

UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL – UNISC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL -
MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Mariéli Milanesi Ceolin

TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE GIRASSOL
COMO UMA ALTERNATIVA MAIS LIMPA DE
PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Santa Cruz do Sul, abril de 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mariéli Milanesi Ceolin

**TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE GIRASSOL COMO UMA
ALTERNATIVA MAIS LIMPA DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Rosana de Cassia de Souza Schneider

Santa Cruz do Sul, abril de 2010.

Mariéli Milanesi Ceolin

**TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE GIRASSOL COMO UMA
ALTERNATIVA MAIS LIMPA DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Esta Dissertação foi submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dr. Luciano Marder

Centro Universitário do Vale do Taquari - UNIVATES

Dr. Marco Flôres Ferrão

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Dr. Valeriano Antônio Corbellini

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Dr^a Rosana de Cassia de Souza Schneider

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Orientadora

RESUMO

A utilização de lipases nas reações de transformação de óleo vegetal vem de encontro aos princípios da química verde, principalmente por serem de fontes renováveis e apresentarem grande eficiência e especificidade nas reações oleoquímicas. Dentre as lipases estudadas destaca-se principalmente a *Candida antarctica B* (Novozym® 435) e por ser comercializada já imobilizada em suporte de resina acrílica, tem a vantagem de ser reutilizada nas reações. Visando aplicar esta lipase e outras (Lipase F-AP 15, Lipase AY – Amano 30, Lipase M – Amano 10 e Lipase PS - Amano) comercializadas puras em reações de transesterificação, inicialmente foi determinada a atividade destas lipases frente a diferentes tipos de substratos (óleos e gorduras) e depois foram realizados ensaios de imobilização e de reação de transesterificação enzimática (metanólise e etanólise). As lipases selecionadas a partir da determinação da atividade foram F-AP 15 e PS, as quais foram empregadas em estudos de imobilização e de transesterificação. Com a lipase Novozym® 435, foi possível otimizar um sistema de transesterificação enzimática por processo contínuo, com o qual foi possível máxima conversão do substrato (óleo de girassol) em ésteres etílicos, assim como realizar 87 ciclos com a mesma enzima sem reduzir a atividade e 224 ciclos, após a redução da atividade. A lipase PS imobilizada em hidrogel apresentou alta conversão, sendo empregada em sistema por batelada. Os sistemas obtidos são adequados ao objetivo e podem ser utilizados com ausência de um solvente orgânico adicional, sendo apenas necessário um excesso do álcool. Os impactos ambientais identificados no sistema final de transesterificação proposto foram menores comparados ao sistema tradicional, em batelada e com catálise básica.

ABSTRACT

The use of lipases in reactions of transformation of vegetable oil is against the principles of green chemistry, mainly because they are renewable and have a high efficiency and specificity in oleochemical reactions. Among the lipases studied stands out mainly *Candida antarctica* B (Novozym® 435) and being marketed already immobilized in support of acrylic resin, has the advantage of being reused in the reactions. Seeking to apply this and other lipase (Lipase F-AP 15, Lipase AY - Amano 30, Lipase M - 10 and Lipase PS Amano - Amano) marketed in pure transesterification reactions, was initially determined the activity of these lipases to different types of substrates (oils and fats) and then tests were performed immobilization and reaction of transesterification (methanolysis and ethanolysis). Lipases selected from the determination of AP activity were F-15 and PS, which were applied in studies of immobilization and transesterification. With lipase Novozym® 435, it was possible to optimize a system of transesterification by a continuous process, with which it was possible maximum conversion of substrate (sunflower oil) in ethyl esters, and perform 87 cycles with the same enzyme without reducing the activity and 224 cycles, after the reduction of the activity. The lipase PS immobilized on hydrogel showed high conversion system being used in each batch. The systems are suitable for purpose and can be used with no additional organic solvent, and only needed an excess of alcohol. The environmental impacts identified in the proposed final system transesterification were lower compared to the traditional system, in batch and basic catalysis.

CONQUISTAS e VITÓRIAS

... Nunca deixe de voar

*Voe sempre na direção de seus objetivos,
por mais alto que eles estejam, você sempre irá alcançá-los.*

*Às vezes se sentirá sozinho ou apenas mais um na multidão
mas lembre-se, nunca deixe de voar.*

*Você encontrará obstáculos, às vezes terá que voltar ao início
e recomeçar tudo de novo*

*terá vontade de abandonar tudo, mas sempre terá alguém para encorajá-lo
Alguém que pode sempre contar com você, que sabe que o caminho é longo e
que haverá disputas, mas saberá a importância do trabalho em equipe
e que a cada conquista, poderão comemorar juntos todas as vitórias.*

Por isso, nunca deixe de voar.

*Seja audacioso, não espere o vento te levar,
mergulhe fundo em seus objetivos, esteja sempre atento as oportunidades,
pois elas o levarão a vôos ainda maiores...*

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Um muito obrigado a minha amiga orientadora Prof^a Rosana, pela dedicação e ajuda por esses dois anos de trabalho, pelo aprendizado e também pela sua compreensão e profissionalismo.

Aos meus pais, Ana Marli Ceolin e Moacir Ceolin, e aos meus irmãos, Rosana e Diogo, agradeço todo o amor, carinho, compreensão e respeito.

Agradeço também ao meu esposo, Thiago Backes, que de forma especial e carinhosa me deu força.

Agradeço com muito carinho a minha “família” de Santa Cruz do Sul, ao meu sogro, sogra e cunhada, muito obrigada por me acolherem com tanta gratidão e carinho.

E não deixando de agradecer de forma grata e grandiosa a equipe de pesquisa do LAOL, pela amizade, companheirismo e dedicação, me ajudando sempre que fosse necessário. Agradeço também aos vigias, que sempre estavam à disposição para recolher amostras.

Um agradecimento a todos os professores, do departamento de Química e Física da UNISC, ao Prof^o Valeriano, Ferrão e Wolmar pelo apoio e ajuda nos momentos necessários.

Agradeço ao CNPQ , FINEP, SCT-RS e FAPERGS pelo apoio financeiro ao projeto de biodiesel na UNISC e ao Programa BIPSS - UNISC pela bolsa, ambos viabilizaram a realização deste trabalho.

E finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto.

Um MUITO OBRIGADO a todos vocês!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A evolução dos biocombustíveis no Brasil ¹⁶	16
Figura 2 - Estrutura de um complexo enzima-substrato	19
Figura 3 - Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster	20
Figura 4 - Métodos para imobilização de enzimas.	23
Figura 5 - Reação de transesterificação de óleos vegetais por metanólise.....	26
Figura 6 - Molécula de glicerol e óleo (triacilglicerol), onde R= cadeia alquílica	32
Figura 7 - Reator semi-contínuo para produção de éster e glicerol em frações separadas ⁶⁹	35
Figura 8 - Esquema do reator de transesterificação em seis fases contínuas ⁷¹	36
Figura 9 - Esquema do reator utilizado na transesterificação sem adição de catalisador ⁷²	37
Figura 10 -Esquema do reator de membrana ⁷⁴	38
Figura 11 -Esquema do reator de transesterificação com membranas com reciclo de metanol ⁷⁵	39
Figura 12 -Fluxograma da avaliação da atividade lipase.	43
Figura 13 -Fluxograma da imobilização da enzima PS Amano em hidrogéis.	47
Figura 14 -Fluxograma da transesterificação enzimática por sistema contínuo e por batelada	49
Figura 15 -Esquema da reação de transesterificação enzimática por sistema em batelada.	50
Figura 16 -Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 1).	53
Figura 17 -Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 2).	54
Figura 18 -Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 3).	55
Figura 19 -Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 1 reator (Protótipo 4).	56
Figura 20 -Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 2 reatores (Protótipo 4).	57
Figura 21 -Modelo do reator do Protótipo 4.....	58
Figura 22 -Fluxograma da avaliação ambiental do sistema contínuo de bancada.	58

Figura 23 -Dendrograma Atividade lipase frente a diferentes substratos.....	66
Figura 24 -Gráfico de scores PC1x PC2	68
Figura 25 -Gráfico de loadings PC1x PC2	68
Figura 26 -Gráfico de scores PC1x PC2	72
Figura 27 -Gráfico de loadings PC1x PC2	72
Figura 28 -Cromatograma íon total do óleo de girassol	73
Figura 29 -Taxa de crescimento das 6 esferas de hidrogel , com relação ao diâmetro da esfera hidratada.	74
Figura 30 -Esfera de hidrogel hidratada com solução de enzima.....	74
Figura 31 -Cromatograma de CCD do produto de reação de transesterificação (24h) realizada com 10 e 20 esferas de hidrogel com enzima imobilizada (O-óleo; B-Biodiesel; 10 – esferas e 20 esferas).	75
Figura 32 -Transesterificação das amostras de óleo de girassol empregando a lipase PS Amano imobilizada em hidrogel (Estudos 3, 6 e 9 com 10 esferas; Estudos 4, 7, 10 com 20 esferas e Estudos 5, 8 e 11 com 40 esferas)	75
Figura 33 -Diferença de tamanho das esferas de hidrogel com enzima imobilizada após a transesterificação.	76
Figura 34 -Proposição de transferência de metanol observado em esferas de hidrogel com enzimas imobilizadas em reações de transesterificação.	77
Figura 35 -Cromatograma de CCD das amostras em triplicata da reação de transesterificação por sistema batelada do óleo de girassol, onde O- óleo de girassol, B- ésteres metílicos (Biodiesel do óleo de girassol).....	79
Figura 36 -Grau de conversão do óleo de girassol em biodiesel por biocatálise	80
Figura 37 -Conversão do óleo de girassol por etanólise enzimática por batelada. ...	80
Figura 38 -Espectro no infravermelho de óleo de girassol (A) e éster metílico do óleo de girassol (B).	82
Figura 39 -Cromatograma íon total do produto de reação de transesterificação do sistema semi-contínuo - Protótipo 1.	83
Figura 40 -Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema semi-contínuo enzimático realizado com Protótipo 1, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).	84
Figura 41 -Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema semi-contínuo enzimático realizado com Protótipo 2, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).	84

Figura 42 -Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema semi-contínuo enzimático realizado com Protótipo 3, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).....	86
Figura 43 -Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema contínuo enzimático realizado com 1 reator, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).....	88
Figura 44 -Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema contínuo enzimático realizado com 2 reatores, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).....	90
Figura 45 -Gráfico das Conversões do Sistema Contínuo Enzimático utilizando 2 reatores.	91
Figura 46 -Gráfico do gasto energético do Sistema Enzimático Contínuo em Bancada Protótipo 4.	92
Figura 47 -Gráfico dos Impactos Ambientais do protótipo 4 de produção de biodiesel por transesterificação enzimática contínua.	96

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -Sistemas biocatalíticos utilizados para produção de biodiesel.....	28
Tabela 2 -Metanólise com a lipase Novozym 435 ^{62,63,64}	30
Tabela 3 -Composição de ácidos graxos	33
Tabela 4 -Condições experimentais empregadas na reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol por batelada.	51
Tabela 5 -Atividade lipase (UI kg ⁻¹) das enzimas em relação ao substrato utilizado.64	
Tabela 6 -Atividade lipase (UI kg ⁻¹) da enzima comercial imobilizada Novozym 435 em relação ao substrato utilizado.....	65
Tabela 7 -Ácidos graxos identificados e índice de iodo das amostras de óleo de palma e palmiste utilizadas para determinação da atividade lipase.	70
Tabela 8 -Descrição das bandas do infravermelho do óleo puro e biodiesel.	83
Tabela 9 -Gasto energético do Sistema Enzimático Contínuo em Bancada Protótipo 4.	92
Tabela 10 -Planilha de interação de Leopoldo obtida a partir da produção de biodiesel por sistema contínuo (Protótipo 4) utilizando como matéria-prima o óleo de girassol e etanol e como catalisador a lipase Novozym 435.	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivos	18
1.1.1	Objetivos específicos	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Enzimas	19
2.1.1	Atuação da enzima e fatores extrínsecos de atividade lipase	21
2.1.1.1	Confinamento em matriz polimérica ou em cápsulas	23
2.2	Transesterificação enzimática	25
2.3	Matérias prima utilizadas	32
2.4	Reatores para a produção de biodiesel	34
2.5	Produção de Biodiesel	40
3	METODOLOGIA	41
3.1	Enzimas, substratos e reagentes	41
3.2	Avaliação da atividade lipase	42
3.2.1	Determinação da atividade Lipase	43
3.2.2	Avaliação da atividade de lipase F-AP-15 frente a diferentes substratos	44
3.2.3	Análise por infravermelho	45
3.2.4	Índice de Iodo	45
3.2.5	Modelos multivariados	45
3.3	Imobilização da lipase PS Amano - Estudo da imobilização em um suporte alternativo - Hidrogel	46
3.3.1	Hidratação dos hidrogéis	46
3.3.2	Imobilização da enzima PS nas esferas de hidrogel	47
3.3.3	Produção de biodiesel em batelada com lipase imobilizada em hidrogel	48
3.4	Produção de biodiesel empregando Enzima Imobilizada Comercial Novozym® 435	48
3.4.1	Produção de biodiesel de óleo de girassol por batelada	49
3.4.2	Produção de biodiesel por sistema semi-contínuo cíclico	51
3.4.3	Produção de biodiesel por sistema contínuo	55
3.5	Avaliação Ambiental do Protótipo 4	58
3.5.1	Consumo energético	58
3.5.2	Planilha de Leopold	59
3.6	Análise do biodiesel	60
3.6.1	Preparo de padrões e amostragem	60
3.6.2	Cromatografia camada delgada	61

3.6.3	Cromatografia gasosa.....	62
3.6.3.1	Derivatização dos óleos para análise por CG	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Estudo da atividade lipase	64
4.1.1	Estudo da atividade lipase de enzimas comerciais não imobilizada com diferentes substratos.....	64
4.1.2	Estudo da atividade lipase da enzima comercial imobilizada Novozym® 435 com diferentes substratos	65
4.1.3	Análise quimiométrica do estudo de atividade lipase.....	66
4.2	Estudo de atividade lipase com a enzima FAP – 15 com diferentes substratos saturados	69
4.3	Imobilização da lipase PS em hidrogel	73
4.3.1	Resultados da aplicação das esferas de hidrogel na produção de biodiesel em batelada	74
4.4	Produção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando Novozym 435.....	78
4.4.1	Produção de biodiesel por batelada.....	78
4.4.2	Produção de Biodiesel por Sistema Semi-contínuo Cíclico e Contínuo... ..	81
4.4.2.1	Protótipo 1 e Protótipo 2.....	81
4.4.2.2	Protótipo 3.....	85
4.4.2.3	Protótipo 4.....	86
4.5	Consumo de energia do sistema contínuo.....	91
4.6	Avaliação do processo utilizando Planilha de Leopold.....	93
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
6	Trabalhos Futuros	98
	ANEXO A – Curvas analíticas de cada éster identificado nas amostras.....	104
	ANEXO B – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 1).	105
	ANEXO D – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 3).	107
	ANEXO E – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 1 Reator (Protótipo 4).	108
	Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 2 Reator (Protótipo 4).	108
	ANEXO F - Registro Fotográfico do Reator do Protótipo 4.	109
7	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia consumida provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento, tornando, portanto, o emprego de fontes alternativas de energia um empreendimento¹.

O diesel tem uma função essencial na economia industrial de um país, sendo usados em automóveis, ônibus urbanos, locomotivas, geradores elétricos, etc. O consumo de diesel em países desenvolvidos tem aumentado continuamente durante as últimas décadas. Um combustível de diesel alternativo deve ser tecnicamente viável, economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e com disponibilidade². Consideradas estas exigências, os triacilgliceróis de óleos vegetais ou gorduras animais e seus derivados podem ser considerados como alternativas viáveis para produção de combustíveis substitutos ao diesel^{3,4}.

O biodiesel é derivado de fontes renováveis, biodegradável, não-tóxico e com baixo perfil de emissão comparado ao diesel de petróleo⁵. É obtido comumente a partir de uma reação química denominada transesterificação, pela mistura de óleos vegetais ou gorduras animais com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador, tendo como co-produto da reação o glicerol. Pode ser obtido também pelo processo de esterificação⁶.

O uso direto dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas e químicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, a acidez, a baixa volatilidade, a presença de ácidos graxos livres, a deposição de resíduos de carbono e o caráter poliinsaturado, que acarretam em alguns problemas aos motores, bem como em uma combustão incompleta^{7,8}. Por esse motivo, visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, micro-emulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com metanol ou etanol⁹. Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção para reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, visto que o processo é relativamente simples promovendo a obtenção de um combustível cujas propriedades são similares às do óleo diesel^{1,10}.

O uso destes ésteres de óleos vegetais ou gorduras animais encontra-se registrado na “Environment Protection Agency – EPA” dos Estados Unidos da

América como combustível e como aditivo para combustíveis e pode ser usado puro (B100), em mistura com o diesel de petróleo como, por exemplo, a 20% (B20), ou numa proporção baixa como aditivo de 1 a 5%. O uso está associado à substituição de combustíveis fósseis em motores diesel, sem haver a necessidade de nenhuma modificação no motor ^{11,12}.

O biodiesel possui algumas características que representam vantagem sobre os combustíveis derivados do petróleo. Essas vantagens incluem em nível de Brasil, a redução à dependência de importação de petróleo, a ausência praticamente completa de enxofre e de compostos aromáticos, a presença de maior ponto de fulgor, alto número de cetano, a maior disponibilidade de matérias-primas em uma grande variedade de fontes renováveis de rápida biodegradabilidade e ausência de problemas para transporte e estocagem. Além disso, seqüestra mais gás carbônico da atmosfera durante a sua produção do que emite quando está sendo queimado, ajudando, com isto, a aliviar o crescente conteúdo de gás carbônico da atmosfera ^{10,13,14}.

O uso de biodiesel em misturas de até 3% ocasiona um aumento da lubrificidade, e com isto, pode prolongar a vida da máquina, diminuir a frequência de substituição de peças e reduzir sensivelmente as emissões de particulados e fumaça ¹⁵.

Cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis. No resto do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não-renováveis. Pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia, como alternativas estratégicas ao petróleo, estes dados pode ser confirmados na Figura 1 ¹⁶.

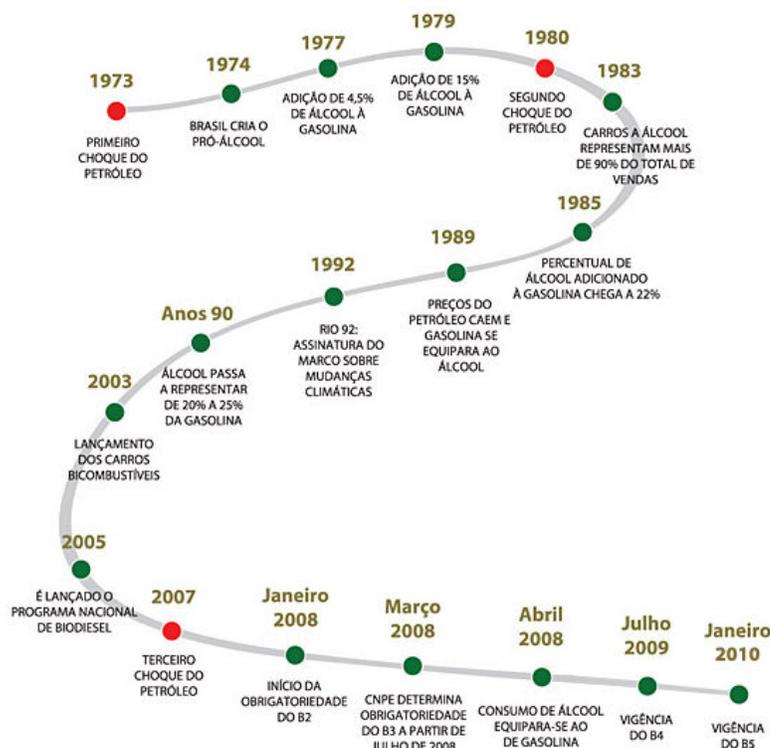


Figura 1 - A evolução dos biocombustíveis no Brasil ¹⁶.

O biodiesel pode ser produzido como um combustível de alta qualidade para motores de ignição por compressão e é amplamente aceito, particularmente quando misturado ao combustível convencional. No entanto, apresenta menor energia do que o diesel convencional, o que ocasiona um aumento em torno de 6% no consumo, maior preço e os tipos de biodiesel comumente usados possuem um desempenho de fluxo a frio inadequado durante o inverno ¹⁷.

A melhora da estabilidade oxidativa e das propriedades de baixa temperatura permanecem como desafios técnicos. A maioria das emissões liberadas, como material particulado, hidrocarbonetos e monóxido de carbono, com exceção dos óxidos de nitrogênio (NOx) foram sendo reduzidas pelo uso de biodiesel ^{18,19}. Assim, a redução de NOx nas emissões gasosas é outro desafio técnico enfrentado pelo biodiesel, especialmente em função da regulamentação cada vez mais rigorosa para o controle de emissões, afetando os motores diesel e ficando mais efetiva nos próximos anos ²⁰.

Tais obstáculos já há mais anos vem sendo superados considerando que o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador)

são otimizado levando, a produção de biodiesel a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel, ou seja, aquele verificado nas bombas dos postos de abastecimento ²¹.

Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos com testes de vários tipos de gorduras e óleos transesterificados, puros ou misturados ao diesel convencional em diferentes proporções e têm demonstrado bons resultados quando utilizados por caminhões, ônibus e tratores ^{22,23}.

Nesse processo é imprescindível a qualidade do produto final e um dos aspectos a serem controlados e otimizados é o uso de catalisadores ²⁴.

Através da tecnologia enzimática, podem-se obter produtos de alta qualidade de maneira limpa, atendendo às necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental.

O processo enzimático pode ser aplicado às modificações específicas ou interconversões de estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos, empregando enzimas contidas em células ou isoladas. A escolha do biocatalisador ocorre entre organismos vivos, de origem animal, vegetal ou microbiana ²⁵. Estes biocatalisadores são proteínas que possuem um alto poder catalítico, têm alto grau de especificidade por seus substratos; aceleram reações químicas específicas e, em alguns casos, podem funcionar tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos ^{24,26}.

Existem vários fatores que podem influenciar a ação das enzimas como biocatalisadores; entre estes podem ser citados a temperatura, o pH, as interações químicas do fluido, os agentes químicos e as irradiações. Altas temperaturas provocam a desnaturação das enzimas, por alterar as ligações químicas que mantêm a sua estrutura tridimensional ²⁴.

A aplicação das enzimas como biocatalisadores em processos industriais tem aumentado gradativamente. Entre os processos de maior interesse, estão as reações de hidrólise, síntese e transesterificação de lipídios ²⁷. As enzimas de origem vegetal ou microbiana são obtidas com maior facilidade que as de origem animal, sendo que as de maior interesse comercial são as enzimas microbianas devido ao curto período para sua produção, à grande variedade de processos metabólicos e à grande biodiversidade na natureza passíveis de serem testados como fonte de enzimas, além de agirem sobre moléculas orgânicas complexas ²⁸.

Muitos estudos foram realizados a respeito de alcoolise enzimática de triacilgliceróis para a produção de biodiesel, utilizando vários tipos de óleos e gorduras. De um modo geral, percebe-se que a transesterificação dos triacilgliceróis utilizando enzimas ou células imobilizadas é mais eficiente do que o uso de enzimas não imobilizadas, apresentando um bom rendimento em menor tempo de reação na presença ou ausência de solventes orgânicos.

Como nos últimos anos intensificaram-se as discussões com relação à diversificação agrícola da região do Vale do Rio Pardo e a curto ou longo prazo o cultivo de oleaginosas poderá contribuir para esta finalidade, a busca de sistemas biotecnológicos que partam destes óleos e empreguem biocatalisadores pode ser um fator de desenvolvimento. Desta forma, uma das alternativas tecnológicas promissoras para produção de biodiesel é a rota enzimática.

1.1 Objetivos

A proposta deste trabalho visa criar alternativas viáveis para a substituição de catalisadores químicos por lipases de fonte renováveis com potencial de reaproveitamento e menos impactantes para o meio ambiente.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade lipase das lipases comerciais: F-AP 15, AY – Amano 30, M – Amano 10 e PS –Amano, frente a diferentes substratos.
- Selecionar algumas das lipases testadas quanto à atividade para emprego em reações de transesterificação usando o óleo de girassol.
- Testar o emprego de hidrogel para a imobilização de lipase e emprego na metanólise.
- Realizar a metanólise e etanólise do óleo de girassol empregando processo enzimático.
- Otimizar a produção de biodiesel por metanólise ou etanólise enzimática, empregando sistema contínuo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para reconhecer o processo de transesterificação enzimática é importante primeiramente reconhecer como as lipases atuam como um catalisador, qual a sua potencialidade e as implicações deste processo.

2.1 Enzimas

As enzimas são moléculas presentes em organismos vivos que agem como catalisadores em sistemas biológicos, elas aumentam a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada ^{29,30}. Os substratos são ligados ao centro ativo da enzima. Por raio X e em baixas temperaturas (para reduzir a velocidade das reações) já foi possível visualizar aspectos reveladores dos complexos enzima-substrato (Figura 2) ⁸.

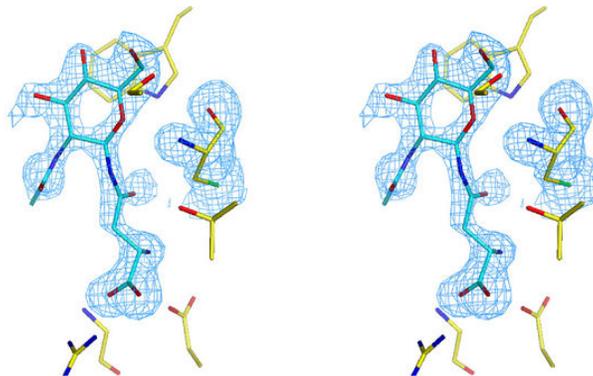


Figura 2 - Estrutura de um complexo enzima-substrato ³¹.

As enzimas apresentam especificidade, pois, atuam exclusivamente sobre substâncias de configuração específica. Quanto à estereoespecificidade, ela se deve ao fato delas apresentarem quiralidade, uma vez que são formadas exclusivamente de L-aminoácidos, formando sítios ativos assimétricos ³².

Na Figura 3, está representado o mecanismo geral de ação catalítica de uma lipase na hidrólise de éster.

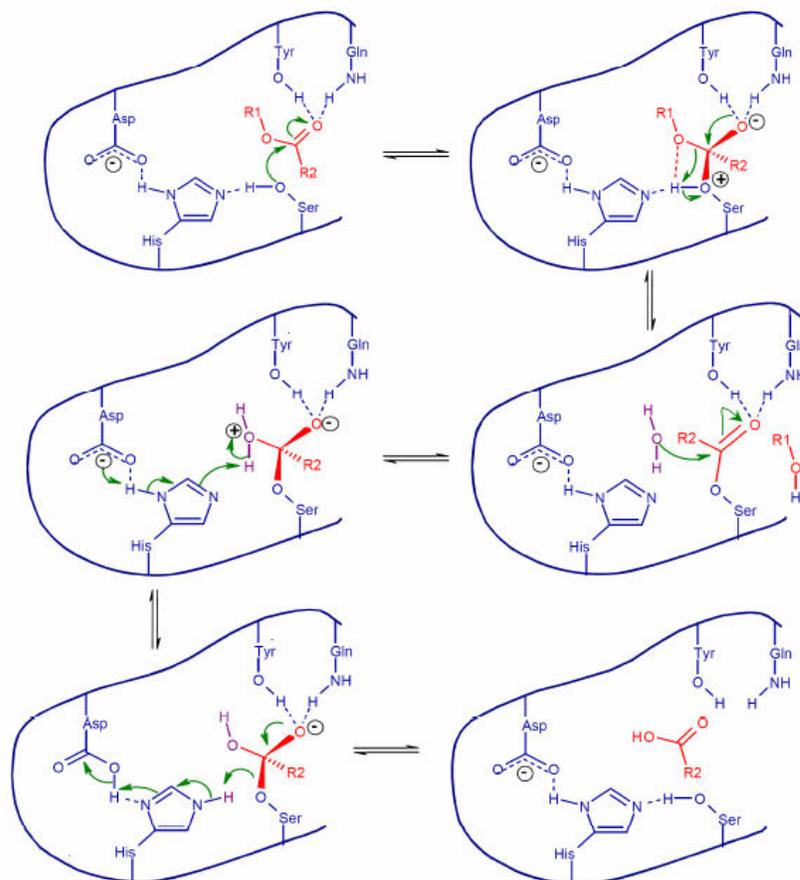


Figura 3 - Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster ³³.

Entre as enzimas as que são de interesse deste trabalho são as lipases denominadas triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3 e classificadas como α/β hidrolases. Estas moléculas atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. A diferença entre uma lipase e uma esterase (EC 3.1.1.1) está no fato que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que a esterase age em substratos solúveis ⁹. Estas lipases biocatalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis fornecendo primeiramente di e monoacilgliceróis e quando total, glicerol e ácidos graxos livres ^{9,34}.

2.1.1 Atuação da enzima e fatores extrínsecos de atividade lipase

A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica, dando-se destaque ao pH e à temperatura, que interferem na atividade lipase pois agem em grupos dissociáveis de vários aminoácidos, os quais podem estar no sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. Assim, a temperatura deve ser controlada para que seja possível aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema, aumenta-se a probabilidade de choques efetivos entre elas e com a finalidade de evitar a desnaturação da enzima, que ocorre em temperaturas mais elevadas quando há a perda de estrutura nativa, catalítica, devido à alteração das ligações químicas na estrutura tridimensional.

O rompimento das ligações de hidrogênio que são termolábeis desencadeia uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou estado sem estrutura definida, à enzima é dita então desnaturada. A temperatura que provoca desnaturação naturalmente varia para cada enzima, mas, geralmente, está pouco acima de sua temperatura ótima de reação ³⁵. Além disso, os valores extremos de pH, provocam protonação ou desprotonação de grupos presentes na estrutura da proteína e como consequência, ocasionam perda de atividade lipase ³⁶.

As funções biológicas das proteínas dependem da forma correta de sua estrutura nativa. A perda desta estrutura ocasiona um desdobramento, levando a um estado inativo. Conseqüentemente, este estado deve ser cuidadosamente estudado, para haver um melhor entendimento sobre o mecanismo de desnaturação das proteínas ³⁷.

Muitas das aplicações das enzimas são em solvente orgânico, visando a solubilidade dos substratos. No entanto, solventes apolares, mudam a constante dielétrica do meio e alteram a força das ligações eletrostáticas, provocando desnaturação, que na maior parte dos casos é irreversível ⁹.

Com relação ao uso de enzima em reações de esterificação e transesterificação, em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água ¹¹.

Uma aplicação das lipases que vem sendo extensivamente revisada é a sua utilização na produção de biocombustíveis a partir de óleos vegetais. Um exemplo é o uso da *Candida antarctica B* (Novozym® 435) na etanolise enzimática do óleo de rícino. Os resultados apresentados neste estudo mostram rendimentos superiores a 90% de conversão de triacilgliceróis em ésteres etílicos do respectivo óleo ¹³. Resultados semelhantes também já haviam sido obtidos por Nelson e colaboradores ¹⁴.

Um caminho para minimizar o processo de desnaturação da enzima durante a biocatálise de reações orgânicas como a de transesterificação é o uso de lipases imobilizadas.

A lipase imobilizada leva a estabilidade e atividade do biocatalisador a um patamar superior ao da forma livre. O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos ³⁸.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização ³⁸.

Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil ³⁹. Diferentes métodos de imobilização promovem a ligação de lipase e suportes por adsorção ou ligação da lipase em um material insolúvel no meio reacional, por entrecruzamento, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica²¹. A Figura 4 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas ⁴⁰.

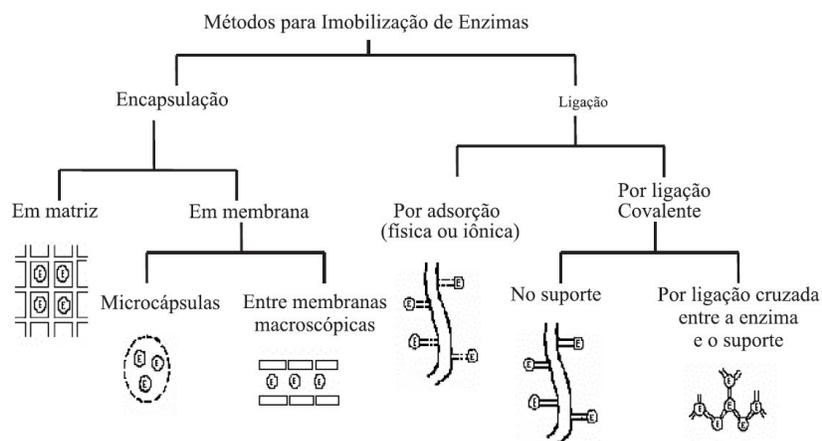


Figura 4 - Métodos para imobilização de enzimas ⁴¹.

A imobilização por adsorção, ligação covalente e/ou multifuncional, em matrizes poliméricas ou por encapsulação, apresenta-se como técnica importante para a utilização em meio orgânico e, muitas vezes, com aumento na atividade e estabilidade. Embora cada método apresente vantagens e desvantagens, a escolha da estratégia deverá considerar as relações entre suporte-enzima-substrato-solvente orgânico-água, para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases. Estes sistemas têm sido utilizados com sucesso para a síntese de lactonas, obtenção de monoglicerídeos, resolução de aminas, ácidos e álcoois racêmicos, e na síntese de ésteres de cadeias curtas, médias e longas, e aromáticos ⁴¹.

2.1.1.1 Confinamento em matriz polimérica ou em cápsulas

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em "confinar" uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero

evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador. Um exemplo é a aplicação de filmes de polissulfonato de sódio (PSS), poli(óxido de etileno) (PEO) e blendas PSS/PEO para a imobilização de lipases de diferentes fontes e procedências.

Em uma pesquisa realizada por Nascimento *et al*⁴², as lipases foram imobilizadas em micro emulsão baseado em organogéis e utilizado com sucesso para a esterificação enantiosseletiva, diesterificação e reações de transesterificação, em solventes orgânicos, a 25°C. Esta metodologia é uma alternativa para a utilização de enzimas em solventes orgânicos. Foi observada alta estabilidade enzimática. Esta é uma maneira conveniente de usar este catalisador em solventes orgânicos, que emprega pequenas quantidades da enzima (250 mg mL⁻¹).

Pesquisadores desenvolveram estratégias para otimização da estabilidade operacional da preparação da lipase *Candida rugosa* imobilizada em sílica de porosidade controlada¹⁷. A albumina e o polietilenoglicol foram utilizadas como aditivos estabilizantes e seus efeitos foram comparados a amostras controle (lipase imobilizada sem aditivo). A albumina mostrou efeitos benéficos para todas as concentrações testadas e polietilenoglicol não apresentou resultados satisfatórios. Moreira *et al*⁴³, realizaram também a comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. Foi comparado a eficiência de imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa* em uma matriz híbrida de polissiloxano álcool polivinílico, por adsorção, ligação covalente e encapsulamento. As atividades dos derivados imobilizados foram avaliados usando p-nitrofenilpalmitato (hidrólise) e ácido butírico e butanol (esterificação) como substratos. Realizaram também a estabilidade operacional e armazenamento. Entre os procedimentos testados, a matriz proposta foi eficaz para imobilizar *Candida rugosa* lipase por adsorção e técnicas de acoplamento covalente e impróprios para fins de encapsulamento. Empregando suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool puro (imobilização por adsorção física), correspondeu a 96,5% de rendimento de imobilização. No caso da

lipase imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool ativado com glutaraldeído, foi verificado um pequeno decréscimo na atividade e no rendimento. A menor expressão de atividade catalítica verificada para a lipase imobilizada por glutaraldeído pode ter sido ocasionada por uma modificação conformacional da enzima durante a etapa de fixação ao suporte ativado com glutaraldeído.

