de estocagem (°C)	- 20 a 40
Tempo de estocagem	2 anos
Condições recomendadas para utilização	
Temperatura de operação (°C)	30-50
Ativação	Metanol
Regeneração	Metanol

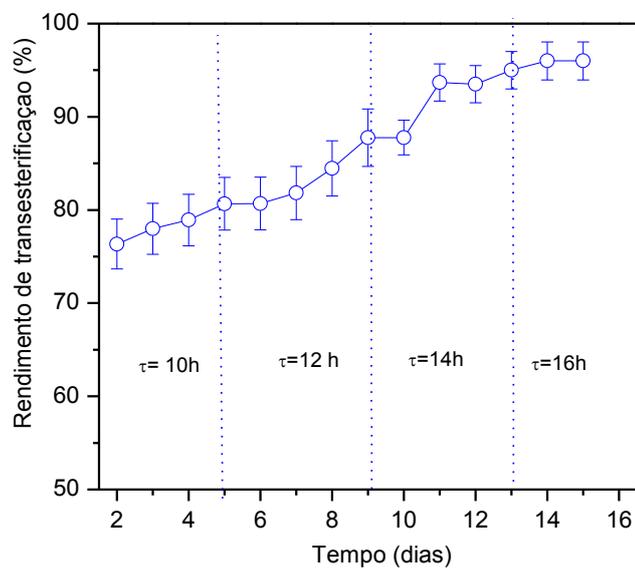
Fonte: Lanxess (2011)

APÊNDICE B – Valores de absorvância das amostras (reator B) previamente diluídas em terc-butanol.

Amostra	Concentração (g/mL)	Absorbância
1	0,00000000	0,0009
2	0,00000000	0,0041
3	0,00000000	0,0005
4	0,00000000	0,0022
5	0,00000000	0,0323
6	0,00000000	0,0162
7	0,00000000	0,0360
8	0,00001160	0,1919
9	0,00012400	0,2979
10	0,00020100	0,3440
11	0,00023400	0,2364
12	0,00015600	0,2136
13	0,00014000	0,1286
14	0,00007860	0,0412
15	0,00001530	0,0373
16	0,00001250	0,0281
17	0,00000586	0,0272
18	0,00000521	0,0200
19	0,00000000	0,0167
20	0,00000000	0,0126
21	0,00000000	0,0074
22	0,00000000	0,0066
23	0,00000000	0,0058
24	0,00000000	0,0101
25	0,00000000	0,0045
26	0,00000000	0,0022

APÊNDICE C

Influência do tempo espacial no desempenho do sistema (Dados experimentais)



Tempo espacial (h)	Rendimento de transesterificação (%)	Concentração de ésteres (mm %)	Produtividade (mgésteres/gmeio /h)
10	77,8±1,3	49,0	49,1±1,8
12	83,9±1,5	53,2	44,4± 1,5
14	91,7±1,6	58,2	41,5±2,0
16	95,6±0,7	60,7	37,9±1,2