

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

WILLIAM COSTA E SILVA

Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto

Lorena – SP

2013

WILLIAM COSTA E SILVA

Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto

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

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP

Agosto, 2013

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

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

Costa e Silva, William

Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto. / William Costa e Silva. – ed. reimpr., corr.- 2013.

133 p: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2013.

Orientadora: Heizir Ferreira de Castro.

1. Transesterificação 2. Lipase 3. Etanol 4. Processo contínuo 5. Óleos láuricos.
I. Título. II. Castro, Heizir Ferreira de, orient.

66.098 -CDU

Dedicatória

Aos meus amados pais, amigos e todos aqueles com quem compartilhei os momentos de alegria e dificuldade durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por seu amor e presença marcante em cada etapa deste trabalho.

À Profa. Heizir Ferreira de Castro, pela valiosa orientação, ensinamentos, dedicação e apoio constante durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Nice e José, por estarem sempre do meu lado me apoiando. Obrigado por todo amor, incentivo, preocupação, valores e princípios.

Aos professores Pedro Carlos de Oliveira, Jayne Carlos de Souza Barboza e Adriano A. Mendes, obrigado pelo incentivo e grande disponibilidade.

Ao grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena: Ariela, Grazielle, Daniel, Gisele, Larissa, Márcio, Natália, Matheus, Patrícia, Ana Karine, Weriton, Eduardo, Lainy, Bruno, Bruna, Ana Letícia, Emanuelle, Renata, Martim, Juan, Angela, Kevin, Tomas e Guilherme.

Aos meus amigos Messias Gomes, Agnes Mafra, Ana Karine e Weriton por terem se mantido presente nesta caminhada, por me ouvirem e incentivarem na realização deste trabalho.

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

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos para o desenvolvimento deste projeto.

E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

RESUMO

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. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo efetivo de síntese enzimática de biodiesel em reator de leito fixo, conectados em série, a partir de óleos vegetais operando em modo contínuo. Para o desenvolvimento do projeto, foram selecionados óleos vegetais de baixo impacto na cadeia alimentícia, tais como óleos de babaçu, macaúba e coco que apresentam composição predominantemente láurica (35-47%). A enzima selecionada para condução dos experimentos foi a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* imobilizada covalentemente em matriz híbrida sílica-PVA com comprovada eficiência na síntese de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas. Todos os experimentos foram efetuados na ausência de solventes a 50°C utilizando etanol como doador do grupo acila. Foram testados reatores de leito fixo (um estágio) e em série (dois estágios). A etapa inicial do trabalho consistiu em testes de desempenho do reator (um estágio) verificando a influência das propriedades dos óleos vegetais no rendimento do processo e atividade do biocatalisador. Apesar do biocatalisador ter apresentado elevado tempo de meia-vida > 373 h, nas condições testadas, independente do óleo usado a concentração máxima de ésteres esperada não foi alcançada (68,2%) limitando os rendimentos para valores máximos de 87,5%. Para contornar as restrições identificadas foi adotada uma configuração de reator de leito fixo dois estágios incorporando uma coluna recheada com resina catiônica (Lewatit GF 202) para adsorção do glicerol formado como subproduto. O desempenho do reator foi avaliado para substratos constituídos de óleos láuricos na razão molar óleo: etanol de 1:12, definindo os limites de operação em termos de vazão do substrato. Foi quantificado o desempenho do sistema para 4 diferentes vazões volumétricas correspondendo a tempos espaciais entre 7 a 17h e determinadas para cada condição a influência do tempo espacial na concentração de ésteres de etila formados, rendimentos de transesterificação e produtividade. O funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais no reator de 14h, fornecendo rendimentos de transesterificação médios de $95,9 \pm 4,1\%$ e valores médios de produtividade de $41,5 \pm 1,5$ mg.g⁻¹.h⁻¹. As amostras de biodiesel purificadas apresentaram viscosidade cinemática média de $5,5 \pm 0,3$ mm².s⁻¹, valor que atende a norma americana ASTM (D6751) e a brasileira pela resolução ANP n°14/2012. A lipase imobilizada em SiO₂-PVA foi estável quanto à suas características morfológicas e catalíticas revelando tempo médio de meia-vida ($t_{1/2}$) superior a 500 h. O emprego da configuração de reatores de leito fixo (PBR) em duplo estágio pode elevar os níveis de rendimento de transesterificação, aumentar a produtividade de biodiesel, por consequência reduzir o custo global do processo. As características globais do desempenho do sistema contínuo proposto torna atrativa a continuidade dos estudos em escala ampliada de processo.

Palavras-chave: Transesterificação. Lipase. Etanol. Processo contínuo. Óleos láuricos.

ABSTRACT

COSTA SILVA, W. **Enzymatic biodiesel production from lauric oils in a two-stage packed-bed reactors incorporating extraction column to remove glycerol formed as by-product.** 2013. 133p. (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

The aim of this study was to develop an effective enzymatic continuous process to obtain biodiesel from vegetable oils in two-stage packed bed reactors. For this, non-edible vegetable oils (babassu, macaw palm and coconut) having predominant lauric acid (35-47%) composition were assessed. The selected enzyme was the microbial lipase from *Burkholderia cepacia* covalent immobilized on hybrid matrix silica-PVA (SiO₂-PVA) which showed already satisfactory performance in the biodiesel synthesis from different lipid feedstocks. All experiments were carried out in solvent free system at 50°C using ethanol as acyl acceptor. Packed bed reactors (simple and two-stages) were tested. Preliminary work was focused on the determination of the influence of the properties of the vegetable oils on the process yield and biocatalyst activity using simple packed bed reactor. Under the conditions used, the biocatalyst was found to have high half-life time > 373 h and independent of the used oil the maximum concentration expected esters was not reached (68.2%) limiting the maximum yield to 87.5%. To overcome such constraints a two-stage packed bed reactor incorporating a column with cationic resins (Lewatit GF 202) to remove the glycerol formed as by-product was proposed. The reactor performance was evaluated for substrates consisting of lauric oils at molar ratio of oil-to-ethanol of 1:12, determining its operation limits in terms of substrate flow rate. The system performance was quantified for four different flow rates corresponded to spatial times from 7 to 17 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 of 14 h, attaining transesterification yields of $95.9 \pm 4.1\%$ and productivities of $41.5 \pm 1.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. 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 500 h. Biodiesel purified samples showed average kinematic viscosity of $5.5 \pm 0.3 \text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, value that meets the criteria established by the American National Standard ASTM (D6751) and Brazilian ANP resolution No. 14/2012. Therefore, the continuous packed-bed reactor connected in series and glycerol separation system has a great potential for achieving high level of transesterification yields, raising biodiesel productivity, consequently decreasing industrial process cost. The performance characteristics of the proposed continuous system made attractive to develop further studies aiming at scaling up the process.

Keywords: Transesterification. Lipase. Ethanol. Continuous process. Lauric oils.

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 2.1. Especificações para ésteres metílicos e etílicos de acordo com as normas Brasileira, Americana e Européia.....	26
Tabela 2.2 Principais plantas oleaginosas usadas na produção de biodiesel.	27
Tabela 2.3. Composição em ácidos graxos presentes na amêndoa e na polpa do fruto de macaúba.	31
Tabela 2.4. Comparação das vantagens e desvantagens do metanol e etanol como agentes acilantes na obtenção de biodiesel.	33
Tabela 2.5. Características físico-químicas do biodiesel metílico (EM) e etílico (EE) de diferentes matérias-primas.	34
Tabela 2.6. Quadro comparativo das principais vantagens e desvantagens na reação de transesterificação de óleos vegetais na obtenção de biodiesel.	36
Tabela 2.7. Lipases microbianas usadas em estudos sobre a produção de biodiesel na presença ou ausência de solventes orgânicos.....	40
Tabela 2.8. Principais características das enzimas livres e imobilizadas.....	42
Tabela 2.9. Processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzida em reator de leito fixo.	64
Tabela 4.1. Especificações dos itens adquiridos para a construção do reator de leito fixo.....	72
Tabela 4.2. Condições para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.	81
Tabela 5.1. Composição em ácidos graxos (% m/m) dos óleos vegetais testados.	85
Tabela 5.2. Propriedades morfológicas do suporte e da lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA.	86
Tabela 5.3. Cálculos dos parâmetros operacionais do reator de leito fixo.....	87
Tabela 5.4. Descrição dos experimentos realizados neste trabalho	87
Tabela 5.5. Análise de desempenho da etanolise de óleos vegetais láuricos (babaçu, macaúba e coco) em reator PBR simples estágio, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA	91
Tabela 5.6. Propriedades das amostras de biodiesel purificadas obtidas a partir dos óleos de babaçu e macaúba (reator descontínuo) catalisada pela lipase <i>B.cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA e usando etanol como agente acilante.	92
Tabela 5.7. Análise comparativa dos óleos vegetais láuricos na reação de transesterificação em reator PBR, duplo estágio, mediada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA, no tempo espacial de 14h.....	98

Tabela 5.8. Correlação entre as propriedades do combustível biodiesel obtido no processo de transesterificação do óleo de coco 106

Tabela 5.9. Valores de rendimento de transesterificação de amostras de biodiesel, empregando a cromatografia gasosa e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio no acompanhamento do desempenho da etanólise enzimática do óleo de coco em reator PBR em série 107

Tabela 5.10. Análise da produtividade volumétrica em ésteres etílicos na reação de transesterificação do óleo de coco e etanol em meio isento de solvente, operada em reatores PBR dispostos em série (dois estágios), empregando tempos espaciais de 14 e 7h 109

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 2.1. Transversal (a) e Longitudinal (b), cortes do coco de babaçu. Componentes a partir da parte externa para a interna: a–epicarpo; b–mesocarpo; c–endocarpo e d–amêndoa; e–fruto <i>in natura</i>	29
Figura 2.2. Partes que compõem o fruto da macaúba	30
Figura 2.3. Mecanismo da reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool, na presença de um catalisador, envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres alquílicos.	35
Figura 2.4. Processo tradicional de produção de biodiesel com etapa de pré-tratamento com catalisador ácido seguido pela catálise alcalina.(A) Reator; (B) Separação sabão/borra/glicerol (centrifuga ou decantador); (D) Purificação do produto e recuperação do álcool.	37
Figura 2.5. Adsorção interfacial da lipase.....	41
Figura 2.6. Reações catalisadas por lípases	41
Figura 2.7. Interação entre suporte e enzima.	44
Figura 2.8. Etapas envolvidas na formação do SiO ₂ -PVA (“ R” representa o grupo alquil).	46
Figura 2.9. Métodos de imobilização: Ligação química; Ligação física	47
Figura 2.10. Efeito sinérgico de duas lipases de diferentes atividades atuando isoladamente e combinadas na formação de ésteres metílicos a partir de gordura de porco. Condições: 50°C, razão molar metanol:óleo 12:1. ■ 4% Novozym 435; ▲Novozym 435(2,04%) + TM-IL(1,96%);○4%TM-IL.	51
Figura 2.11. Biorreator agitado mecanicamente	56
Figura 2.12. Biorreatores agitados pneumaticamente: (A) Coluna de bolhas; (B) <i>airlift</i> tipo <i>split</i> ; (C) <i>airlift</i> de cilindros concêntricos; (D) <i>airlift</i> de circulação externa.....	57
Figura 2.13. Modelos de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas.....	59
Figura 2.14. 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.	62
Figura 4.1. Ilustração do sistema durante o teste traçador demonstrando a distribuição do corante nos reator PBR duplo estágio e na coluna extratora de glicerol.....	75
Figura 4.2. Esquema experimental do reator de leito fixo simples estágio: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.	77

Figura 4.3. Esquema experimental dos reatores de leito fixo em duplo estágio: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Coluna extratora de glicerol; 8- Saída de produto.	78
Figura 5.1. Montagem experimental da etanólise contínua de óleos vegetais láuricos em reator de leito fixo simples estágio: (a) Vaso de alimentação contendo meio reacional óleo:etanol razão molar (1:7); (b) Agitador magnético;(c) condensador;(d) Bomba peristáltica;(e) Reator PBR empacotado com lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA;(f) Saída de produto.	88
Figura 5.2 Formação de ésteres na etanólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo operando de modo contínuo (50° C, razão molar óleo vegetal etanol 1:7, tempo de residência 7 h) empregando lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA como biocatalisador	89
Figura 5.3. Perfil da formação de ésteres na etanólise do óleo de macaúba em reator de leito fixo operando de modo contínuo (50°C, razão molar óleo vegetal: etanol 1:7, tempo de residência 7 h) empregando lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA como biocatalisador.....	89
Figura 5.4a. Concentração total em ésteres obtida na etanólise enzimática do óleo de coco em reator PBR, operando em modo contínuo (temperatura 50°C, razão molar 1:7 (óleo de coco:etanol), vazão 0,78 mL/h, tempo espacial 7 h) empregando a lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	90
Figura 5.4b. Perfil de formação dos monoésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA, em meio isento de solvente.	91
Figura 5.5. Afinidade do glicerol pelo suporte de SiO ₂ -PVA e pela lipase imobilizada em SiO ₂ -PVA (derivado imobilizado): (1) derivado imobilizado e 0 % glicerol; (2) derivado imobilizado e 2 % glicerol; (3) derivado imobilizado e 4 % glicerol; (4) derivado imobilizado e 6 % glicerol; (5) derivado imobilizado e 8 % glicerol; (6) derivado imobilizado e 10 % glicerol; (7) suporte SiO ₂ -PVA e 10 % glicerol.	93
Figura 5.6. Montagem experimental utilizada na etanólise contínua dos óleos vegetais láuricos em reator de leito fixo duplo estágio: (a) Agitador magnético; (b) Vaso de alimentação contendo o meio reacional óleo vegetal e etanol, razão molar óleo:etanol (1:12); (c) condensador; (d) Bomba peristáltica; (e) Primeiro reator PBR empacotado com lipase <i>B.cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA; (f) Coluna extratora de glicerol (Lewatit GF 202); (g) Segundo reator PBR empacotado com lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA; (h) Saída de produto (Ésteres etílicos).....	94
Figura 5.7. Perfil de formação dos monoésteres na etanólise contínua do óleo de macaúba em reator PBR em duplo estágio para diferentes vazões volumétricas.	95
Figura 5.8. Rendimento em ésteres na etanólise contínua do óleo de macaúba em reator PBR em duplo estágio, empregando diferentes vazões volumétricas.	95
Figura 5.9. Perfil de formação dos monoésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR em duplo estágio para diferentes vazões volumétricas.....	97

Figura 5.10. Rendimento em ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR duplo estágio empregando diferentes vazões volumétricas.	97
Figura 5.11. Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de coco e etanol).....	99
Figura 5.12. Determinação da função concentração do corante <i>versus</i> tempo, $C(t)$ <i>versus</i> dt..	100
Figura 5.13. Cálculo do tempo médio de residência do biorreator	101
Figura 5.14. Perfil do rendimento em ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR em série, empregando diferentes tempos espaciais	103
Figura 5.15. Perfil da produtividade volumétrica em ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR em estágio duplo empregando diferentes tempos espaciais.....	103
Figura 5.16. Perfil de formação dos ésteres no efluente do primeiro e do segundo reator PBR, na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR duplo estágio, mediada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em suporte híbrido de SiO ₂ -PVA, em meio isento de solvente, empregando tempo espacial de 14h.....	104
Figura 5.17. Relação entre viscosidade cinemática e rendimento de transesterificação do óleo de coco, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo conectados em série, na presença de uma coluna extratora de glicerol, em meio isento de solvente	105
Figura 5.18a. Ressonância magnética nuclear de prótons da amostra referente ao tempo de 48 h no processo contínuo de síntese enzimática de biodiesel de óleo de coco.....	106
Figura 5.18b. Ressonância magnética nuclear de prótons da amostra referente ao tempo de 360h no processo contínuo de síntese enzimática de biodiesel de óleo de coco.....	107

ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AGL	cidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM D6751	Especificações físico-químicas de qualidade para o biodiesel (Estados Unidos)
B8, B100	Mistura de biodiesel no diesel
BSTR	Reator Batelada de Tanque Agitado
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CSTR	Reator de Tanque Agitado Contínuo
CG	Cromatografia Gasosa
DTR	Distribuição do Tempo de Residência
EE	steres Etílicos
EM	steres Metlicos
EN 14214	Especificações físico-químicas de qualidade para o biodiesel (Europa)
EtOH	Etanol
K_d	Constante de inativação térmica
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LRM	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
MeOH	Metanol
NBR	Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio
PBR	Reator de Leito Fixo
PEG	Polietilenoglicol
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PVA	lcool Polivinílico
SiO₂-PVA	Suporte Híbrido Polissiloxano – lcool polivinílico
TAG	Triacilglicerdeos
STR	Reator de tanque agitado
t_(1/2)	Tempo de meia-vida
TEOS	Tetraetilortosilicato
t_m	Tempo médio de residência (h)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. Biodiesel e o cenário energético	25
2.2. Matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel	26
2.2.1. Óleo de babaçu.....	28
2.2.2. Óleo de macaúba.....	29
2.2.3. Óleo de coco	31
2.3. Agente acilante.....	32
2.4. Método de obtenção do biodiesel.....	34
2.5. Catálise química de óleos vegetais.....	36
2.6. Catálise enzimática	38
2.6.1. Lipases	39
2.6.2. Reações catalisadas por lipase	41
2.7. Enzimas imobilizadas	41
2.8. Suportes para a imobilização de enzimas.....	43
2.8.1. Métodos de imobilização de enzimas	46
2.8.1.1. Adsorção	47
2.8.1.2. Ligação covalente	47
2.9. Vantagens e limitações da imobilização de enzimas	49
2.10. Produção enzimática de biodiesel	50
2.10.1. Teor de água.....	52
2.10.2. Efeito inibidor do agente acilante	52
2.10.3. Solventes orgânicos	53
2.10.4. Efeito do glicerol.....	54
2.11. Biorreatores.....	54
2.12. Tipos de biorreatores.....	55
2.12.1. Biorreatores de tanque agitado (STB).....	56

2.12.2. Biorreatores agitados pneumaticamente	57
2.12.3. Biorreatores membrana	58
2.12.4. Biorreatores com células/enzimas imobilizadas	59
2.13. Biorreatores tanque agitado	60
2.13.1. Biorreator batelada tanque agitado (BSTR)	60
2.13.2. Biorreator contínuo tanque agitado (CSTR)	61
2.14. Biorreator em regime contínuo	61
2.14.1. Biorreator de leito fixo (PBR)	61
2.14.2. Biorreator de leito fluidizado	62
2.15. Processos de obtenção de biodiesel em regime contínuo	63
3. OBJETIVOS	69
4. MATERIAIS E MÉTODOS	71
4.1. Materiais	71
4.1.1. Fonte de lipase	71
4.1.2. Materiais de partida	71
4.1.3. Outros reagentes	71
4.2. Equipamentos	71
4.2.1. Reator de leito fixo	71
4.2.2. Principais equipamentos	72
4.3. Metodologia experimental	72
4.3.1. Síntese e ativação do suporte híbrido	72
4.3.2. Imobilização da lipase <i>B. cepacia</i> em SiO ₂ -PVA ativada	73
4.3.3. Teste com a resina de troca iônica (Lewatit GF 202)	73
4.4. Testes operacionais	74
4.4.1. Calibração da bomba peristáltica	74
4.4.2. Função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR)	74
4.5. Montagem experimental	76
4.5.1. Reator de leito fixo (um estágio)	76

4.5.2. Reator de leito fixo conectados em série dois estágios	77
4.6. Síntese de biodiesel em reator de leito fixo (PBR)	78
4.7 Ativação e recuperação da resina Lewatit GF 202.....	79
4.8. Purificação das amostras de biodiesel.....	79
4.9. Métodos de análise.....	79
4.9.1. Densidade do suporte híbrido de SiO ₂ -PVA.....	79
4.9.2. Teor de umidade	80
4.9.3. Determinação da atividade hidrolítica	80
4.9.4. Dosagem dos ésteres de etila	80
4.9.5. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	81
4.9.6. Determinação da viscosidade absoluta.....	81
4.9.7. Densidade do biodiesel	81
4.10. Cálculos.....	82
4.10.1. Rendimentos da transesterificação.....	82
4.10.2. Tempo espacial (τ).....	82
4.10.3. Produtividade	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.1. Composição química dos óleos vegetais testados.....	85
5.2. Propriedades da lipase de <i>B.cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	86
5.3. Ajuste da vazão da bomba peristáltica e cálculo do tempo espacial	86
5.4. Operação do reator de leito fixo.....	87
5.5. Etanólise de óleos láuricos catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA em reator de leito fixo (um estágio).....	88
5.6. Efeito do glicerol na etanólise contínua no reator PBR	92
5.7. Etanólise dos óleos de macaúba e coco em reator PBR em duplo estágio catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	94
5.8. Distribuição de tempo de residência (DTR) no reator de duplo estágio utilizando óleo de coco como matéria-prima	98

5.9. Testes de etanólise do óleo de coco em PBR duplo estágio empregando a estratégia de separação do glicerol.....	102
5.10. Estudo reológico da amostra de biodiesel obtida à partir do óleo de coco	105
5.11. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	106
5.12. Avaliação global do desempenho do reator de leito fixo duplo estágio.....	108
6. CONCLUSÕES	111
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	112
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE.....	129

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel obtido a partir de fontes renováveis constitui um dos combustíveis alternativos mais interessantes, que está sob intensa pesquisa e desenvolvimento em razão da sua baixa emissão de poluentes e excelentes características químicas, como: combustível não tóxico, biodegradável, e isento de enxofre, que pode ser obtido a partir de plantas oleaginosas ou gordura animal (BASHA et al., 2009; YAAKOB et al., 2013). Além disso, o biodiesel pode ser utilizado em qualquer motor a diesel convencional, ao contrário dos combustíveis de origem fóssil. Os combustíveis fósseis emitem grandes quantidades de poluentes ao meio ambiente, como: óxidos de carbono, chumbo, nitrogênio e hidrocarbonetos (DERMIBAS, 2009; YAAKOB et al., 2013).

Neste contexto, o biodiesel vem sendo explorado no mundo inteiro por apresentar propriedades semelhantes ou melhores quando comparado às do petrodiesel, podendo ainda ser utilizado puro ou misturado com diesel fóssil (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2012). A primeira tentativa em produzir biodiesel no Brasil foi conduzida em 1940, quando ambos os ésteres metílicos e etílicos do óleo da semente de algodão demonstraram ser um biocombustível alternativo que poderia substituir o petrodiesel (POUSA; SANTOS; SUARES, 2007).

Desta forma, a pesquisa e o desenvolvimento do biodiesel brasileiro têm progredido significativamente, de tal forma que o governo lançou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em 13 de janeiro de 2005 Lei federal N° 11097 (POUSA; SANTOS; SUARES, 2007). Esta lei estabelece a obrigatoriedade da introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, sob a forma de uma mistura de biodiesel no diesel fóssil em proporções crescentes com perspectivas de alcançar a comercialização do diesel contendo 8% de biodiesel (B8) a partir de 2014 (MENDES; COSTA, 2009).

Desta forma, constata-se um incremento na produção anual de praticamente de zero no final dos anos 1990 para aproximadamente 2.717.483 m³/ano em dezembro de 2012 (ANP, 2013). Em virtude disso, a indústria nacional de biodiesel precisou melhorar o sistema de produção, de forma a torná-lo mais eficiente e ambientalmente favorável (QUINTELLA et al., 2009). Na busca por processos mais eficientes, a escolha da matéria-prima graxa para a produção de biodiesel é muito importante. Para tanto, vários fatores tais como disponibilidade, custo, propriedades de armazenamento e o desempenho como

combustível irá determinar o potencial de uma determinada matéria-prima em particular para ser adotada na produção comercial de biodiesel (HAAS; FOGLIA, 2006). O Brasil é um grande produtor de soja e 82% da produção nacional de biodiesel provêm desta oleaginosa. Todavia a soja é uma das matérias-primas mais onerosas do mercado e além de seu elevado custo, apresenta menor rendimento em termos óleo por hectare. Dessa forma, o governo vem investindo intensamente na produção de biodiesel a partir de culturas ligadas à agricultura familiar – como mamona, pinhão-manso, dendê, entre outras (BIODIESELBR, 2012).

Industrialmente, o biodiesel é produzido pela transesterificação de óleos vegetais e gordura animal com alcoóis de cadeia curta usualmente metanol ou etanol por catálise homogênea (alcalina ou ácida) (HAYYAN et al., 2013). A catálise homogênea alcalina é utilizada em maior proporção, devido ao seu baixo custo e altas taxas de conversão, em temperaturas relativamente baixas. Entretanto, existem inconvenientes, tais como dificuldade de recuperação do catalisador e sua natureza corrosiva que é muitas vezes prejudicial à vida útil do reator (LEUNG; GUO, 2006).

A substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma rota alternativa promissora, uma vez que atende a demanda por processos menos poluentes e mais seletivos, em função das vantagens que os catalisadores heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos, incluindo fácil separação, poucos problemas com rejeitos, fácil manuseio e possibilidade de reuso (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 de processo, reduzir impacto ambiental e custo do processo (ZHANG et al., 2010).

Dentro da catálise heterogênea, a catálise enzimática usando lipases surge como uma opção alternativa no processo de produção de biodiesel ecologicamente correto. Para que a catálise enzimática possa competir com a rota química, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. As lipases, devido à sua natureza proteica, podem sofrer ao longo da reação um processo de inativação, como perda progressiva da atividade catalítica. Por meio da imobilização em suportes sólidos, pode ocorrer um aumento na estabilidade do catalisador, prolongando sua vida útil. A imobilização facilita a recuperação da enzima do meio reacional, possibilitando sua posterior reutilização (SAUMANOU et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

Considerando o crescimento da utilização do biodiesel em âmbito mundial, não somente pelo aspecto ambiental, mas, principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável, a investigação do uso de lipases imobilizadas para produção de biodiesel é de relevante importância como atestam os trabalhos desenvolvidos em escala de bancada (DA RÓS et al., 2012; DA RÓS et al., 2013; FUKUDA et al., 2001; JEGANNATHAN et al., 2008; SILVA et al., 2012; STAMENKOVIC, VELICKOVIC, VELJKOVIC, 2011).

A grande maioria desses trabalhos tem sido direcionada para a seleção de enzimas adequadas e os testes de desempenho catalítico efetuados em reatores operando em regime batelada em pequena escala de produção, entretanto, em termos práticos, os processos que envolvem enzimas imobilizadas são preferivelmente operados de forma contínua (HALIM et al., 2009; DORS et al., 2012; WANG et al., 2011). Este sistema, quando comparado com o processo em batelada, apresenta vantagens técnicas, por possibilitar o controle automático, ser mais fácil de operar e favorecer o controle de qualidade do produto.

Várias configurações de reatores têm sido usadas em estudos com lipases imobilizadas, entre as quais o leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado, 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 uma maior área superficial para a reação, por unidade de volume, do que um reator de membrana e não têm a desvantagem das elevadas tensões de corte devido à agitação mecânica (HALIM et al., 2009; LEE et al., 2010; WANG et al., 2011).

Com base na potencialidade dessa configuração de biorreator para conduzir reações catalisadas por lipases (DORS et al., 2012; FREITAS et al., 2010; SIMÕES, 2011), foi selecionada a configuração de dois reatores de leito fixo conectados em série, com a incorporação de coluna extratora de glicerol entre os reatores, para o desenvolvimento deste projeto. A presente proposta inclui ainda o uso de óleos vegetais láuricos como os óleos de babaçu, macaúba e coco, devido ao baixo impacto dessas matérias-primas no setor alimentício. Como doador do grupo acila foi utilizado etanol em função das vantagens oferecidas em relação ao metanol (STAMENKOVIC, VELICKOVIC, VELJKOVIC, 2011). Desta forma, o presente projeto teve como enfoque desenvolver uma tecnologia viável de produção de biodiesel por etanólise de óleos vegetais láuricos mediada por lipase imobilizada em reator de leito fixo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biodiesel e o cenário energético

Em razão da constante alta dos preços do barril de petróleo, aliada a questões ambientais, e o elevado consumo de combustíveis fósseis, e por consequência, a diminuição das reservas de petróleo, muitos países estão procurando diminuir a dependência sobre os combustíveis fósseis, pela produção de biocombustíveis empregando óleos vegetais, tais como os óleos de coco, palma, canola, soja, macaúba e o pinhão-manso, como matéria-prima (BRUNSCHWING; MOUSSAVOU; BLIN, 2012; CAO et al., 2009; HOSSAIN; DAVIES, 2010; NOUREDDINI; ZHU, 1997; TUPUFIA et al., 2013).