Os resultados revelam que as melhores propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico foram demonstrados pelo acoplamento covalente da lipase imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool ⁴⁴, incluindo também uma meia-vida satisfatória e boa estabilidade de armazenamento.

2.2 Transesterificação enzimática

A transesterificação consiste numa reação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis. Para a produção de biodiesel a transesterificação é conduzida com alcoóis metílicos ou etílicos. Os ésteres obtidos desta forma, são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia.

A reação de transesterificação, Figura 5 pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. O processo é uma seqüência de três consecutivas reações reversíveis, podendo formar mono e diacilgliceróis como intermediários de reação. A utilização da lipase como biocatalisador na produção de biodiesel tem um grande potencial comparado com os métodos químicos, porque não exige operações complexas para recuperação do glicerol e eliminação do catalisador, além de evitar etapas de purificação ²⁸.

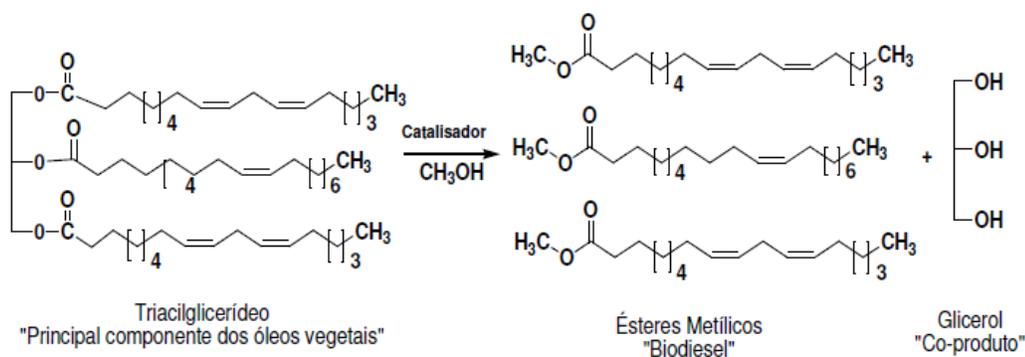


Figura 5 - Reação de transesterificação de óleos vegetais por metanólise.

As vantagens ambientais do processo enzimático comparado ao químico são evidentes, pois requerem menor gasto energético com temperaturas elevadas, os produtos são mais facilmente recuperados e a quantidade de glicerina, co-produto do processo, é melhor separada e apresenta qualidade superior ²⁸.

O custo das lipases continua sendo consideravelmente maior que dos catalisadores químicos, entretanto o procedimento de imobilização da lipase facilita uma posterior reutilização do biocatalisador.

Resumidamente a reação transesterificação já é conhecida como uma seqüência de três etapas consecutivas e reversíveis, em que um éster é transformado em outro pela mudança na porção alcóxi (radical alquila ligado ao átomo de oxigênio, RO-). Na primeira etapa, as moléculas de triacilglicerol são convertidas em diacilglicerol, depois em monoacilglicerol e, finalmente, na última etapa, o glicerol é obtido. Os alcoóis que podem ser utilizados neste tipo de reação são metanol, etanol, propanol, butanol entre outros de cadeia curta. Devido às propriedades conferidas ao produto, o metanol e o etanol estão entre os principais agentes de transesterificação e são os mais freqüentemente empregados no processo de produção de biodiesel ⁴⁵.

Destaca-se que quando se emprega método de catálise química (ácida ou básica), produzir biodiesel por etanólise, que usa o etanol, não é um processo tão simples quanto realizar a transformação com o uso do metanol, denominado metanólise. Uma dificuldade no processo de etanólise é a necessidade de se utilizar o etanol anidro, pois o uso do etanol hidratado reduz o grau de conversão da reação, levando à reversibilidade de reação ⁴⁶. Outro problema importante a ser destacado é

a maior dificuldade de separação dos produtos, ésteres etílicos e glicerol, porém é ambientalmente atrativo por ser renovável e não tóxico ^{47,48}.

A conversão na transesterificação enzimática tem resultados promissores, conforme apresentado na Tabela 1, com os substratos etanol e óleo de pinhão manso e utilizando a lipase imobilizada de *B. cepacia* foi possível uma taxa de conversão de 98 % em 8 horas de reação ⁴⁹.

Esta lipase foi investigada livre e imobilizada em processos de transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol. A lipase imobilizada, além de apresentar melhores resultados, foi constantemente mais ativa do que a livre e também mais estável, apresentando maiores condições de reutilização no processo e apresentando redução na atividade quando submetida a usos repetitivos ⁵⁰.

A partir da década 80 houve um crescente interesse na utilização de técnicas de imobilização de enzimas que visam minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, como solventes orgânicos, variações no pH, altas temperaturas, diminuição do custo por análise, aumentando a rapidez e a exatidão dos processos utilizados ⁵¹.

Tabela 1 - Sistemas biocatalíticos utilizados para produção de biodiesel.

Biocatalisadores	Agente microbiano	Solvente	Óleo	Álcool	Rendimento (%)	Tempo (h)	Fonte
Lipase bruta	<i>Cryptococcus spp</i>	n-hexano	Arroz	Metanol	86	120	52
Lipase livre	<i>Bacillus SP</i>	Hexano	ácido oléico	Metanol	51	16	79
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Água	Soja	Metanol	40	1	50
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Água	Soja	Etanol	35	1	50
	<i>Burkholderia cepacia/ celite</i>	Livre	Pinhão-manso	Etanol	98	8	49
	<i>Bacillus sp / sefarose 4B</i> ativada	Hexano	ácido oléico	Metanol	60	16	67
	<i>Burkholderia cepacia / matriz de</i> filosilicato sol-gel	Livre	Gordura	Metanol	98	48	66
Lipase imobilizada	<i>Candida antarctica / matriz de</i> filosilicato sol-gel	Livre	Gordura	Metanol	60	48	66
	<i>Burkholderia cepacia / sílica</i>	Água	Soja	Metanol	67	1	50
	<i>Burkholderia cepacia / sílica</i>	Água	Soja	Etanol	65	1	50
Sistema celular íntegro	<i>Rhizopus oryzae</i>	Hexano	Soja	Metanol	86	72	65
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Livre	Soja	Metanol	72	72	65
	<i>Rhizopus oryzae</i>	terc-butanol	Soja	Metanol	90	24	65

Lipase pó	<i>Cândida rugosa</i>	Nenhum	Colza	2-Etil 1-hexanol	97	-	53
Imobilizada	<i>M. miehei</i> (Lipozyme IM-20)	Nenhum	Manga (<i>Madhuca latifolia</i> , <i>Mangifera indica</i>) e sal (<i>Shorea robusta</i>)	Álcool C ₄ -C _{18:1}	86.8 - 99.2	-	54
	<i>M. miehei</i> (Lipozyme)	Nenhum	Girassol	Etanol	83	-	55
Imobilizada	<i>C. Antarctica</i> (Novozym 435)	Nenhum	Peixe	Etanol	100	-	56
Lipase pó	<i>P. cepacia</i> (Lipase PS-30) + <i>C. antarctica</i> (Lipase SP435)	Nenhum	Gordura restaurante	Etanol	85,4	-	57
	<i>M. miehei</i> (Lipozyme IM60)	Hexano	Sebo	Álcool Primário ^a	94.8-98.5	-	58
Imobilizada	<i>C. antarctica</i> (SP435)	Hexano	Soja	Álcool	61.2-83.8		
	<i>M. miehei</i> (Lipozyme IM60)	Nenhum	Colza	Secundário ^b	19.4		
	<i>M. miehei</i> (Lipozyme IM60)	Nenhum		Metanol	52		
		Nenhum		Etanol	65.5		
Lipase pó	<i>P. fluorescens</i>	Éter de Petróleo	Girassol	Metanol	3	-	59
		Nenhum		Metanol	79		
		Nenhum		Etanol	82		
Lipase pó	<i>P. cepacia</i> (Lipase PS-30)	Nenhum	Palmiste	Metanol	15	-	60
				Etanol	72		

^a Metanol, etanol, propanol, butanol e isobutanol.

^b Isopropanol e 2-butanol.

Conforme demonstrado na Tabela 2, Samukawa *et al*⁶² concluíram em seus estudos, que a lipase imobilizada *Candida antarctica* (Novozym 435) foi a mais eficaz para metanólise entre as lipases que eles testaram. Uma vez que a enzima foi inativada por agitação em uma mistura que continha 1,5 equivalentes molares de metanol/óleo, eles desenvolveram um método onde adicionou-se metanol aos poucos para evitar a inativação da lipase. Como resultado, mais de 95% da conversão de éster foi mantida mesmo após 50 ciclos de reação. Em misturas contendo mais equivalentes do que 1,5 molar de metanol, o montante em excesso de metanol permaneceu como gotículas dispersas no óleo. Os autores salientam que a lipase pode ser inativada quando em contato com estas gotas de metanol, em um sistema de reação em que se dissolve completamente o metanol necessário para a metanólise enzimática de óleos. Eles também apontam que o procedimento de adição gradual de metanol é adequado para um processo industrial⁶¹.

Watanabe *et al*⁵⁹, em 2000, publicaram resultados da eficiência na reação de metanólise em batelada utilizando a Novozym 435. O teor de ésteres metílicos alcançado foi de 90-93%, e a lipase pôde ser usada por pelo menos 100 vezes em ambos os sistemas de reação. O efeito do pré-tratamento de Novozym 435 em metanólise para a produção de biodiesel foi investigada por Samukawa *et al*.⁶⁴ A metanólise progrediu muito mais rápido quando Novozym 435 foi incubado em oleato de metila em 0,5 h e posteriormente, em óleo de soja para 12 h. Como resultado, o teor de ésteres metílicos na mistura de reação chegou a mais de 97% no intervalo de 3,5 h por adição gradual de 0,33 molar equivalentes de metanol em intervalos 0,25-0,4 h.

Tabela 2 - Metanólise com a lipase Novozym 435^{62,63,64}.

Lipase	Regioespecificidade	Processo e operação	Éster Metílico (%)	Tempo de reação (h)	Fonte
<i>Candida antarctica</i> ^a (Novozym® 435)	Nenhuma	Batelada repetido ^b	96 -98	48	62
		Sistema contínuo ^c	92-94	7	63
		Batelada ^{b, d}	87	3,5	64

^a Lipase imobilizada por uma resina de troca iônica.

^b Três etapas de adição de metanol, uma mistura de reação de óleo/metanol (1:1, mol mol⁻¹) foi alimentado em cada etapa.

^c Em três etapas, uma mistura de reação de óleo/metanol (1: 3 mol mol⁻¹) foi alimentado em cada coluna.

^d O pré-tratamento da lipase imobilizada com oleato de metila e óleo de soja.

A imobilização de enzimas é um método a ser explorado, no caso de lipases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência ⁶⁵. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico, quando ligações covalentes são formadas com a lipase, e o método físico, quando interações fracas ou retenção mecânica é utilizada. No método químico, a lipase é fixada no suporte por ligação covalente com formação de ligação cruzada. No método físico a lipase pode ficar retida ou micro encapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes. A recuperação de lipases imobilizadas depende da meia vida da enzima, que após certo tempo precisa de purificação antes de ser reutilizada.

Apesar de suas propriedades catalíticas excelentes, as propriedades da enzima têm que geralmente ser melhoradas antes de sua execução na escala industrial, onde muitos ciclos de processos elevados do rendimento são desejados. Geralmente, as enzimas solúveis têm que ser imobilizadas para reuso por várias vezes em reatores industriais e as propriedades críticas da enzima tem que ser melhorada como a estabilidade, atividade, inibição por produtos da reação e seletividade. As enzimas imobilizadas podem exibir propriedades funcionais muito melhor por protocolos muito simples de imobilização.

Estudos mostram que várias lipases produzidas por diferentes organismos como *Mucor miehei* e *Candida rugosa* são utilizadas para atuarem como biocatalisadoras na produção de biodiesel e oportunizam a recuperação do catalisador, eliminando os problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio, além de minimizar os impactos causados ao meio pelos resíduos que o processo gerou ⁶⁶.

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas na busca por um método adequado para a produção de biodiesel, entre os quais está a produção de biocatalisadores com diversos polímeros sintéticos e naturais, como o poli (óxido de etileno), poli (álcool vinílico), carboximetilcelulose, alginato de sódio e quitosana ^{50,67}.

2.3 Matérias prima utilizadas

Óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, formadas predominantemente de produtos de condensação entre glicerol e ácidos graxos chamados triacilgliceróis. Uma molécula de óleo consiste de três moléculas de ácido graxo esterificada em uma molécula de glicerol, como podemos ver na Figura 6.

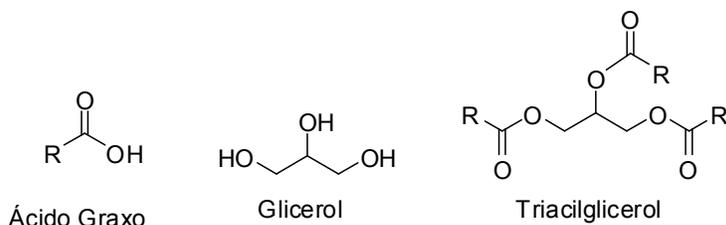


Figura 6 - Molécula de glicerol e óleo (triacilglicerol), onde R= cadeia alquílica

A diferença entre óleos e gorduras reside na sua aparência física. As gorduras apresentam aspecto sólido e os óleos, líquido. A temperatura de 20°C é definida como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo desta temperatura. O termo gordura é usualmente empregado quando o estado físico não tem maior significância. As propriedades físicas, químicas e nutricionais dos óleos e gorduras estão subordinadas à natureza e à proporção de seus constituintes, do número de átomos de carbono que formam a cadeia dos ácidos graxos e da maneira como eles formam os triacilgliceróis⁶⁸.

Os óleos e gorduras apresentam papel fundamental na alimentação humana, fornecem calorias, agem como veículo para vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como linoléico, linolênico e araquidônico.

O óleo de girassol, de cor amarelo-claro, tem cheiro agradável, o sabor é doce e resiste a baixas temperaturas sem congelar-se. Este óleo quando utilizado na alimentação humana, se distingue dos outros óleos vegetais, em função da sua composição em ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos comumente encontrados no óleo de girassol, objeto de estudo deste trabalho, são os que estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição de ácidos graxos ⁶⁸.

Ácido graxo	Nomenclatura	Legislação % (g/100g)
C < 14	-	< 0,4
C 14:0	Mirístico	<0,5
C 16:0	Palmítico	3,0 - 10,0
C 16:1	Palmitoléico	<1,0
C 18:0	Esteárico	1,0 - 10,0
C 18:1	Oléico	14,0 - 35,0
C 18:2	Linoléico	55,0 - 75,0
C 18:3	Linolênico	<0,3
C 20:0	Araquídico	<1,5
C 20:1	Eicosenóico	<0,5
C 22:0	Behênico	<1,0
C 22:1	Erúcico	<0,5
C 24:0	Lignocérico	<0,5
C 24:1	Tetracosenóico	<0,5

Com relação aos alcoóis, os mais freqüentemente utilizados são os de cadeia curta, tais como metanol, etanol, propanol e butanol. No Brasil o uso do etanol anidro é vantajoso, pois é produzido em larga escala para ser misturado a gasolina, além de ser um produto obtido através de biomassa e, dessa maneira, o processo torna-se totalmente independente do petróleo, promovendo a produção de um combustível completamente agrícola.

O etanol é uma substância limpa, sem cor, de cheiro agradável, fortemente penetrante, na forma concentrada, é um poderoso combustível, perfeitamente miscível em água, assim como em gasolina. O álcool pode ser obtido por via fermentativa, a partir de qualquer vegetal rico em açúcar, como cana de açúcar e beterraba, a partir do amido, extraído do arroz e do milho e a partir da celulose, extraída da madeira. Entretanto, por questões técnico-econômicas, a quase totalidade do etanol produzida no Brasil provém da cana-de-açúcar.

Além disso, o etanol também pode ser obtido através da hidratação, direta ou indireta, do eteno (produto do petróleo). Essa tecnologia só é importante em

países com baixa disponibilidade de terras adaptáveis à cana-de-açúcar. São inúmeras as aplicações do álcool etílico. É utilizado como matéria-prima ou como insumo do processo de fabricação de outras substâncias ou produtos; pode ser empregado como combustível, além de ter larga aplicação na fabricação de bebidas.

O principal álcool empregado na manufatura de biodiesel é o metanol (CH_3OH), que era inicialmente produzido a partir da destilação da madeira e, por isso, originalmente denominado de “álcool de madeira”. Entretanto, outras rotas tecnológicas de produção do metanol foram desenvolvidas e pouco a pouco, a via renovável de produção deste álcool foi abandonada por razões técnico-econômicas. Atualmente, o metanol é industrialmente produzido através da redução catalítica do monóxido e dióxido de carbono. A matéria-prima desse reagente é o gás natural, abundante e barato para a maioria dos países.

O metanol é um líquido incolor, de baixa viscosidade e com cheiro característico. Quimicamente, é uma substância inflamável a uma temperatura ambiente, tóxica, não somente pela inalação, mas também através da ingestão e pelo contato prolongado com a pele e olhos.

A utilização da capacidade instalada de produção de biodiesel atingiu 86,2% no mês de fevereiro de 2009 e a produção de biodiesel foi de 9,8 milhões de litros por dia em fevereiro. No mês de janeiro, a capacidade ocupada foi de 46% e em dezembro de 2008, a capacidade era ainda menor, de apenas 30%. O total de biodiesel produzido, 71,16% foi feito a partir de óleo de soja, 24,54% a partir de sebo animal, 3,25% de óleo de algodão e 1,05% de outros materiais. Atualmente, 64 empresas estão autorizadas a produzir biodiesel no Brasil, sendo que 42 estão autorizadas a comercializar o produto ¹⁶.