Óleos vegetais e gordura animal foram investigados como combustível para motores diesel bem antes da crise energética da década de 1970, e no início de 1980 ocorreu o interesse de utilizá-los como matérias-primas na produção de combustíveis alternativos. É também conhecido que Rudolf Diesel (1858-1913), o inventor do motor que leva seu nome, tinha algum interesse por esses combustíveis. Os óleos vegetais foram usados como combustível de emergência e outros propósitos durante a Segunda Guerra Mundial (KNOTHE, 2006).

O grande problema é a viscosidade cinemática que é muito maior do que o diesel derivado do petróleo. Sendo que, a alta viscosidade leva a fraca atomização do combustível no motor, combustão incompleta com elevada emissão de poluentes, deposição de carbono, e entupimento dos bicos injetores do motor. Para solucionar estes problemas, a reação de transesterificação vem sendo investigada na produção de biodiesel (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010).

A transesterificação é uma reação na qual óleos vegetais ou gordura animal reagem com alcoóis de cadeia curta como metanol ou etanol para produzir biodiesel e glicerol (QUINTELLA et al., 2009; KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010). O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais precisa passar por um intenso controle de qualidade, antes da sua comercialização. Portanto, é importante o monitoramento das propriedades físico-químicas do biodiesel por meio de normas estabelecidas, tais como na Europa a EN 14214 e nos Estados Unidos a ASTM D6751 que limitam a quantidade de contaminantes permitida no biodiesel (KNOTHE, 2006).

No Brasil, o mesmo é realizado na Resolução N°14/2012 da ANP, a especificação brasileira é similar à 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, conforme mostrado na Tabela 2.1. 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.

Tabela 2.1. Especificações para ésteres metílicos e etílicos de acordo com as normas Brasileira, Americana e Européia.

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

ANP- Norma Brasileira; ASTM-Norma americana; EN ISO- Norma europeia

Fonte: ANP (2012); Brunschwing; Moussavou; Blin (2012).

2.2. Matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel

As matérias-primas graxas típicas para a produção de biodiesel são os óleos vegetais refinados. Neste grupo, a escolha da matéria-prima varia de localização e disponibilidade, a matéria graxa mais abundante é geralmente a mais comumente utilizada (HASS; FOGLIA, 2006).

A escolha da matéria-prima mais apropriada para a produção de biodiesel pode ser um dos principais problemas no setor. O Brasil surge como promissor produtor de biodiesel em virtude da sua disponibilidade em diferentes plantas oleaginosas como:

pinhão-manso, soja, girassol, amendoim, macaúba, babaçu, canola e buriti (LOPES; NETO, 2011). No Brasil, 82% 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, conforme mostra a Tabela 2.2 (BIODIESELBR, 2012; ANP, 2012).

É importante ressaltar que o custo associado à matéria-prima corresponde a 80% do custo total de biodiesel, além do mais, a produtividade obtida com o uso da soja não é muito favorável, produzindo cerca de 700L biodiesel/ha, cerca de um terço do total produzido por outros tipos de matérias-primas lipídicas.

Tabela 2.2 Principais plantas oleaginosas usadas na produção de biodiesel.

Plantas do biodiesel	Soja	Mamona	Girassol	Babaçu	Dendê
(%) de óleo	18	45-50	38-48	66	22
Rendimento kg de óleo/hectare	200-400	500-900	500-1900	100-300	3000-6000

Fonte: BIODIESELBR (2012); ANP (2012).

Além da preocupação econômica, existem outros pontos a serem considerados no uso da soja na produção nacional de biodiesel, tais como o impacto sobre o preço dos alimentos. O Brasil ainda preserva grandes áreas disponíveis para fins agrícolas, produzindo 85 milhões de toneladas de soja na safra 2011/2012. Devido à importância da soja como fonte de alimentação humana, alguns pesquisadores consideram que o uso da soja para produzir biodiesel constitui um erro semelhante à produção de etanol à base de milho (DA COSTA et al., 2010). Neste contexto, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), visando a inclusão social de famílias rurais, adotou como prioridade o desenvolvimento de uma base tecnológica para produzir sementes oleaginosas com elevada produtividade, portanto, dando todo suporte à produção de biodiesel, não só do ponto de vista econômico, mas também do ponto de vista social, por apoio ao agronegócio familiar (ANP, 2012).

Apesar da ampla diversidade de matérias-primas disponíveis para a produção de biodiesel, é importante ressaltar que suas propriedades químicas e físicas estão diretamente associadas à qualidade do produto final (SARAF; THOMAS, 2007). Visto que, os óleos

vegetais e gorduras animais são constituídos de triglicerídeos, sendo estes triésteres resultantes da ligação entre glicerol e ácidos graxos. Logo, a qualidade dos ésteres alquílicos obtidos pela reação de transesterificação depende das características estruturais dos ácidos graxos da matéria-prima precursora (ÁVILA; SODRÉ, 2012).

Em geral, ésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de matéria-prima oleaginosa, mas nem toda matéria-prima pode ser utilizada para a produção de biodiesel que atenda às especificações internacionais. Isso porque algumas delas apresentam propriedades não ideais que são transferidas para o biocombustível e que o torna inadequado para uso direto (B100) ou misturado em variáveis proporções ao diesel em motores do ciclo Diesel. Uma propriedade indesejada é a baixa estabilidade à oxidação, que torna o armazenamento do biodiesel mais complexo e compromete o seu uso direto em motores (KNOTHE, 2006).

A produção de biodiesel a partir do óleo de babaçu vem sendo intensivamente estudada (FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010; SIMÕES, 2011). Outras culturas que vem atraindo grande atenção de pesquisadores é a macaúba e coco, oleaginosas nativas das regiões Nordeste e do cerrado Brasileiro. Alves; Medeiros; Suarez (2010) estudaram a metanólise do óleo de macaúba e reportaram rendimentos próximos a 98% em biodiesel metílico. Ribeiro et al. (2012) investigaram a transesterificação do óleo de coco na síntese de biodiesel, empregando a lipase comercial Novozym 435 como catalisador e etanol. Os melhores rendimentos foram da ordem de 80,5% em ésteres etílicos. Em função dos resultados promissores obtidos, os óleos de babaçu, macaúba e coco foram selecionados para o desenvolvimento deste projeto.

2.2.1. Óleo de babaçu

Babaçu é uma palmeira (até 20 m de altura) encontrada naturalmente no Brasil e na Colômbia. Os principais produtos são frutos— pequenos cocos que ficam pendurados em cachos, quatro cachos por árvore e por estação, com 15 a 25 frutos de coco cada. O nome babaçu refere-se a três espécies diferentes da família Palma: *Scheelea*, *Attalea* e *Orbigneya* onde o nome de babaçu geralmente se refere à espécie *Orbignya phalerata*. Os frutos são elipsóides pesando 90–280g. Externamente, ele apresenta fina casca (o epicarpo), que envolve uma camada secundária (o mesocarpo), e como um núcleo do coco há o endocarpo com 3–4 amêndoas, a partir do qual é extraído o óleo (Figura 2.1).

O nordeste brasileiro possui uma área de cerca de 12 milhões de hectares plantados com babaçu, sendo que a maior parte está concentrada no estado do Maranhão. Mensalmente são extraídos em torno de 140.000 t de amêndoas destes babaçuais (SOLER; VITALI; MUTO, 2007). Outras regiões brasileiras onde são encontradas são Norte e a Central. Na região Sudeste apenas o estado de Minas Gerais possui uma área expressiva de babaçu plantada (LOPEZ; NETO, 2011). Contudo, o potencial do babaçu continua inexplorado, sendo possível o aproveitamento econômico para produção de carvão, óleo combustível, gás, e lubrificante. No que tange à produção de óleo combustível, o óleo de babaçu apresenta características excelentes para produção de biodiesel, devido sua composição ser predominantemente láurica.

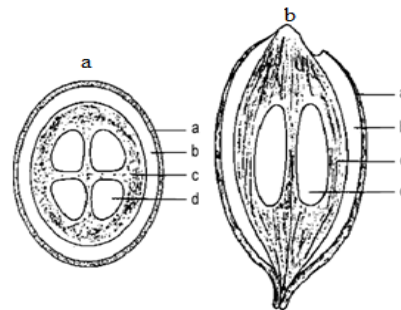


Figura 2.1. Transversal (a) e Longitudinal (b), cortes do coco de babaçu. Componentes a partir da parte externa para a interna: a–epicarpo; b–mesocarpo; c–endocarpo e d–amêndoa; e–fruto *in natura*.

Fonte: Teixeira (2008); Lopes; Neto (2011)

Esta característica facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais efetivamente com o agente acilante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas (LIMA et al., 2007).

2.2.2. Óleo de macaúba

Macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira espinhosa, com mais de 16m de altura, é uma oleaginosa nativa também do Cerrado brasileiro, em particular no estado de Minas de Gerais. O fruto de macaúba apresenta forma esférica, 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 Figura 2.2 (MACAUBABRASILVENDAS, 2013).



Figura 2.2. Partes que compõem o fruto da macaúba

Fonte: Macaubabrasilvendas (2013)

Esta cultura apresenta grande potencial para produção de óleo com vasta aplicação nos setores industriais e energéticos, com vantagens sobre outras oleaginosas, principalmente, com relação à sua maior rentabilidade agrícolas e produção total de óleo. Dessa forma, a macaúba ganha impulso na busca por matérias-primas alternativas em face da crise energética (DA MOTTA et al., 2002). A macaúba apresenta potencial para produzir até 30 t fruto ha⁻¹. ano⁻¹, com conteúdo de óleo entre 23 a 34% em relação à massa seca do fruto.

Tanto a polpa quanto a amêndoa tem elevada proporção de óleo, contudo, a composição química em ácidos graxos é diferente. A polpa apresenta alto conteúdo de ácidos graxos livres, por isso, ele é normalmente empregado na produção de sabão (FORTES; BAUGH, 1999). A Tabela 2.3 mostra a distribuição dos ácidos graxos presentes no fruto da macaúba. No óleo da amêndoa, o ácido graxo predominante é o láurico (~37,78%), seguido do oleico (~28,50%).

A composição é similar ao de outras amêndoas, tais como óleo de babaçu e coco. Como ocorre para outros óleos láuricos observa-se a presença significativa de ácidos graxos de média massa molecular como C14:0, C10:0 e C8:0. Análise da composição química indica que a alta estabilidade oxidativa do óleo da amêndoa é favorável para produção de biodiesel.

Quanto aos outros usos do óleo da amêndoa, é de grande interesse tanto na indústria cosmética, quanto na oleoquímica e na de alimentos, em função do amplo uso de gorduras láuricas na produção de massas e sorvetes (DUARTE et al., 2010).

Tabela 2.3. Composição em ácidos graxos presentes na amêndoa e na polpa do fruto de macaúba.

Ácido graxo (AG)	% (m.m ⁻¹)	
	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: Duarte et al.(2010)

Nesse contexto, o óleo da amêndoa de macaúba vem despertando interesse na comunidade acadêmica, no emprego desta como matéria-prima na produção de biodiesel, visto que apresenta um perfil semelhante ao óleo de babaçu de consolidada vantagens na produção de biodiesel. Contudo, em função do seu maior grau de ácidos graxos insaturados na cadeia triglicéridica, o óleo da amêndoa apresenta menor ponto de fusão, consequentemente cristaliza-se em temperatura mais baixa quando comparado com o óleo de babaçu.

2.2.3. Óleo de coco

O coqueiro (*Cocus nucifera* L.) oferece as mais diversas possibilidades de utilização, desde a agroindústria quanto a química fina. O conteúdo do óleo na polpa é superior a 60 % , o que equivale a uma produção de 500 a 3000 kg de óleo/ha. Quanto aos ácidos graxos, ocorre predominância do ácido láurico, muito usado na indústria de cosméticos e sabões (ARAÚJO; CARVALHO; SOUSA, 2009). Em relação à sua composição em ácidos graxos, o óleo de coco apresenta características semelhantes ao babaçu, predominantemente láurica (~ 48%).

De acordo com LIMA et al. (2007) óleos com predominância láurica podem fornecer um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas, em razão dos

ésteres láuricos serem compostos de cadeias curtas que interagem mais efetivamente com o agente acilante e com o catalisador.

2.3. Agente acilante

A reação de transesterificação pode ocorrer na presença de moléculas reativas chamadas acil-aceptores (agente acilante), tais como alcoóis e acetatos. Os agentes acilantes são em sua maioria: i) alcoóis primários ou secundários de cadeia curta contendo entre 1 a 8 átomos de carbono, ou ii) acetatos, tais como acetato de metila (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012). Os alcoóis que conferem os melhores resultados de conversão de biodiesel são os alcoóis não ramificados, com baixo impedimento estérico, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico, por apresentar intermediários com menor energia de ativação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010; MA; HANNA, 1999).

O metanol e etanol são os agentes acilantes empregados mais frequentemente, sendo que o etanol é o álcool preferido no processo de transesterificação em comparação com o metanol, por ser derivado de produtos agrícolas, de fontes renováveis e ecologicamente mais favorável ao meio ambiente. Entretanto, em escala industrial, metanol é mais frequentemente empregado, devido seu menor custo e vantagens físico-químicas (maior polaridade e reatividade) (DEMIRBAS, 2005).

A Tabela 2.4 permite uma melhor avaliação das vantagens e desvantagens da utilização do metanol ou etanol como agentes acilantes na obtenção de biodiesel. Verifica-se que a opção de utilização de etanol no Brasil é bastante atrativa devido à grande vocação agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país (COSTA; OLIVEIRA, 2006).

Comparando-se com o biodiesel metílico, o biodiesel etílico têm maior estabilidade oxidativa, menor índice de iodo e melhores propriedades de lubrificidade. Além do mais, biodiesel obtido via etanol apresenta menor ponto de névoa e fluidez, que melhora a combustão no motor em baixas temperaturas e, os átomos extras de carbono trazidos pela molécula de etanol aumentam ligeiramente o calor de combustão e o número de cetano (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011).

Tabela 2.4. Comparação das vantagens e desvantagens do metanol e etanol como agentes acilantes na obtenção de biodiesel.

	Vantagem	Desvantagem
Metanol	<ul style="list-style-type: none"> • O consumo de metanol no processo de transesterificação é cerca de 45% menor que o do etanol anidro. • O preço do metanol é quase a metade do preço do etanol. • É mais reativo. • Para uma mesma taxa de conversão, o tempo de reação utilizando o metanol é menos da metade do tempo de quando se emprega o etanol. • Os equipamentos da planta operando pela rota metílica têm cerca de um quarto do volume dos equipamentos em comparação com a rota etílica, para uma mesma produtividade e qualidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Apesar de poder ser produzido a partir da biomassa, é tradicionalmente um produto de origem fóssil. • É bastante tóxico • Maior risco de incêndios. Chama invisível. • Transporte é controlado pela Polícia Federal, por se tratar de matéria-prima para extração de drogas. • A capacidade atual de produção brasileira de metanol só garantiria o estágio inicial de programa de âmbito nacional.
Etanol	<ul style="list-style-type: none"> • Produção alcooleira no Brasil consolidada. • Produz biodiesel com maior índice de cetano e maior lubrificidade, se comparado ao biodiesel metílico. • Produz um combustível 100% renovável • Gera ainda mais economia de divisas. • Não é tóxico como o metanol. • Menor risco de incêndios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Os ésteres etílicos possuem maior afinidade com a glicerina, dificultando a separação. • Possui azeotropia quando misturado em água, requerendo gastos energéticos elevados na etapa de desidratação. • Dependendo do preço da matéria-prima, o custo de produção de biodiesel etílico pode ser até 100% maior que o metílico.

Analisando a Tabela 2.5, fica claro que a qualidade do biodiesel obtido via etanol é similar ao biodiesel metílico. Em virtude das razões mencionadas justifica-se o emprego do etanol como agente acilante no processo de obtenção de biodiesel, em função do menor impacto ambiental.

Tabela 2.5. Características físico-químicas do biodiesel metílico (EM) e etílico (EE) de diferentes matérias-primas.

Fonte de TAG	Éster alquílico	Ponto de névoa (°C)	Ponto de entupimento do filtro (°C)	Número de cetano
Óleo de soja	EM	2	-3	-
	EE	0	-5	-
Óleo de mamona	EM	-	0	43,90
	EE	-	0	43,80
Óleo de girassol	EM	-	1	67,60
	EE	-	-1	69,00
Norma EN 14214	-	-	-6 à +5	≥ 51

Fonte: Stamenkovic; Velickovic; Veljkovic (2011).

2.4. Método de obtenção do biodiesel

O uso direto de óleos vegetais em motores a diesel causa acúmulo de gomas nas partes internas do motor, devido à presença de fosfolipídios presentes nos óleos vegetais. A fim de evitar incrustações nos motores, um método alternativo consiste na modificação química dos óleos vegetais pela transesterificação na obtenção de biodiesel (BRUNSCHWING; MOUSSAVOU; BLIN, 2012). Transesterificação, também denominada de alcoólise, é o método mais comumente utilizado no processo de obtenção de biodiesel (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

A transesterificação é uma reação química, que consiste em uma série de reações consecutivas e reversíveis, como ilustra a Figura 2.3. O primeiro estágio é a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos, seguido da conversão dos diglicerídeos em monoglicerídeos, e os monoglicerídeos em glicerol, gerando uma molécula de metil ou etil éster a partir de cada glicerídeo em cada etapa (SHAHID; JAMAL, 2011).

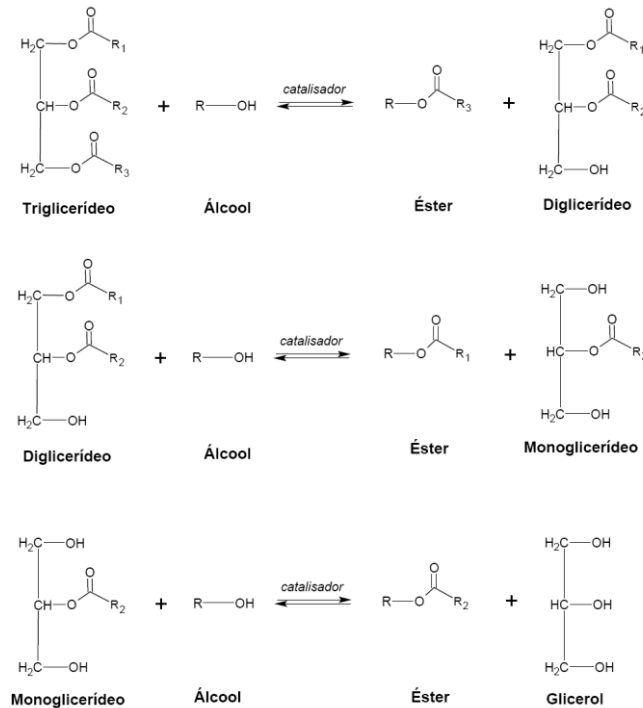


Figura 2.3. Mecanismo da reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool, na presença de um catalisador, envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres alquílicos.

Fonte: Fukuda; Kondo; Noda (2001)

Conseqüentemente, para completar a reação de transesterificação, estequiometricamente, a razão molar álcool: óleo é 3:1. Na prática, para alcançar rendimentos máximos de ésteres, a razão molar precisa ser superior à razão estequiométrica. Em virtude da reversibilidade da reação, excesso de álcool é utilizado para favorecer o deslocamento do equilíbrio para formação do produto (biodiesel) (ENWEREMADU; MBARAWA, 2009). As vantagens e desvantagens da reação de transesterificação na obtenção do combustível biodiesel são apresentadas na Tabela 2.6.

Uma vez que a reação é finalizada, geralmente, duas fases coexistem, uma fase rica em ésteres e outra fase rica em glicerol, sendo separadas simplesmente pela gravidade ou por outros métodos, tais como centrifugação ou filtração por membranas. No caso da etanólise (transesterificação via etanol), uma fase única pseudo-homogênea é comumente observada. Dessa forma, o meio reacional é purificado para eliminar contaminantes como o glicerol, o álcool residual, o catalisador, sabões e glicerídeos (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012). A reação de transesterificação é realizada, geralmente, em presença de um catalisador para acelerar a velocidade reacional. A rota catalítica estudada

e apresentada na literatura na produção dos ésteres alquílicos é classificada em catálise química e bioquímica (LAM; LEE; MOHAMED, 2010).

Tabela 2.6. Quadro comparativo das principais vantagens e desvantagens na reação de transesterificação de óleos vegetais na obtenção de biodiesel.

Transesterificação	
Vantagens	Desvantagens
Propriedades do combustível próximas ao diesel	Baixo teor de AGL e água (catálise alcalina)
Elevada eficiência de conversão	Geração de poluentes (etapas de neutralização e lavagem)
Adequado para escala industrial e baixo custo	Formação de subprodutos e dificuldade de separação dos produtos
Reação rápida	Elevado consumo de energia

Fonte: Atanabi et al. (2012).

2.5. Catálise química de óleos vegetais

A catálise alcalina é rápida, mas é influenciada pelo conteúdo de água e ácidos graxos livres presentes no óleo vegetal ou gordura animal. Os ácidos graxos livres podem reagir com o catalisador básico, formando sabão. O sabão não somente reduz o rendimento de ésteres alquílicos, como também aumenta a dificuldade na separação do biodiesel e glicerol, assim como na água de lavagem devido à formação de emulsão (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010). Os catalisadores alcalinos mais frequentes utilizados são hidróxidos de sódio e de potássio, e alcóxidos. Os alcóxidos são mais caros e difíceis de manuseá-los, contudo, a sua utilização reduz a quantidade de água liberada na reação, por consequência, ocorre menor formação de sabão, o que aumenta a eficiência da reação (VICENTE; MARTINEZ; ARACIL, 2004; VALLE et al., 2009).

Os catalisadores ácidos são caracterizados pela baixa velocidade de reação e elevadas quantidades de álcool. Normalmente, a catálise ácida é utilizada quando a matéria-prima lipídica apresenta alto teor de ácidos graxos livres e água. O processo de catálise ácida requer grande excesso de álcool, portanto, o reator onde ocorre a reação de transesterificação e a coluna de destilação alcalina são maiores do que no processo de catálise alcalina, para as mesmas condições de operação. Alta eficiência de conversão na transesterificação via catálise ácida pode ser alcançada, aumentando a razão molar álcool: óleo, temperatura reacional, concentração de catalisador e tempo de reação

(KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010). Entretanto, os ácidos são altamente corrosivos e requerem equipamentos mais sofisticados (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

Desta forma, as plantas tradicionais de biodiesel utilizam com maior frequência a transesterificação alcalina (KAIEDA et al., 1999; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; SRIVASTAVA; PRASAD, 2000; ZHANG et al., 2003), onde matérias-primas com elevado conteúdo de água e ácidos graxos livres (AGL) precisam de pré-tratamento empregando catalisadores ácidos, a fim de esterificar os AGL (FREEDMAN et al., 1984; KAIEDA et al., 1999; ZHANG et al., 2003), conforme ilustrado na Figura 2.4. O pré-tratamento é necessário para evitar a formação de sabão durante a reação e facilitar a separação do biodiesel e glicerol, e o catalisador remanescente das águas residuárias alcalinas. Portanto, grandes quantidades de água residuárias são produzidas durante o processo, em torno de 0,2 t por ton.de biodiesel produzido (SUEHARA et al., 2005).

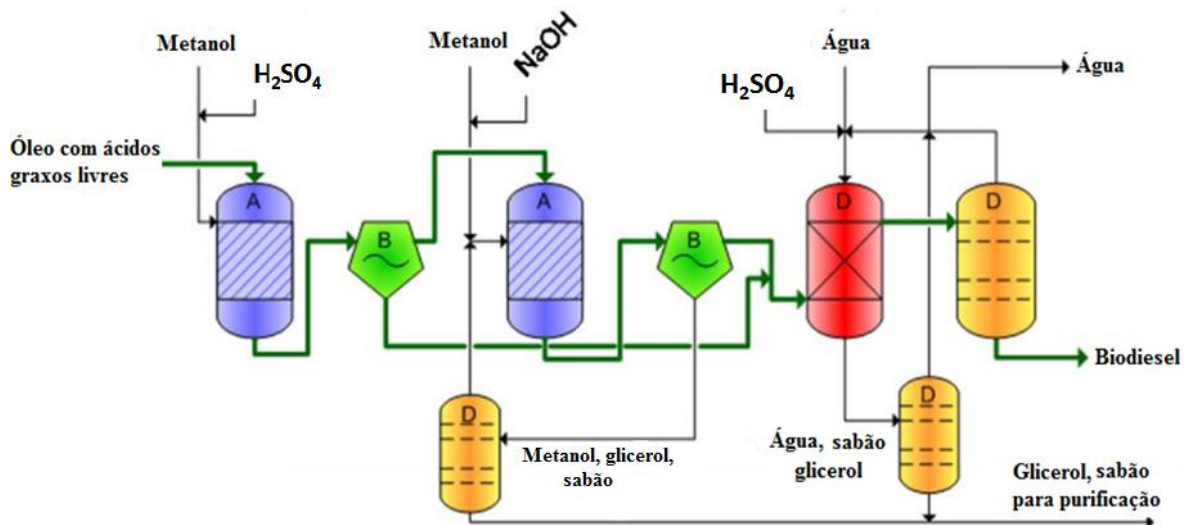


Figura 2.4. Processo tradicional de produção de biodiesel com etapa de pré-tratamento com catalisador ácido seguido pela catálise alcalina. (A) Reator; (B) Separação sabão/borra/glicerol (centrifuga ou decantador); (D) Purificação do produto e recuperação do álcool.

Fonte: Fjerbaek; Christensen; Norddahl (2009).

Deste modo, o tratamento de águas residuárias e eventual necessidade de reutilização de água, constitui um problema grave tanto do ponto de vista do consumo de energia quanto do ponto de vista ambiental. Contrário aos catalisadores alcalinos, enzimas

não promovem formação de sabão e podem esterificar tanto AGL quanto triglicérides, em uma única etapa, sem a necessidade de etapas subsequentes de lavagem (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). Portanto, a catálise enzimática surge como uma rota alternativa na produção de biodiesel em escala industrial (AL-ZUHAIR et al., 2011).

2.6. Catálise enzimática

Enzimas têm sido propostas para superar os inconvenientes da catálise química na produção de biodiesel. Na catálise enzimática, as etapas do processo são similares às da catálise química, entretanto, ocorre redução na geração de águas residuárias, além de que não é necessário o emprego de colunas de destilação na separação do glicerol formado no processo (SEVERSON; MARTIN; GROSSMANN, 2013). Lipases, como potenciais biocatalisadores, estão sendo amplamente investigados em função de seus benefícios ao meio ambiente, comparados com outros métodos tradicionais de produção de biodiesel (AKOH et al., 2007).

O mérito da catálise bioquímica inclui: (a) operação em condições amenas, isso implica um menor consumo de energia; (b) maior diversidade na seleção da matéria-prima, incluindo óleos usados com elevado teor de acidez; (c) maior facilidade de separação do meio reacional, se a enzima estiver imobilizada; (d) facilidade nas etapas subsequentes de separação e purificação do biodiesel; e (e) menor emissão de poluição e processo ambientalmente favorável (KUMARI; SHAH; GUPTA, 2007; ZHANG et al., 2012).

Porém, a enzima livre como biocatalisador apresenta algumas desvantagens, tais como alto custo, baixa estabilidade e impossibilidade de reutilização. Dessa forma, um importante avanço foi o surgimento da técnica de imobilização de enzima, que permitiu melhorar a estabilidade operacional da enzima e sua reutilização no processo de produção de biodiesel (DA RÓS et al., 2012; DA RÓS et al., 2013; FREITAS et al., 2009; FREITAS et al., 2011; PAULA et al., 2010; PAULA et al., 2008; PAULA et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Alguns resultados foram reportados na literatura, Da Rós et al. (2012), alcançaram êxito na reação de transesterificação do óleo de babaçu catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida de sílica-PVA, com rendimento de ésteres etílicos obtidos em 100%. Lee et al. (2010) utilizaram uma mistura de lipase de *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae* imobilizada em sílica gel, obtendo rendimentos acima

de 90% para 108 h de reação em sistema de reator contínuo. Li et al. (2011) investigaram a reação de transesterificação do óleo de soja, empregando como catalisador lipase *B. cepacia* imobilizada em nanofibras de poliacrilonitrila, alcançando rendimento de 90% após 24 h de reação.

Os resultados reportados demonstraram a possibilidade de utilização da enzima imobilizada por longos períodos de reação, bem como a viabilidade do seu reuso, o que reduz os impactos econômicos nos custos do processo.

2.6.1. Lipases

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C.3.1.1.3) catalisam, naturalmente, a hidrólise de triglicerídeos. Contudo, elas mostram-se como uma alternativa promissora na catálise de diversas outras reações, tais como a esterificação, transesterificação, acidólise e interesterificação (GOG et al., 2012; NARWAL; GUPTA, 2013). Isto ocorre em função do ataque nucleofílico que a enzima realiza sobre o grupo carbonila do éster (NARWAL; GUPTA, 2013).

Desta forma, as lipases vem sendo utilizadas em diversos ramos industriais, tais como indústrias de modificação de óleos, cosmética, farmacêutica, detergente, têxtil, biodiesel, síntese de produtos para a química fina, agroquímica e indústria de novos materiais poliméricos. A razão para este amplo potencial biotecnológico das lipases é devido à sua alta estabilidade em solventes orgânicos, não exigirem cofatores, elevada especificidade ao substrato (CHANDRASEKERAN; BHARTIYA, 2009), e sobretudo alta enantioseletividade (HOLT; HANEFELD, 2009; NARWAL; GUPTA, 2013).

Na última década, uma atenção particular vem sendo direcionada ao uso de lipases como biocatalisadores na produção de biodiesel (GOG et al., 2012). Neste contexto, as lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (AGL). Estas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Logo, esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros ésteres como acilhidrolases, colesterol esterase e tioesterase (CARVALHO et al., 2003; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). A diferença entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa

reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas. Sendo que, os microrganismos, são em geral, os principais produtores de enzimas industriais (NARWAL; GUPTA, 2013). As lipases microbianas apresentam baixo custo de produção e fácil modificação de suas propriedades. Entretanto, somente algumas enzimas mostram-se aptas na síntese eficiente de biodiesel, e dentro deste grupo, um número restrito de enzimas consegue catalisar reações na presença ou ausência de solventes. A Tabela 2.7 apresenta algumas enzimas comerciais imobilizadas em diferentes tipos de suportes, empregadas na síntese de biodiesel (ANTCZAK et al., 2009).

Tabela 2.7. Lipases microbianas usadas em estudos sobre a produção de biodiesel na presença ou ausência de solventes orgânicos

Reação em solvente orgânico	Referência	Meio isento de solvente	Referência
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soumanou; Bornsheuer (2003)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Silva et al. (2012)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Noureddini et al. (2002)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Moreira et al. (2007)
<i>Candida antarctica</i>	Haldar; Nag, (2008)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Da Rós et al. (2010)
<i>Mucor miehei</i>	Nelson; Foglia; Marmer(1996)	<i>Rhizopus oryzae</i>	Noureddini et al. (2002)

Fonte: Adaptado de Antczak et al. (2009)

Estas enzimas apresentam um complexo mecanismo catalítico. Em soluções aquosas homogêneas, a lipase está, essencialmente, numa conformação fechada e inativa, onde o sítio ativo está completamente isolado do meio reacional por meio de uma cadeia oligopeptídica chamada de flap ou lid ou “tampa”, que bloqueia a entrada do substrato até o sítio ativo. Esta cadeia polipeptídica apresenta vários resíduos aminoácidos hidrofóbicos em seu interior, que interagem com as regiões hidrofóbicas ao redor do sítio ativo. Esta conformação pode existir em um equilíbrio parcial com a conformação aberta e ativa, onde a tampa abre e estabiliza-se em função das interações iônicas ou ligações ponte de hidrogênio com partes específicas da superfície da enzima, permitindo o acesso do substrato até o sítio ativo (PALOMO et al., 2006). A Figura 2.5 apresenta o mecanismo acima descrito.

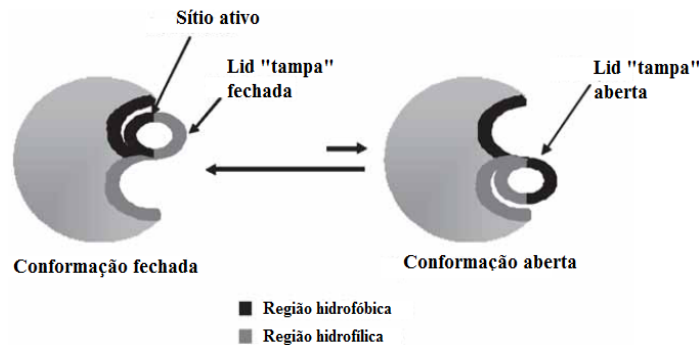


Figura 2.5. Adsorção interfacial da lipase
Fonte: Palomo et al. (2006)

2.6.2. Reações catalisadas por lipase

Dependendo do sistema reacional, isto é, aquoso ou solvente orgânico, lipases são capazes de catalisar, não somente, a hidrólise, mas também reações de síntese, tais como esterificação, acidólise, alcoólise e glicerólise, conforme ilustrado na Figura 2.6.

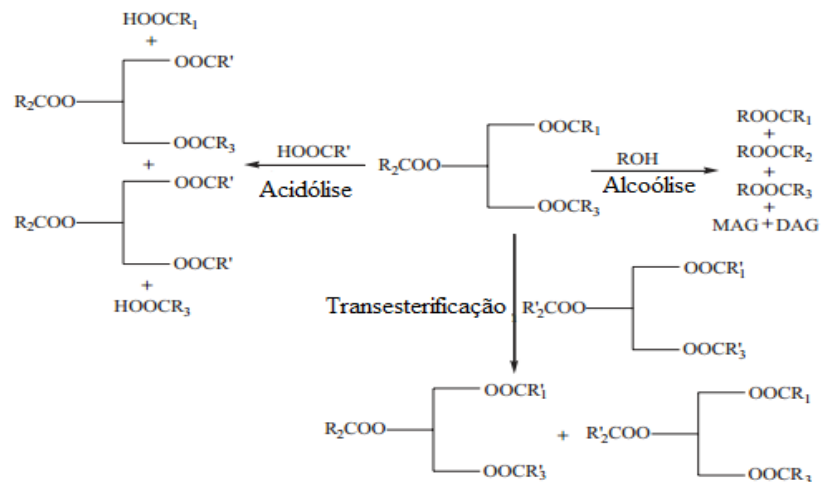


Figura 2.6. Reações catalisadas por lípases
Fonte: Soumanou et al. (2013)

2.7. Enzimas imobilizadas

As enzimas apresentam-se como biocatalisadores promissores em muitas reações orgânicas. Possuem excelentes características, tais como elevada atividade, especificidade e seletividade, podendo catalisar sob condições mais brandas e ecologicamente mais favoráveis. Entretanto, a utilização de enzimas na sua forma solúvel é limitada em processos de larga escala, em razão do seu alto custo de produção e da estabilidade.

Enzimas solúveis podem inativar, devido ao efeito do solvente ou em razão dos choques mecânicos (MENDES et al., 2013). Portanto, estudos têm sido propostos para estabilizar a atividade enzimática e aumentar sua estabilidade operacional (MENDES et al., 2013). Neste contexto, a técnica de imobilização de enzimas surge como uma estratégia promissora, pois permite melhorar as propriedades da enzima, tais como: a estabilidade operacional; seletividade e especificidade; e a redução da inibição pelo meio ou produto (MATEO et al., 2007). A Tabela 2.8 apresenta as principais características das enzimas na forma livre e imobilizada.

Tabela 2.8. Principais características das enzimas livres e imobilizadas.

Características	
Enzima livre	Enzima imobilizada
Dificuldade de recuperação e Reutilização	Fácil separação substrato/produto e capacidade de reuso
Alto custo, baixa eficiência e insolúvel em meio não aquoso	Alta eficiência
Atividade instável, influenciada pela temperatura e pH.	Atividade estável em uma ampla faixa de temperatura e pH

Fonte: Zhang et al. (2012).

A imobilização de enzimas é um processo que fixa a enzima em um suporte apropriado pela adsorção, inserção ou ligação covalente (SAUMANOU et al., 2013). Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material. O complexo enzima—suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima. O termo “enzima imobilizada” inclui: (DE CASTRO et al., 2008).

- (i) modificação das enzimas de forma a torná-las insolúveis em água.
- (ii) utilização de enzimas na forma insolúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração, que permite o escoamento dos produtos da reação, mas retêm a enzima no interior do reator.
- (iii) restrição da mobilidade da enzima pela ligação a outra molécula, que torna o sistema insolúvel no meio de reação

O processo de imobilização tem como objetivo a estabilização da lipase e a redução do custo no processo industrial, tornando os processos industriais viáveis economicamente. As enzimas imobilizadas são facilmente separadas do meio reacional, empregando um processo físico simples como a filtração, em seguida podendo ser reutilizada. A imobilização ainda facilita o desenvolvimento de processos contínuos, os quais são geralmente operados em reatores de tanque agitado ou de leito fixo (SAUMANOU et al., 2013).

2.8. Suportes para a imobilização de enzimas

As propriedades dos biocatalisadores imobilizados são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte (TISHER; KASCHE, 1999). A interação entre esses dois componentes proporciona um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (Figura 2.7). Dentre os diversos parâmetros que impactam no processo de imobilização, pH, temperatura e força iônica, apresentam grande efeito. Estes fatores influenciam no desempenho do suporte, na conformação da enzima, na velocidade de transferência de massa, portanto, regem o comportamento da enzima imobilizada (ANTCZAK et al., 2009).

Além disso, outros fatores devem ser considerados quando um biocatalisador é selecionado para uma reação específica como o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos. A simples relação entre dois componentes pode levar a uma interpretação errônea (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Água é, talvez, o componente mais relevante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Estudos reportados na literatura mostram que uma quantidade mínima de água, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, um controle rígido do teor de água é exigido, pois excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise em detrimento da síntese (LORTIE, 1997; KLIBANOV, 2001).

As enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Dentre todos os fatores anteriormente mencionados, com exceção da enzima, a maior contribuição para o desempenho eficiente da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Na seleção de um

suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, e a possibilidade de regeneração do material (DE CASTRO et al., 2008).

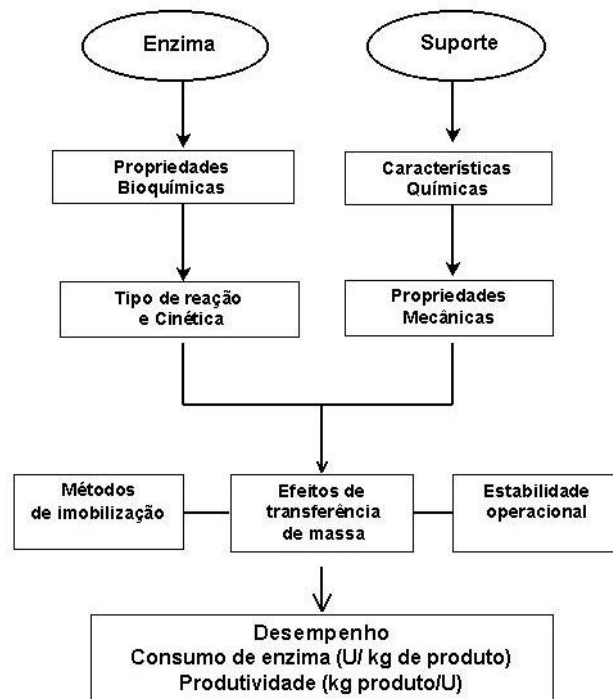


Figura 2.7. Interação entre suporte e enzima.

Fonte: Tisher; Kasche (1999)

O suporte deve ser quimicamente resistente nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação. A resistência mecânica deve permitir o uso de filtração, centrifugação e agitação, pois o processo de imobilização e o uso repetido e contínuo, algumas vezes, requerem o emprego dessas operações. A estabilidade térmica é outra propriedade importante, principalmente quando se utiliza o biocatalisador em diferentes temperaturas. A maioria dos suportes inorgânicos é apropriado para o uso industrial por apresentar elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque por microrganismos. Entretanto, a maioria das enzimas imobilizadas comercializadas é obtida em matrizes orgânicas, devido à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos nesses suportes (DE CASTRO et al., 2008).

Um tipo de suporte que tem merecido a atenção dos pesquisadores são os materiais híbridos (materiais que combinam características inorgânicas e orgânicas). Entre as

matrizes testadas, resultados promissores têm sido relatados para matriz híbrida polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) (DA RÓS et al., 2012; DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; MOREIRA et al., 2007; PAULA et al., 2007; SANTOS et al., 2008a; SANTOS et al., 2008b; SILVA et al., 2012). A síntese desta matriz envolve três etapas, conforme esquematizado na Figura 2.8 (SANTOS et al., 2008a).

Esta matriz se mostrou compatível com lipases de diferentes fontes (DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; PAULA et al., 2007; PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008a), resultando em elevada recuperação da atividade enzimática e estabilidade operacional (FREITAS et al., 2010; PAULA et al., 2008). Outra vantagem apresentada por esse tipo de suporte não comercial é o baixo custo de obtenção em relação aos suportes manufaturados industrialmente. As boas propriedades morfológicas do suporte, aliadas à eficiência do método desenvolvido de imobilização da lipase, conferem elevada estabilidade operacional do sistema imobilizado em reações de síntese. Estas características são essenciais para o processo de imobilização de enzimas e por este motivo a matriz híbrida SiO₂-PVA foi selecionada para a realização do presente trabalho.

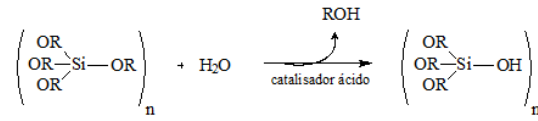
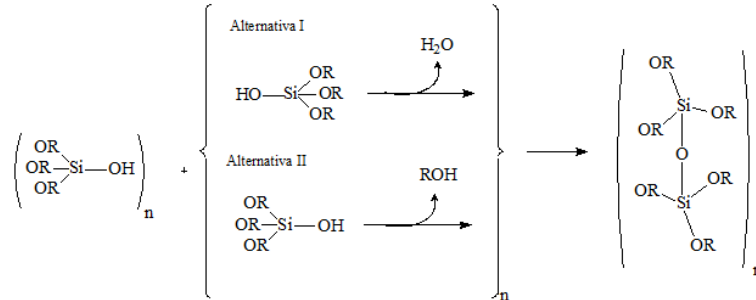
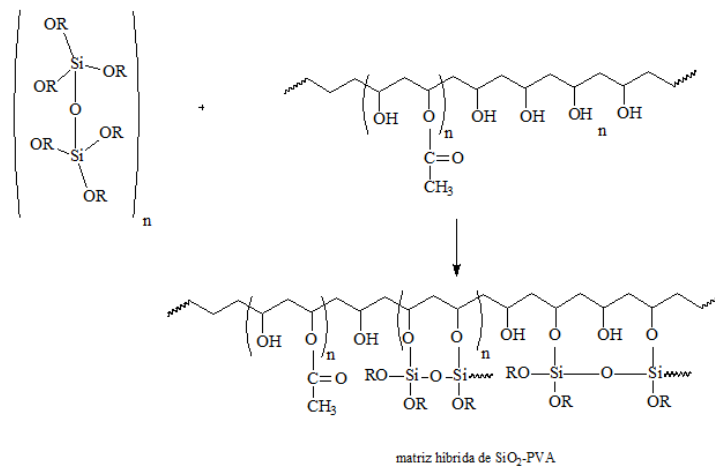
Etapa 1 - Hidrólise**Etapa 2 - Condensação****Etapa 3 - Formação da matriz híbrida de SiO₂-PVA**

Figura 2.8. Etapas envolvidas na formação do SiO₂-PVA (“R” representa o grupo alquil).

Fonte: Santos et al. (2008a)

2.8.1. Métodos de imobilização de enzimas

Existem diversos protocolos de imobilização de enzimas, os quais podem ser divididos dentro de duas categorias: ligação física e química (Figura 2.9). A ligação física incluem encapsulação e aprisionamento da enzima pelo suporte sólido. Na ligação química incluem a ligação iônica, adsorção e a ligação covalente (DE CASTRO et al., 2010; FJAEBAK et al., 2009; JEGANNATHAN et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

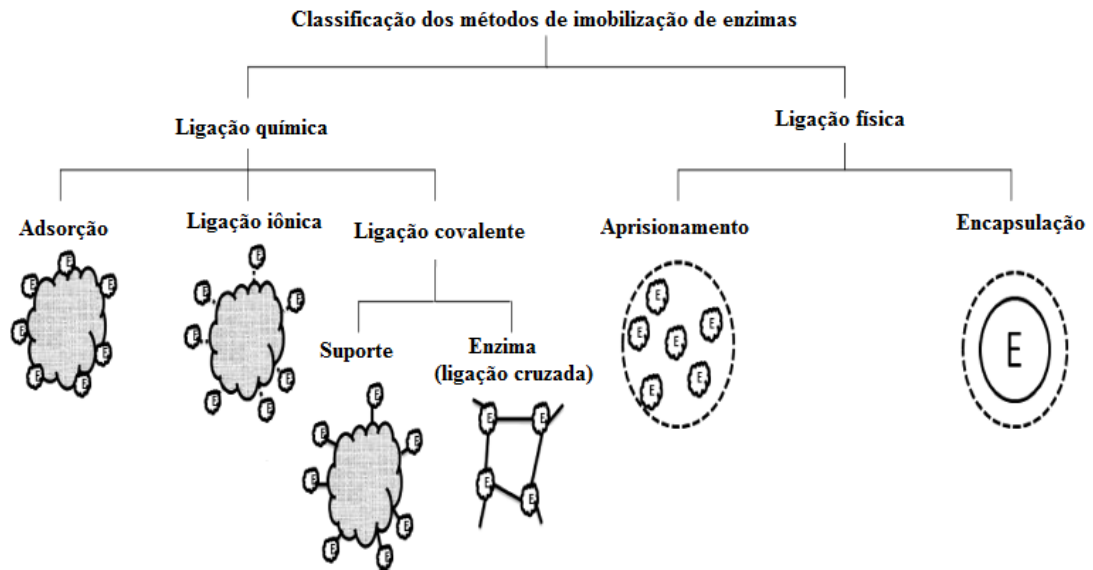


Figura 2.9. Métodos de imobilização: Ligação química; Ligação física

Fonte: Jegannathan et al. (2008)

2.8.1.1. Adsorção

Adsorção é a ligação da enzima na superfície do suporte por fracas interações tais como força de Van der Waals, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças de dispersão (JEGANNATHAN et al., 2008; ZHANG et al., 2012). Em função disso, a enzima pode se desprender do suporte.

Em comparação com outros métodos, adsorção é o método mais empregado na imobilização de enzimas com vantagens comerciais especiais: (a) condições mais suaves e fácil preparação; (b) baixo custo; (c) não é exigida a incorporação de aditivos químicos; (d) o suporte pode ser regenerado para repetidos usos; e (e) alta atividade (FUKUDA et al., 2001; MENDES et al., 2012).

2.8.1.2. Ligação covalente

Este é o método mais amplamente estudado. Em geral, ligações covalentes de enzimas em suportes são baseadas em reações químicas entre os grupos funcionais não essenciais, localizados sobre a superfície da enzima e os grupos funcionais que estão conectados na superfície do suporte. A carbonila, hidroxila e amino são os grupos funcionais presentes nas enzimas (DUTTA, 2008; OKAFOR, 2007). Alguns suportes, como: agarose; celulose; dextrana; poliacrilamida; álcool polivinílico; poliestireno;

poliamida; vidro e bentonita, são normalmente utilizados na imobilização de enzimas. Enzimas imobilizadas covalentemente apresentam as seguintes vantagens: (1) em razão da forte ligação, elas não separam do suporte durante o processo de imobilização; (2) fácil contato da enzima imobilizada com o substrato, pois estão localizadas na superfície do suporte; e (3) aumento da estabilidade térmica, devido à forte interação entre a enzima e o suporte (OKAFOR, 2007).

Por conta da forte interação enzima—suporte, não é surpresa que as propriedades da enzima como atividade, seletividade e estabilidade sejam influenciadas significativamente pela natureza física e química do suporte selecionado. Logo, o desempenho da enzima imobilizada covalentemente no suporte é influenciado por algumas propriedades, como: (CAO, 2005; MATEO et al., 2006; MATEO et al., 2007)

- (i) natureza física do suporte (por exemplo, tamanho de poro, tamanho de partícula, porosidade, forma, entre outras);
- (ii) estrutura química do suporte;
- (iii) natureza da ligação ou ligação química;
- (iv) orientação da enzima;
- (v) natureza e o comprimento do braço espaçador;
- (vi) propriedades do meio usado para a ligação da enzima como pH e temperatura;
- (vii) número de ligações formadas entre a enzima e o suporte;
- (viii) distribuição da enzima sobre o suporte.

Lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada covalentemente em matriz híbrida de SiO₂-PVA foi empregada na etanolise de sebo bovino na síntese de biodiesel assistida por irradiação de micro-ondas. Sob condições otimizadas, atingiu conversão total a 45°C em 8h de reação (DA RÓS et al., 2012). Freitas et al. (2010) estudaram a síntese enzimática de monoglicerídeos pela reação de esterificação direta do glicerol e diversos ácidos graxos (C12 a C18) empregando lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada por ligação covalente em SiO₂-PVA. Os resultados obtidos indicaram que a especificidade da lipase foi relativamente dependente do comprimento da cadeia dos ácidos graxos, apresentando elevada especificidade para os ácidos mirístico e palmítico. A composição em termos de monoglicerídeos e diglicerídeos atendeu os requisitos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para ser usados como agentes emulsificantes alimentares.

Desta forma, os resultados citados anteriormente demonstram a eficiência da enzima imobilizada covalentemente. Desta forma, no presente projeto, o método de ligação covalente foi escolhido para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

2.9. Vantagens e limitações da imobilização de enzimas

A imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização também auxilia a dispersão homogênea da enzima no meio, essencial, para a condução de reações enzimáticas (DE CASTRO; ANDERSON, 1995; VILLENEUVE et al., 2000).

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são: (i) aproveitar a atividade catalítica por um maior período de tempo, no processo em batelada; (ii) operar de forma contínua o que possibilita o melhor controle das variáveis do processo; (iii) facilitar a separação do catalisador e do produto da reação, já que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação; (iv) reduzir o volume de reação, porque a enzima imobilizada é retida no biorreator permite alta concentração enzimática em menor volume de reator, isto é, alta atividade por unidade de volume. Isto conduz à uma alta produtividade volumétrica (kg) por volume de reator (m³) e por hora. Além disso, devido às condições de reação mais suaves por um menor tempo de reação, impede-se a ocorrência de reações indesejáveis; (v) altera, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima, como por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura (DE CASTRO et al., 2008).

O sucesso da tecnologia de imobilização mostra, de modo geral, que as vantagens superam as limitações. Entretanto, alguns aspectos devem ser apontados, não como desvantagens do processo, mas sim como pontos a serem evitados. Dentre estes fatores podem ser citados: (i) perda da atividade durante o processo de imobilização; (ii) efeitos difusionais, que é amenizado pela escolha apropriada do suporte e condições de operação do biorreator; (iii) inativação da enzima pela sua modificação parcial, dependendo do procedimento escolhido; (iv) condições otimizadas de imobilização difíceis de serem encontradas (ROSEVEAR et al., 1984).

2.10. Produção enzimática de biodiesel

Lipases de diferentes fontes têm sido testadas para a síntese enzimática de biodiesel. Ko et al. (2012) estudaram o desempenho da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica macroporosa (Novozym 435) na metanólise do óleo de soja em reator batelada, atingindo conversão de 99% em 14h de reação. Da Rós et al. (2010) reportaram elevadas taxas de conversão na etanólise do sebo bovino e babaçu empregando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte híbrido não comercial.

Muitas enzimas estão disponíveis comercialmente, também na forma imobilizada. CALB, LRM e LTL imobilizadas são comercializadas pela empresa Novozymes como Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, respectivamente. Em 2011, a Amano lançou no mercado a Lipase de *Burkholderia cepacia* "Amano" IM imobilizada em terra diatomácea com elevada atividade de transesterificação (AMANO, 2012).

Outra estratégia que vem sendo empregada na produção enzimática de biodiesel é o uso combinado de enzimas. Há algum tempo que tem sido mencionado que o custo da produção de biodiesel pode ser minimizado, com o emprego de duas enzimas imobilizadas com especificidade de posição complementares, ao invés de uma lipase. Desta forma, Huang et al. (2010) adotaram a técnica de planejamento experimental visando determinar as condições para o uso combinado das enzimas Novozym 435 (não-específica) e a Lipozyme TL-IM (*sn*-1,3 específica), e reportaram rendimentos em ésteres metílicos de 97,2%. Estas lipases puderam ser recicladas 20 vezes (HUANG et al., 2010). O uso combinado da lipase Novozym 435 e a Lipozyme TLIM gerou uma ação sinérgica significativamente positiva com elevada conversão em EM, conforme ilustrado na Figura 2.10.

Diversos trabalhos reportados na literatura descrevem a síntese de biodiesel mediada por lipases, utilizando diferentes matérias-primas e alcoóis sob condições diversas (ARYEE et al., 2013; AKOH et al., 2007; DA RÓS et al., 2012; DA RÓS et al., 2010; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MOREIRA et al., 2007; NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996; SILVA et al., 2012; YUCEL, 2013).

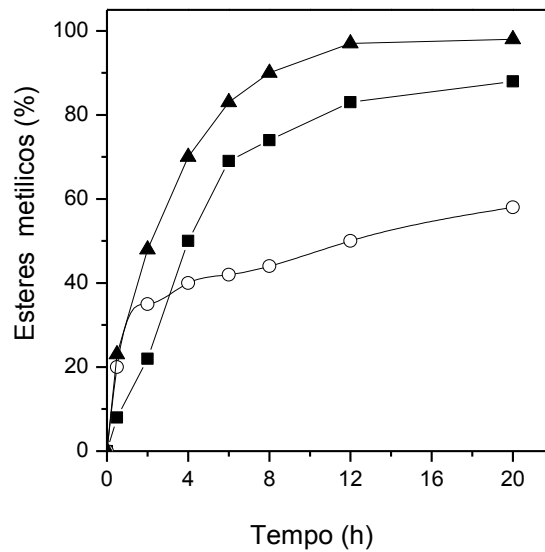


Figura 2.10. Efeito sinérgico de duas lipases de diferentes atividades atuando isoladamente e combinadas na formação de ésteres metílicos a partir de gordura de porco. Condições: 50°C, razão molar metanol:óleo 12:1. ■ 4% Novozym 435; ▲ Novozym 435(2,04%) + TM-IL(1,96%); ○ 4% TM-IL.

Fonte: Huang et al.(2010)

A qualidade da matéria-prima lipídica também pode interferir na qualidade do produto. Óleos residuais (óleo de fritura), normalmente, apresentam elevado teor de ácidos graxos livres, logo, isto irá requerer inicialmente uma reação de esterificação, empregando um catalisador ácido, e em seguida a reação de transesterificação para atingir um produto dentro das especificações (RABU; JANAJREH; HONNERY, 2013).

Além dos ácidos graxos livres, outros componentes ou possíveis impurezas devem ser considerados, até mesmo um componente comum em diversos óleos vegetais como o fosfolípido, que tem sido reportado como inibidor da atividade de lipases. Isto foi ilustrado em experimentos empregando 3 amostras de óleo de soja (cru, degomado e refinado) e CALB imobilizada como catalisador (WATANABE et al., 2002). Os resultados obtidos indicaram que conversões mais elevadas foram alcançadas nos experimentos conduzidos com óleo degomado. Desta forma, recomenda-se efetuar a degomagem do óleo, principalmente o óleo de soja, antes da reação de transesterificação ou alternativamente, efetuar simultaneamente a degomagem enzimática e a síntese de biodiesel (NOVOZYMES, 2009).

Os problemas críticos de teor de água, estabilidade à temperatura, estabilidade aos agentes acilantes (alcoóis de cadeia curta), uso de solventes e formação de glicerol como

subproduto são discutidos em relação à produção de biodiesel empregando lipases imobilizadas (ANTCZAK et al., 2009).

2.10.1. Teor de água

Na produção enzimática de biodiesel, a lipase exerce sua ação catalítica em meio predominantemente não-aquoso, a água desempenha várias funções, apresentando forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da enzima (GOG et al., 2012; LU et al., 2009). Ativação da lipase pela água envolve mudança conformacional da enzima, a qual é dependente da disponibilidade da interface óleo/água. Logo, o rendimento de transesterificação depende do tamanho da área interfacial, o qual pode ser aumentado pela adição de uma quantidade estabelecida de água. Entretanto, lipases são hidrolases e o excesso de água irá favorecer a reação de hidrólise, causando redução das taxas de conversão de transesterificação (GOG et al., 2012).

Diversos estudos revelaram que a adição de uma pequena quantidade de água na mistura reacional catalisada por enzima eleva a velocidade de síntese de ésteres de ácidos graxos (HSU et al., 2004; NIE et al., 2006; LU et al., 2008; SHAH; GUPTA, 2007; SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003). Tan et al. (2006) investigaram a síntese enzimática de biodiesel, a partir do óleo de cártamo, alcançando 96% de conversão pela ação catalítica da lipase de *Candida* sp. 99-125, e determinaram o conteúdo ótimo de água na faixa de 10 a 20% (v.v⁻¹).

Li et al. (2006) reportaram um desempenho reduzido em reações conduzidas com óleos contendo elevados teores de água (óleo de colza refinado e óleo de fritura) empregando uma combinação de lipases CALB e LTL na presença de *tert*-butanol como solvente.