2.4 Reatores para a produção de biodiesel

Vários tipos de reatores foram vistos na literatura, cabe destacar algumas pesquisas. Segundo Dossat *et al* ⁶⁹, a principal proposta do seu estudo foi à produção do oleato de butila pelo método de transesterificação num processo semi-contínuo eficiente visando uma possível utilização em escala industrial. O

processo semi-contínuo de reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol contendo alto teor de ácido oléico foi realizado em reator do tipo leito-fixo. Onde válvulas elétricas foram colocadas na saída do reator permitindo que os dois produtos da reação, éster e glicerol, fossem coletados separadamente. As bombas eram controladas por um temporizador, que fixa um ciclo de síntese de 2 h, e um ciclo de lavagem de 15 minutos. Conforme Figura 7.

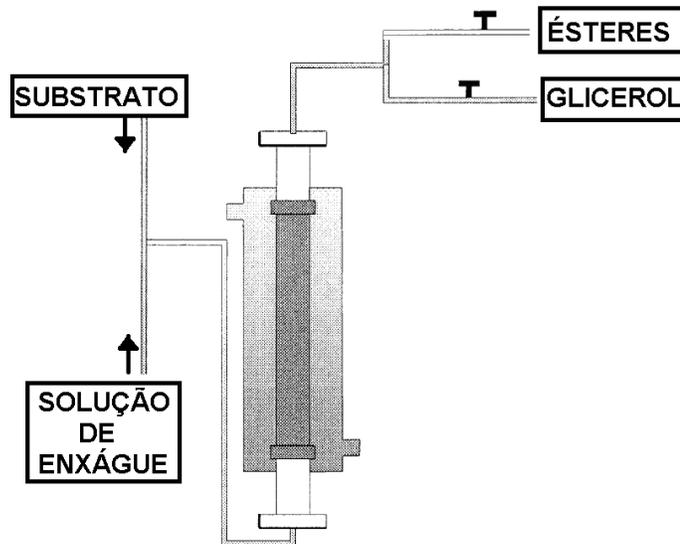


Figura 7 - Reator semi-contínuo para produção de éster e glicerol em frações separadas ⁶⁹.

Para o processo contínuo, utilizou-se o mesmo reator, de leito fixo, utilizando-se uma série de nove colunas empacotadas com lipase de *Candida antarctica sp.* imobilizada. Como substrato das reações foram utilizados óleos vegetais ou óleo residual com uma proporção mol L⁻¹ 1:3 óleo-metanol. A planta foi operada com uma vazão de 15 L h⁻¹ dando uma produção anual de 100 toneladas. O rendimento de conversão final dos ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de óleos vegetais e outros óleos usados sob condições ótimas foram de 90% e 92%, respectivamente. A vida da lipase imobilizada foi superior a 10 dias. Esta metodologia destaca-se por ser de baixa poluição ao meio ambiente, menor gasto de energia e baixo custo ⁷⁰.

Leevijit *et al*⁷¹, investigaram a reação de transesterificação do óleo de palma, em um protótipo contínuo de 6 estágios (Figura 8), a relação molar de metanol ao óleo foi de 6:1 e temperatura de 60 ° C. Foram investigadas os efeitos do tempo de permanência, velocidade de agitação, e a concentração de NaOH (em peso do óleo). Maior velocidade de agitação aumentou a taxa de reação até uma velocidade apropriada, no entanto a agitação excessiva leva redução da conversão. A maior concentração de NaOH aumentou significativamente a taxa de conversão de óleo em éster e a capacidade de produção do reator.

Também foram realizados estudos verificando o consumo de energia de reator. Foi possível verificar que a velocidade de 200, 300 e 500 rpm, com consumo de energia em potência de um agitador por unidade de volume do reator foi de 0,2; 0,6 e 2,8 kW/m³, respectivamente.

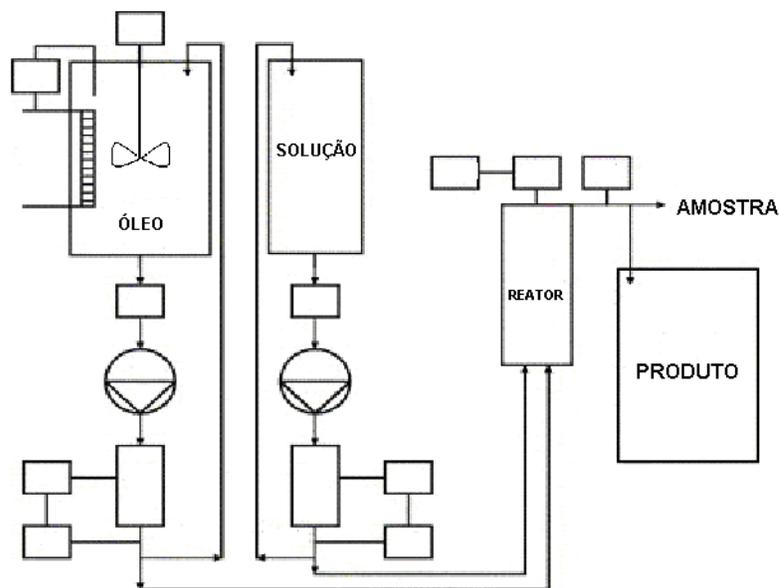


Figura 8 - Esquema do reator de transesterificação em seis fases contínuas⁷¹.

Em outros estudos Joelianingsih *et al*⁷², desenvolveram um sistema para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos, soprando bolhas de vapor metanol superaquecidos continuamente em óleo vegetal sem utilizar qualquer tipo de catalisador. Com este sistema foi possível obter um rendimento de 95,17 % a uma temperatura de 250 °C.

O funcionamento do reator consistia em um sistema de desidratação do metanol através de uma coluna preenchida com uma peneira molecular. O

metanol era bombeado passando por um sistema de aquecimento com banho termostático aquecido com temperatura controlada no fluxo de saída. O metanol então era enviado em forma de vapor para o reator onde acontecia a reação de transesterificação. O vapor de metanol foi soprado em forma de bolhas de MeOH superaquecidas (9,87 atm, 230 – 260 °C) continuamente com saída de 4 g min⁻¹. O esquema da Figura 9 ilustra o sistema de transesterificação realizado sem adição de catalisador.

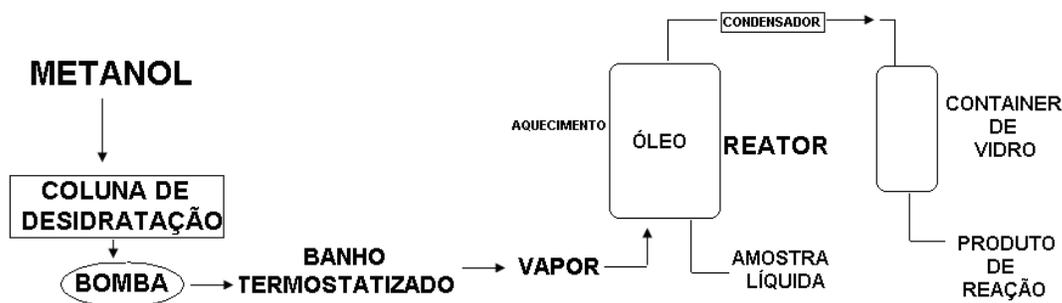


Figura 9 - Esquema do reator utilizado na transesterificação sem adição de catalisador ⁷² Erro! Indicador não definido.

Kojima *et al* ⁷³, publicaram, em 2008, uma pesquisa sobre a produção de biodiesel, em planta piloto, a partir do resíduo de “activated bleaching earth” (ABE, tipo de terra diatomácea), utilizando lipase da *Candida cylindracea*. O ABE é um pó branco que não se dissolve em água, óleo ou solvente orgânico, e é amplamente utilizado na purificação de mel, ceras e glicerina, e na descoloração de óleos vegetais e animais. Aproximadamente 40% do peso de ABE residual é óleo vegetal, o qual foi testado como matéria-prima para produção de biodiesel. O estudo conclui que é possível produzir biodiesel a partir do resíduo de ABE. A única desvantagem é o custo da enzima.

Vários pesquisadores estão desenvolvendo novas alternativas para transformação de óleos vegetais como a utilização de reatores de membranas de cerâmica. Foi realizada a hidrólise de óleo de palma e azeite de oliva utilizando um reator de membranas assimétricas. As reações foram conduzidas à 40 °C e uma pressão média de 115 mmHg com taxas de fluxo de 2,5 e 3,0 mL min⁻¹, respectivamente ⁷⁴.

O processo de transesterificação com catálise ácida e básica utilizando diferentes catalisadores foi realizado no reator de membrana do tipo semi-

batelada à 60, 65 e 70°C. Algumas variáveis como concentração de catalisador, aumento de temperatura, razão de matéria-prima (metanol/óleo) aumentaram significativamente a conversão de óleo para biodiesel. O grande diferencial deste estudo foi que este novo reator permitiu a separação dos produtos de reação. Além disso, o reator foi extremamente importante na remoção do óleo canola não reagido.

Estas membranas de carbono utilizadas são de especial interesse, pois são quimicamente resistentes e estáveis a altas temperaturas. O tamanho dos poros da membrana são de 0,05 µm. O diâmetro interior e exterior da membrana foi de 6 e 8 mm, respectivamente. O princípio de funcionamento do reator de membrana está ilustrado na Figura 10 ⁷⁴.

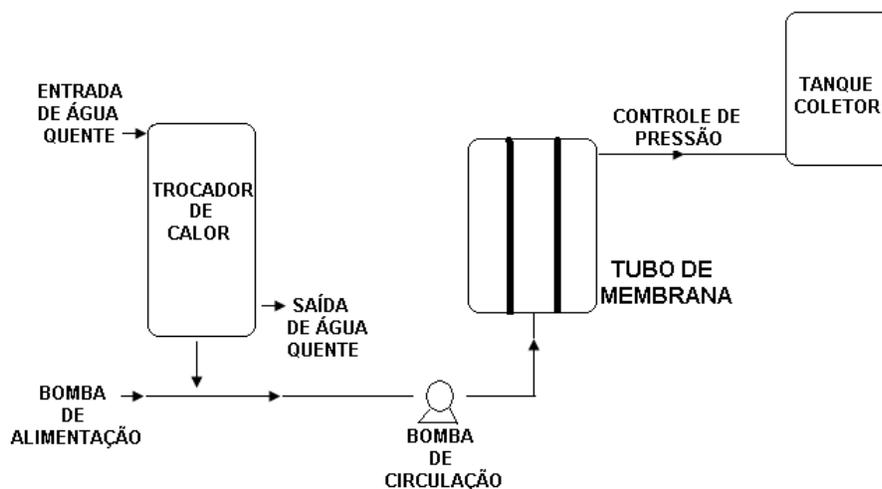


Figura 10 - Esquema do reator de membrana ⁷⁴.

A utilização de reatores de membranas é interessante, principalmente devido ao efeito de imiscibilidade de metanol/óleo de canola e miscibilidade dos ésteres metílicos em metanol.

Também é possível controlar a presença de metanol no meio e monitorar indicadores do desempenho do membrana tais como a pressão, o perfil de acumulação do glicerol no circuito do reator bem como estudar a reciclagem de metanol.

Um reator de membrana bifásico foi desenvolvido por Dubé e colaboradores ⁷⁵ para produção de ésteres metílicos do óleo de canola, conforme demonstrado na Figura 11, apresenta-se o esquema do reator de

transesterificação com membranas com reciclo de metanol, onde a reação de transesterificação ocorre sob uma pressão (dentro das membranas) e temperatura controlada dentro de um sistema onde os reagentes são succionado por uma bomba de circulação e passam pelo conjunto de membranas de cerâmica onde ocorre a separação dos ésteres metílicos. Com auxílio de um sistema com válvula de saída de pressão, o biodiesel é separado e enviado para um compartimento para resfriamento.

As membranas de cerâmica são muito populares em aplicações comerciais, devido as suas vantagens como: estabilidade química e térmica, tamanho de poros, alta porosidade, alto fluxo, resistência mecânica e vida longa. Além de suportar reações químicas e estabilidade térmica permite também a limpeza da membrana de forma mais eficiente quando utilizado matérias-primas como o petróleo sujo de resíduos. No presente estudo, a membrana cerâmica é construída com um suporte de óxido de titânio e da camada ativa.

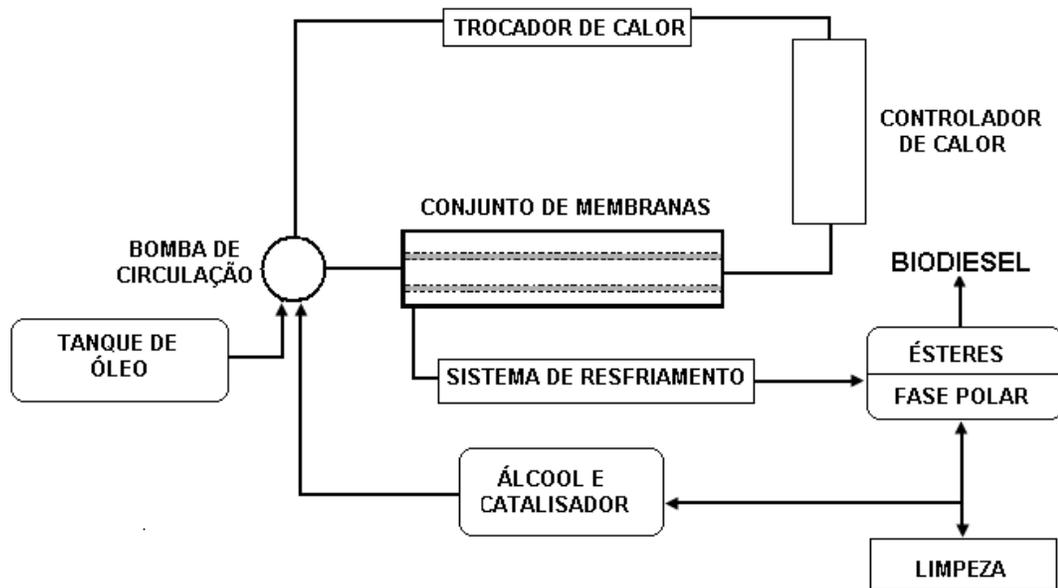


Figura 11 - Esquema do reator de transesterificação com membranas com reciclo de metanol ⁷⁵.

Após o biodiesel puro é armazenado e o álcool já separado retorna para o sistema de reação novamente.

2.5 Produção de Biodiesel

De um modo geral, biodiesel foi definido pela “Nacional Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores Diesel).

O biodiesel é sintetizado pela transesterificação de óleos vegetais ou animais com metanol ou etanol na presença de um catalisador ácido, básico ou enzimático. É uma alternativa atraente, pois é produzido a partir de recursos renováveis. É reconhecido mundialmente por ser um combustível com características não tóxicas e biodegradáveis. A transesterificação tem sido largamente utilizada para diminuição da viscosidade dos triacilgliceróis, melhorando as propriedades físicas dos combustíveis para motores a diesel ¹⁹. A principal preocupação na obtenção de bicompostíveis é a substituição de uma matéria prima de fonte não renovável por uma de fonte renovável, gerando um produto final através de um processo de produção de energia mais limpa.

O combustível produzido destas matérias primas apresenta considerável redução na emissão de gases poluentes e material particulado, quando comparado com o combustível fóssil, óleo diesel que atualmente domina o mercado. O aumento na eficiência da produção será feito a partir da dedicação de laboratórios de pesquisa e investigadores industriais na projeção de novas rotas de produção bem como na auto-sustentabilidade do processo de produção de biodiesel. Assim ocorrerá uma maior disponibilidade tornando o preço deste combustível cada vez mais competitivo. Projetos de implantação de plantas de biodiesel de pequena escala retiram a dependência do pequeno agricultor ao petróleo altamente subsidiado assim possibilitando uma maior renda a sua propriedade.

3 METODOLOGIA

Na primeira parte desta pesquisa buscou-se a avaliação da atividade lipase em relação a diferentes tipos de substratos para verificar se alguma das lipases disponíveis no laboratório poderia ter uma maior atividade para produção de biodiesel. A lipase selecionada foi a seguir submetida à avaliação da atividade em relação a substratos semelhantes.

Posteriormente, fez-se a imobilização da enzima PS Amano em hidrogéis (polímero absorvente) e aplicação desta na produção de biodiesel de óleo de girassol.

Na terceira etapa do projeto foram realizados ensaios de bancada de transesterificação enzimática por sistema contínuo e por batelada. Os ensaios foram conduzidos variando as concentrações de enzima, substrato, etanol ou metanol e a presença ou não de solvente orgânico (hexano). Estas variáveis também foram aplicadas no sistema por batelada.

Na última etapa da pesquisa, buscou-se fazer uma avaliação ambiental do sistema, escolhido para passar a escala piloto. Nesta etapa foi analisado quais impactos estavam relacionados à produção de biodiesel e qual o consumo de energia do processo.

3.1 Enzimas, substratos e reagentes

A lipase Novozym 435 foi fornecida pela Novozymes, conforme o laudo fornecido pela indústria, a atividade declarada da lipase é de 10.000 PLU g⁻¹ (PLU - *propyl laurate unit*), seu organismo de produção é *Aspergillus oryzae*, produzido por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, a qual não é geneticamente modificada, foi separada do organismo produtor.

As enzimas F-AP-15, AY Amano 30, M Amano 10 e PS Amano foram fornecidas pela Amano Enzyme Inc. A lipase PS “Amano” é uma preparação de enzimas lipolíticas fabricados por processo de fermentação de uma cepa

selecionada de *Burkholderia cepacia*. O microrganismo é cultivado em farelo de trigo e a enzima produzida é extraída com água e purificada com etanol. Sua atividade é de 30.000 u g⁻¹, onde uma unidade é a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por um minuto em pH 7.

A lipase F-AP 15 é uma lipase produzida por fermentação do *Rhizopus oryzae*, sua atividade declarada é de 150 u mg⁻¹. Ela pode hidrolisar ácidos graxos curto, médio e longo de 1,2 e 3 posições de tri-, di- e monoacilgliceróis. A lipase F-AP 15 pode ser usada para processamento de produtos lácteos, gorduras e óleos.