Neste contexto, o conteúdo de água ideal para a maximização da atividade enzimática depende do tipo de reação, da matéria-prima empregada, da lipase utilizada, do suporte testado e do solvente orgânico selecionado (JEGANNATHAN et al., 2008; LU et al., 2009; TAN et al., 2010).

2.10.2. Efeito inibidor do agente acilante

Nas reações de transesterificação (óleo: álcool), alcoóis de cadeia curta apresentam 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 são os alcoóis mais empregados na produção industrial de biodiesel, entretanto eles apresentam elevada inativação sobre a atividade catalítica da enzima, comparativamente com os alcoóis alifáticos de cadeia longa (GOG et al., 2012).

Chen e Wu (2003) reportaram que o grau de inativação é inversamente proporcional ao número de átomos de carbono presente na molécula de álcool. Logo, o efeito inibidor dos alcoóis na atividade das lipases parece diminuir com o aumento da massa molecular do álcool e tem sido relatada uma aparente relação entre a solubilidade do álcool no óleo e o efeito desestabilizante do óleo (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). A velocidade da reação de metanólise é diminuída significativamente com adição de mais de 1/2 em equivalente molar de álcool no início do processo enzimático (SHIMADA et al., 2002). Neste sentido, diversas estratégias estão sendo propostas para solucionar este problema como adição gradativa de metanol, mudança de agente acilante e uso de solventes, entretanto, este último não é utilizado em escala industrial devido à dificuldade de recuperação do solvente (TAN et al., 2010).

2.10.3. Solventes orgânicos

O uso de solventes orgânicos na síntese enzimática de biodiesel melhora a solubilidade dos triglicerídeos e alcoóis, bem como protege a enzima da inativação causada pela elevada concentração do álcool. Vários solventes orgânicos têm sido usados na síntese enzimática de biodiesel, sendo os mais apropriados aqueles com caráter hidrofóbico, tais como iso-octano, *n*-heptano, éter de petróleo, *n*-hexano e ciclohexano. Porém, como glicerol é insolúvel em solventes orgânicos hidrofóbicos, fica retido no reator e é absorvido pelo suporte de imobilização da enzima (GOG et al., 2012).

A biocatálise em solventes orgânicos apresenta algumas desvantagens, como: a toxicidade do solvente orgânico ao biocatalisador e a difícil recuperação do produto final. Estas desvantagens acabam tornando o uso de solventes orgânicos na área de bioprocessos um fator limitante do processo global (AIRES-BARROS, 2002).

2.10.4. Efeito do glicerol

Durante a reação de transesterificação de óleos vegetais, é preciso observar o efeito do glicerol, subproduto da reação, sobre a eficiência do processo. O glicerol dificulta a difusão do substrato na molécula da lipase reduzindo a eficiência reacional (SHIMADA et al., 2002). Isto ocorre porque o glicerol 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 (HAMA et al., 2011b; XU et al., 2011).

Sendo assim, do ponto de vista de planejamento e operação de uma planta industrial, a remoção eficiente do glicerol pode ser um obstáculo na implementação de reatores de leito fixo (HAMA et al., 2011a). Este efeito indesejável do glicerol leva à diminuição da estabilidade operacional do biocatalisador, impactando na viabilidade econômica do processo (LAI et al., 2005). 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, conseqüentemente, reduzir a viscosidade do meio reacional.

Logo, em razão do efeito restritivo do glicerol na etanolise enzimática, torna-se desejável examinar o comportamento do glicerol no leito catalítico do biorreator, portanto, no presente trabalho, o método de tingimento (corante) foi empregado, para elucidar o real comportamento do glicerol, no sistema reacional e seu acúmulo na superfície da enzima imobilizada (XU et al., 2011).

2.11. Biorreatores

Biorreator é um equipamento em que transformações bioquímicas são catalisadas por enzimas ou células microbianas (DUTTA, 2008). A mistura reacional, constituída de meio (de cultivo ou para conversão enzimática) e agente biológico é processada em biorreatores, onde deverão ser mantidas condições ótimas para o agente biológico expressar o máximo de sua atividade catalítica, seja através do metabolismo das células ou de simples reação enzimática. Quando se tratar de um processo puramente enzimático, o meio reacional é adicionado de unidades de atividade enzimática e a catálise é realizada também em biorreatores para máximo de conversão e produtividade (PEREIRA JR, 2008).

Para projetar um biorreator, alguns aspectos devem ser levados em consideração. As decisões tomadas na etapa de planejamento podem impactar significativamente no desempenho global do processo. Portanto, o conhecimento sobre a cinética da reação é essencial para o entendimento de como o biorreator trabalha. Assim como, o conhecimento em outras áreas como: engenharia de bioprocessos, balanço de massa e energia, transferência de massa e calor, cálculo de tubulações, entre outras. Por essa razão, o desenvolvimento de biorreatores constitui-se uma das mais complexas áreas de atuação da Engenharia Bioquímica (NAJAFPOUR, 2007; PEREIRA JR, 2008).

Enzimas (isoladas ou purificadas) e células microbianas, vegetais ou animais são utilizadas em biorreatores na síntese de produtos biológicos. O desempenho de qualquer biorreator dependerá de vários fatores, conforme a seguir descrito: (NAJAFPOUR, 2007)

- Concentração de biomassa elevada o suficiente para alcançar altos rendimentos;
- Condições estéreis devem ser mantidas para os sistemas de culturas;
- Agitações efetivas, para manter uniforme a distribuição de substrato no leito do reator;
- Tensões de cisalhamento adequadas, elevadas tensões podem ser nocivos aos microrganismos ou romper paredes celulares, bem como baixas tensões não são desejadas, pois geram incrustações nas paredes do reator.

2.12. Tipos de biorreatores

Vários tipos de biorreatores são empregados em escala de bancada ou industrial (BALTARU et al., 2009). 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). Pode-se encontrar uma grande variedade de configurações de biorreatores, entre as quais podem ser citadas:

- Biorreatores de tanque agitado (STB- Stirred Tank Bioreactor);
- Biorreatores agitados pneumáticamente (Biorreatores pneumáticos);
- Biorreatores a membrana;
- Biorreatores com enzimas/células imobilizadas.

2.12.1. Biorreatores de tanque agitado (STB)

São os mais estudados e utilizados industrialmente. Embora não sendo ideais, os tanques agitados apresentam versatilidade e fornecem bons resultados para uma gama de bioprocessos, em particular as empresas farmacêuticas, pois diferentes substâncias podem ser produzidas no mesmo biorreator durante o seu tempo de vida. Apesar de sua flexibilidade, os biorreatores STB 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 (PEREIRA JR, 2008). A Figura 2.11 apresenta uma configuração básica de biorreator STB.

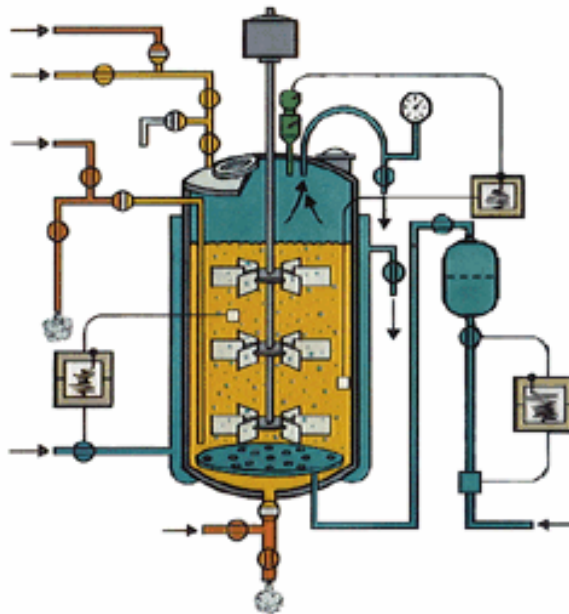


Figura 2.11. Biorreator agitado mecanicamente

Fonte: Pereira Jr. (2008)

2.12.2. Biorreatores agitados pneumaticamente

A potência necessária para se atingir o grau de mistura desejável no sistema reacional, a fim de se produzirem altas taxas de transferência de massa e calor, é suprida pela energia cinética do líquido, através de sua circulação pelo movimento das bolhas gasosas, isto é, pneumaticamente. Este tipo de biorreator (Figura 2.12) conhecido na literatura como *airlift* (com circulação interna ou externa) ou coluna de bolhas (*bubble column*), é empregado em sistemas biológicos suscetíveis às forças cisalhantes (PEREIRA JR, 2008).

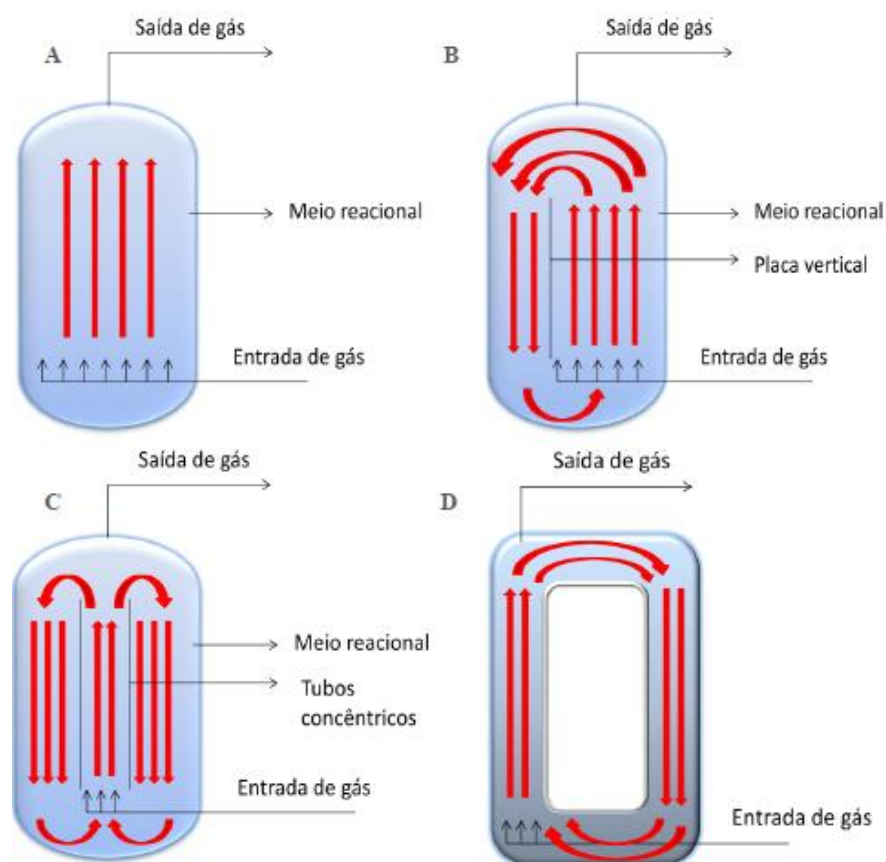


Figura 2.12. Biorreatores agitados pneumaticamente: (A) Coluna de bolhas; (B) *airlift* tipo *split*; (C) *airlift* de cilindros concêntricos; (D) *airlift* de circulação externa.

Fonte: Mafra (2013)

Neste tipo de reatores combinam-se a mistura das fases através do controle das condições do fluxo e baixas tensões de cisalhamento, com as solubilidades elevadas para substratos/produtos hidrofóbicos, obtendo-se velocidades de reações elevadas e facilitando a recuperação do produto por extração. A diferença de densidades entre as duas fases

líquidas é pequena, o que dificulta a geração de zona de decantação no topo do reator (AIRES-BARROS, 2002). Os biorreatores pneumáticos possibilitam a operação contínua de bioprocessos com altas densidades celulares, resultando em altos valores de produtividade volumétrica. Altas relações altura/diâmetro do reator (H/D_r) são necessárias a fim de se alcançarem elevadas retenções de bolhas gasosas no seio do líquido e de gerar altas pressões hidroestáticas próximo a entrada de ar, que induzirão o movimento do líquido (PEREIRA JR, 2008).

Os biorreatores pneumáticos são considerados de simples concepção, sendo a injeção de gás comprimido a única fonte de energia de entrada no reator. A circulação do líquido deve-se, exclusivamente, pela aspensão e dispersão do gás. A única variável controlada em um biorreator pneumático é a vazão de gás, que afeta a mistura do meio reacional e a transferência de massa gás-líquido (MORAVEJI et al., 2012; YUGUO, ZHAO; XIAOLONG, 2000). Como não existem partes mecânicas móveis para a agitação, há redução do risco de contaminação, e a limpeza e a esterilização são facilitadas. Uma vez que a injeção do ar tem o intuito de agitar e aerar, um biorreator pneumático opera com baixo consumo de energia e com alta transferência de massa e energia (SIEGEL; ROBINSON, 1992).

2.12.3. Biorreatores membrana

Este tipo de biorreator vem sendo muito utilizado nos últimos 30 anos, em estações de tratamento de águas residuárias, e recentemente, em indústrias de biorrefinarias e na produção de bioenergia (HE et al., 2012). Sua principal vantagem está na possibilidade de confinar enzimas dentro do biorreator, separando-as da corrente de saída do sistema quando se opera continuamente, e tornando esta etapa desnecessária durante o processo de recuperação (*downstream*). Embora, esta vantagem possa ser também adquirida com outras técnicas de imobilização, o confinamento de células em biorreatores à membrana microporosa é, talvez, a forma mais inócua de imobilização de células e enzimas, pois não empregados agentes químicos, nem condições drásticas de aprisionamento. O uso de biorreatores membranas é particularmente usado em sistemas bifásicos, pois muitas dificuldades associadas com emulsificação e separação de fases podem ser evitadas (PEREIRA JR, 2008; AIRES-BARROS, 2002).

2.12.4. Biorreatores com células/enzimas imobilizadas

Nas últimas duas décadas houve grande e rápido desenvolvimento no uso de enzimas para propósitos industriais, analíticos e médicos. A fim de tornar seu uso mais conveniente, este agente biológico tem sido imobilizado, assemelhando-se aos catalisadores de fase sólida da química convencional. Várias vantagens associadas à imobilização de células/enzimas podem ser apontadas (PEREIRA JR, 2008):

- Possibilidade de aplicação em reações enzimáticas de múltiplas etapas;
- Rendimento e produtividades elevados;
- Estabilidade operacional alta;
- Altas densidades celulares podem ser empregados;
- Densidades celulares e atividades enzimáticas podem ser mantidas por longos períodos de operação;
- Produtos podem ser facilmente separados;
- Menor suscetibilidade a contaminações microbianas.

Por outro lado, existem pontos a serem observados com maior atenção, como:

- Reações indesejáveis podem ocorrer pela presença de várias enzimas cataliticamente ativas;
- Desprendimento de célula e enzima do suporte;
- Problemas relacionados à transferência de massa intra-partícula.

Os tipos de biorreatores (Figura 2.13) que empregam células/ enzimas imobilizadas mais comumente utilizados são: CSTR; Leito fixo e Leito fluidizado, os dois últimos mais indicados por minimizarem a exposição do enzima/ célula imobilizada a elevados graus de cisalhamento e colisões (PEREIRA JR, 2008).

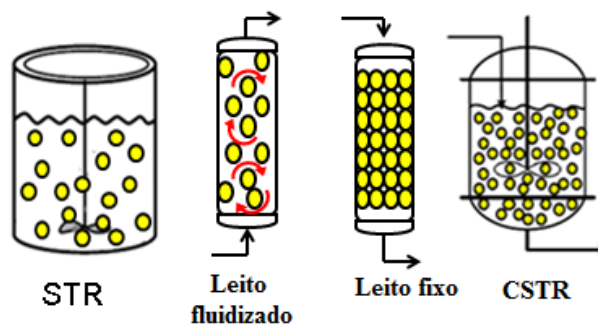


Figura 2.13. Modelos de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas.

Fonte: Zanin; Moraes (2004).

A seleção do tipo de biorreator a ser utilizado em processos com enzimas imobilizadas depende da análise criteriosa de uma série de fatores, tais como: (a) a forma da enzima imobilizada – partículas, membranas, fibras; (b) a natureza do substrato – solução, sólidos em suspensão ou coloidal; (c) requisitos operacionais da reação – controle de pH, temperatura; (d) cinética da reação – inibição por substrato, produto, ou ambos; (e) a superfície catalítica por unidade de volume de reator; (f) características de transferência de massa externa e interna; (g) facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração; (h) facilidade de construção do biorreator; e (i) custo do biorreator. Nessa análise os pontos fundamentais são a natureza da solução de substrato e a cinética da reação enzimática (ZANIN; MORAES, 2004).

Desta forma, em particular na produção de biodiesel, os biorreatores mais comumente utilizados são os reatores de tanque agitado e os de leito fixo (PBR). Portanto, para reduzir custos operacionais, o biodiesel pela rota enzimática, deve ser produzido em plantas industriais operadas continuamente (GOG et al., 2012).

2.13. Biorreatores tanque agitado

2.13.1. Biorreator batelada tanque agitado (BSTR)

No reator batelada, as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato e a agitação promovida por agitadores mecânicos (ZANIN; MORAES, 2004). Este tipo de configuração é muito usado em escala de bancada devido à simples montagem do aparato, a mais utilizada nos processos com enzimas em solução, entretanto, enzimas imobilizadas são também empregadas. Normalmente, a enzima é introduzida no reator juntamente com o substrato, e o conteúdo é descarregado quando se alcança o grau de conversão desejado (CIFTCI; TEMELI, 2013; DA RÓS et al., 2010).

O processo pode ser operado com a adição de todos os componentes no início, considerando, que em alguns casos é recomendada a adição gradativa de um dos componentes do substrato, como por exemplo, na transesterificação de lipídeos com metanol (RODRIGUES et al., 2010). A condução de um processo em regime de batelada é útil para coletar dados sobre o processo, como a cinética da reação (DA RÓS et al., 2010).

Estes tipos de reatores têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases. Entretanto, apresentam algumas desvantagens para uso em escala

industrial, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e estão susceptíveis à rupturas devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (WATANABE et al., 2005).

Outros fatores negativos deste tipo de processo em larga escala são: necessidade de reatores de grande volume, longo período de reação e maior tempo na separação dos produtos, pois todos os estágios da reação são realizados no mesmo reator. Além do mais, o reator batelada requer longos períodos para alcançar boa produtividade industrial (YAAKOB et al., 2013).

2.13.2. Biorreator contínuo tanque agitado (CSTR)

O cenário real da indústria de biodiesel, em plantas de larga escala, a reação transesterificação ocorre em um reator CSTR ou em série, com ou sem a remoção do glicerol. Uma vez que os parâmetros operacionais são frequentemente selecionados com base em experimentos em batelada, eles geralmente precisam ser ajustados para processos contínuos. Em razão deste fato, as condições operacionais ótimas não são conhecidas quando uma planta industrial começa a operar. Conseqüentemente, isto resulta em perda de tempo e recursos para investigar as condições operacionais ótimas que maximize a produtividade em reatores contínuos. Uma vantagem do CSTR é a possibilidade de inserir etapas de separação entre os tanques para eliminação de produto ou subproduto com potencialidade de inibição na reação, por exemplo, separar o glicerol liberado na reação (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008).

2.14. Biorreator em regime contínuo

2.14.1. Biorreator de leito fixo (PBR)

Os reatores de leito fixo são, tradicionalmente, empregados na maioria dos reatores biocatalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala e controle automático e menor grau de força de cisalhamento, o que conseqüentemente, evita a ruptura das partículas do biocatalisador (AL-ZUHAIR et al., 2011; BALTARU et al., 2009; CHANG et al., 2009; CHEN; LIN, 2010; HALIM et al., 2009; WANG et al., 2011). Porém, existem alguns inconvenientes nos PBR, o glicerol formado ficar retido na superfície da lipase imobilizada, diminuindo a sua eficiência catalítica e ocorrência de caminhos preferenciais. Entretanto, este problema

pode ser superado pela remoção em tempo hábil do glicerol durante o processo (GOG et al., 2012).

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 adição gradual de metanol (ROYON et al., 2007; SHIMADA et al., 2002); PBR simples estágio com recirculação (HSU et al., 2004); PBR nove estágios conectados em série com um hidrociclone para separar glicerol (NIE et al., 2006). Inclusive PBR para produção em escala industrial (AL-ZUHAIR et al., 2011).

Na produção enzimática de biodiesel, diversos trabalhos são reportados na literatura, em particular, Wang et al. (2011) estudaram a metanólise do óleo de soja empregando lipase imobilizada em nanopartículas de Fe_3O_4 , em dois tipos diferentes de configuração: um PBR simples de um estágio, e um PBR de quatro estágios em série. A Figura 2.14 ilustra a montagem dos reatores simples de um estágio e quatro estágios conectados em série. Os resultados obtidos indicam que o PBR apresenta grande potencial no desenvolvimento e funcionamento em larga escala na produção de biodiesel.

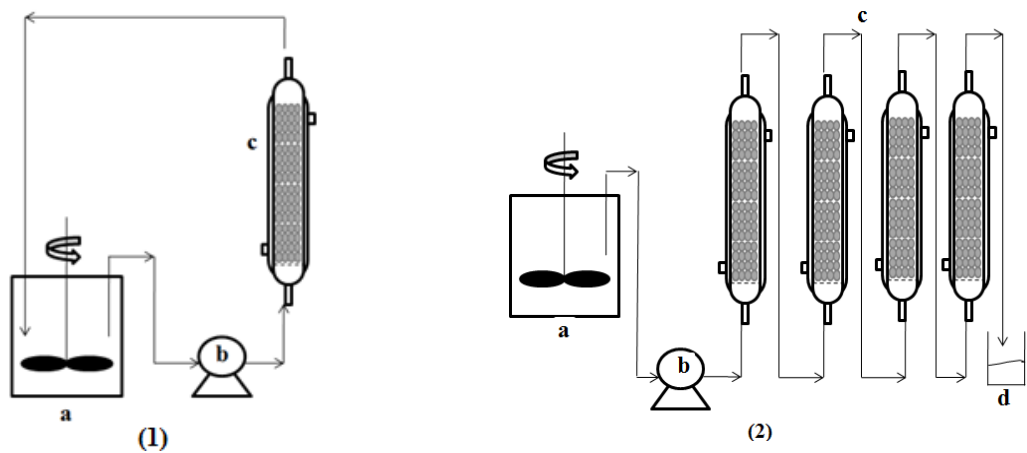


Figura 2.14. Representação esquemática da produção enzimática de biodiesel em: (1) Reator de leito fixo simples estágio; (2) Reator de leito fixo quatro estágios em série. (a) tanque de alimentação; (b) bomba peristáltica; (c) reator de leito fixo; (d) tanque coleta de produto.

Fonte: Wang et al. (2011)

2.14.2. Biorreator de leito fluidizado

Outra opção de biorreatores são os reatores de leito fluidizado que possuem algumas vantagens em relação aos reatores STR e PBR, tais como melhor sistema de

transferência de massa e calor, otimização do estado de mistura do meio reacional e ausência de obstrução do leito catalítico (DAMNJANZOVIC et al., 2012). Com a elevação da velocidade ascendente do fluido reacional, atinge-se um ponto, no qual a queda de pressão no leito torna-se equivalente à massa deste por unidade de superfície, fazendo com que as partículas percam o contato entre si e movimentem-se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização) acima da qual as partículas são carregadas para fora do reator (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996).

2.15. Processos de obtenção de biodiesel em regime contínuo

Devido ao elevado custo das lipases, o processo contínuo na produção de ésteres alquílicos utilizando lipases imobilizadas empacotadas em reator de leito fixo é considerado um processo viável (AL-ZUHAIR et al., 2011). Entretanto, informações para aplicação em escala industrial são ainda escassas.

Desta forma, grandes esforços devem ser feitos para investigar possíveis configurações de reatores que possam empregar lipases imobilizadas. No reator de leito fixo, as enzimas imobilizadas preenchem a coluna do reator através da qual o reagente é bombeado, é um dos tipos de biorreatores mais comumente empregado na biotecnologia, sendo de fácil operação e elevado volume de reator. Os PBRs possuem a vantagem de ter baixa força de cisalhamento sobre a enzima imobilizada, e isto gera longos períodos de estabilidade enzimática (HAMA et al., 2011a).

Alguns trabalhos empregando enzimas imobilizadas em reatores contínuos tem sido reportadas pela literatura especializada, devido aos benefícios já mencionados. Na Tabela 2.9 são listados alguns trabalhos publicados referentes à produção de biodiesel em reatores contínuos, em particular, de leito fixo.

Hsu et al. (2004) estudaram a etanólise contínua de óleo residual de fritura em reator de leito fixo (135 mm x 25 mm de diâmetro interno) empacotado com lipase *B. cepacia* imobilizada. As condições operacionais otimizadas foram: vazão de 1800 mL.h⁻¹; temperatura de 50 °C, razão molar etanol: óleo de 4:1.

Nie et al. (2006) realizaram experimentos visando a otimização da alcoólise de óleos vegetal e residual de fritura operando em regime batelada e contínuo, empregando

lipase de *Candida* sp. 99-125 imobilizada em membrana de algodão. A transesterificação com metanol, em processo contínuo, foi realizada em três reatores em série (10 mm x 180 mm de diâmetro interno) contendo 500 g de enzima, com três etapas de adição de um terço equivalente molar de metanol (uma adição em cada reator) e éter de petróleo foi utilizado como solvente.

Tabela 2.9. Processos de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel conduzida em reator de leito fixo.

Lipase	Óleo	Agente acilante	Meio	Referência
<i>B. cepacia</i>	residual	EtOH	Isento de solventes	HSU et al. (2004)
<i>Candidasp.</i> imobilizada em membrana de algodão	vegetal residual	MeOH	Éter de petróleo/ água	NIE et al. (2006)
Novozym 435	semente de algodão	MeOH	<i>terc</i> -butanol	ROYON et al. (2007)
Novozym 435	soja	MeOH	<i>n</i> -hexano <i>terc</i> -butanol	SHAW et al. (2008)
Novozym 435	palma residual	MeOH	<i>terc</i> -butanol	HALIM et al. (2009)
Novozym435	canola	MeOH	Isento de solventes	HAJAR et al. (2009)
Novozym 435	soja	Iso-propanol	Isento de solventes	CHANG et al. (2009)
Novozym 435 Lipozyme TL-IM	girassol	MeOH EtOH Iso-propanol	Ésteres de ácidos graxos	JACHMANIAN et al. (2010)
Lipase AK Lipase AY	palma	EtOH	Isento de solventes	TONGBORIBOON; CHEIRSILP; H-KITTIKUN, (2010)
Novozym 435	soja	MeOH	<i>terc</i> -butanol	CHEN et al. (2010)
Lipase <i>B.cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	babaçu	EtOH	Isento de solvente	SIMÕES (2011)
Lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA	palma	EtOH	<i>terc</i> -butanol	DORS et al. (2012)

O glicerol foi separado na saída de cada reator. A conversão do processo contínuo foi de 90% para o óleo vegetal e de 92% para o óleo residual. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi superior a 20 dias (NIE et al., 2006).

Royon et al. (2007) relataram a produção de biodiesel por metanólise do óleo de semente de algodão utilizando Novozym435 como catalisador em solvente *terc*-butanol. No processo batelada, foi possível observar que a inibição da enzima, causada pelo metanol insolúvel, foi eliminada pela adição do *terc*-butanol ao meio reacional, que também proporcionou um aumento no rendimento em ésteres. Um rendimento de 97 % foi observado em 24 h de reação a 50°C, em meio reacional contendo 32,5% de *terc*-butanol, 13,5% metanol e 54% óleo e carregamento catalítico de 0,017g de enzima.g⁻¹de óleo. Rendimento de 95 % foi obtido utilizando um reator de leito fixo (180 x 6 mm) com uma vazão de 9,6 mL.h⁻¹. O sistema contínuo operou por mais de 500 h sem apresentar expressiva redução no rendimento em ésteres.

O processo contínuo de metanólise do óleo de soja, catalisado pela Novozym 435 na presença de co-solvente, uma mistura de *n*-hexano: *terc*-butanol foi investigado por Shaw et al. (2008). O reator de leito fixo consistiu de um tubo de aço inoxidável de 250 x 25 mm empacotado com 1 g de enzima. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar os efeitos dos parâmetros de síntese e as melhores condições de síntese foram: temperatura 52 °C, vazão de 6 mL.h⁻¹ e razão molar de metanol:óleo de soja 4,3:1. O valor predito para a conversão foi de 74,2 % e o valor experimental de 75,2 %.