A atividade declarada da lipase AY "Amano" 30 é de 30.000 u g⁻¹ seu organismo de produção é a *Candida rugosa*, produzido por fermentação. Ela pode hidrolisar ácidos graxos curto, médio e longo de 1,2 e 3 posições de tri-, di- e monoacilgliceróis. Ela pode ser usada para processamento de produtos lácteos, gorduras e óleos.

A lipase M "Amano" 10 possui atividade de 10.000 u g⁻¹. É uma lipase produzida por fermentação do microrganismo *Mucor javanicus*. Assim como as lipases F-AP 15 e AY "Amano" 30, ela também pode ser usada para processamento de produtos lácteos, gorduras e óleos.

As amostras de substratos lipídicos consistiram de óleo de arroz comercial, de canola comercial, de girassol (bruto e refinado-comercial), de milho comercial, de rícino comercial e de soja comercial, azeite de oliva comercial, manteiga comercial, banha suína, sebo bovino e gordura vegetal hidrogenada comercial e foram obtidas de fornecedores locais. Mono-hidrogenofosfato de potássio e hidróxido de sódio (Nuclear®), goma arábica (Synth®) e brometo de potássio grau espectroscópico (Vetec®) foram utilizados como recebidos.

3.2 Avaliação da atividade lipase

Foi realizada a avaliação da atividade lipase em relação a diferentes tipos de substratos para verificar se alguma das lipases disponíveis no laboratório poderia ter uma maior atividade para produção de biodiesel. A lipase selecionada foi a F-AP 15 e a seguir realizou-se à avaliação da atividade desta em relação a substratos semelhantes, conforme fluxograma da Figura 12.

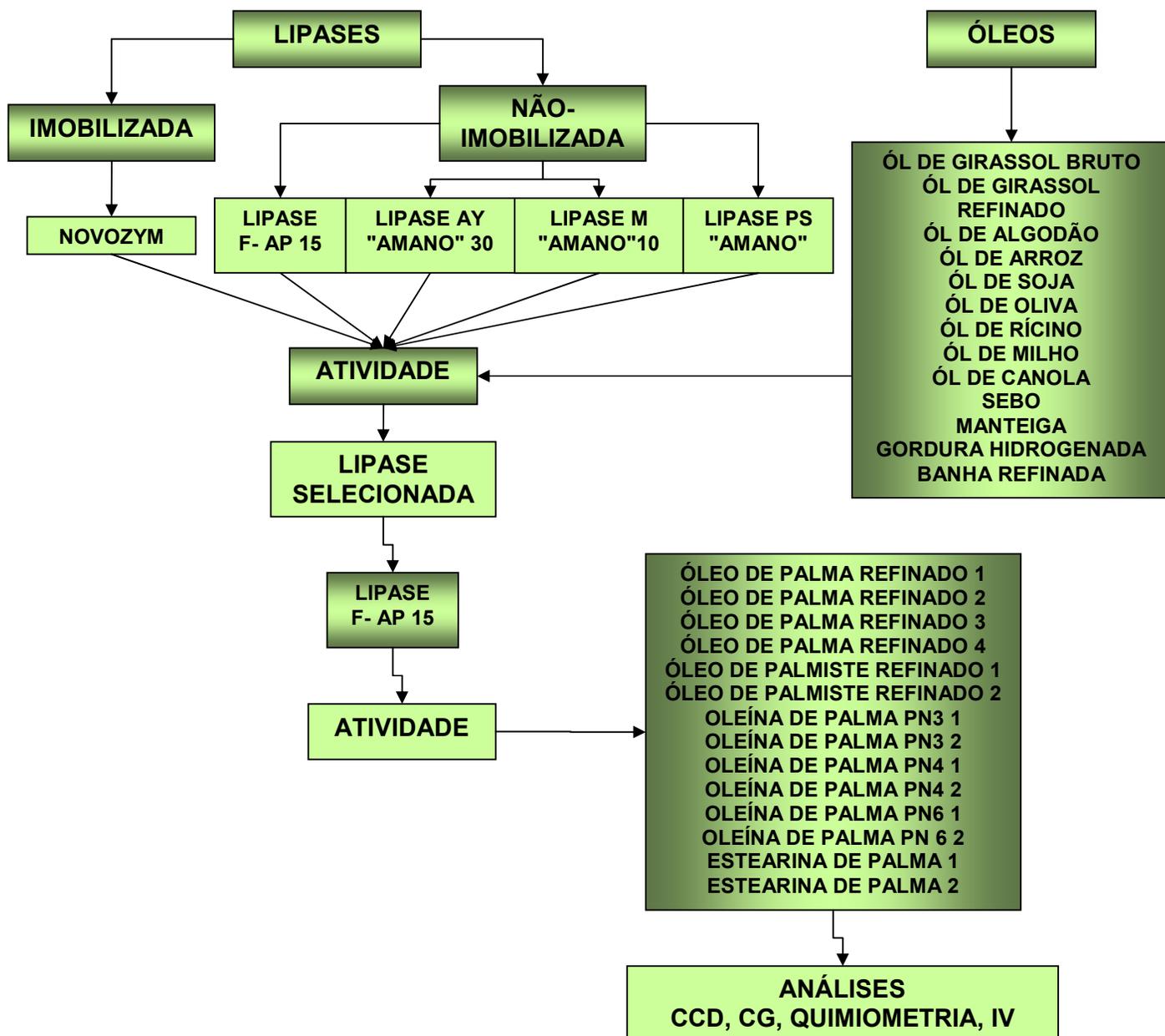


Figura 12 - Fluxograma da avaliação da atividade lipase.

3.2.1 Determinação da atividade Lipase

A atividade lipase foi realizada visando identificar sobre qual óleo a lipase teria maior atividade. As análises foram realizadas em triplicatas através da adição de 5 mg de enzima em 20 mL de emulsão 5% de substrato e 5% de goma

arábica (Synth®) em tampão fosfato de potássio (Nuclear®) 0,1 mol L⁻¹ pH = 8,0 (preparadas anteriormente) e incubando-se por 30 min 37°C em incubadora orbital com 40rpm. O controle negativo foi preparado de maneira semelhante, porém adicionando a enzima após a incubação e procedendo-se a titulação imediatamente ⁷⁶.

Para o cálculo (Equação 1) foi considerado que a quantidade de ácidos graxos produzidas é diretamente relacionada com a quantidade de lipases responsáveis pela degradação dos respectivos ésteres de ácidos graxos presentes no substrato utilizado, e é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácidos graxos por minuto de reação a 37°C. As unidades finais foram expressa em unidade internacional (UI) por kg de óleo.

$$\text{Atividade} = [(A - B) \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot 10^3] / \Theta]1000 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

A = volume (mL) da amostra

B = volume (mL) do branco

Θ = tempo (min)

C = concentração (mol L⁻¹)

3.2.2 Avaliação da atividade de lipase F-AP-15 frente a substratos semelhantes

A lipase F-AP-15 foi a selecionada para a realização deste experimento, fornecida pela Amano Enzyme Inc. Amostras de substratos lipídicos consistiram de óleo de palma refinado, óleo de palmiste refinado, oleína de palma PN3, oleína de palma PN4, oleína de palma PN6 e estearina de palma refinada (Grupo Agropalma). Mono-hidrogenofosfato de potássio e hidróxido de sódio (Nuclear®), goma arábica (Synth®) e brometo de potássio grau espectroscópico (Vetec®) foram utilizados como recebidos.

3.2.3 Análise por infravermelho

Para realização da análise no infravermelho, adicionou-se uma gota de cada amostra de óleo e estas foram submetidas à homogeneização com KBr antes da aquisição dos espectros. Os espectros foram obtidos em triplicata na faixa de 600-4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando um espectrofotômetro da Nicolet Magna 550 e um acessório de espectroscopia reflectância difusa no infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS) ⁷⁷.

Para a análise de óleos e gorduras de palma os espectros foram obtidos utilizando um acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe) acoplado no mesmo espectrofotômetro.

Neste caso foi adicionado uma gota da amostra sobre o cristal e os espectros foram obtidos em triplicata, nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.2.4 Índice de Iodo

Para a realização do teste de índice de iodo em óleos e ácidos graxos, foi utilizado o método oficial. O procedimento deste experimento encontra-se em anexo G ⁷⁸.

3.2.5 Modelos multivariados

Para a construção dos modelos de regressão multivariados visando auxiliar na análise dos dados de atividade das lipases, foram utilizadas ferramentas de análise multivariada.

Para tanto foram utilizadas as ferramentas: análise de componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). Os dados de atividade lipase, tipo de substrato, tipo de lipase, índice de iodo e concentração de ácidos graxos foram autoescalados, utilizando-se o software Pirouette versão 3.11, para visualização gráfica.

3.3 Imobilização da lipase PS Amano - Estudo da imobilização em um suporte alternativo - Hidrogel

Na Figura 13, tem-se um fluxograma dos experimentos realizados para a imobilização da enzima PS Amano em hidrogéis (polímero absorvente) e aplicação desta na produção de biodiesel de óleo de girassol.

3.3.1 Hidratação dos hidrogéis

Primeiramente foi realizado um estudo para avaliar a taxa de crescimento das esferas de hidrogel em água deionizada. Os diâmetros das esferas hidratadas foram aferidos com um paquímetro a cada hora de imersão até um total de 10h. Para tanto, cada esfera foi colocada em um copo de becker com 100 mL de água deionizada.

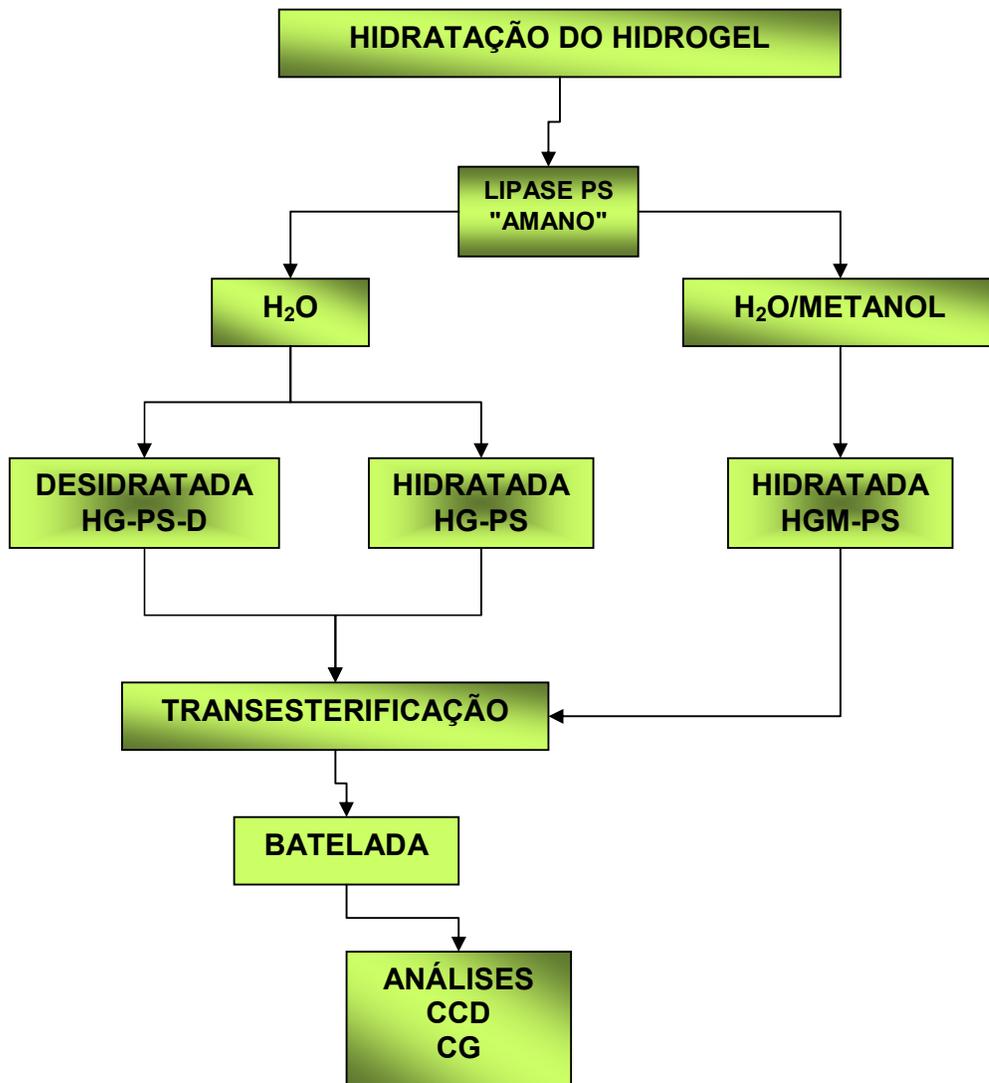


Figura 13 - Fluxograma da imobilização da enzima PS Amano em hidrogéis.

3.3.2 Imobilização da enzima PS nas esferas de hidrogel

Para o experimento as esferas de hidrogel foram imersas em soluções de enzima preparadas em concentrações de 80 mg mL^{-1} , por 1h, a 30°C , em shaker com agitação orbital (Marconi) com 70 rpm. As esferas assim obtidas foram denominadas HG-PS.

Após a imobilização, parte das esferas foi desidratada a 37°C por 36h. As esferas assim obtidas foram denominadas HG-PS-D.

O mesmo procedimento de imobilização foi realizado com a substituição da água por uma solução 1:9 de metanol-água deionizada e as esferas obtidas deste processo foram denominadas HGM-PS.

3.3.3 Produção de biodiesel em batelada com lipase imobilizada em hidrogel

A transesterificação enzimática do óleo de girassol foi realizada com a enzima PS Amano imobilizada no hidrogel.

As condições experimentais utilizadas na reação de transesterificação foram definidas a partir de resultados prévios obtidos com óleo de mamona^{49,79} e girassol^{67,80}. Assim foram selecionadas a temperatura de 55°C, 24h de reação e 100 rpm.

Em um erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 1 g de óleo de girassol, 0,362 g de metanol anidro, 40 mL de hexano (Nuclear®) e 10, 20 e 40 esferas de hidrogel com enzima imobilizada (2 a 10g) (HG-PS e HGM-PS). Com as esferas desidratadas após imobilização também foram utilizadas 10, 20 e 40 esferas (0,1 a 0,4g) (HG-PS-D).

Após a reação, o meio reacional foi filtrado para separação das esferas e o solvente rota-evaporado. Os produtos de reação foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD) e quantificado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3.4 Produção de biodiesel empregando Enzima Imobilizada Comercial Novozym® 435

Nesta etapa da pesquisa, foram realizados ensaios de bancada de transesterificação enzimática por sistema contínuo e por batelada. Os ensaios foram conduzidos variando as concentrações de enzima, substrato, etanol ou metanol e a presença ou não de solvente orgânico (hexano). Estas variáveis

também foram aplicadas no sistema por batelada. As etapas do processo estão apresentadas na Figura 14.

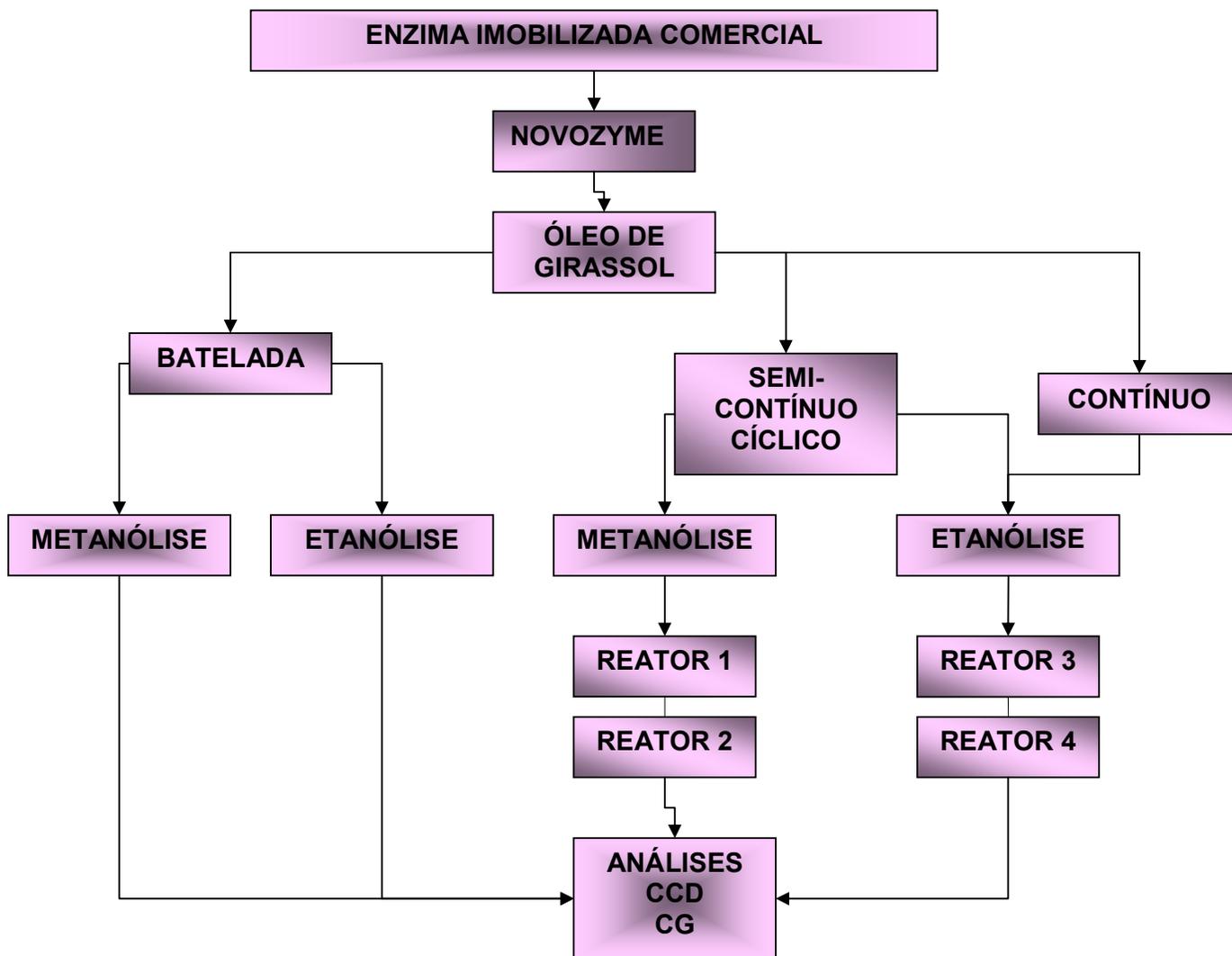


Figura 14 - Fluxograma da transesterificação enzimática por sistema contínuo e por batelada.

3.4.1 Produção de biodiesel de óleo de girassol por batelada

Os experimentos foram realizados em escala laboratorial, com o auxílio de uma Incubadora *Shaker* MA 420 (MARCONI), a 40 rpm conforme Figura 15.

Foram realizadas reações de metanólise e etanólise enzimática do óleo de girassol na presença do solvente orgânico hexano. As reações tiveram como

substrato óleo de girassol e metanol ou etanol. A enzima empregada como biocatalisadora das reações de transesterificação foi a lipase *Candida antarctica B* (Novozym® 435). Foram realizadas em erlenmeyer de 125 mL, em períodos de 2 a 24 horas. Os erlenmeyer foram preparados com 1 g do óleo de girassol, diferentes proporções de metanol ou etanol, água e enzima, foram adicionados 40 mL de hexano (Nuclear®) como solvente em todos os frascos, depois fechados e imediatamente introduzidos no *shaker* pré-aquecido.

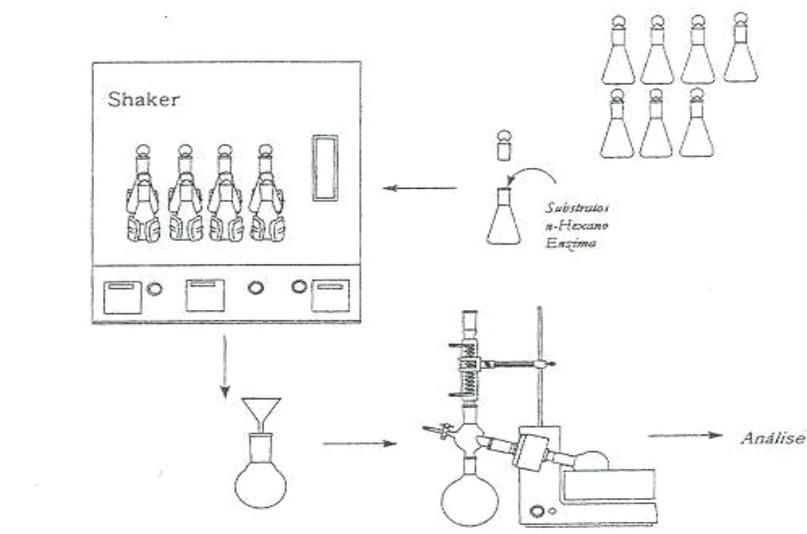


Figura 15 - Esquema da reação de transesterificação enzimática por sistema em batelada.

As condições das reações estão na Tabela 4, as quais foram empregadas nos diferentes estudos realizados, sendo que as condições foram selecionadas a partir da seleção de variáveis determinantes da velocidade de reação e conforme planejamento experimental de dois níveis e 4 variáveis (água, enzima, razão de substratos e temperatura). A quantidade de enzima e de água adicionadas ao meio reacional foi definida com relação à soma das massas dos substratos álcool e óleo. Logo após, cada extrato foi filtrado para separação da enzima, e o solvente rota-evaporado e secado em estufa a 50 – 70°C. Cada estudo foi realizado em 7 tempos (2, 6, 10, 14, 18, 22 e 24 horas de reação), feitos paralelamente, ou seja, no início do período de 24 horas colocava no shaker 7 erlenmeyers, sendo retirado 1 a cada tempo pré-definido.

As análises dos produtos de reação foram realizadas inicialmente por CCD, observando-se a ocorrência ou não de conversões, analisadas estas amostras, elas foram também analisadas por CG-EM empregando um equipamento Shimadzu QP2010, equipado com uma coluna DB5 MS (30m x 0,25mm x 0,25 µm).

Tabela 4 - Condições experimentais empregadas na reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol por batelada.

Estudo	Temperatura(°C)	Tempo (h)	Enzima (%)	Óleo/alcool	Água (%)
E1	55	2,6,10,14,18,22,24	5	1:4	0
E2	55	2,6,10,14,18,22,24	5	1:10	10
E3	55	2,6,10,14,18,22,24	20	1:10	0
E4	55	2,6,10,14,18,22,24	20	1:4	10
E5	65	2,6,10,14,18,22,24	5	1:10	0
E6	65	2,6,10,14,18,22,24	5	1:4	10
E7	65	2,6,10,14,18,22,24	20	1:4	0
E8	65	2,6,10,14,18,22,24	20	1:10	10
E9	60	2,6,10,14,18,22,24	12,5	1:6,5	5

Os valores foram adaptados de Oliveira e Oliveira⁸¹

A razão molar óleo-alcool (metanol ou etanol) foi calculada a partir das massas molares dos mesmos. A quantidade de enzima e de água adicionadas ao meio reacional foi definida com relação à soma das massas dos substratos álcool e óleo.

3.4.2 Produção de biodiesel por sistema semi-contínuo cíclico

O processo semi-contínuo cíclico de reação transesterificação enzimática do óleo de girassol foi realizado em diferentes protótipos de reatores. O estudo envolveu a preparação de ésteres metílicos e etílicos, utilizando metanol ou etanol e o óleo de girassol como substrato da reação. Nos protótipos estudados,

o éster e o glicerol foram armazenados no mesmo recipiente, sendo o glicerol depositado no fundo, desta forma conseguindo-se a separação.

Os protótipos dos sistemas semi-contínuos cíclicos envolviam de maneira geral, banho termostaticado, reator, bomba peristáltica, reservatório, condensador e chapa de aquecimento com agitação magnética.

Nos processos semi-contínuos de reação de transesterificação enzimática apresentados nos protótipos das Figuras 16 e 17, as reações foram realizadas nas mesmas condições experimentais, mudando apenas o modelo do reator e modelo do reservatório do produto final. As reações de metanólise enzimática do óleo de girassol foram realizadas com a adição de 3 g de lipase *Candida antarctica B* (Novozym® 435), metanol na proporção 1:8 molar em relação ao óleo, 50 g de óleo de girassol e hexano como solvente no meio reacional. Utilizou-se uma bomba peristáltica ISMATEC IPC e tubos de Tygon para auxílio no fluxo do processo. Após a reação o álcool e o solvente utilizados foram retirados do meio por rota-evaporação. Durante a realização deste experimento foram retiradas amostras em variados tempos, para análise da conversão. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada.

No protótipo 1 (Figura 16), tem-se no reator, óleo de girassol, metanol ou etanol, hexano e enzima. O aquecimento do reator ocorre em banho de óleo na chapa de aquecimento a uma temperatura de 55°C, com agitação magnética. Conforme vai ocorrendo a reação, o produto transesterificado vai sendo transferido para o reservatório final com o auxílio da bomba peristáltica, onde é armazenado.

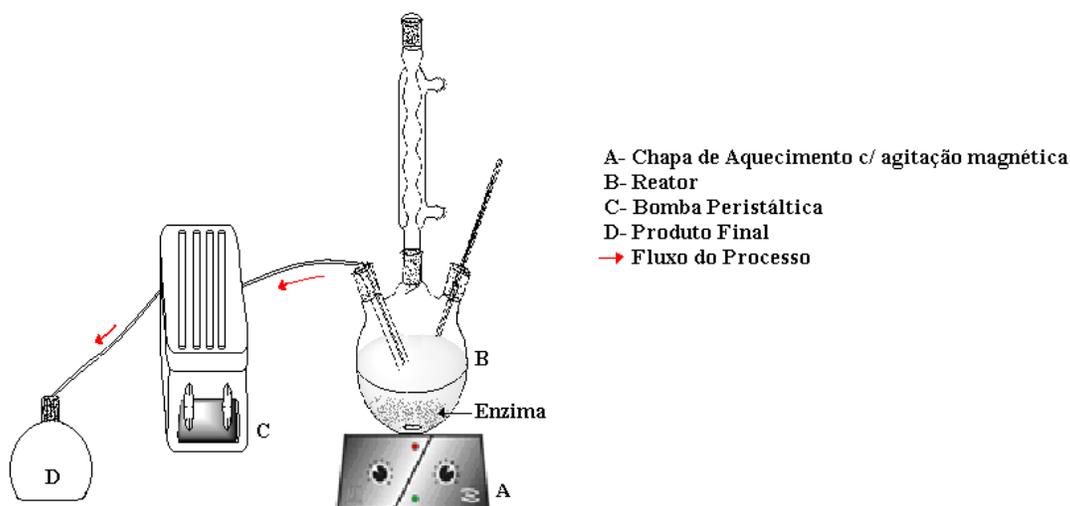


Figura 16 - Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 1).

No protótipo 2 (Figura 17), tem-se no reservatório do sistema, óleo de girassol, metanol ou etanol e hexano, o aquecimento ocorre em banho de óleo na chapa de aquecimento a uma temperatura de 55°C, com agitação magnética. Com o auxílio da bomba peristáltica, a solução vai sendo transferida para o reator o qual possui a enzima que sofre agitação magnética e esta fica presa no reator, com o auxílio de lã de vidro na saída do reator. Conforme vai ocorrendo a reação, o produto transesterificado volta para o reservatório inicial, ocorrendo a recirculação no sistema até completa conversão.

Em anexo (B), encontra-se o registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 1).

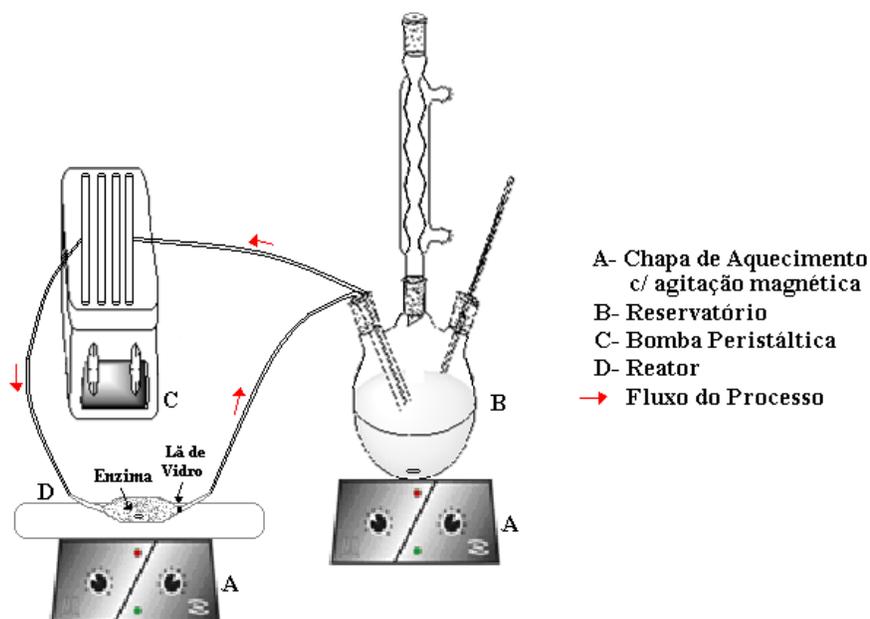


Figura 17 - Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 2).

No processo semi-contínuo cíclico de reação de transesterificação enzimática apresentado no protótipo da Figura 18, a reação de etanolise enzimática do óleo de girassol foi realizada em um reator de vidro. A reação foi realizada com 1g de lipase *Candida antarctica B* (Novozym® 435), etanol na proporção 1:10 molar em relação ao óleo, 5 g de óleo de girassol e 200mL de hexano como solvente no meio reacional. Utilizou-se uma bomba peristáltica ISMATEC IPC e tubos de Tygon para auxílio no fluxo do processo. Após a reação o metanol e o solvente utilizado foram retirados do meio por rota-evaporação. Durante a realização deste experimento foram retiradas amostras em variados tempos, para análise da conversão. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada. No anexo C, encontra-se o registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 2).

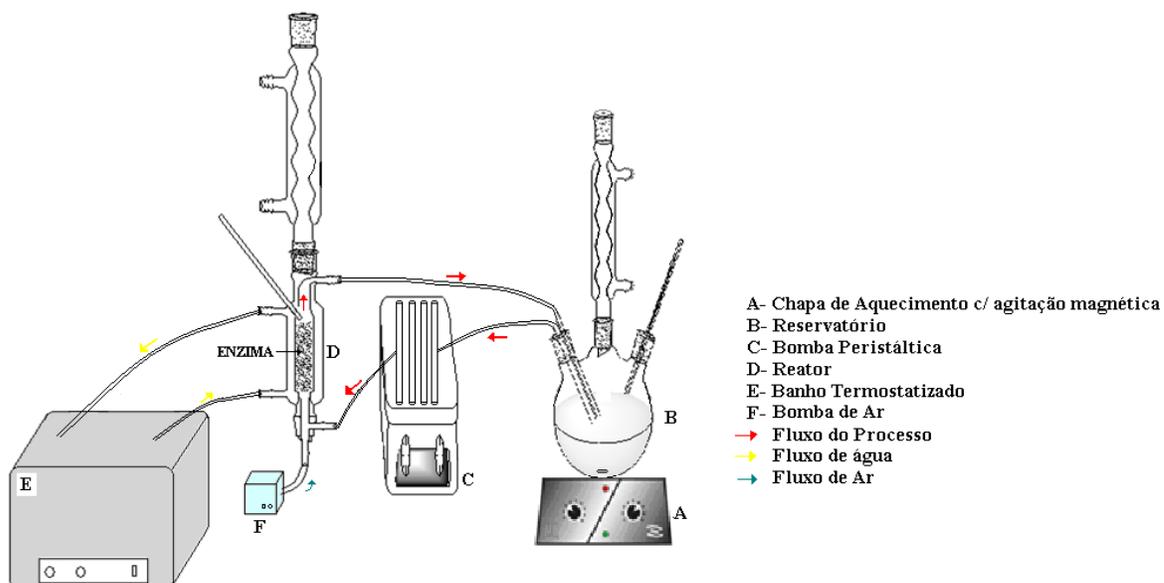


Figura 18 - Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 3).

No protótipo 3, tem-se no reservatório do sistema óleo de girassol, metanol ou etanol e hexano, o aquecimento ocorre em banho termostático a uma temperatura de 55°C. Com o auxílio da bomba peristáltica, a solução vai sendo transferida para o reator o qual possui a enzima. O reator possui uma “luva” a qual circula água quente que vem do banho termostático para manter o sistema aquecido. No reator a agitação da enzima ocorre devido a presença de uma bomba de ar conectada embaixo do reator. A solução que está sofrendo reação no reator, volta para o reservatório inicial, ocorrendo a recirculação no sistema até completa conversão. Em anexo (D), encontra-se o registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 3).

3.4.3 Produção de biodiesel por sistema contínuo

O estudo com maior ênfase foi no protótipo 4 (Figura 19), pois neste processo contínuo de reação de transesterificação enzimática, foi realizada a reação com a utilização apenas de etanol e óleo de girassol como substrato da

reação, evitando a presença de um solvente orgânico como o hexano, a reação foi realizada adicionando 1g de *lipase Candida antarctica B* (Novozym[®] 435) no reator de aço pré aquecida a 55 °C na estufa por 1 hora para sua ativação. Foi utilizado inicialmente 20g de óleo de girassol e 80 mL de etanol, sendo que o reservatório foi realimentado sempre que necessário, pois o sistema permaneceu ligado durante 64 horas. As temperaturas do banho de óleo e da água mantiveram-se constante em 55 °C e a velocidade utilizada na bomba peristáltica foi constante. Após a reação o etanol utilizado foi retirado do meio por rota-
evaporação.

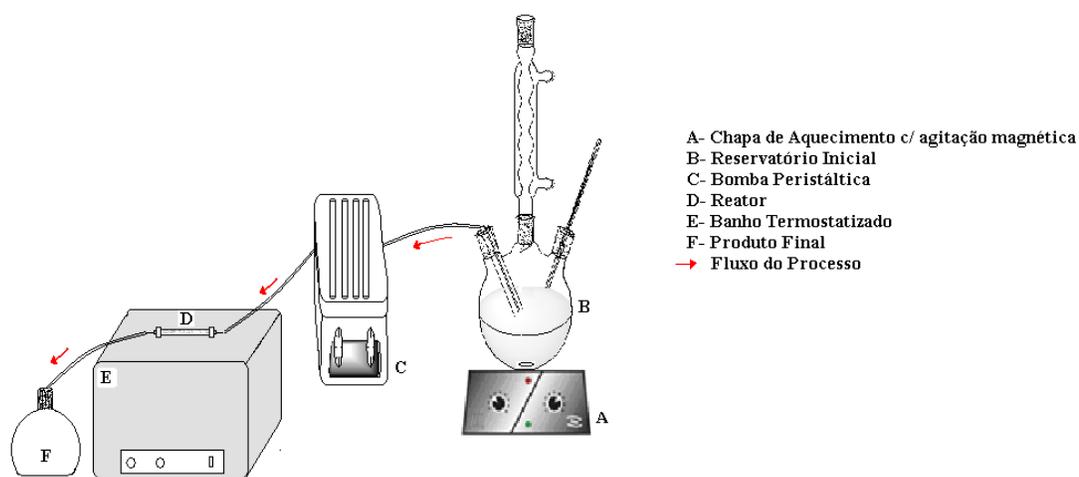


Figura 19 - Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 1 reator (Protótipo 4).