Halim et al. (2009) estudaram a metanólise do óleo de palma residual catalisada pela Novozym 435 com objetivo de determinar a condição ótima para o processo contínuo de transesterificação em um reator de leito empacotado, visando a possibilidade de aumento de escala de processo. As duas colunas com dimensões de 180 mm x 10 mm foram alimentadas em fluxo ascendente. Duas importantes variáveis do processo foram estudadas: altura do leito e vazão do substrato. As melhores condições para a transesterificação foram: 105,3 mm de altura do leito e vazão volumétrica de 34,2 mL.h⁻¹ de substrato, nestas condições o rendimento em ésteres metílicos foi de 79,0 % tendo um valor predito de 80,3%.

A metanólise enzimática do óleo de canola em reator de leito fixo (100 mm x 15 mm) contendo 2 g de Novozym 435 e pequenos pedaços de esponja natural em meio isento de solventes foi estudada por Hajar et al. (2009). O sistema foi constantemente recirculado durante 72 h e o metanol adicionado em 3 etapas, uma no início da reação (0 h), a segunda em 24 h e a terceira em 48 h. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para determinar o efeito das seguintes variáveis: fluxo do substrato, temperatura e razão molar

etanol: óleo de canola. As condições ótimas obtidas foram: fluxo de 378 mL.h^{-1} , temperatura de $38 \text{ }^\circ\text{C}$ e razão molar metanol: óleo de canola de 4,3:1. Estas condições foram repetidas por 6 ciclos (432 h) no reator de leito fixo, mantendo a conversão de ésteres metílicos superior a 97% (retiradas a cada 72 h).

A produção de biodiesel em um reator de leito fixo (aço inoxidável, 250 mm x 46 mm) mediada pela lipase Novozym 435, a partir de óleo de soja com isopropanol em sistema isento de solvente foi investigado por Chang et al. (2009). Os autores utilizaram como ferramenta o planejamento estatístico para determinar as condições otimizadas da reação. As condições que permitiram uma conversão de 75 % em ésteres isopropílicos no processo contínuo foram: fluxo = 6 mL.h^{-1} , temperatura = $51,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e razão molar de 1:4,14 (óleo:álcool), utilizando 1,7 g de lipase. A lipase mostrou excelente estabilidade operacional e o sistema foi operado durante sete dias sem redução da produção dos ésteres isopropílicos. Segundo os autores, o álcool isopropílico é um subproduto da indústria eletrônica e sua utilização reduziria os custos do processo de produção de biodiesel.

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

A síntese de biodiesel utilizando um reator de leito fixo com uma mistura de lipases (*Pseudomonas fluorescens*-AK e *Candida rugosa*-AY) para a transesterificação do óleo de palma com etanol em meio isento de solvente foi proposta por Tongboriboon; Cheirsilp; H-Kittikun (2010). O reator consistia de duas colunas empacotadas, na primeira as duas enzimas estavam misturadas e na segunda a lipase AY estava no fundo e a lipase AK no topo da coluna. O substrato foi alimentado em fluxo ascendente de 15 mL.h^{-1} e a temperatura foi controlada por circulação de água ($45 \text{ }^\circ\text{C}$). A conversão média do óleo de palma em biodiesel na coluna empacotada com as lipases separadas foi de apenas 14%. Esse resultado foi atribuído ao efeito inibitório do etanol sobre a atividade da lipase AY.

Na coluna empacotada com a mistura das lípases, a produção média de biodiesel foi da ordem de 22%. Para aumentar a conversão do óleo de palma em biodiesel, os autores aumentaram a altura da coluna de reação. O teor de biodiesel obtido na coluna empacotada com as lípases separadas atingiu valor máximo de 67% em 8 h, mas diminuiu para 59 % e 49 % após 12 h e 22 h, respectivamente. Neste mesmo estudo foi testada a adição gradual de etanol. Observou-se que a diferença da conversão de biodiesel quando todo o etanol foi adicionado em uma única etapa (89 %) em relação ao teste efetuado com adição gradual em três etapas (91 %) foi de apenas 2%. Assim, a adição em uma única etapa foi considerada a melhor escolha, pois a adição gradual do substrato pode impor limitações na configuração do reator, principalmente para operação em fluxo contínuo.

Chen; Chen (2011) produziram biodiesel a partir de óleo de soja com metanol na presença de *terc*-butanol (32,5 % em relação a massa de óleo) mediado pela lipase CALB imobilizada (Novozym 435). Este solvente aumentou a miscibilidade do metanol com óleos vegetais, bem como atuou como agente de regeneração da lipase. Empregando um planejamento estatístico de experimentos e análise dos resultados pela metodologia de superfície de resposta, foi investigada a influência das variáveis independentes (temperatura de reação, vazão volumétrica e razão molar do substrato) na variável resposta considerada (conversão molar). As condições ótimas para operação contínua do reator de leito fixo proporcionaram uma conversão máxima de 83,31% com vazão volumétrica de 6 mL.h⁻¹, 52,1 °C e a razão molar de 4:1 (álcool:óleo). O reator de leito operou por mais de 30 dias sem perda significativa na conversão de substrato.

Simões (2011) investigou a reação de etanólise enzimática do óleo de babaçu em sistema contínuo, meio isento de solvente. O estudo iniciou com a realização de um teste de desempenho empregando duas preparações de lipase imobilizadas, uma disponível comercialmente (Novozym 435) de eficiência comprovada na literatura e outra adquirida na forma solúvel e posteriormente imobilizada (suporte não comercial SiO₂-PVA) de eficiência comprovada em trabalhos anteriormente efetuados em regime de batelada empregando óleo de babaçu (DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2009). As conversões de biodiesel na etanólise enzimática do óleo de babaçu variaram de 65 a 87%, correspondendo a um tempo espacial de 7h em reator de leito fixo (diâmetro interno = 15 mm, altura = 55 mm) operando em modo contínuo (temperatura 50 °C, razão molar 1:7

(óleo de babaçu:etanol), vazão $0,78 \text{ mL.h}^{-1}$, empregando a lipase *B. cepacia* imobilizada em suporte não comercial, SiO_2 -PVA.

Dors (2012) avaliou a reação de alcoólise enzimática do óleo de palma com etanol em sistema contínuo na ausência e presença de solvente (terc-butanol). Para tanto, foram utilizadas as lipases de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano – álcool polivinílico (AK SiO_2 -PVA) e de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym 435) disponível comercialmente. Foi avaliado o comportamento da reação de alcoólise em reator do tipo tanque agitado com cesta e do tipo leito fixo. Os rendimentos mais elevados no reator do tipo cesta (48%) foram obtidos com um tempo espacial de 13 h, utilizando 30 % de terc-butanol em relação ao óleo. No reator de leito fixo, os rendimentos mais elevados (88%) foram obtidos utilizando a enzima AK imobilizada em SiO_2 -PVA, na presença de solvente.

3. OBJETIVOS

Na revisão bibliográfica buscou-se enfatizar a relevância dos óleos vegetais de composição predominantemente láurica (C 12:0) como matéria-prima para produção de biodiesel, bem como as configurações de reatores utilizados na síntese enzimática de ésteres alquílicos. Dentre as matérias-primas nacionais que se constituem fonte de ácidos graxos de cadeia média, destacam-se os óleos de babaçu, macaúba e coco que apresentam elevados teores de ácido láurico (36 a 48%).

Na revisão bibliográfica, observa-se que poucos trabalhos reportam a etanólise de óleos vegetais catalisada por enzimas imobilizadas em reatores contínuos de leito fixo em série, evidenciando o efeito de variáveis de processo e caracterizando e quantificando adequadamente o produto formado.

Assim, o presente trabalho de mestrado teve como meta alcançar os seguintes objetivos:

OBJETIVOS GERAIS:

- ⇒ Estudar a síntese de biodiesel em reator contínuo de leito fixo conectado sem série em meio isento de solvente;
- ⇒ Analisar a viabilidade técnica de obtenção de biodiesel neste sistema.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ⇒ Avaliar os efeitos dos seguintes parâmetros de processo na produção de biodiesel enzimático: razão molar entre os reagentes de partida e configuração dos reatores contínuos em série;
- ⇒ Segregar o glicerol formado através de colunas preenchidas com resinas de troca iônica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Fonte de lipase

Todos os experimentos foram realizados utilizando a lipase não específica de *Burkholderia cepacia* manufaturada pela Amano (Nagoya, Japão) adquirida na forma em pó (extrato enzimático) da Sigma-Aldrich (Brasil) e posteriormente imobilizada em suporte híbrido polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA), preparado pela técnica sol-gel (DA RÓS et al., 2010).

4.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: etanol anidro (99%, Cromoline), óleo de babaçu gentilmente cedido pela Pulcra Chemicals (Jacarei-SP); óleo da amêndoa de macaúba adquirido da Associação dos Pequenos Produtores Rurais de Riacho D`Antas e Adjacências-Fazenda Riacho D`Antas (Montes Claros-MG) e o óleo de coco obtido da Fres-coco (São Paulo-SP). As propriedades dos óleos testados estão apresentadas no APÊNDICE A.

4.1.3. Outros reagentes

Resina de troca iônica (Lewatit GF 202) foi gentilmente cedida pela Lanxess (Leverkusen, Alemanha). Corante alimentício Amarantho foi adquirido da Sigma-Aldrich (Brasil). Outros reagentes utilizados foram: solventes (terc-butanol e hexano, Cromoline), álcool polivinílico (88%, Acros Organics), HCl (mínimo 36%, Isofar), epicloridrina (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).

4.2. Equipamentos

4.2.1. Reator de leito fixo

Para a elaboração e adaptação dos reatores de leito fixo na produção de biodiesel, foram utilizadas colunas de vidro, bomba peristáltica, placa de agitação, tubulações de silicone, banho termostaticado, aquecedor e resistências flexíveis. As especificações dos

equipamentos estão descritas na Tabela 4.1. As conexões foram feitas por tubos de silicone e de marprene.

Tabela 4.1. Especificações dos itens adquiridos para a construção do reator de leito fixo.

Equipamento	Descrição	Marca
Bomba peristáltica	Bomba Peristáltica SJ-1211	Atto
Banho termostatizado	Banho Ultratermostato Criostato	Nova ética
Coluna de vidro	Diâmetro= 15 mm, Altura = 50 mm, Volume = 8,0mL	Construído em oficina especializada
Reator de vidro de coluna encamisado	Diâmetro= 15 mm, Altura = 55 mm, Volume = 10 mL	Construído em oficina especializada
Agitador magnético	Agitador Magnético MA 085	Marconi
Aquecedor	Aquecedor e Desumidificador de ar (2000W)	Mondial
Resistências flexíveis	Resistência flexível 2m/25W	KW Resistências Eletr.

4.2.2. Principais equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: balança analítica ID 50 Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.) para a determinação do teor de umidade dos suportes e derivados imobilizados; para as análises de atividade enzimática foram usados um banho termostatizado com agitação, Modelo 145 Marconi (Marconi) e um Titulador automático Modelo 794 BASIC TITRINO Metrohm (Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica Ltda, São Paulo, SP); incubadora Modelo 420 TECNAL (Equipamentos para laboratórios) para a imobilização da lipase; Cromatógrafo a gás Modelo GC-3800 VARIAN (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) para dosagens dos ésteres de etila. A viscosidade absoluta foi mensurada em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers, Inglaterra), empregando o cone CP 42. A densidade foi analisada em densímetro Anton Paar Modelo DMA 35N EX (Anton Paar, Áustria).

4.3. Metodologia experimental

4.3.1. Síntese e ativação do suporte híbrido

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado conforme metodologia descrita por Paula et al. (2008), pela mistura de 5mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 5 mL de etanol, 6 mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m.v⁻¹).

Esta mistura foi aquecida a 60 °C sob agitação, com adição de 0,2 mL de HCl concentrado. A mistura permaneceu 40 minutos reagindo, e após este tempo a preparação resultante foi mantida a 25 °C por no mínimo 48h até a completa dissolução. O composto foi triturado e classificado em peneira padrão série Tyler, onde o composto ultrapassava a peneira 42 MESH e ficava retido na peneira de 60 MESH. Em seguida, o suporte foi embebido em solução de agente de ativação epicloridrina 2,5% (v.v⁻¹) em solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹ e pH 7,5) na proporção massa de suporte:volume de solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 2h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado diversas vezes com água destilada e solução tampão de fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹ e pH 7,5) e em seguida encaminhado à estufa (60 °C) por 24h.

4.3.2. Imobilização da lipase *B. cepacia* em SiO₂-PVA ativada

A enzima foi imobilizada covalentemente ao suporte. O suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido:líquido de 1:10 (g.mL⁻¹) e mantido sob agitação por 2h. Após este período, o sólido decantou e o excesso de hexano foi removido por filtração a vácuo. Em seguida, sob o suporte foi adicionado PEG 1500 (1g suporte: 100 µL de PEG) e lipase na proporção de 300 mg de enzima.g⁻¹ suporte ativado (seco). O derivado imobilizado foi recuperado por filtração à vácuo e em seguida transferido para um dessecador acoplado a uma bomba à vácuo, no intuito, de reduzir o teor de umidade. A atividade hidrolítica do derivado imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácidos graxos livres na condições do ensaio (pH 7,0 e temperatura de 37 °C). Os resultados foram expressos em unidades de atividade por grama de sólido.

4.3.3. Teste com a resina de troca iônica (Lewatit GF 202)

A resina Lewatit GF 202 foi desenvolvida pela Lanxess especialmente para purificação de biodiesel removendo glicerol e sabão. As propriedades físico-químicas desta resina de troca iônica estão disponíveis no APÊNDICE B (LANXESS, 2013).

No teste, o efluente do primeiro reator PBR permeia em fluxo descendente pela coluna de vidro recheada com a resina de troca iônica. O fluxo foi controlado pela bomba

peristáltica, na vazão requerida do processo. A temperatura na coluna extratora foi mantida em 25 °C (temperatura ambiente).

4.4. Testes operacionais

4.4.1. 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 – 913AJ05.016). 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 de 1,0 mL de meio reacional, cronometrando-se o tempo.

4.4.2. 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 (Figura 4.1). 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 (10% m.v⁻¹) diluída no meio reacional óleo de coco 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 correlacionando a leitura da absorbância em função da concentração de traçador.



Figura 4.1. Ilustração do sistema durante o teste traçador demonstrando a distribuição do corante nos reator PBR duplo estágio e na coluna extratora de glicerol

Para a realização do ensaio de Distribuição do Tempo de Residência utilizou-se dois reatores de capacidade nominal de 10 mL, cada um, empacotado com 6,94 gramas de lipase imobilizada em SiO₂-PVA inativada. O traçador (corante lipossolúvel CI 61554) na concentração de 10% em meio reacional foi injetado com o auxílio de uma seringa de 5,0 mL, tendo sido injetado 0,791 g da mistura. O reator foi alimentado com meio reacional numa vazão fixa de 1,56 mL.h⁻¹, sendo retiradas amostras na saída da segunda coluna a cada 1 hora por um período total de 38 h, considerando-se como tempo inicial do ensaio o momento da injeção do traçador.

Os valores de concentração do corante na saída do reator foram calculados segundo equação obtida na curva de calibração. Por meio dos valores determinados, foi plotado um gráfico de concentração do corante (mg.mL⁻¹) em função do tempo e um modelo matemático exponencial foi ajustado aos pontos obtidos. A função da DTR, $E(t)$ foi calculada pela equação 4.1, considerando constante a vazão volumétrica utilizada.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (4.1)$$

Em que: $C(t)$ = a concentração do corante no tempo t (g.mL⁻¹) e t = tempo (h). Para determinar o valor do denominador da equação 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 4.2.

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt \quad (4.2)$$

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 4.3.

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - t_m)^2 \cdot E(t) dt \quad (4.3)$$

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 4.4.

$$\sigma^3 = \frac{1}{\sigma_2^3} \cdot \int_0^{\infty} (t - t_m)^3 \cdot E(t) \cdot dt \quad (4.4)$$

A magnitude desse momento mede a extensão em que a distribuição é assimétrica em uma ou outra direção em relação à média (FOGLER, 2002). Para esse modelo, analise-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 4.5.

$$n = \frac{\tau^2}{\sigma_2} \quad (4.5)$$

4.5. Montagem experimental

4.5.1. Reator de leito fixo (um estágio)

A representação esquemática dos ensaios é demonstrada na Figura 4.2, sendo composto de um reator de vidro e conexões. A síntese de biodiesel foi realizada em colunas de vidro encamisada com capacidade nominal de 10 mL. 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. Foram realizados 6 experimentos. Em cada experimento a coluna foi empacotada com uma suspensão do derivado imobilizado no meio reacional e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna por um período de 3 tempos espaciais. Esta metodologia possibilitou a retirada de bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna. As amostras foram acondicionadas e estocadas a -2°C, para posterior análise por cromatografia de fase gasosa. Os resultados foram expressos em porcentagem mássica dos ésteres obtidos.

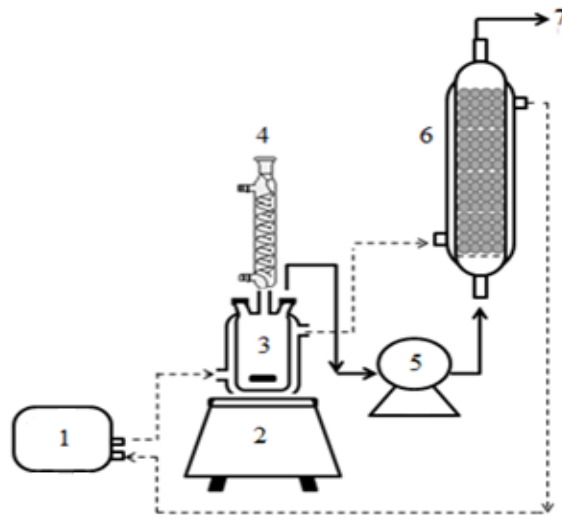


Figura 4.2. Esquema experimental do reator de leito fixo simples estágio: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.

4.5.2. Reator de leito fixo conectados em série dois estágios

A representação esquemática dos ensaios é demonstrada na Figura 4.3, sendo composto de dois reatores, dispostos em série, com uma coluna extratora de glicerol entre cada reator e conexões. A síntese de biodiesel foi realizada em reatores de vidro encamisados com capacidade nominal de 10 mL. O substrato foi alimentado por meio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto), conforme descrito no item 4.5.1.

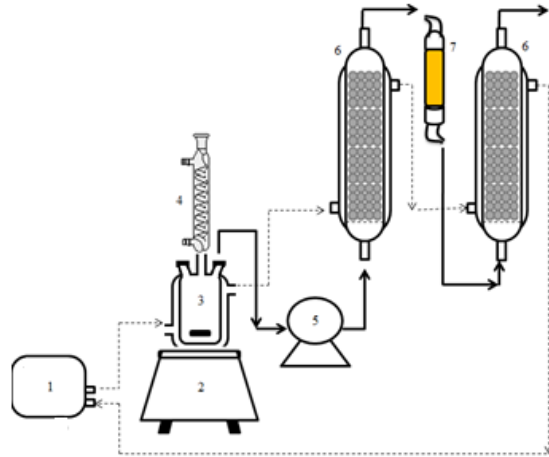


Figura 4.3. Esquema experimental dos reatores de leito fixo em duplo estágio: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Coluna extratora de glicerol; 8- Saída de produto.

4.6. Síntese de biodiesel em reator de leito fixo (PBR)

A mistura reacional composta por óleo vegetal e etanol foi mantida em um vaso de alimentação, sob agitação magnética (150 rpm) e temperatura de 50°C. O substrato foi bombeado através da coluna do reator de leito fixo com auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto) na vazão requerida. Ao final dos experimentos, a enzima foi recuperada e lavada com terc-butanol para a remoção de substratos e produtos eventualmente retidos nas partículas da matriz. A atividade hidrolítica inicial e residual dos substratos imobilizados foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva (item 4.9.3), empregando o modelo de inativação de primeira ordem foram calculados as constante de inativação (K_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), pelas equações 4.6 e 4.7, respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kd.t} \quad (4.6)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{kd} \quad (4.7)$$

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

4.7 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 secada à temperatura ambiente. A resina ativada foi acondicionada em uma coluna de vidro, através da qual o efluente do primeiro reator PBR permeava. O fluxo foi controlado pela bomba peristáltica, na vazão requerida do processo. A temperatura na coluna extratora foi mantida em 25 °C (temperatura ambiente). A recuperação da resina, após o processo, ocorreu por meio de lavagens sucessivas com metanol e secagem à temperatura ambiente.

4.8. Purificação das amostras de biodiesel

Inicialmente, as amostras foram submetidas à lavagens sucessivas com água destilada. Em cada lavagem, foi utilizado aproximadamente o mesmo volume de água em relação ao volume da mistura reacional. A mistura foi transferida para um funil de decantação, agitada e mantida em repouso por tempo necessário até a separação das fases. A fase superior é constituída pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à centrifugação (1569 g/15 min) e posteriormente à evaporação em rota-evaporador (70°C/30 min) para a retirada de traços de etanol e água remanescentes. Para finalizar a etapa de purificação, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro.

4.9. Métodos de análise

4.9.1. Densidade do suporte híbrido de SiO₂-PVA

A densidade do sólido foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com água à temperatura ambiente. Adicionou-se uma massa conhecida de suporte no interior do balão, as mesmas foram imersas em água destilada sob vácuo para eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi aferido com água, determinando o volume ocupado pelo sólido por diferença de massa após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos.

4.9.2. Teor de umidade

O conteúdo de água do suporte e dos derivados imobilizados foi determinado em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50). A análise consiste na medida da perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (aproximadamente 0,1g) em balança analítica com infravermelho durante 15 minutos à 100°C.

4.9.3. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da lipase *B. cepacia* nas formas livre e imobilizada foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva, de acordo com metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos livres liberados na reação foram titulados com solução de KOH (0,025 mol.L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de teste. As atividades foram calculadas de acordo com a Equação 4.8 e expressa em µmol.g⁻¹.min⁻¹ (U.g⁻¹).

$$A = \frac{(v_a - v_b) \cdot C \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (4.8)$$

em que: v_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra, v_b = volume do KOH gasto na titulação do branco, M = concentração da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa da amostra seca, em gramas.

4.9.4. Dosagem dos ésteres de etila

Os ésteres de etila formados foram dosados por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo a gás, Varian 3800), com detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável 5% DEGS em Chromosorb WHP, 80/100 mesh (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), adotando metodologia previamente estabelecida por Urioste et al. (2008). Nitrogênio foi usado como gás de arraste. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 90 °C por 3 min, 120 °C por 10 min e 170 °C por 15 min sendo aquecida numa taxa de 25°C.min⁻¹. As condições para determinação dos ésteres de etila são apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Condições para determinação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.

Padrão interno	Hexanol	
Programa de temperaturas	90 °C (3min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min)	
Taxa de variação	25 °C.min ⁻¹	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Preparo da amostra	1:3 (amostra - hexano)	
Preparo para injeção	1:1 (amostra - padrão interno)	
	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

4.9.5. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

As análises de ressonância nuclear magnética protônica (RMN¹H) das amostras de biodiesel foram realizadas em um espectrofotômetro Varian modelo Mercury 300 MHz. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDC13), utilizando-se como referência o tetrametilsilano. A conversão do triglicerídeo em seus respectivos ésteres foi determinada pela técnica de RMN empregando a equação validada por Paiva et al.(2013).

4.9.6. Determinação da viscosidade absoluta

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 realizadas a 40 °C, empregando aproximadamente 0,5 mL de amostra.

4.9.7. Densidade do biodiesel

Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35n EX (Anton Paar). As medidas foram realizadas a 15 °C, empregando-se 2,0 mL da amostra purificada.

4.10. Cálculos

4.10.1. Rendimentos da transesterificação

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila ($\sum M_e$). 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 (4.9a) 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 4.9b). 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 ($\sum M_e$), conforme mostrado na Equação (4.9c).

$$\mathcal{M}e = \frac{(\mathcal{M}_o \cdot \mathcal{M}M_a)}{\mathcal{M}M_e} \quad (4.9a)$$

$$\mathcal{M}o = C_a \cdot \mathcal{M}i \quad (4.9b)$$

$$\mathcal{R} = \frac{\mathcal{M}_t}{\sum \mathcal{M}_e} \cdot 100 \quad (4.9c)$$

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 vegetal (óleo de babaçu, macaúba e coco);(g) MM_a = massa molecular de cada 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 vegetal testado ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); M_i = massa inicial de óleo vegetal (g); R = rendimento (%).

4.10.2. Tempo espacial (τ)

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 4.10 (a), (b) e(c):

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (4.10a)$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (4.10b)$$

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{w}{\rho} \quad (4.10c)$$

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, $V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator, w = massa do catalisador seco (g), ρ = densidade do biocatalisador seco (g.mL^{-1}).

4.10.3. Produtividade

A produtividade foi calculada de acordo com a Equação 4.11:

$$P = \frac{C}{\tau} \quad (4.11)$$

Em que: P = produtividade ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); C = concentração de ésteres etílicos na saída do reator ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1}$); τ = tempo espacial (h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química dos óleos vegetais testados

As propriedades físico-químicas dos óleos, gorduras e seus respectivos ésteres alquílicos, variam de acordo com a composição dos ácidos graxos presentes em cada matéria-prima (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010). Em relação à composição em ácidos graxos, Pinzi et al. (2009) reportaram que matérias-primas adequadas para a síntese de biodiesel devem conter: i) elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados; ii) baixo teor de ácidos graxos poli-insaturados e iii) quantidade controlada de ácidos graxos saturados. Este perfil de ácidos graxos permite alcançar um biodiesel com propriedades que atendem as normas estabelecidas (PINZI et al., 2009).

A Tabela 5.1 apresenta o perfil de ácidos graxos dos óleos vegetais testados no presente trabalho, na qual verifica-se que todos os óleos apresentam elevado teor de ácido láurico (36-47%), seguido de ácido mirístico (10,4-19,1%) e oleico (6,1-28,1%). A elevada porcentagem de ácido oleico ($\approx 28,1\%$) presente no óleo de macaúba confere maior fluidez desta matéria-prima à temperatura ambiente, o que pode facilitar a operação do reator de leito fixo.

Tabela 5.1. Composição em ácidos graxos (% m.m⁻¹) dos óleos vegetais testados.

Ácido graxo		Babaçu	Macaúba	Coco
C8:0	Caprílico	3,5	5,6	9,0
C10:0	Cáprico	4,5	3,9	6,5
C12:0	Láurico	44,7	36,3	47,1
C14:0	Mirístico	17,5	10,4	19,1
C16:0	Palmítico	9,7	8,7	8,0
C18:0	Esteárico	3,1	3,6	2,6
C18:1	Oleico	15,2	28,1	6,1
C18:2	Linoleico	1,8	3,4	1,6
Saturado		83	68,5	92,3
Monoinsaturado		15,2	28,1	6,1
Poli-insaturado (2)		1,8	3,4	1,6
Grau de Insaturação		17,0	31,5	7,7

5.2. Propriedades da lipase de *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA

Para a realização dos experimentos foram preparadas dez bateladas da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, de acordo com metodologia descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.2. O derivado imobilizado e o suporte (SiO₂-PVA) foram caracterizados quanto às suas propriedades morfológicas, utilizando o método de Brunauer, Emmett e Teller a partir de isotermas de adsorção de N₂ a 77k, conforme apresentado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Propriedades morfológicas do suporte e da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA.

Material	Área superficial específica (m ² .g ⁻¹)	Volume de poros específico (cm ³ .g ⁻¹)
Suporte	461	0,28
Derivado imobilizado	337	0,25

A atividade hidrolítica média obtida foi da ordem de 2038 ± 141 (U.g⁻¹) e a umidade inferior a 12%. A massa específica da enzima imobilizada em SiO₂-PVA determinada foi de 1,865 g.mL⁻¹. Conforme dados apresentados na Tabela 5.2 nota-se a deposição da lipase na superfície do suporte, em função da redução da área superficial, confirmando a imobilização da enzima. Além disso, o volume de poros do derivado imobilizado foi também menor em relação ao suporte. O Apêndice C apresenta as propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, conforme dados publicados por Da Rós et al. (2010).