O sistema apresentado na Figura 19, pode ser descrito da seguinte maneira: no reservatório inicial do sistema está a solução de óleo de girassol e etanol, o aquecimento ocorre em banho de óleo a uma temperatura de 55°C, com agitação magnética. Com o auxílio da bomba peristáltica, a solução vai sendo então disponibilizada para o reator com o auxílio de uma bomba peristáltica ISMATEC IPC e tubos de Tygon para auxílio no fluxo do processo. Neste sistema o óleo e a solução etanólica permanecem por um tempo determinado em contato com a enzima que se encontra empacotada no reator, passando por este, ocorrendo assim a reação. O reator fica imerso no banho termostatizado a uma temperatura de 55°C para manter-se aquecido. O produto transesterificado vai sendo transferido para o reservatório final onde é armazenado.

A mesma pesquisa foi realizada com a adição de mais um reator, conforme Figura 20, para aumentar o tempo de contato entre enzima e substrato. As condições aplicadas no sistema com 2 reatores foram exatamente iguais a com 1 reator. No sistema contínuo com 2 reatores, o sistema permaneceu ligado por 388h. Durante a realização destes experimentos foram retiradas amostras para análise da conversão. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. No anexo E, encontra-se o registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo com 1 e 2 reatores respectivamente (Protótipo 4).

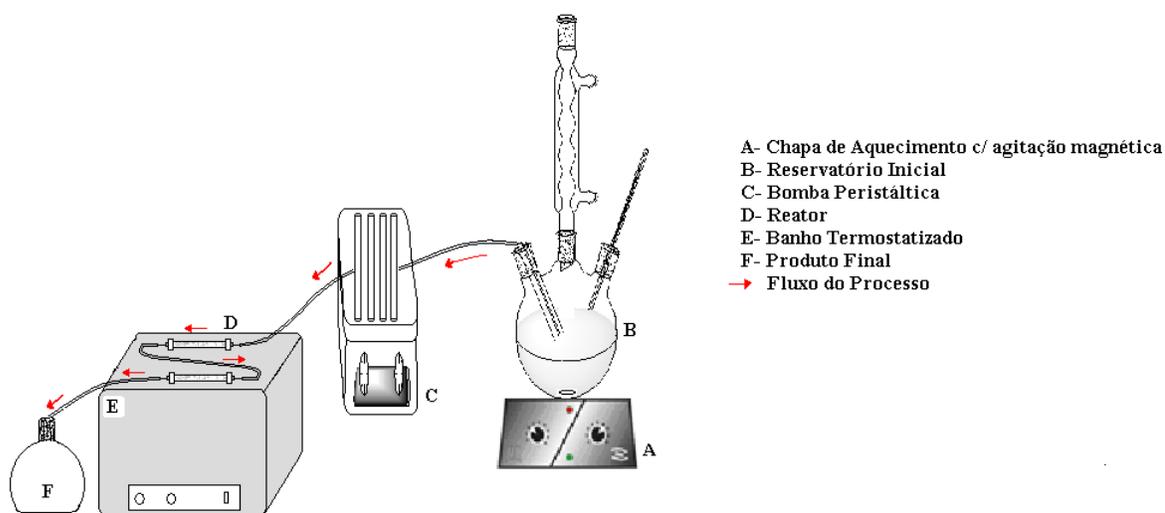


Figura 20 - Esquema da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 2 reatores (Protótipo 4).

Na Figura 21, apresenta-se o modelo do reator utilizado no protótipo 4 construído em aço inoxidável. É constituído basicamente por um tubo de 8,5 cm de comprimento com orifício, para o empacotamento da enzima. A sua capacidade é para 1g de *lipase Candida antarctica B* (Novozym® 435). As extremidades do tubo, possuíam duas telas, entre elas lã de vidro para evitar a saída da enzima do reator. As telas estavam encaixadas em uma peça de conexão entre o tubo e as agulhas onde serão conectados os tubos de tygon. O comprimento total do reator foi de 16,5 cm.

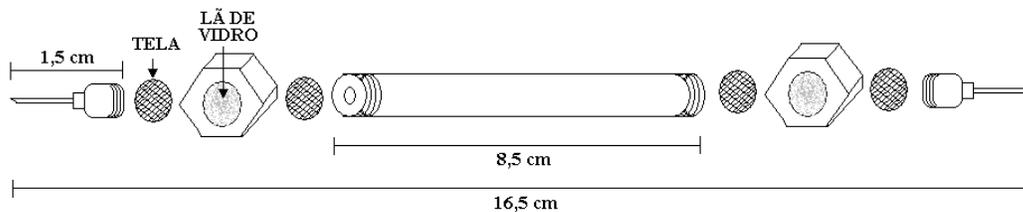


Figura 21 - Modelo do reator do Protótipo 4.

Encontra-se em anexo F, o registro fotográfico do reator utilizado no Protótipo 4.

3.5 Avaliação Ambiental do Protótipo 4

No fluxograma da Figura 22, esta a última etapa da pesquisa, onde se buscou fazer uma avaliação ambiental do sistema, escolhido para passar a escala piloto. Nesta etapa foi analisado quais impactos estavam relacionados a produção de biodiesel e qual o consumo de energia do processo.



Figura 22 - Fluxograma da avaliação ambiental do sistema contínuo de bancada.

3.5.1 Consumo energético

A avaliação do consumo energético no protótipo 4 foi realizada com o instrumento Alicate Wattímetro Digital portátil, Modelo: ET-4090 em W.

A medição foi realizada através de um software Universal Data logging Systems For Superior Digital, que estava conectado ao instrumento de leitura o qual estava conectado na extensão onde todo o sistema estava ligado.

Por último fez-se a medição do gasto energético da etapa de rota-
evaporação, que é uma etapa separada do processo.

3.5.2 Planilha de Leopold

Para identificação dos impactos ambientais decorrente da utilização do protótipo, foi adotado como ferramenta uma Matriz de Interação derivada da matriz de Leopold ⁸². A Matriz de Interação qualifica os impactos seguindo critérios com características de valor, ordem, espaço, tempo, dinâmica e plástica. Após lançados na matriz, as ações impactantes são multiplicadas pelos fatores ambientais resultando em impactos identificados, os quais apresentam subsídios para adoção de medidas ambientais minimizadoras ou potencializadoras.

Para qualificar os impactos, adotam-se os critérios apresentados por Silva ⁸³ e estão caracterizados a seguir.

- Características de Valor:
 - a) *Impacto positivo*: quanto uma ação causa melhoria da qualidade de um parâmetro;
 - b) *Impacto negativo*: quando uma ação causa dano à qualidade de um parâmetro.
- Característica de Ordem:
 - a) *Impacto direto*: quando resulta de uma simples relação de causa e efeito;
 - b) *Impacto indireto*: quando é uma reação secundária em relação à ação.
- Características Espaciais:
 - a) *Impacto local*: quando a ação circunscreve-se ao próprio sítio e suas imediações;
 - b) *Impacto regional*: quando um efeito se propaga por uma área além das imediações;
 - c) *Impacto estratégico*: o componente é afetado coletivo, nacional ou internacional.
- Características Temporais:
 - a) *Impacto em curto prazo*: quando o efeito surge no curto prazo (a determinar);

b) *Impacto em médio prazo*: quando o efeito se manifesta no médio prazo (a determinar);

c) *Impacto em longo prazo*: quando o efeito se manifesta no longo prazo (a determinar).

- Características Dinâmicas:

a) *Impacto temporário*: quando o efeito permanece por um tempo determinado;

b) *Impacto Cíclico*: quando o efeito se faz sentir em determinados períodos;

c) *Impacto permanente*: executada a ação, os efeitos não cessam de se manifestar num horizonte temporal conhecido.

- Características Plásticas:

a) *Impacto reversível*: a ação cessada, o fato ambiental retorna às condições originais;

b) *Impacto irreversível*: quando cessada a ação, o fator ambiental não retorna às suas condições originais, pelo menos num horizonte de tempo aceitável pelo homem.

3.6 Análise do biodiesel

Os métodos instrumentais de análise utilizados para a caracterização e quantificação de amostras de biodiesel foram cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa e espectroscopia no infravermelho.

Os equipamentos utilizados na realização deste estudo foram: cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas CGQP2010 Plus, marca Shimadzu, equipado com Injetor Automático AOC 20i, espectrofotômetro de infravermelho marca Nicolet Modelo Magna 550 ® com transformada de Fourier equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe).

3.6.1 Preparo de padrões e amostragem

Os padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos adquiridos da Supelco denominados KIT ME10 (ésteres metílicos de ácidos graxos contendo cadeia

saturada) e KIT ME14 (ésteres metílicos de ácidos graxos contendo cadeia insaturada) foram preparados em soluções estoque, utilizando como solvente o heptano (Synth®), em concentração de 10 mg mL⁻¹.

A partir da solução estoque foi preparada uma diluição de 0,1 mg mL⁻¹, a qual foi analisada no cromatógrafo, a fim de identificar os compostos através das bibliotecas NIST e WILEY, bem como avaliar os tempos de retenção, o fator de resposta e quais os ésteres seriam utilizados neste estudo.

Após identificados os ésteres de maior interesse, uma mistura destes foi preparada em quatro concentrações, a partir da solução estoque de cada padrão, para obtermos a curva analítica (1,0 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹ e 0,1 mg mL⁻¹).

Após uma análise no cromatógrafo utilizando uma amostra biodiesel com concentração de 20 mg mL⁻¹, verificou-se a resposta do equipamento, e então todas as amostras foram diluídas em hexano (Nuclear®) para realização da análise. As curvas analíticas obtidas a partir das soluções padrões estão no Anexo A.

3.6.2 Cromatografia camada delgada

A análise qualitativa desta pesquisa foi realizada por cromatografia em camada delgada, onde 1 gota das amostras foram diluídas em 1mL de hexano (Nuclear®), da mesma forma que o óleo de partida e o biodiesel (B100), em 3 diferentes frascos. Aplicou-se o óleo, o biodiesel e a amostra na placa de CCD e eluiu-se com hexano (Nuclear®):acetato de etila (Vetec®) (9:1 v/v). As placas cromatográficas de sílica utilizadas no experimento apresentavam medida de 4 cm x 5,5cm (Macherey Nagel®). A revelação das substâncias separadas foi realizada em câmara de iodo, que reage com muitos compostos orgânicos formando complexos de cor café ou amarela.

3.6.3 Cromatografia gasosa

A análise por cromatografia gasosa foi realizada com o objetivo da separação e identificação dos ácidos graxos presentes nas amostras de óleos e dos produtos da atividade lipase.

Para tal foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu GC -2010 com detector GCMS – QP2010 Plus Gas Chromatograph Spectrometer.

Para as análises em CG-MS dos padrões de referência de ésteres metílicos de ácidos graxos, bem como das amostras de biodiesel, foi utilizado o cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas CGQP2010 Plus, marca Shimadzu, equipado com Injetor Automático AOC 20i. As condições da coluna de DB5 MS 30m x 0,25 mm x 0,25 µm iniciaram em 150°C (0,1min) aquecendo até 250°C (3°C min⁻¹), continuando o aquecimento a 30°C min⁻¹ até 300°C; no detector de massas a temperatura da fonte de ionização e a temperatura de interface em 280°C e split de 1:5, utilizando o modo SCAN, sendo que foi injetada em triplicata uma alíquota de 1µL de cada mistura de padrões e da amostra para identificação dos ésteres metílicos.

3.6.3.1 Derivatização dos óleos para análise por CG

Em um balão volumétrico foi pesado 0,100 g de amostra (óleo) e adicionado 6 mL de solução metanólica de NaOH (Nuclear®) (1 g de NaOH em 50 mL de metanol).

A seguir acoplou-se um condensador e deixou-se em refluxo e em aquecimento por 20 min. Após adicionou-se por intermédio do condensador, gota-a-gota, 7 mL de solução BF₃/metanol (Merck®) deixou-se refluxar por mais 4 min. O mesmo procedimento foi adotado para adicionar 5 mL de heptano (Synth®) sendo refluxado durante 2 min.

Removeu-se a amostra do aquecimento e do condensador e deixou-se a amostra esfriar a temperatura ambiente para acrescentar uma solução saturada de NaCl (Synth®), seguida de rotações suaves para que a fase heptânica flutuasse.

Transferiu-se a fase heptânica para um tubo de ensaio, no qual foi adicionado Na₂SO₄ (Nuclear®) anidro. Após alguns minutos, o extrato foi transferido para um recipiente limpo e seco, e armazenado até o momento da análise cromatográfica.

Para a análise, otimizaram-se condições da coluna DB – SMS (30m x 0,25mm x 0,25µm) iniciando a 150°C aquecendo a 0,1°C min⁻¹ até 250°C, continuando o aquecimento a 3°C min⁻¹ até 300°C com aquecimento de 30°C min⁻¹ do injetor split/splifless 280°C; injeção modo split 1:5, velocidade linear de 38 cm s⁻¹; fluxo da coluna de 1 mL min⁻¹; tempo da corrida 35,1min. Fonte de íons 280°C, interface 280°C e voltagem do detector 0,78 kV. Pelo mesmo método descrito, foram injetados os padrões de identificação das amostras, obtendo-se as curvas do Anexo A.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da atividade lipase

Para selecionar as lipases a serem testadas na transesterificação, foram realizados experimentos que buscavam reconhecer as condições substrato-enzima que poderiam revelar alguma situação preferencial para a produção de biodiesel por biocatálise.

4.1.1 Estudo da atividade lipase de enzimas comerciais não imobilizada com diferentes substratos

Os valores de atividade lipase obtidos pelo método titrimétrico em função da hidrólise dos óleos como substratos com as 4 diferentes enzimas podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade lipase (UI kg^{-1}) das enzimas em relação ao substrato utilizado.

SUBSTRATO	Atividade lipase (UI kg^{-1})			
	LIPASE F- AP 15	LIPASE AY "AMANO" 30	LIPASE M "AMANO"10	LIPASE PS "AMANO"
Óleo de Girassol Bruto	9740	6800	3820	7400
Óleo de Girassol Refinado	6270	10500	3900	8200
Óleo de Algodão	12900	4060	1820	8800
Óleo de Arroz	13730	7900	2880	14400
Óleo de Soja	8960	14650	1760	10940
Óleo de Oliva	5900	2780	1380	5540
Óleo de Rícino	2590	740	640	5280
Óleo de Milho	13180	12640	3840	11420
Óleo de Canola	7400	1090	590	4450
Sebo	18480	2150	5510	16900
Manteiga	3960	1850	4360	14320
Hidrogenada	14420	4290	5380	21220
Banha Refinada	6440	1650	825	8910

Observa-se que a atividade lipase varia conforme o substrato utilizado. Para o óleo bruto de girassol houve uma redução da atividade comparada ao óleo refinado, com exceção dos resultados encontrados com a Lipase F-AP15. Este é um resultado relevante porque se busca evitar o refino para a produção de biodiesel.

Também não se observam uma seletividade preferencial das lipases, ou seja, seletividade em relação ao tipo de triacilgliceróis ou em relação a presença de insaturação das ramificações dos triacilgliceróis. Para isso foi necessário uma análise multivariada a ser apresentada no item 4.1.3.

4.1.2 Estudo da atividade lipase da enzima comercial imobilizada Novozym® 435 com diferentes substratos

O mesmo estudo foi realizado com lipase imobilizada Novozym 435 (Tabela 6). Analisando as atividades com os mesmos substratos empregados no item 4.1.1, observa-se que os valores obtidos com a Novozym 435 são menores que os encontrados com as lipases livres, porque na massa utilizada em cada teste, não foi considerado a massa do suporte e, portanto continha menos lipase.

Tabela 6 - Atividade lipase (UI kg⁻¹) da enzima comercial imobilizada Novozym 435 em relação ao substrato utilizado e faixa de índice de iodo da literatura.

	Atividade lipase (UI kg ⁻¹)	
	Novozym 435	Índice de Iodo
Óleo de Girassol Bruto	880	120 – 141
Óleo de Girassol Refinado	200	118 – 145 ⁸⁴
Óleo de Algodão	1420	99 – 113 ⁸⁵
Óleo de Arroz	320	99 – 108
Óleo de Soja	190	124 – 139 ⁸⁴
Óleo de Oliva	320	79 – 89 ⁸⁶
Óleo de Rícino	510	82 – 88 ⁸⁴
Óleo de Milho	220	103 – 128 ⁸⁵
Óleo de Canola	740	110 – 126 ⁸⁴
Sebo Bovino	500	40 – 47 ⁸⁶
Manteiga	730	25 - 40 ⁸⁷
Gordura Hidrogenada	560	
Banha Suína	2010	53-77 ⁸⁵

Destaca-se também que esta lipase parece ter preferência para óleos menos insaturados, o que deve ser investigado.

4.1.3 Análise quimiométrica do estudo de atividade lipase

Para auxiliar na interpretação dos dados utilizou-se a análise multivariada, mais especificamente a ferramenta quimiométrica de análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). Com ela analisou-se a atividade lipase, frente a diferentes substratos, apresentados na Figura 23. As enzimas Novozym® 435 e Amano M 10 possuem maior semelhança na atividade em relação aos substratos. No entanto, esta semelhança se deve a menor massa de lipase no teste com Novozym® 435, logo, os valores de atividade foram menores como os obtidos com a Amano M 10.