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

Para esta análise foram utilizados: bomba peristáltica, mangueira de marprene com diâmetro interno de 0,5 mm e frasco de alimentação aquecido na temperatura de reação, com agitação e condensador para evitar a perda de etanol por evaporação. O ajuste dos parâmetros testados foi efetuado nas condições estabelecidas para a condução dos experimentos: temperatura de 50 °C, substrato preparado na razão molar 1:7 (óleo vegetal: etanol) para os experimentos 1 a 3 e razão molar 1:12 (óleo vegetal: etanol) para os experimentos 4 a 7. O ajuste foi feito manualmente no painel de controle da bomba e a vazão foi determinada por meio da verificação do tempo necessário para preencher 1,0 mL do meio reacional, medido em proveta. O Apêndice D lista os valores de tempo e volume

empregados para medição das vazões ajustadas. O cálculo do tempo espacial é apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Cálculos dos parâmetros operacionais do reator de leito fixo

Experimento	Cálculo			
	Volume da enzima (mL)	Volume útil do leito (mL)	Vazão média (mL.h ⁻¹)	Tempo espacial (h)
	$V_{enzima} = \frac{m_{enzima}}{d_{cristalina}}$	V _{útil} = V _{reator} – V _{enzima}	Ajuste	$\tau = \frac{V_{útil}}{vazão}$
1	4,17	5,83	0,78	7,49
2	4,34	5,66	0,77	7,36
3	4,46	5,54	0,77	7,23
4	8,68	11,08	0,65 – 1,11	17 - 10
5	8,68	11,08	0,79 – 1,11	14 - 10
6	8,68	11,08	0,80	13,90
7	8,68	11,08	1,52	7,31

5.4. Operação do reator de leito fixo

Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 50°C, de acordo com as condições descritas no item 4.5.1 e listadas na Tabela 5.4. Nos experimentos 1 a 3 foram efetuados testes do aparato experimental, levantamento de dados operacionais e avaliação do desempenho PBR em um único estágio utilizando os três óleos láuricos. Os experimentos subsequentes (4 a 7) foram conduzidos em reatores em duplo estágio utilizando os óleos de macaúba e coco.

Tabela 5.4. Descrição dos experimentos realizados neste trabalho

Experimento	Óleo vegetal	Razão molar (óleo:etanol)	Tempo espacial (h)	Objetivo
1 2 3	Babaçu Macaúba Coco	1:7	7	Testes operacionais e análise de desempenho do PBR de simples estágio
4	Macaúba	1:12	17 14 10	Reator PBR em duplo estágio e variação do tempo espacial
5	Coco		14 12 10	
6 7			14 7	

5.5. Etanólise de óleos láuricos catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA em reator de leito fixo (um estágio)

Adotando a configuração de PBR simples estágio, foram testados três óleos vegetais láuricos nas mesmas condições operacionais, conforme aparato experimental ilustrado na Figura 5.1.

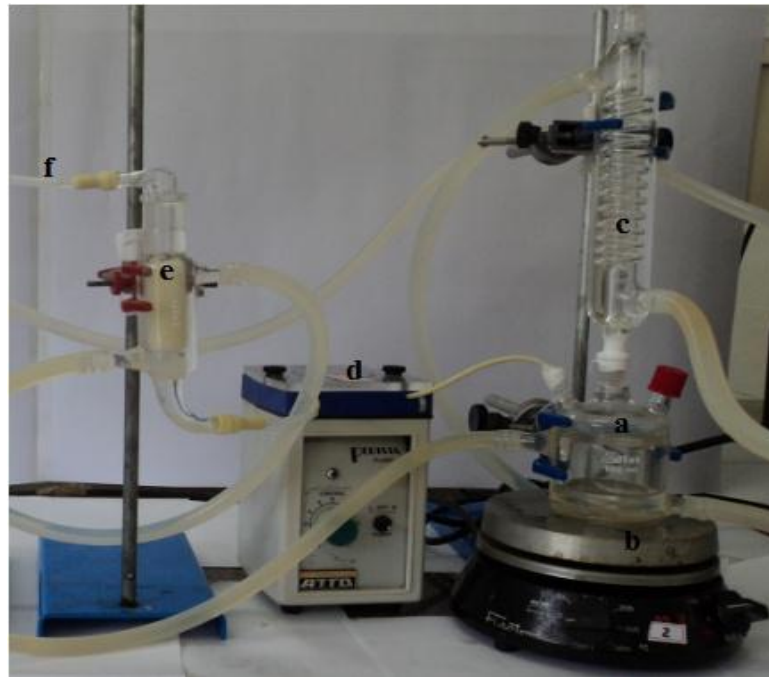


Figura 5.1. Montagem experimental da etanólise contínua de óleos vegetais láuricos em reator de leito fixo simples estágio: (a) Vaso de alimentação contendo meio reacional óleo:etanol razão molar (1:7); (b) Agitador magnético; (c) condensador; (d) Bomba peristáltica; (e) Reator PBR empacotado com lipase imobilizada em SiO₂-PVA; (f) Saída de produto.

Para o óleo de babaçu (Figura 5.2) o regime estacionário foi alcançado em 72 h e a concentração média em ésteres de etila foi de $60,6 \pm 4,2$ (g.g⁻¹), correspondendo a rendimento médio de transesterificação de $78,0 \pm 5,4$ % e produtividade média de $81,9 \pm 6,0$ mg_{éster}.g⁻¹_{meio}.h⁻¹. 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 foi de 1017 ± 23 U.g⁻¹, o que correspondeu a uma perda de atividade da ordem 54% em relação à atividade inicial. Aplicando as equações 4.6 e 4.7 (seção 4.6) foram obtidos os valores de $1,2 \cdot 10^{-3}$.h⁻¹ e 559h para a constante de inativação e tempo de meia-vida, respectivamente.

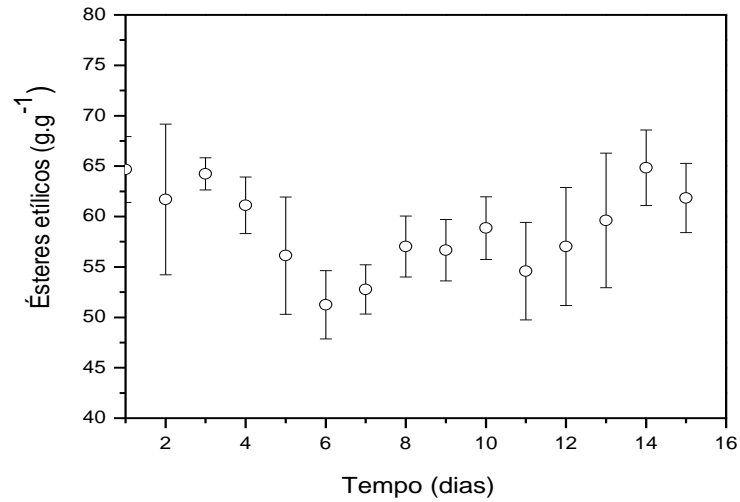


Figura 5.2 Formação de ésteres na etanólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo operando de modo contínuo (50° C, razão molar óleo vegetal etanol 1:7, tempo de residência 7 h) empregando lipase *B. cepacia* imobilizada em sílica-PVA como biocatalisador

Para o óleo de macaúba (Figura 5.3) o regime estacionário foi alcançado em 24 h (3 tempos espaciais) e o valor médio obtido em concentração mássica de ésteres de etila foi $65,4 \pm 4,8 \text{ \% (m.m}^{-1}\text{)}$, correspondendo a rendimento de transesterificação de $86,3 \pm 6,5\%$ e produtividade de $93,4 \pm 6,9 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ meio} \cdot \text{h}^{-1}$.

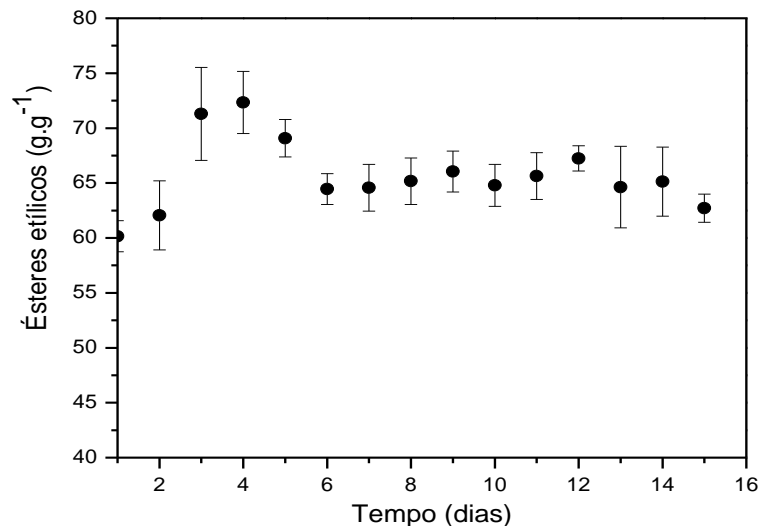


Figura 5.3. Perfil da formação de ésteres na etanólise do óleo de macaúba em reator de leito fixo operando de modo contínuo (50°C, razão molar óleo vegetal: etanol 1:7, tempo de residência 7 h) empregando lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA como biocatalisador.

Ao final de 15 dias de processamento contínuo da etanólise do óleo de macaúba, a enzima imobilizada foi recuperada e tratada com terc-butanol. A atividade hidrolítica residual do derivado imobilizado foi de $1580 \pm 107 \text{ U.g}^{-1}$, o que correspondeu a uma perda de atividade da ordem 41% em relação à atividade inicial. Aplicando as equações 4.6 e 4.7, foram obtidos os valores de $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e 509 h para a constante de desativação térmica e tempo de meio-vida, respectivamente.

No etanólise do óleo de coco (Figura 5.4a,b) o regime estacionário foi alcançado em 72 h e o valor médio obtido em concentração mássica de ésteres de etila $59,3 \pm 4,1\%$ (m.m^{-1}), correspondendo a rendimento médio de transesterificação de $87,5 \pm 6,0\%$ e produtividade de $84,8 \pm 5,5 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meio}} \cdot \text{h}^{-1}$. As Figuras 5.4a e 5.4b apresentam o comportamento dinâmico da concentração total em ésteres de etila formados na reação enzimática. A atividade residual da lipase recuperada foi da ordem de $1101 \pm 43 \text{ U.g}^{-1}$, correspondendo uma perda de atividade enzimática de 48 % e revelando um tempo de meia-vida de 447 horas. Os resultados obtidos na etanólise do óleo de coco em reator PBR simples estágio, foram similares aos obtidos com os óleos de babaçu e macaúba.

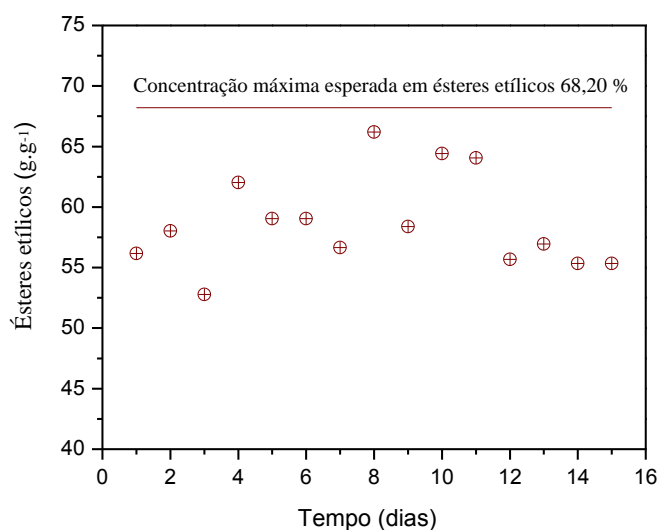


Figura 5.4a. Concentração total em ésteres obtida na etanólise enzimática do óleo de coco em reator PBR, operando em modo contínuo (temperatura 50°C , razão molar 1:7 (óleo de coco: etanol), vazão $0,78 \text{ mL/h}$, tempo espacial 7 h) empregando a lipase *B. cepacia* imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$

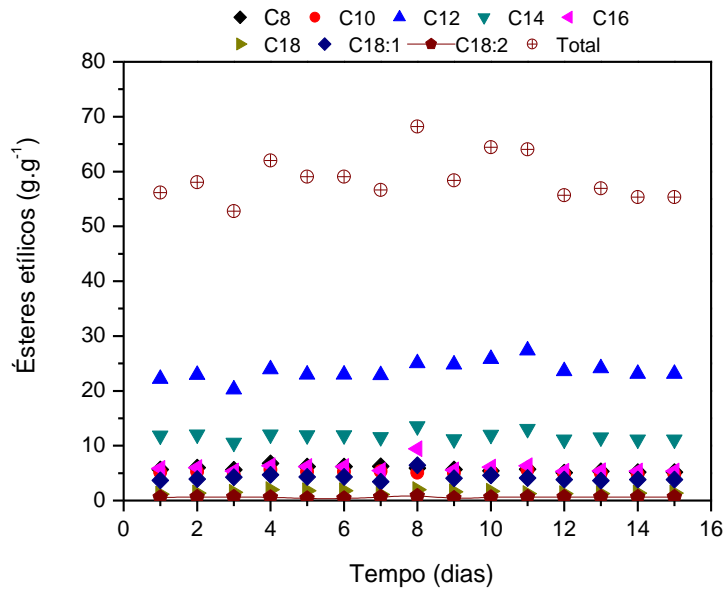


Figura 5.4b. Perfil de formação dos ésteres na etanolise contínua do óleo de coco em reator PBR, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, em meio isento de solvente.

Informações adicionais dos experimentos realizados são apresentadas na Tabela 5.5 que permite a comparação do desempenho do reator de um estágio para os três óleos láuricos. Verifica-se que apesar do biocatalisador ter apresentado elevado tempo de meia-vida (> 373 horas), nas condições testadas, independente do óleo usado a concentração máxima de ésteres esperada não foi alcançada (68,2%) limitando os rendimentos para valores máximos de 87,5 %.

Tabela 5.5. Análise de desempenho da etanolise de óleos vegetais láuricos (babaçu, macaúba e coco) em reator PBR simples estágio, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em sílica-PVA

Parâmetro	Óleo de babaçu	Óleo de macaúba	Óleo de coco
Biocatalisador (atividade inicial U.g ⁻¹)	2220 ± 84	2670 ± 110	2149 ± 209
Biocatalisador (atividade residual U.g ⁻¹)	1280 ± 70	1580 ± 107	1101 ± 43
Tempo de operação do reator (dias)	15	15	15
Constante desativação térmica(k _d , h ⁻¹) x10 ³	1,53	1,45	1,86
Tempo de meia-vida do biocatalisador (h)	453	478	373
Concentração em ésteres (% g _{éster} .g ⁻¹ meio)	60,6 ± 4,2	65,0 ± 5,0	59,3 ± 4,1
Produtividade (mg _{éster} .g ⁻¹ substrato.h ⁻¹)	81,9 ± 6,0	93,4 ± 6,9	84,8 ± 5,5
Rendimento de transesterificação (%)	78,0 ± 5,4	85,8 ± 6,6	87,5 ± 6,0
Viscosidadecinemática (mm ² .s ⁻¹)	9,7 ± 1,4	6,8 ± 0,9	6,6 ± 1,7

Entretanto, é importante mencionar que o biorreator contínuo geralmente exhibe menores rendimentos, em comparação aos rendimentos alcançados em reator descontínuo. Comparando os dados obtidos neste trabalho com aqueles descritos por Carvalho (2011) usando o mesmo derivado imobilizado e óleos vegetais láuricos, verifica-se na Tabela 5.6 que o desempenho alcançado em reator de batelada foi superior ao reator contínuo tanto em termos de conversão de substrato como propriedades do biodiesel.

A redução do rendimento do sistema contínuo de produção de biodiesel pode ser um resultado da elevada viscosidade do substrato que impediu um fluxo uniforme através dos interstícios da matriz de imobilização (SiO₂-PVA). Outra razão pode ser associada a adsorção do glicerol na superfície do suporte durante o estado estacionário, logo a quantidade acumulada de glicerol pode ser maior do que num processo em estado não-estacionário operada em regime descontínuo.

Desta forma, visando minimizar efeitos anteriormente mencionados, duas estratégias foram adotadas: (i) aumento da razão molar óleo:etanol, promovendo desta forma redução da viscosidade do meio reacional; e (ii) incorporação de uma coluna extratora de glicerol, minimizando os efeitos restritivos do glicerol sobre o biocatalisador.

Tabela 5.6. Propriedades das amostras de biodiesel purificadas obtidas a partir dos óleos de babaçu e macaúba (reator descontínuo) catalisada pela lipase *B.cepacia* imobilizada em sílica-PVA e usando etanol como agente acilante.

Parâmetro	Óleo de babaçu	Óleo de macaúba
Rendimento de transesterificação (%)	99,1±0,4	99,2±0,2
Viscosidade Cinemática à 40°C (mm ² .s ⁻¹)	4,28	4,56
Massa específica à 20°C (kg.m ⁻³)	877	880
Número de cetano	63	61

Reações de transesterificação conduzidas a 50°C, razão molar óleo:etanol de 1:7 por 24h.

Fonte: Carvalho (2011)

5.6. Efeito do glicerol na etanólise contínua no reator PBR

Em razão do efeito negativo do glicerol formado na etanólise enzimática, torna-se desejável examinar o comportamento deste subproduto no leito catalítico (XU et al., 2011). Um método simples de tingimento empregando o corante Amarantho foi descrito por Xu et al. (2011), para elucidar o comportamento do glicerol na etanólise do óleo de colza, verificando a partição do glicerol *in situ* e seu acúmulo sobre a enzima imobilizada.

Neste contexto, no presente trabalho, testes foram conduzidos para verificar a afinidade do glicerol pela lipase *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA. Para tanto, em misturas preparada com etanol, biocatalisador e glicerol (em diferentes proporções 0-10%), foram adicionados o corante Amaranto na proporção de 10% (g.g⁻¹) em relação ao derivado imobilizado. As fotos ilustradas na Figura 5.5 mostram a afinidade do glicerol (indicado pela presença do corante de cor vermelha) durante a investigação no sistema multifásico. De acordo com a literatura, o glicerol forma uma camada na superfície da lipase imobilizada (XU et al., 2011), logo, o glicerol adicionado à mistura reacional preparada foi identificada pelo corante (cor vermelha), sendo que nas fotos (1) e (7), o glicerol apresentou afinidade tanto para o suporte híbrido formado por SiO₂-PVA, quanto para a lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA.

Esses resultados são similares aos reportados por Xu et al. (2011) que investigaram a afinidade do suporte a base de sílica e da Novozym 435 pelo glicerol empregando o mesmo corante. Os resultados obtidos mostraram que o suporte à base de sílica apresentou grande afinidade pelo glicerol, em razão das propriedades hidrofílicas do material. Entretanto, a Novozym 435 demonstrou afinidade moderada, sugerindo que a lipase imobilizada no suporte diminuiu o caráter hidrofóbico do suporte, em função dos grupos polares presente na enzima.

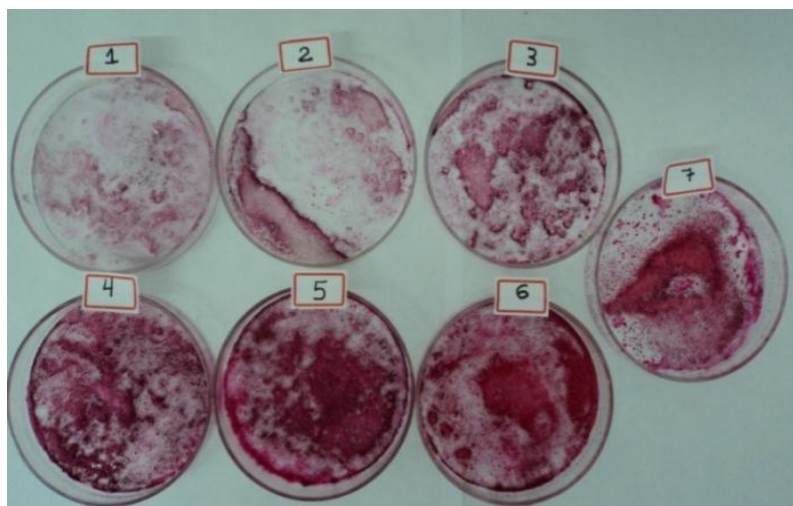


Figura 5.5. Afinidade do glicerol pelo suporte de SiO₂-PVA e pela lipase imobilizada em SiO₂-PVA (derivado imobilizado): (1) derivado imobilizado e 0 % glicerol; (2) derivado imobilizado e 2 % glicerol; (3) derivado imobilizado e 4 % glicerol; (4) derivado imobilizado e 6 % glicerol; (5) derivado imobilizado e 8 % glicerol; (6) derivado imobilizado e 10 % glicerol; (7) suporte SiO₂-PVA e 10 % glicerol.

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

5.7. Etanólise dos óleos de macaúba e coco em reator PBR em duplo estágio catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA

O desempenho da montagem experimental consistindo de reatores de leito fixo em duplo estágio e incorporando uma coluna extratora de glicerol foi testado na etanólise dos óleos de macaúba e coco, em meio isento de solventes nas mesmas condições operacionais (Figura 5.6).

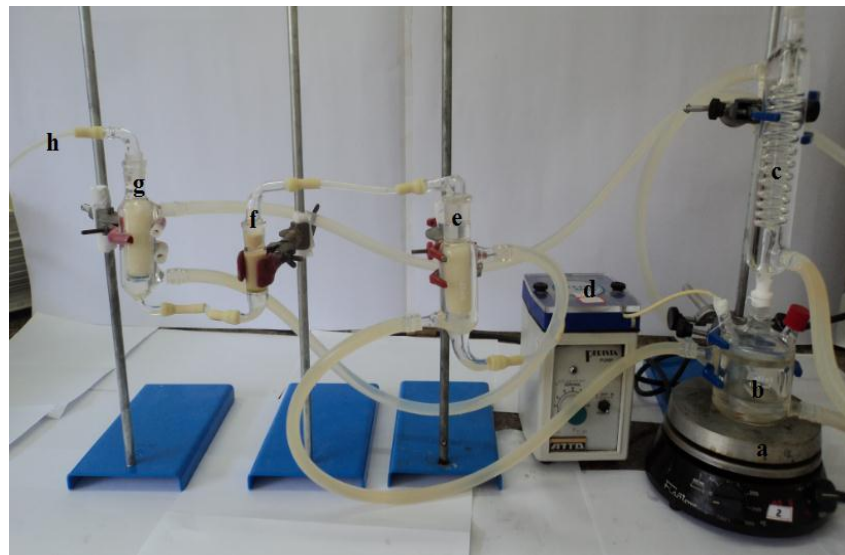


Figura 5.6. Montagem experimental utilizada na etanólise contínua dos óleos vegetais láuricos em reator de leito fixo duplo estágio: (a) Agitador magnético;(b) Vaso de alimentação contendo o meio reacional óleo vegetal e etanol, razão molar óleo:etanol (1:12);(c) condensador;(d) Bomba peristáltica;(e) Primeiro reator PBR empacotado com lipase *B.cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA;(f) Coluna extratora de glicerol (Lewatit GF 202);(g) Segundo reator PBR empacotado com lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA; (h) Saída de produto (Ésteres etílicos)

A mistura reacional óleo e etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12) foi bombeada através dos reatores contendo cada um 7,8 g da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA (carregamento catalítico de 15000 U), com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto) na vazão adequada. Na saída do primeiro reator, foi acoplada uma coluna contendo resina Lewatit para a adsorção do glicerol formado. O tempo espacial foi

calculado de acordo com Levenspiel (2000). O desempenho do sistema operacional foi avaliado para diferentes vazões volumétricas correspondendo a tempos espaciais entre 10 e 17 h. Para cada condição, foi determinada a influência do tempo espacial na concentração de ésteres de etila formados, rendimentos de transesterificação e produtividade (Figuras 5.7 e 5.8).

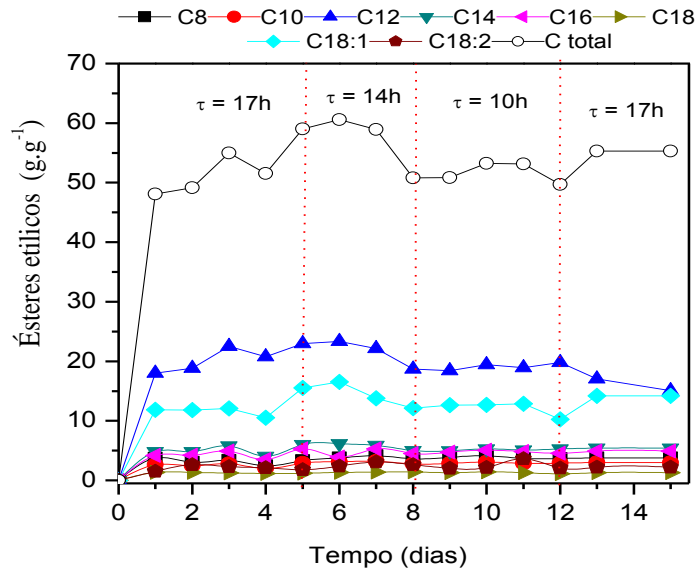


Figura 5.7. Perfil de formação dos ésteres na etanolise contínua do óleo de macaúba em reator PBR em duplo estágio para diferentes vazões volumétricas.

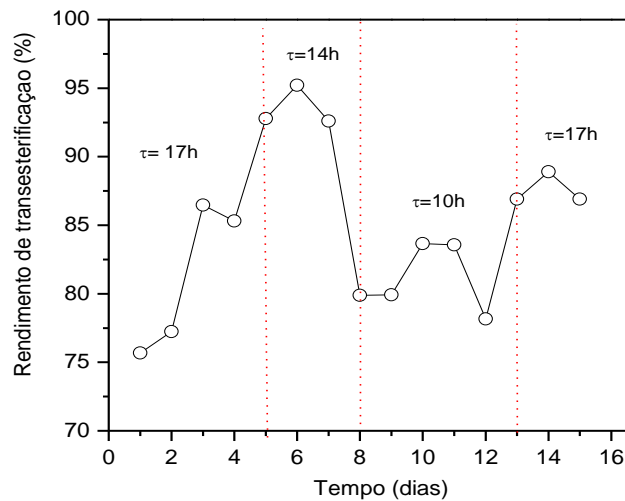


Figura 5.8. Rendimento em ésteres na etanolise contínua do óleo de macaúba em reator PBR em duplo estágio, empregando diferentes vazões volumétricas.

A Figura 5.7 mostra a concentração dos ésteres de etila derivados do óleo de macaúba para diferentes tempos espaciais na saída do segundo reator. A alteração do tempo espacial ao longo do processo interferiu na formação de ésteres de etila, resultando numa concentração máxima de 60,6 % (m.m⁻¹), correspondendo a rendimento máximo de transesterificação de 95,2 % (Figura 5.8). Esses valores são 20% superiores aos alcançados no primeiro estágio.

Na faixa de variação do fluxo de alimentação estudada, verifica-se que o melhor desempenho do sistema foi constatado para tempo espacial de 14 h (vazão volumétrica = 1,04 mL.h⁻¹). Nessa condição 93,5 ± 1,4% dos ácidos graxos presentes no óleo de macaúba foram convertidos nos ésteres de etila correspondentes, alcançando uma produtividade média de 45,9 ± 0,90 mg_{éster}.g⁻¹_{meio}.h⁻¹. Esses resultados se comparam favoravelmente aos dados descritos na literatura, principalmente se for considerado que os experimentos foram efetuados em meio reacional isento de solventes.

Deve ser ainda destacado que nenhuma evidência de problemas de perda de desempenho do reator em função da atividade catalítica do leito foi constatada, conforme confirmado por meio da quantificação da atividade hidrolítica ao final do experimento, revelando uma redução global de 38,4% em relação à atividade hidrolítica inicial. Aplicando as Equações (4.6) e (4.7) determinou-se a constante de inativação (1,9 h⁻¹) e o tempo de meia-vida do biocatalisador (363h), respectivamente.

No experimento subsequente, foi investigado o efeito da variação do tempo espacial no rendimento de transesterificação do óleo de coco, razão molar óleo de coco:etanol (1:12) e temperatura 50°C. Os tempos espaciais variaram de 10 a 14 h. A Figura 5.9 mostra o perfil em concentração mássica de ésteres de etila que variaram de 45,0 a 55,2% (m.m⁻¹), correspondendo a produtividades na faixa de 33 a 46 mg_{éster}.g⁻¹_{meio}.h⁻¹.

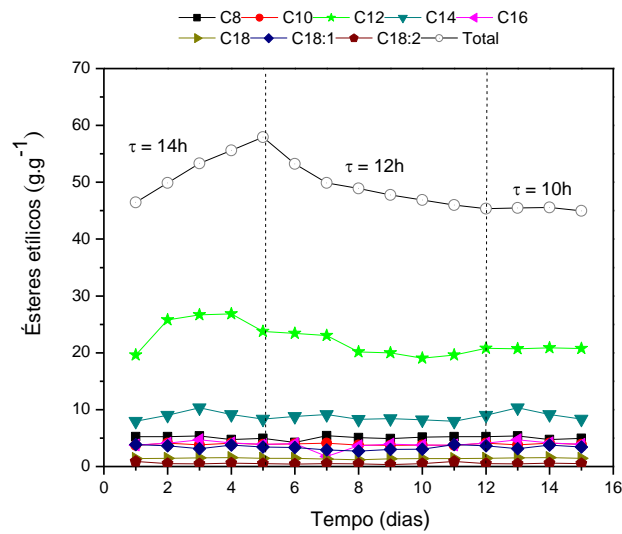


Figura 5.9. Perfil de formação dos ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR em duplo estágio para diferentes vazões volumétricas.

O valor médio de rendimento de transesterificação foi de $95,2 \pm 4,6 \%$, obtido no tempo espacial de 14 h, conforme apresentado na Figura 5.10.

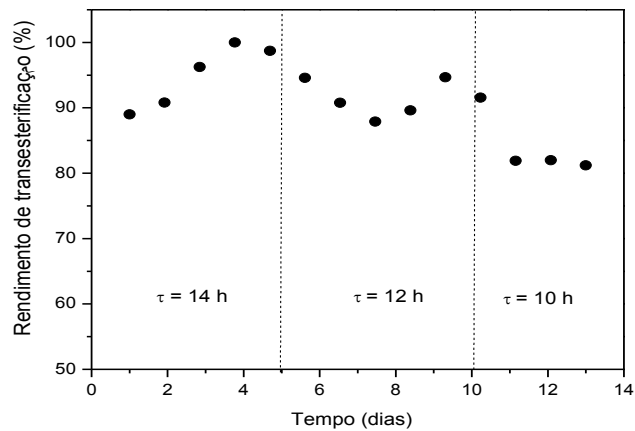


Figura 5.10. Rendimento em ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR duplo estágio empregando diferentes vazões volumétricas.

O desempenho do reator em duplo estágio na etanólise do óleo de coco foi similar ao desempenho alcançado na etanólise do óleo de macaúba (Tabela 5.7). Considerando a dificuldade de aquisição comercial do óleo de macaúba, optou-se para dar continuidade aos estudos empregando o óleo de coco, em função da disponibilidade comercial deste óleo. Além disso, estudos de transesterificação do óleo de coco são ainda escassos na literatura.

Tabela 5.7. Análise comparativa dos óleos vegetais láuricos na reação de transesterificação em reator PBR, duplo estágio, mediada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em sílica-PVA, no tempo espacial de 14h

Parâmetro	Óleo de macaúba	Óleo de coco
Biocatalisador (atividade inicial $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	$2061 \pm 46,7$	$2163 \pm 1,8$
Biocatalisador (atividade residual $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	$1154 \pm 13,6$	$927 \pm 74,2$
Tempo de operação do reator (dias)	15	15
Constante desativação térmica (K_d, h^{-1}) $\times 10^3$	1,91	2,52
Tempo de meia-vida do biocatalisador (h)	363	275
Concentração em ésteres ($\% \text{ g}_{\text{éster}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{meio}}$)	$59,1 \pm 1,3$	$52,3 \pm 4,0$
Produtividade ($\text{mg}_{\text{éster}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{substrato}}\cdot\text{h}^{-1}$)	$43,0 \pm 4,0$	$38,5 \pm 3,3$
Rendimento de transesterificação (%)	$93,5 \pm 1,4$	$95,2 \pm 4,6$
Viscosidade cinemática ($\text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	$6,3 \pm 2,4$	$6,1 \pm 0,9$

5.8. Distribuição de tempo de residência (DTR) no reator de duplo estágio utilizando óleo de coco como matéria-prima de partida

Em um reator ideal de escoamento uniforme, todos os átomos que saem do reator permaneceram dentro dele exatamente o mesmo tempo. Da mesma forma, em um reator batelada ideal, 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 chamado de tempo de residência dos átomos no reator (FOGLER, 2002).

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, 2002).

A Distribuição do Tempo de Residência (DTR) em um reator é uma característica da mistura que ocorre em seu interior. 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 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, 2002).

Para o cálculo experimental do tempo médio de residência do substrato no biorreator, bem como para a caracterização da mistura no leito reacional, foi realizado o teste traçador tipo pulso.

Inicialmente, preparou-se a solução na concentração de 10 % (m.m⁻¹) do corante azul lipossolúvel (traçador) em meio reacional óleo de coco e etanol na razão molar 1:12, adotando a metodologia descrita no item 4.5.1.

A construção da curva de calibração “absorbância *versus* concentração de traçador”, para a determinação da concentração do traçador na saída do reator foi realizada com o corante lipossolúvel CI 61554. A varredura feita no espectrofotômetro na faixa da luz visível mostrou que a maior absorbância para este corante foi observada no comprimento de onda de 646 nm. Desta forma, neste comprimento de onda, foram feitas as leituras subsequentes para as diferentes concentrações de solução de traçador em meio reacional empregando como solvente terc-butanol.

Na Figura 5.11 é mostrado o comportamento da absorbância em função da concentração do traçador, tomando por base os dados apresentados no Apêndice E. A reta que ajusta os dados experimentais é apresentada na Equação 5.1.

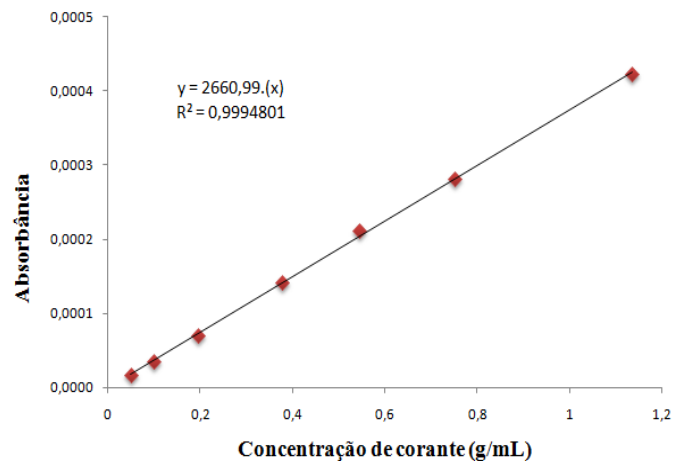


Figura 5.11. Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de coco e etanol)

$$\begin{aligned} \text{Absorbância} &= 2660,99 \cdot [C] \\ \text{Coeficiente de correlação } (R^2) &= 0,9994801 \end{aligned} \quad (5.1)$$

Em que : [C] = Concentração do corante lipossolúvel CI 61554 no efluente do biorreator.

A função DTR foi calculada experimentalmente, injetando-se uma solução de corante lipossolúvel azul (10 % m.m⁻¹) em meio reacional óleo de coco: etanol na razão molar (1:12), no tempo $t = 0$ e, então, medindo-se, periodicamente, a concentração (C) do corante no efluente do biorreator em função do tempo. As medidas de concentração do corante foram determinadas no espectrofotômetro UV-visível Varian modelo Cary 50 Conc em 646 nm.

O experimento foi realizado por 38 horas, com retirada de amostra a cada hora. Os valores de absorvância e concentração se encontram no APÊNDICE F, sendo que cada amostra foi diluída 6 vezes com terc-butanol (400 μ L de amostra e 2 mL de terc-butanol) para a realização da leitura de absorvância. Os valores de concentração do corante foram calculados de acordo com o modelo matemático obtido na curva de calibração (Figura 5.11) e, por meio de desses valores, foi plotado um gráfico de concentração *versus* tempo ajustando um modelo matemático exponencial aos pontos obtidos (Figura 5.12).

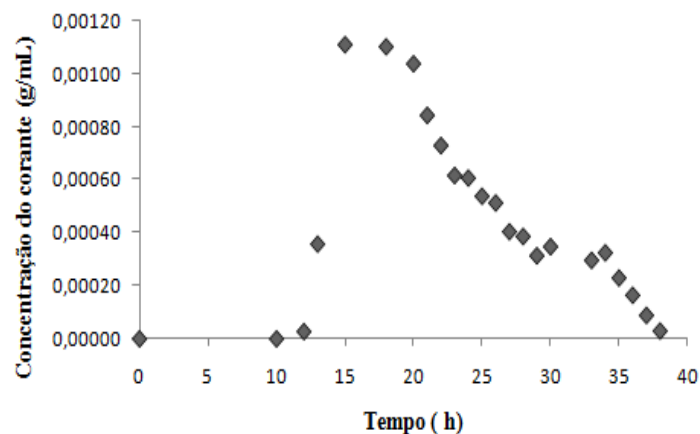


Figura 5.12. Determinação da função concentração do corante *versus* tempo, $C(t)$ *versus* dt

Como a vazão volumétrica utilizada no teste foi constante, a função da DTR, $E(t)$, pode ser calculada pela Equação 5.2. Para a determinação do valor do denominador da referida questão, foi plotado um gráfico de $C(t)$ *versus* t . Por meio do software OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724), foi possível determinar que:

$$\int_0^{\infty} C(t). dt = 0,01477 \text{ g. h/mL} \quad (5.2)$$

Para cada valor de tempo foi calculada a função da DTR, $E(t)$ e posteriormente, o tempo médio de residência (t_m), que corresponde ao tempo espacial (τ), foi calculado pela Equação 5.3, utilizando o software OriginPro 8 para a determinação da área do gráfico de $t.E(t)$ versus t para um tempo de 0 a 38 horas (Figura 5.13).

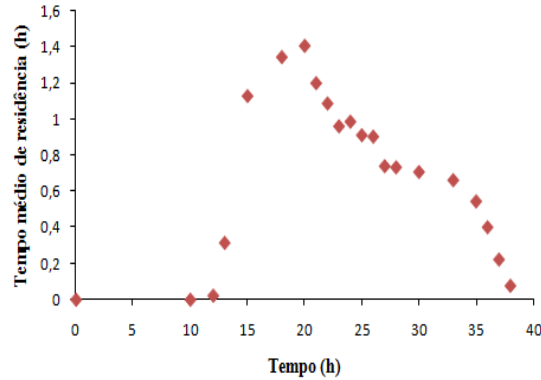


Figura 5.13. Cálculo do tempo médio de residência do biorreator

Desta forma, foi determinado que:

$$\tau = t_m = 21,64 \text{ h} \quad (5.3)$$

O valor encontrado não foi igual ao tempo espacial calculado pela razão entre o volume útil do biorreator e a vazão volumétrica requerida sobre a seção transversal da coluna, que foi de 14 h. Esta diferença pode ser explicada em função dos volumes considerados em cada caso. O conceito tempo espacial calculado teoricamente considera apenas o volume do reator onde ocorre a catálise enzimática, não levando em consideração as conexões dos reatores dispostos em série, e muito menos o volume útil da coluna extratora de glicerol, que contém a resina Lewatit. Nesse contexto, considerando todo o aparato experimental e recalculando o tempo espacial pela Equação 5.4, tem-se:

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}_a} + V_{\text{útil}_b} + V_{\text{útil}_c}}{v} = 20,70 \text{ h} \quad (5.4)$$

Em que: $V_{\text{útil}_a}$ = Volume útil do primeiro reator PBR; $V_{\text{útil}_b}$ = Volume útil do segundo reator PBR; $V_{\text{útil}_c}$ = Volume útil da coluna extratora de glicerol; v = vazão requerida no processo.

O novo valor calculado de tempo espacial foi similar ao determinado no teste traçador, mostrando-se útil na determinação deste importante parâmetro da configuração do sistema utilizado. A similaridade entre os tempos espaciais pode ser considerada como

um bom indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou zonas mortas no reator, demonstrando qualitativamente uma boa mistura e dinâmica adequada dos reagentes no leito catalítico.

Outro parâmetro importante calculado foi o número de tanques ideais (n), reator mecanicamente agitado (STR), em série que corresponderiam, aproximadamente, ao reator não ideal utilizado. De acordo com o parâmetro n (Equação 4.5), o aparato experimental (reator PBR em estágio duplo), corresponde a 6 reatores ideais STR em série, demonstrando que o reator PBR ocupa menor espaço físico, comparado ao STR.

5.9. Testes de etanólise do óleo de coco em PBR duplo estágio empregando a estratégia de separação do glicerol

Os reatores PBR conectados em série de capacidade nominal de 10 mL cada um, foram preenchidos com 7,8 gramas de lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, formando uma coluna empacotada uniforme e correspondendo a um carregamento catalítico de 20834 unidades de atividade. A alimentação do substrato na razão molar 1:12 (óleo de coco: etanol) foi efetuada em fluxo ascendente. Dois experimentos foram conduzidos (codificados como 6 e 7) nos quais empregaram-se tempos espaciais fixos e distintos, 14h (0,78 mL.h⁻¹) e 7 h (1,44 mL.h⁻¹), respectivamente.

Para o experimento 6 verifica-se que a concentração em ésteres de etila variou de 52,4 a 59,3 % (m.m⁻¹) correspondendo a rendimentos de transesterificação de 88,6 a 100% e produtividade volumétrica de 37,5 a 42,4 (mg_{éster}.g⁻¹_{meio}.h⁻¹). No entanto, no experimento 7 a concentração em ésteres oscilou entre 51,8 a 59,2 % (m.m⁻¹), o rendimento de transesterificação variou de 87,4 a 100 %, gerando valores de produtividade na faixa de 73,9 a 86,5 (mg_{éster}. g⁻¹_{meio}.h⁻¹).

De acordo com a Figura 5.14, no experimento 6 (tempo espacial 14 h), a conversão total do óleo nos ésteres correspondentes foi alcançada em 24 h (1° dia), permanecendo constante nesta taxa por um período de 5 dias. Após 144 h, a conversão apresentou um leve declínio, atingindo 94 % de rendimento. No experimento 7 (tempo espacial de 7 h), a conversão em biodiesel alcançou também 100% em 24 h de reação, permanecendo constante neste valor de conversão por 10 dias. Após esse período, foi constatada uma redução no rendimento da ordem 12 %. Por outro lado, conforme esperado o experimento 7 apresentou maior produtividade volumétrica em ésteres (Figura 5.15).

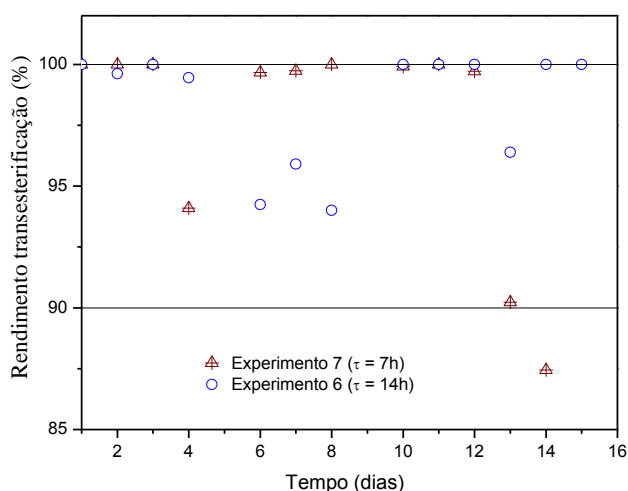


Figura 5.14. Perfil do rendimento em ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR em série, empregando diferentes tempos espaciais

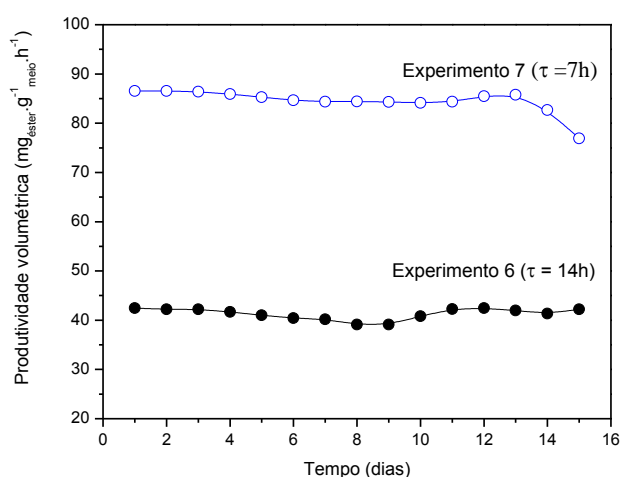


Figura 5.15. Perfil da produtividade volumétrica em ésteres na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR em estágio duplo empregando diferentes tempos espaciais

Entretanto, em ambos os experimentos a lipase imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ revelou elevados tempos de meia-vida, 447h (experimento 6) e 1427 h (experimento 7) devido à incorporação da coluna de extratora de glicerol (Lewatit GF 202), que amenizou os problemas de limitação difusional e inativação da enzima imobilizada no segundo reator PBR (HAMA et al., 2012). O maior tempo de meia-vida do biocatalisador verificado no experimento 7 pode ser creditado ao aumento da vazão volumétrica no leito catalítico que reduziu o acúmulo do glicerol na fase sólida da enzima.

Em comparação com o reator de leito fixo, simples estágio, as altas taxas de rendimento e a elevada estabilidade operacional da enzima, foram obtidos nos reatores de leito fixo dispostos em série (dois estágios), tendo em vista que os reatores PBR em série, proporcionam maior tempo de contato entre a mistura reacional e o biocatalisador (WANG et al., 2011).

Adicionalmente, a estratégia de utilizar a coluna extratora de glicerol mostrou-se satisfatória, uma vez que a resina Lewatit GF 202 é um composto hidrofílico, com capacidade de adsorver glicerol. Logo, a coluna extratora minimizou a limitação difusional e inibição da enzima no segundo reator de PBR, proporcionando um incremento na formação de ésteres de etila em relação ao primeiro estágio, conforme visualizado na Figura 5.16. Esta estratégia também pode ter influenciado a baixa oscilação na formação dos ésteres etílicos no segundo reator.

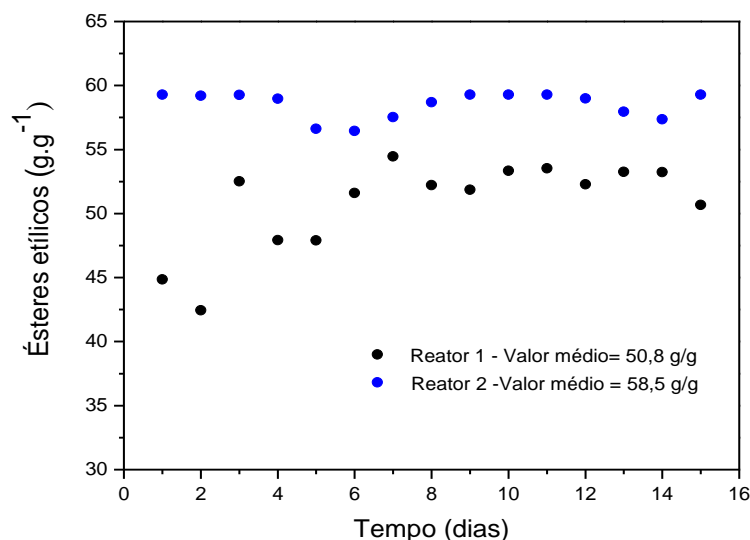


Figura 5.16. Perfil de formação dos ésteres no efluente do primeiro e do segundo reator PBR, na etanólise contínua do óleo de coco em reator PBR duplo estágio, mediada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em suporte híbrido de SiO₂-PVA, em meio isento de solvente, empregando tempo espacial de 14h

5.10. Estudo reológico da amostra de biodiesel obtida à partir do óleo de coco

O acompanhamento da viscosidade durante o processo de transesterificação serve de indicativo da conversão dos triglicerídeos em ésteres alquílicos e por consequência, a gradual redução da viscosidade do produto transesterificado, ou seja, a viscosidade é um parâmetro de qualidade do biodiesel (MOREIRA et al., 2007). A Figura 5.17 apresenta a relação viscosidade em relação ao rendimento de transesterificação na etanólise do óleo de coco em reator PBR conectados série (duplo estágio).

De acordo com as especificações americana ASTM (D6751) e da brasileira pela resolução ANP n°14/2012, a viscosidade cinemática do biodiesel (B100) deve estar na faixa de $1,9\text{--}6,0\text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (HOEKMAN et al., 2012; ANP, 2012). O biodiesel obtido a partir do óleo de coco apresentou valor de viscosidade cinemática dentro das especificações (Tabela 5.8). O baixo valor de viscosidade encontrado no biodiesel do óleo de coco confirma a elevada conversão do óleo em ésteres etílicos alcançada na reação de transesterificação desta matéria-prima.

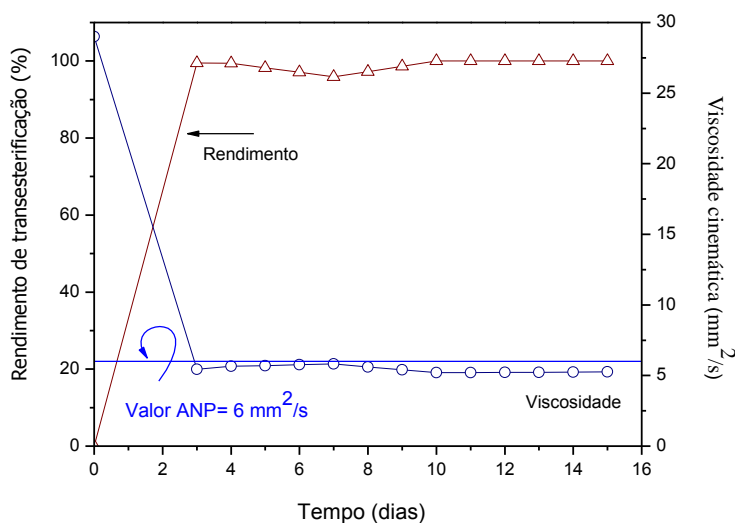


Figura 5.17. Relação entre viscosidade cinemática e rendimento de transesterificação do óleo de coco, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$, em reator de leito fixo conectados em série, na presença de uma coluna extratora de glicerol, em meio isento de solvente

Tabela 5.8. Correlação entre as propriedades do combustível biodiesel obtido no processo de transesterificação do óleo de coco

Biodiesel	Rendimento de transesterificação (%)	Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² .s ⁻¹)
Óleo de coco	98,0 ± 1,4	5,5 ± 0,3

5.11. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

Os resultados apresentados nas Figuras 5.18 (a,b), são referentes às amostras de ésteres etílicos obtidas após a etapa de purificação (item 4.8), sendo após este tratamento, quantificadas as conversões dos triglicerídeos em ésteres etílicos por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H).

Nos espectros das Figuras 5.18a e 5.18b, verificam-se as ausências dos sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio do grupo CH₂ do glicerol em 4,2 ppm e o aparecimento do sinal de um quarteto em 4,1 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos da porção alcoólica do éster [CH₃—CH₂—OC(=O)—R].

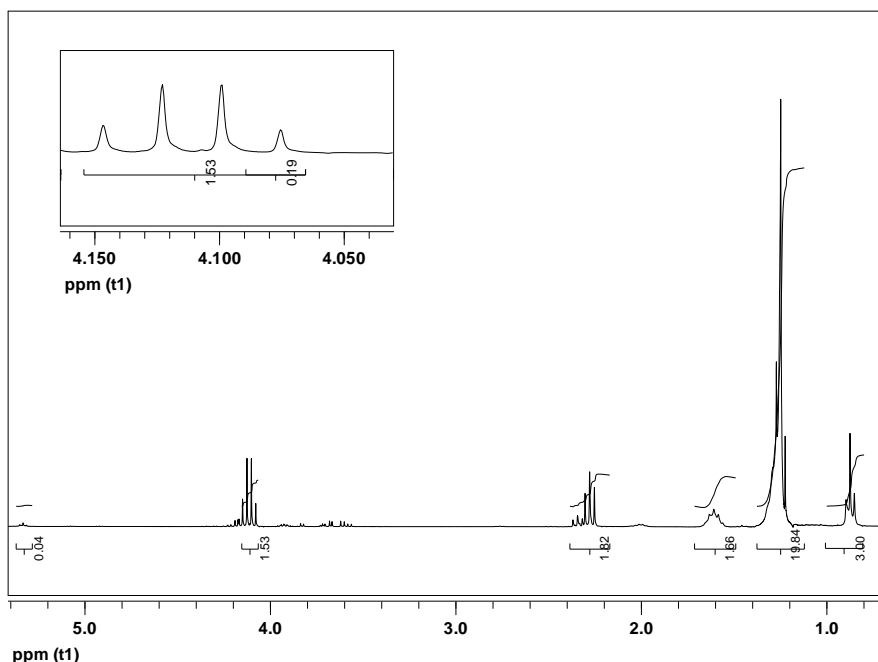


Figura 5.18a. Ressonância magnética nuclear de prótons da amostra referente ao tempo de 48 h no processo contínuo de síntese enzimática de biodiesel de óleo de coco

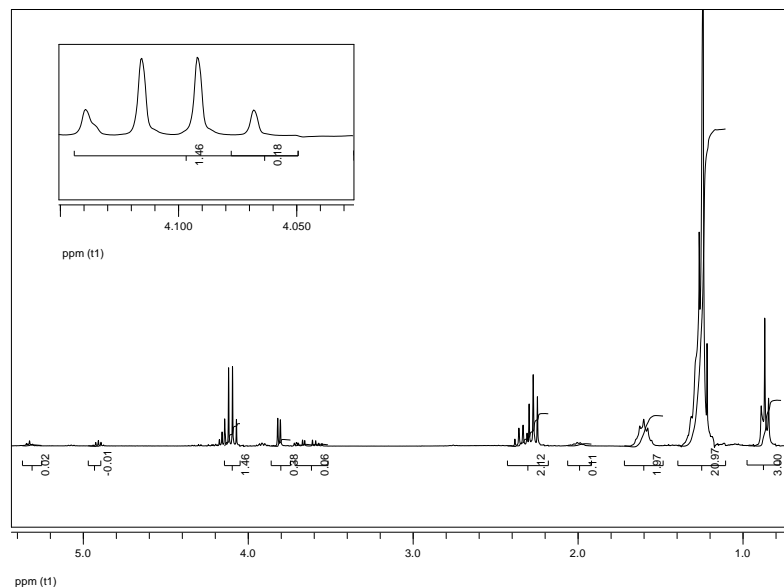


Figura 5.18b. Ressonância magnética nuclear de prótons da amostra referente ao tempo de 360h no processo contínuo de síntese enzimática de biodiesel de óleo de coco

A análise cromatográfica (item 4.9.4) permitiu quantificar e acompanhar a conversão em ésteres etílicos das amostras de biodiesel, ao longo da reação. De acordo com a análise cromatográfica, as amostras referentes aos tempos de 48 e 360 h apresentaram elevadas taxas de conversão em biodiesel, 99 e 100 %, respectivamente. Estas elevadas taxas de conversão em biodiesel, foram confirmadas por RMN ^1H (Tabela 5.9).

Tabela 5.9. Valores de rendimento de transesterificação de amostras de biodiesel, empregando a cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio no acompanhamento do desempenho da etanólise enzimática do óleo de coco em reator PBR em série

Amostras de biodiesel	Rendimento de transesterificação (%)	
	Calculado por CG	Calculado por RMN
48 h	99,0	98,7
360 h	100	99,0

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 5.9, a lipase *B. cepacia* imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ apresentou elevada estabilidade operacional, mantendo os rendimentos de transesterificação constantes durante todo o período de operação do reator. Estes resultados confirmam os dados descritos na literatura (HALIM et al., 2009;

SEVERAC et al., 2011) que afirmam, que enzimas imobilizadas permitem operações estáveis de reatores contínuos por longos períodos.

5.12. Avaliação global do desempenho do reator de leito fixo duplo estágio

O crescente mercado global de biodiesel vem estimulando pesquisadores a buscar formas atrativas de produzir biodiesel em larga escala. Neste contexto, o uso de enzimas imobilizadas pode viabilizar a produção enzimática de biodiesel. Portanto, pesquisas têm sido concentradas no desenvolvimento de projetos de biorreatores, entre os quais a configuração PBR possui potencial para aplicação em escala industrial, em função de melhorar a produtividade volumétrica e a estabilidade da enzima (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; HAMA et al., 2011a).

No presente trabalho, a reação de transesterificação foi conduzida em reatores contínuos de leito fixo duplo estágio, adotando-se a estratégia de remoção do glicerol formado no efluente do primeiro reator. A estratégia de remoção do glicerol combina com a elevação da vazão volumétrica contribuíram para a redução de impurezas hidrofílicas e da viscosidade do substrato no segundo reator, permitindo que o biocatalisador apresentasse elevada estabilidade operacional (BERIOS et al., 2011; HAMA et al., 2011b).

Desta forma, o desempenho satisfatório obtido na configuração de reator estudada operando em diferentes tempos espaciais (Tabela 5.10) pode ser associado à composição em ácidos graxos, simultaneamente, a estratégia de utilizar reatores PBR em série, aumenta o tempo de residência substrato-enzima, podendo levar a um aumento nas taxas de conversões.

Deve ser ainda destacado, que não foi encontrada nenhuma evidência de perda de desempenho dos reatores em função da atividade catalítica do leito, conforme confirmado por meio da quantificação da atividade hidrolítica dos biocatalisadores recuperados ao final dos experimentos (7 e 6). Reduções da ordem de 10 a 38 % em relação à atividade hidrolítica inicial foram constatadas que correspondem a tempos de meia-vida do biocatalisador de 1426 e 521 h, respectivamente.

Estes resultados se comparam favoravelmente com os dados descritos na literatura. Hama et al. (2011b) reportaram taxas de conversão de biodiesel superiores a 90% na metanólise enzimática do óleo de soja em reatores de leito fixo conectados em série, ao longo de 550 h de reação.

Tabela 5.10. Análise da produtividade volumétrica em ésteres etílicos na reação de transesterificação do óleo de coco e etanol em meio isento de solvente, operada em reatores PBR dispostos em série (dois estágios), empregando tempos espaciais de 14 e 7h

Desempenho	Substrato	
	(óleo de coco e etanol)	
Tempo espacial (h)	14	7
Vazão volumétrica (mL.h ⁻¹)	0,80	1,44
Atividade inicial do biocatalisador (U.g ⁻¹)	2134±64	1795±87
Atividade residual do biocatalisador (U.g ⁻¹)	1320±35	1614±75
Razão molar óleo vegetal:etanol	1:12	1:12
Tempo total de operação (dias)	15	15
Constante de desativação (k _d , h ⁻¹) x10 ³	1,33	0,85
Tempo de meia-vida (h)	521	1426
Concentração de ésteres de etila (g.g ⁻¹)	58,1±2,1	56,8±4,8
Produtividade (mg _{éster} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)	41,54±1,51	81,9±7,35
Rendimento de transesterificação (%)	98,0±1,45	95,9±4,10
Viscosidade cinemática (mm ² .s ⁻¹)	5,5 ± 0,3	5,9 ± 1,8

Portanto, os resultados obtidos (Tabela 5.10) demonstram a viabilidade técnica na síntese enzimática de biodiesel a partir dos óleos vegetais de composição predominantemente láurica, mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA em meio isento de solvente operando continuamente em reatores PBR em série, em presença de uma coluna extratora de glicerol, em virtude da elevada estabilidade operacional (tempo de meia-vida do biocatalisador superior a 521 h) e capacidade de reutilização do biocatalisador durante prolongados tempos de reação.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema eficiente para a etanolise de óleos vegetais, de composição predominantemente láurica (C12:0), em reatores PBR conectados em série (dois estágios) integrado a um sistema de remoção do glicerol, em meio isento de solvente mediada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA. Os resultados alcançados demonstraram que:

- ⇒ É possível operar um sistema contínuo para a produção enzimática de biodiesel de óleos vegetais láuricos empregando uma configuração de reatores PBR conectados em série na ausência de solventes;
- ⇒ A razão molar entre óleo vegetal e etanol foi um parâmetro relevante na obtenção de elevados rendimentos, sendo que o melhor desempenho alcançado foi para substrato contendo elevado excesso de etanol, ou seja, razão molar óleo:etanol de 1:12;
- ⇒ A lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA foi estável quanto às suas características morfológicas e catalíticas apresentando tempo de meia-vida ≥ 500 h;
- ⇒ 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 limitação difusional e inativação da lipase imobilizada.
- ⇒ O funcionamento do sistema em série foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais totais no reator de 14 e 7h, resultando em produtividades da ordem de $41,5 \pm 1,5$ e $81,9 \pm 7,3$ mg_{éster}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹, e correspondendo a rendimentos de transesterificação de $98,0 \pm 1,4$ e $95,9 \pm 4,1$ %, respectivamente;
- ⇒ Nas condições estabelecidas, a amostra de biodiesel purificada (viscosidade cinemática média de $5,5 \pm 0,3$ mm².s⁻¹) se enquadra na norma ASTM D6751, que estabelece que a viscosidade cinemática do B100 na faixa entre 1,9-6,0 mm².s⁻¹.
- ⇒ Os resultados apresentados demonstram a viabilidade técnica da síntese enzimática de biodiesel 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 coco estudos adicionais são pertinentes, visando a obtenção de altas taxas reacionais e elevados valores em produtividade volumétrica em ésteres.

- ⇒ Novas estratégias de remoção de glicerol, taxa de empacotamento do biocatalisador no leito, uso combinado de enzimas e novas configurações de reatores devem ser investigados.

REFERÊNCIAS

AIRES-BARROS, M. A. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia*. Portugal: Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, ed. Quadrimestral N° 72. Cap. 2, p. 2-12, 2002.

AKOH, C. C; CHANG, S. W; LEE, G. C; SHAW, J. F. Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8995–9005, 2007.

ALVES, M. B; MEDEIROS, F. C. M; SUAREZ, P. Cadmium compounds as catalysts for biodiesel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v.49, p. 7176-7182, 2010.

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.

AMANO ENZYME INC. **Biotransformation use**. Disponível em: <<http://www.amano-enzyme.co.jp/aee/product/biotransformation.html>>. Acesso em 10 jul. 2012.

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 12 jun. 2013.

ANP-AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Dados estatísticos mensais**. Disponível em:<http://www.anp.gov.br/?pg=64555&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1367690190824>. Acesso em 04 de maio de. 2013.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

ARAÚJO, G. S; CARVALHO, R, H. R; SOUSA, E. M. B. D. Produção de biodiesel a partir de Óleo de coco (*Cocos nucifera L.*) Bruto. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2., 2009.

ARYEE, A. N. A; DUTILLEUL, P; PASZTI, M; SIMPSON, B. K. Optimized transesterification of animal fats to alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v.109, p. 103-110, 2013.

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.

ÁVILA, R. N. A; SODRÉ, J. R. Physical-chemical properties and thermal behavior of fodder radish crude oil and biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 54-57, 2012.

BALTARU, R; GALACTION, A. I; CASCAVAL, D. Bioreactors of “Basket” type with immobilized biocatalysts. In: WSEAS INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ELECTRONICS AND BIOMEDICAL INFORMATICS, 2., 2009. p. 238-243- ISBN: 978-960-474-110-6, ISSN: 1790-5125.

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.

BARON, G. V; WILLAERT, R. G; BACKER, L. Immobilized cell reactors. In: BARON, G. V; WILLAERT, R. G; BACKER, L. Immobilized living cell systems: Modeling and Experimental Methods, John Wiley & Sons Ltd., p. 67-65, 1996.

BERIOS, M; MARTIN, M.A; CHICA, A. F; MARTIN, A. Purification of biodiesel from used cooking oils. **Applied Energy**, v. 88, p. 3625-3631, 2011.

BIODIESELBR. **Biodiesel: dominado pela soja.** Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/biodiesel-dominado-soja-150611.htm>> Acesso em 14 jun. 2012.

BRUNSCHWING, C; MOUSSAVOU, W; BLIN, J. Use of ethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 283-301, 2012.

CAO, L. Carrier-bound immobilization enzymes: Principles, Application and Design In: CAO, L. **Covalent enzyme immobilization**. New York: Wiley-VCH, 2005. Cap. 3, p. 169-293.

CAO, P; TREMBLAY, A. Y; DUBE, M. A. Kinetics for canola oil transesterification in a membrane reactor. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 2533-2541, 2009.

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos.** 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CARVALHO, P. D. O; CAMPOS, P. R. B; NOFFS, M. D; DE OLIVEIRA, J. G; SHIMIZU, M. T; DA SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CHANDRASEKERAN, S. M; BHARTIYA, S. Substrate specificity of lipase in alkoxyacylation reaction: QSAR model development and experimental validation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 554-564, 2009.

CHANG, C; CHEN, J; CHANG, C. J; WU, T; SHIEH, C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 26, n. 3-4, p. 187-192, 2009.

CHEN, J.P; LIN, G.H. Optimization of biodiesel production catalyzed by fungus cells immobilized in fibrous supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 181-194, 2010.

CHEN, J. W; WU, W. T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 466-469, 2003.

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

CHEN, H; CHEN, G.Q. Energy cost of rapeseed-based biodiesel as alternative energy in China. **Renewable Energy**, v. 36, p.1374-1378, 2011.

CIFTCI, O. N; TEMELLI, F. Enzymatic conversion of corn oil into biodiesel in a batch supercritical carbon dioxide reactor and kinetic modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 75, p. 172-180, 2013.

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

DA COSTA, A. C. A; PEREIRA JR, N.; ARANDA, D. A. G. The situation of biofuels in Brazil: New generation Technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 3041-3049, 2010.

DA MOTTA, P. E. F; CURI, N; DE OLIVEIRA FILHO, A. T; GOMES, J. B. V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 1023-1031, 2002.

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, p. 5508-5516, 2010.

DA RÓS, P. C. M; CASTRO, H. F; CARVALHO, A. K. F; SOARES, C. M. F; MORAES, F. F; ZANIN, G. M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 529-536, 2012.

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.

DAMNJANOVIC, J. J; ZUZA, M. G; SAVANOVIC, J. K; BEZBRADICA, D. I; MIJIN, D. Z; BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 50-59, 2012.

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004.

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; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

DE CASTRO, H. F; ZANIN, G. M; MORAES, F. F; SÁ-FERREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S; FERRARA, M. A; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Ed Interciência; UFRJ: CAPES:FAPERJ, 2008, cap. 6, p. 123-151.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, p. 466-487, 2005.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy conversion and Management**, v. 50, p. 14-34, 2009.

DORS, G; FREITAS, L; 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 & Fuels**, v. 26, p. 197-203, 2012.

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

DOSSAT, V; COMBES, D; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil with in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzymeand Microbial Technololy**, v. 25, p. 194-200, 1999.

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.

DUTTA, R. Immobilized enzyme. In: DUTTA, R. **Fundamentals of biochemical engineering**. New Delhi: Ane Book India, 2008, Cap. 3. P. 50-69.

ENWEREMADU, C. C; MBARAWA, M. M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2205-2224, 2009.

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

FOGLER, H. S. Distribuições de Tempos de Residência para Reatores Químicos. In: FOGLE, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**, 3^a Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. Cap. 13. p. 744-802.

FORTES, I. C. P; BAUGH, P. J. Study of analytical on-line pyrolysis of oils from macauba fruit (*Acrocomias clerocarpa* M) via GC/MS. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 469-477, 1999.

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

FREITAS, L. SANTOS, PAULA, A. V; SANTOS, J. C ; ZANIN, G. M ; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 87-90, 2010.

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

FREITAS, L; SILVA, G. S; SANTOS, J. C; OLIVEIRA, P. C; DE CASTRO, H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research and Technology**, v.233, p. 743-750, 2011.

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

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.

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

HALDAR, S. K; NAG, A. Utilization of three non-edible vegetable oils for the production of biodiesel catalyzed by enzyme. **Open Chemical Engineering Journal** v. 2, p. 79-83, 2008.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.

HAMA, S; TAMALAMPUDI, S; YOSHIDA, A; TAMADANI, N; KURATANI, N; NODA, H; FUKUDA, H; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 66-71, 2011a.

HAMA, S; TAMALAMPUDI, S; YOSHIDA, A; TAMADANI, N; KURATANI, N; NODA, H; FUKUDA, H; KONDO, A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10419-10424, 2011b.

HASS, M. J; FOGLIA, T. A. Matérias-primas alternativas e tecnologias para produção de biodiesel. In: KNOTHE, G; GERPEN, J. V; KRAHL, J; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. Cap 4.2 p. 46-66.

HAYYAN, A; HASHIM, M.A; MJALLI, F. S; HAYYAN, M; ALNASHEF, I. M. A novel phosphonium-base deep eutectic catalyst for biodiesel production from low grade crude palm oil. **Chemical Engineering Science**, v. 92, p. 81-88, 2013.

HE, Y; BAGLEY, D. M; LEUNG, K. T; LISS, S. N; LIAO, B. Q. Recent advances in membrane technology for biorefining and bioenergy production. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 817-858, 2012.

HOEKMAN, S. KENT; BROCH, AMBER; ROBBINS, CURTIS; CENICEROS, ERIC; NATARAJAN, MANI. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 143-169, 2012.

HOLT, J; HANEFELD, U. Enantioselective enzyme-catalyzed synthesis of cyanohydrins. **Current Organic Synthesis**, v.6, p. 1005-1018, 2009.

HOSSAIN, A. K; DAVIES, P. A. Plant oil as fuel for compression ignition engines: a technical review and life cycle analysis. **Renewable Energy**, v. 35, p. 1-13, 2010.

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

HUANG, Y; ZHENG, H; YAN, Y. Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 504-515, 2010.

JACHMANIAN, I; DOBROYAN, M.; MOLTINI, M.; SEGURA, N.; IRIGARAY, B; PABLO, V. J.; VIEITEZ, I.; GROMPONE, M. A. Continuous lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil: effect of phase-equilibrium on process efficiency. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, p. 45-53, 2010.

JAEGER, K. E; DIJKSTRA, B. W; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JEGANNATHAN, K. R; ABANG, S. Production of biodiesel using immobilized lipase—a critical review. **Critical Review in Biotechnology**, v. 28, p. 253-264, 2008.

KAIEDA, M; SAMUKAWA, T; MATSUMOTO, T; BAN, K; KONDO, A; SHIMADA, Y; NODA, H; NOMOTO, F; OHTSUKA, K; IZUMOTO, E; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 627-631, 1999.

KARMAKAR, A; KARMAKAR, S; MUKHERJEE, S. Biodiesel production from neem towards feedstock diversification: Indian perspective. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 1050-1060, 2012.

KARMAKAR, A; KARMAKAR, S; MUKHERJEE, S. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7201-7210, 2010.

KENNEDY, J. F; CABRAL, J. M. S. Immobilized living cells and their applications. **Applied Biochemistry and Bioengineering**, v. 4, p. 189-280, 1983.

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

KNOTHE, G. A história dos combustíveis derivados de óleos vegetais. In: KNOTHE, G; GERPEN, J. V; KRAHL, J; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. Cap 2. p 5-18.

KNOTHE, G. Métodos analíticos para o biodiesel. In: KNOTHE, G; GERPEN, J. V; KRAHL, J; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. Cap 5. p 67-82.

KNOTHE, G. Viscosidade do biodiesel. In: KNOTHE, G; GERPEN, J. V; KRAHL, J; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. Cap 6.2 p 89-90.

KNOTHE, G; KRAHL, J; GERPEN, J. V. The Biodiesel Handbook 2nd ed. LOCAL: AOCs PRESS, 2009.

KO, M. J; PARK, H. J; HONG, S. Y; YOO, Y. J. Continuous biodiesel production using in situ glycerol separation by membrane bioreactor system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 69-75, 2012.

KUMARI, V; SHAH, S; GUPTA, M. N. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 368-372, 2007.

LAI, C. C; ZULLAIKAH, S; VALI, S. R; JU, Y. H. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 331-337, 2005.

LAM, M. K; LEE, K. T; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500-518, 2010.

LANXESS. **Removal of glycerine from biodiesel**. Disponível em: http://www.lewatit.com/ion/en/applications/chem_env/greenfuels/index.php?pID=3&subID=94&group=1&segment=197&app=53794. Acesso em 27 de maio 2013.

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

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

LEUNG, D. Y. C; GUO, Y. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 87, p. 883-890. 2006.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**, 2nded. New York: John Wiley, 2000.

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

LI, S. F; FAN, Y. H; HU, R. F; WU, W. T. *Pseudomonas cepacia* lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic**, v. 72, p. 40-45, 2011.

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

LOPES, D. C; NETO, A. J. S. Potential crops for biodiesel production in Brazil: A review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 206-217, 2011.

LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 1-15, 1997.

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.

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

MACAUBABRASILVENDAS. **Macaúba Brasil**. Disponível em <http://macaubabrasilvendas.blogspot.com.br/>. Acesso em 04 de maio. de 2013.

MAFRA, A. C. O. **Produção de ácido glucônico e xarope de frutose a partir de sacarose catalisada por enzimas em reator airlift**, 2013, 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) –Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MATEO, C; PALOMO, J. M; FUENTE, M; BETANCOR, L; GRAZU, V; LÓPEZ-GALLEGO, F; PESSELA, B. C. C; HIDALGO, A; FERNÁNDEZ-LORENTE, G; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R; GUIBAN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 267-280, 2006.

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

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.

MENDES, A. A; DE CASTRO, H. F; ANDRADE, G. S. S; TARDIOLI, P. W; GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipase by covalent attachment. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, p. 160-167, 2013.

MENDES, A. A; DE CASTRO, H. F; RODRIGUES, D. S; ADRIANO, W. S; TARDIOLI, P. W; MAMMARELLA, E. J; GIORDANO, R. C; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p.1055-1066, 2011.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; VELEZ, A. M; GIORDANO, R. C; GIORDANO, R. L. C; DE CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipase on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.50, p. 503-511, 2012.

MENDES, A. P. D. A; COSTA, R. C. D. **Mercado Brasileiro de Biodiesel e Perspectivas Futuras**, v. 31, p. 253-280, 2009. <http://www.inovacao.unicamp.br/report/inte-biodiesel100712.pdf> . Acesso em 24 jul. 2012.

MORAVEJI, M. K; PASAND M. M; DAVARNEJAD R; CHISTI, Y. Effects of surfactants on hydrodynamics and mass transfer in a split-cylinder airlift reactor. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 90, p. 93-99, 2012.

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

NAJAFPOUR, G. D. Bioreactor Design. In: NAJAFPOUR. G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Netherlands: Elsevier, 2007, Cap. 6, p. 142-169.

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

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

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

NOUREDDINI, H; GAO, X; JOSHI, S; WAGNER, P. R. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 33-39, 2002.

NOUREDDINI, H; ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 74, p. 1457-1463, 1997.

NOVOZYMES A/S. H. C; P. M. NIELSEN; M. W. CHRISTENSEN. **Enzymatic production of degummed fatty acid alkyl esters**, Patent: EP1893764, 2009.

OKAFOR, N. Biocatalysts: Immobilized Enzymes and Immobilized Cells. In: OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. South Carolina: Science Publishers, 2007. Cap. 22. pg. 398- 419.

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

PAIVA, E. J. M; SILVA, M.L.C.P; BARBOZA, J.C. S; OLIVEIRA, P. C; DE CASTRO, H. F; GIORDANI, D.S. Non-edible babassu oil as a new source for energy production-a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 833-838, 2013.

PALOMO, J. M; FERNANDEZ-LORENTE, G; MATEO, C; SEGURA, R. L; ORTIZ, C; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; GUIBAN, J. M. Purification, immobilization, hiperactivation, and stabilization of lipase by selective adsorption on hydrophobic supports. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells** 2nd ed. Madrid: Humana Press, 2006. Cap 13, p.130-143.

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

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

PAULA, A. NUNES, G. F. M; FREITAS, L; DE CASTRO, H. F; SANTOS, J. C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 117-121, 2010.

PEREIRA JR, N. Tecnologia de bioprocessos. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

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.

PINZI, S; GARCIA, I. L; LOPEZ-GIMENEZ, F. J; DE CASTRO, M. D. L; DORADO, D; DORADO, M. P. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. **Energy and Fuels**, v. 29, p. 2325-2341, 2009.

POUSA, G. P. A. G; SANTOS, A. L. F; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, p. 5393-5398, 2007.

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

RABU, R. A; JANAJREH, I; HONNERY, D. Transesterification of waste cooking oil: Process optimization and conversion rate evaluation. **Energy Conversion and Management**, v. 65, p. 764-769, 2013.

RIBEIRO, L. M. O; SANTOS, B. C. S; ALMEIDA, R. M. R. G. S. Studies on reactions parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 498-503, 2012.

RODRIGUES, R. C; VOLPATO, G; WADA, K; AYUB, M. A. Z. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 85, p. 825-830, 2010.

ROSEVEAR, A. Biocatalysts immobilized - a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34, p. 123-150, 1984.

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

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

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

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

SEVERAC, E; GALY, O; TURON, F; MONSAN, P; MARTY, A. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. **Bioresource Technology**, v. 108, n. 8, p 4954-4961, 2011.

SEVERSON, K; MARTIN, M; GROSSMANN, I. E. Optimal integration for biodiesel production using bioethanol. **AIChE-Journal**, v.59, p. 834-844, 2013.

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, p. 4732-4745, 2011.

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

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

SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 47, N° 13/14, p. 3387-3394, 1992.

SILVA, G. A. M; DA RS, 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.

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

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-9, p. 745-757, 1999.

SOLER, M. P; VITALI, A.A; MUTO, E. F. Tecnologia de quebra do coco babaçu (*Orbignyas peciosa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 717-722, 2007.

SOUMANOU, M. M; PERIGNON, M; VILLENEUVE, P. Lipase-catalysed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.115, p.270-285, 2013.

SOUMANOU, M. M; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 97-103, 2003.

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

STAMENKOVIC, O. S; VELICKOVIC, A. V; VELJKOVIC, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141-3155, 2011.

SUEHARA, K; KAWAMOTO, Y; FUJII, E; KOHDA, J; NAKANO, Y; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 437-442, 2005.

TAN, T; NIE, K; WANG, F. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, p. 109-116, 2006.

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

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

TISCHER, W; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 326-335, 1999.

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

TUPUFIA, S. C; JEON, Y. J; MARQUIS, C; ADESINA, A. A; ROGERS, P. L. Enzymatic conversion of coconut oil for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 721-726, 2013.

URIESTE, 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.

VALLE, PEDRO W. P. A; REZENDE, THAIS F; SOUZA, ROSANGELA A; FORTES, ISABEL C. P; PASA, VANYA M. D. Combination of fractional factorial and Doehlert experimental designs in biodiesel production: Ethanolysis of *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* stokes oil catalyzed by sodium ethoxide. **Energy and Fuels**, v. 23, p. 5219-5227, 2009.

VICENTE, G; MARTINEZ, M; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 297-305, 2004.

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

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

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

YAAKOB, Z; A; MOHAMMAD, M; ALHERBAWI, M; ALAM, Z; SOPIAN, K. Overview of production of biodiesel from waste cooking oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 184-193, 2013.

YUCEL, Y. The enzymatic Production of biodiesel from pomace oil using immobilized *Thermomyces lanuginosus*. **Energy Source**, v. 35, p. 370-375, 2013.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. α - amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 115–121, 2000.

ZANIN, G. M; MORAES, F. F. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. In: SAIAD, S; PIETRO, R. C. L. R (Eds.). Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 4, p. 35-85.

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

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

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

APÊNDICE

APÊNDICE A – Propriedades físico-químicas das matérias-primas testadas

Parâmetros	Babaçu	Coco	Macaúba
Viscosidade Cinemática à 40 °C (mm ² /s)	29,52	29	29,8
Índice de Acidez (mg KOH /g de óleo)	0,65	0,41	16,11
Índice de Saponificação (mg KOH /g de óleo)	238,0	238,0	223,0
Índice de Iodo (g I ₂ /100 g de óleo)	25,0	25,0	28,0
Índice de Peróxido (meq / kg de óleo)	1,82	0,36	3,96

Fonte: Carvalho (2011)

APÊNDICE B– Ficha técnica da 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	250 g.L ⁻¹
pH	6 -10
Tamanho de poros	(0,65 ±0,05) mm
Densidade cristalina	0,70 g.L ⁻¹
Temperatura de estocagem	Até 40°C
Tempo de estocagem	2 anos

Fonte: Lanxess (2013)

APÊNDICE C – Propriedades catalíticas da lipase de *Burkholderia 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 (mmol.L ⁻¹)	1883
	V_{max} (U.g ⁻¹)	3873
$d_{sólido}$ (g.mL ⁻¹)	1,865	

Fonte: Da Rós et al. (2010)

APÊNDICE D– Valores de vazão volumétrica obtidos nos testes de ajuste da vazão da bomba peristáltica (ATTO).

Experimento 1: Etanolise do óleo de babaçu em reator PBR

Experimento 1 - Tempo espacial = 7,10 h - vazão 0,78 ± 0,001 mL.h⁻¹		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
79 min – 1,0 mL $v = 0,786 \text{ mL.h}^{-1}$	77 min – 1,0 mL $v = 0,78 \text{ mL.h}^{-1}$	78 min – 1,0 mL $v = 0,78 \text{ mL.min}^{-1}$

Experimento 2: Etanolise do óleo de macaúba em reator PBR

Experimento 2 - Tempo espacial = 6,99h - vazão $0,768 \pm 0,001 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
78,48min – 1,0 mL $v = 0,785 \text{ mL.h}^{-1}$	73 min – 1,0 mL $v = 0,775 \text{ mL.h}^{-1}$	70min – 1,0 mL $v = 0,767 \text{ mL.h}^{-1}$

Experimento 3: Etanolise do óleo de coco em reator PBR

Experimento 3 - Tempo espacial = 7,15 h - vazão $0,775 \pm 0,001 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
78,50 min – 1,0 mL $v = 0,783 \text{ mL.h}^{-1}$	71 min – 1,0mL $v = 0,774 \text{ mL.h}^{-1}$	74 min – 1,0mL $v = 0,773 \text{ mL.h}^{-1}$

Experimento 4: Etanolise do óleo de macaúba, empregando diferentes tempos espaciais, em reator de leito fixo, conectados em série

Tempo espacial = 17 h - vazão $0,3294 \pm 0,000066 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
184,10 min – 1,0 mL $v = 0,3258 \text{ mL.h}^{-1}$	182,86 min – 1,0 mL $v = 0,3282 \text{ mL.h}^{-1}$	179,90 min – 1,0 mL $v = 0,3336 \text{ mL.h}^{-1}$

Tempo espacial = 14h - vazão $1,0734 \pm 0,0014 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
78,50 min – 1,0 mL $v = 0,783 \text{ mL.h}^{-1}$	77,40 min – 1,0 mL $v = 0,775 \text{ mL.h}^{-1}$	74 min – 1,0 mL $v = 0,773 \text{ mL.h}^{-1}$

Tempo espacial = 10h – vazão $1,3092 \pm 0,00056 \text{ mL.min}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
47 min – 1,0 mL $v = 1,2762 \text{ mL.h}^{-1}$	45,88 min – 1,0 mL $v = 1,3074 \text{ mL.h}^{-1}$	44,66 min – 1,0 mL $v = 1,3434 \text{ mL.h}^{-1}$

Experimento 5: Etanolise do óleo de coco, empregando diferentes tempos espaciais, em reator de leito fixo, conectados em série.

Tempo espacial = 14 h –vazão $0,785 \pm 0,00017 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
77,30 min – 1,0 mL $v = 0,776 \text{ mL.h}^{-1}$	75,35 min – 1,0 mL $v = 0,796 \text{ mL.h}^{-1}$	76,58 min – 1,0 mL $v = 0,784 \text{ mL.h}^{-1}$

Tempo espacial = 12h - vazão $1,162 \pm 0,00027 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
51,36 – 1,0 mL $v = 1,168 \text{ mL.h}^{-1}$	52,45 min – 1,0 mL $v = 1,144 \text{ mL.h}^{-1}$	51,07 min – 1,0 mL $v = 1,175 \text{ mL.h}^{-1}$

Tempo espacial = 10h – vazão $1,309 \pm 0,033 \text{ mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
47 min – 1,0 mL $v = 1,276 \text{ mL.h}^{-1}$	45,88 min – 1,0 mL $v = 1,307 \text{ mL.h}^{-1}$	44,66 min – 1,0 mL $v = 1,343 \text{ mL.h}^{-1}$

Experimentos 6 e 7 – Etanólise do óleo de coco em reator PBR, conectados em série, empregando diferentes tempos espaciais.

Tempo espacial = 14 h –vazão $0,785 \pm 0,00017\text{mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
77,30 min – 1,0 mL $v = 0,776 \text{ mL.h}^{-1}$	75,35 min – 1,0 mL $v = 0,796 \text{ mL.h}^{-1}$	76,58 min – 1,0 mL $v = 0,784 \text{ mL.h}^{-1}$
Tempo espacial = 7h - vazão $1,6188 \pm 0,00047\text{mL.h}^{-1}$		
1ª medição	2ª medição	3ª medição
37,72 min – 1,0 mL $v = 1,5906 \text{ mL.h}^{-1}$	36,43 min – 1,0 mL $v = 1,647\text{mL.h}^{-1}$	37,06 min – 1,0 mL $v = 1,6188 \text{ mL.h}^{-1}$

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

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

APÊNDICE F – Concentração de corante nas amostras de acordo com a equação da reta

Tempo (h)	Fator de diluição Amostra/<i>terc</i>-butanol	Absorbância da amostra	Concentração (g.mL⁻¹)
1	6	0	0
2	6	0	0
3	6	0	0
4	6	0	0
5	6	0	0
6	6	0	0
7	6	0	0
8	6	0	0
9	6	0	0
10	6	0	0
11	6	0	0
12	6	0,0123	0,000029
13	6	0,1517	0,000359
14	6	-	-
15	6	0,4936	0,001113
16	6	-	-
17	6	-	-
18	6	0,4902	0,001105
19	6	-	-
20	6	0,4616	0,001041
21	6	0,3750	0,000846
22	6	0,3243	0,000731
23	6	0,2743	0,000618
24	6	0,2698	0,000608
25	6	0,2393	0,000539
26	6	0,2280	0,000514
27	6	0,1798	0,000405
28	6	0,1719	0,000388
29	6	0,1395	0,000314
30	6	0,1548	0,000349
33	6	0,1317	0,000297
34	6	0,1445	0,000326
35	6	0,1022	0,000230
36	6	0,4393	0,000165
37	6	0,2372	0,00009
38	6	0,0800	0,00003