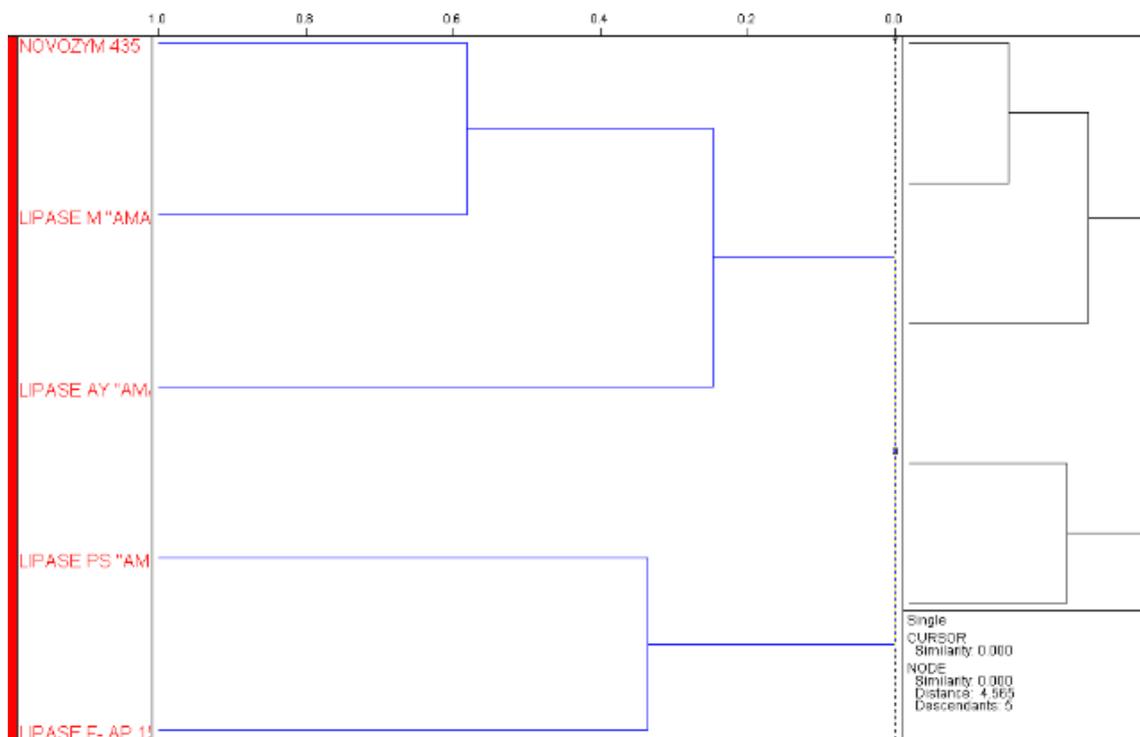


Figura 23 - Dendrograma atividade lipase frente a diferentes substratos.

Outro aspecto visualizado na Figura 23 é a existência de alguma similaridade entre as lipases PS e F-AP 15, ambas do mesmo fornecedor. Estas foram as lipases que apresentavam um perfil de atividade interessante para uso na transesterificação de óleos vegetais, uma vez que, outros autores ⁶⁶ já utilizaram a PS com este objetivo. Para a maioria dos substratos analisados a atividade foi maior com estas duas lipases como mostram os gráficos de *scores* e *loadings* das Figuras 24 e 25. Para a análise por componentes principais (PLA).

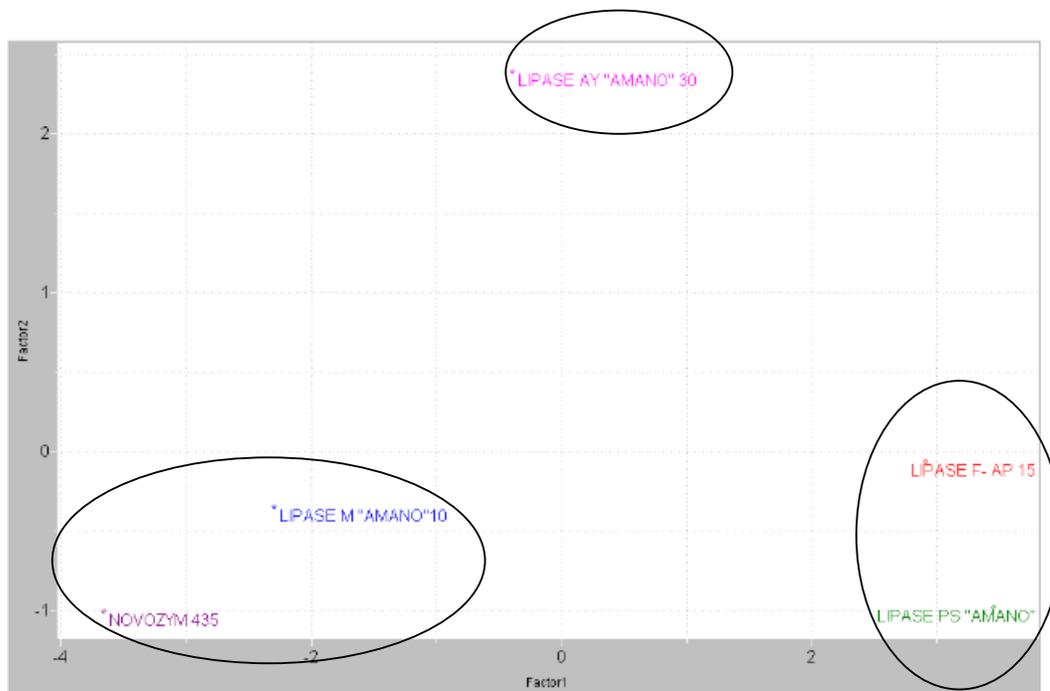


Figura 24 - Gráfico de scores PC1 (75,44%) x PC2 (15,03%) para PCA das atividades lipases das diferentes enzimas estudadas.

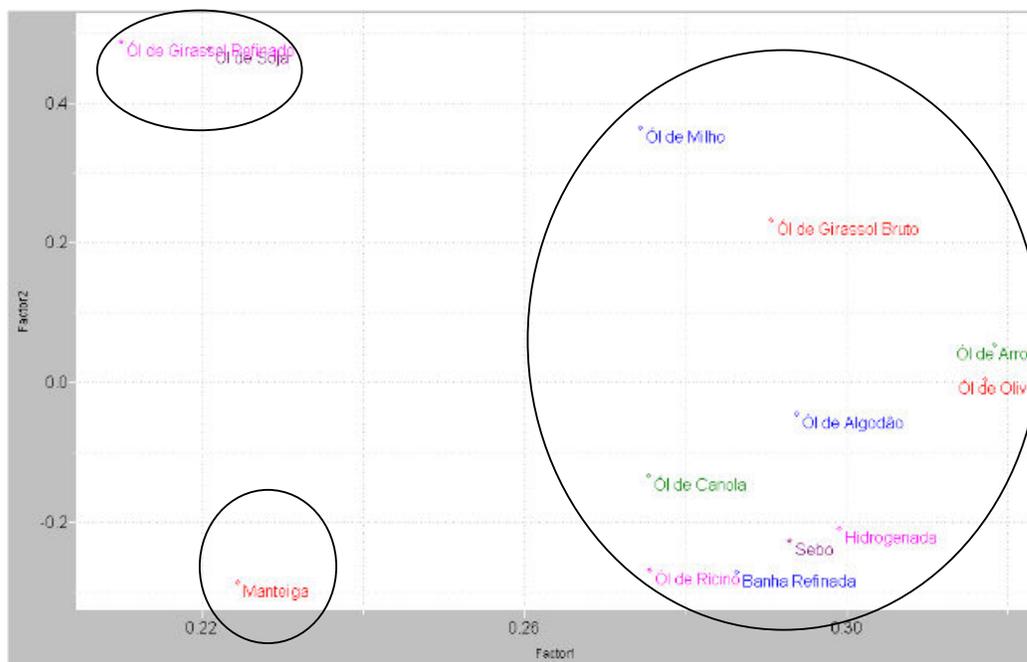


Figura 25 - Gráfico de loadings PC1 (75,44%) x PC2 (15,03%) para o PCA dos diferentes substratos utilizados no teste da atividade lipase.

Observando as Figuras 24 e 25 constata-se que existe uma maior atividade das lipases FAP-15 e PS Amano com os óleos e gorduras mais saturados (óleo de arroz comercial, de canola comercial, de girassol bruto, de milho comercial e de rícino comercial, azeite de oliva comercial, banha suína, sebo bovino e gordura vegetal hidrogenada comercial).

Com relação a atividade das lipases em substratos mais insaturados observou-se que a lipase AY-30 apresentou uma maior relação com base no gráfico de scores e loadings, no entanto, a atividade foi menor do que a encontrada com a FAP-15 e PS. Desta forma, optou-se para realizar novos experimentos com estas duas lipases (FAP-15 e PS).

Em função da similaridade destas lipases frente aos substratos como foi visto na análise quimiométrica foram feitos diferentes experimentos com as duas, uma vez que a massa de lipase doada para pesquisa é limitada. A FAP-15 foi utilizada para uma nova avaliação da atividade lipase com substratos semelhantes e mais saturados e a PS foi utilizada na reação de transesterificação empregando um procedimento alternativo de imobilização.

4.2 Estudo de atividade lipase com a enzima FAP – 15 com diferentes substratos saturados

Visando avaliar a lipase FAP-15 com relação a substratos mais semelhantes e que tivessem maior correlação com a mesma, foram realizados novos experimentos de atividade lipase empregando os óleos e gorduras a seguir:

- Óleo de Palma 1, para o lote 1;
- Óleo de Palma 2, para o lote 2;
- Óleo de Palma 3, para o lote 3;
- Óleo de Palma 4, para o lote 4;
- Óleo de Palmiste 1, para o lote 1;
- Óleo de Palmiste 2, para o lote 2;
- Oleína de Palma PN3 1, para o lote 1;
- Oleína de Palma PN3 2, para o lote 2;
- Oleína de Palma PN4 1, para o lote 1;

- Oleína de Palma PN4 2, para o lote 2;
- Oleína de Palma PN6 1, para o lote 1;
- Oleína de Palma PN6 2, para o lote 2;
- Estearina de Palma Refinada 1, para o lote 1 e
- Estearina de Palma Refinada 2, para o lote 2.

Estes óleos e gorduras foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, onde foi possível identificar a composição em ácidos graxos de cada amostra e a partir do seu índice de iodo, avaliar o grau de insaturação, conforme valores apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Ácidos graxos identificados e índice de iodo das amostras de óleo de palma e palmiste utilizadas para determinação da atividade lipase.

Óleos	Ácidos graxos (%)						Índice de iodo (mg I ₂ g ⁻¹)	Atividade lipase (UI kg ⁻¹)
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:2	C18:1	C18:0		
Palma Refinado 1	0,40	1,75	35,99	14,22	36,76	10,89	56,23	21.860
Palma Refinado 2	56,23	2,53	41,75	12,05	35,95	6,18	56,71	19.840
Palma Refinado 3	56,71	1,17	41,42	11,44	30,94	14,64	54,43	19.580
Palma Refinado 4	54,43	1,19	50,82	11,34	27,45	8,78	57,08	16.400
Palmiste Refinado 1	57,08	18,31	9,80	3,06	15,51	4,50	19,30	34.110
Palmiste Refinado 2	19,30	13,67	8,35	2,42	13,27	3,13	18,42	26.780
Oleína de Palma PN3 1	18,42	1,15	30,15	16,33	42,18	9,39	64,83	20.300
Oleína de Palma PN3 2	64,83	1,06	29,90	17,02	44,17	7,47	66,00	19.600
Oleína de Palma PN4 1	35,00	1,34	65,92	19,35	4,24	8,80	62,55	20.860
Oleína de Palma PN4 2	62,55	1,06	31,91	14,00	37,09	15,46	61,64	34.020
Oleína de Palma PN6 1	61,64	1,26	36,76	13,28	33,71	14,46	48,82	31.520
Oleína de Palma PN6 2	48,82	1,31	31,03	14,91	39,04	12,97	57,80	16.170
Estearina de Palma 1	57,80	1,33	29,25	17,03	40,14	11,35	35,60	960
Estearina de Palma 2	35,60	3,48	48,45	10,32	28,13	8,67	32,70	960

Após a determinação da atividade lipase destes óleos e gorduras pode-se observar que a atividade da lipase F-AP-15 é diferente em cada óleo e também em cada lote utilizado (Tabela 7). O óleo em que a lipase apresentou maior atividade foi o óleo de palmiste. Este óleo apresenta alta concentração em ácido láurico, o que a difere das outras amostras utilizadas.

Este resultado pode estar relacionado com o fato da maioria dos ácidos graxos presentes no óleo de palmiste ser de cadeia menor e saturada. Neste caso a enzima teria uma especificidade por cadeias carbônicas curtas e ácidos graxos mais saturados, pois outros bons resultados de atividade foram encontrados em amostras ricas em ácido oléico, que é monoinsaturado⁸⁸.

Assim como o óleo de palmiste, as amostras de oleína de palma PN3, PN4 e PN6 também tiveram uma grande atividade lipase e apresentaram uma maior composição de ácido palmítico e oléico.

Com base nos resultados obtidos para interpretar se há uma preferência da enzima por uma condição específica, foi utilizado a análise multivariada por PCA onde observa-se que existe uma correlação entre a atividade e o tipo de ácido graxo presente no triacilglicerol. Amostras de menor tamanho de cadeia carbônica e mais saturadas estavam relacionadas com a maior atividade lipase (Figura 26 e 27).

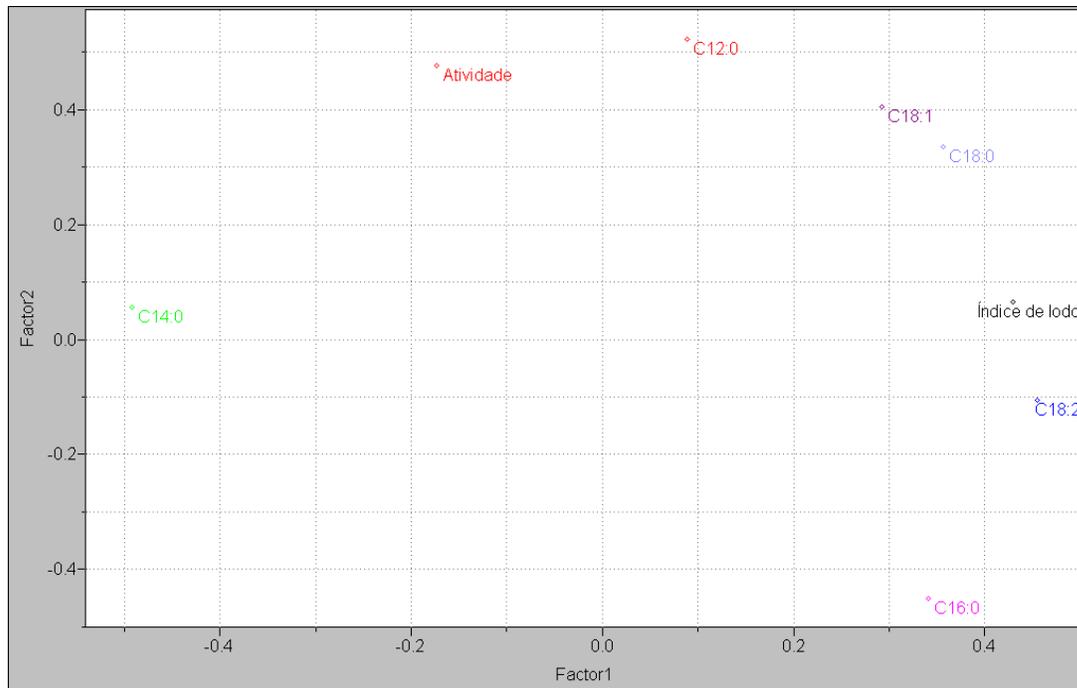


Figura 26 - Gráfico de scores PC1 (49,76%) x PC2 (16,86%) para PCA utilizando os resultados para a enzima FAP-15.

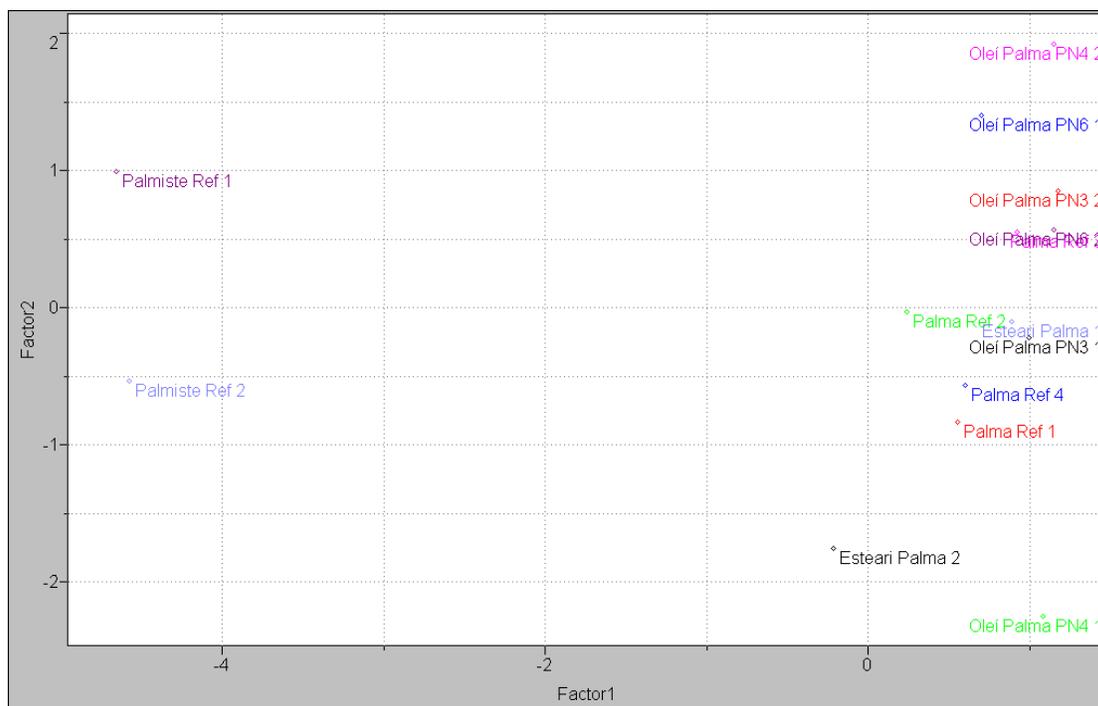


Figura 27 - Gráfico de loadings PC1 (49,76%) x PC2 (16,86%) para PCA utilizando os resultados para a enzima FAP-15.

Com base nestes resultados pode-se constatar que a pesar da lipase FAP-15 não ser considerada específica pelo fabricante, há uma relação entre maior atividade e substratos mais saturados e de cadeia carbônica menor.

Assim, entende-se que ela pode ser utilizada na produção de biodiesel a partir do óleo de girassol com alto oléico (88,9%) e que não teria o mesmo resultado com o óleo de girassol de baixo conteúdo em ácido oléico, que conforme análise cromatográfica apresenta 44% em ácido linoléico (C18:2), apresentado na Figura 28.

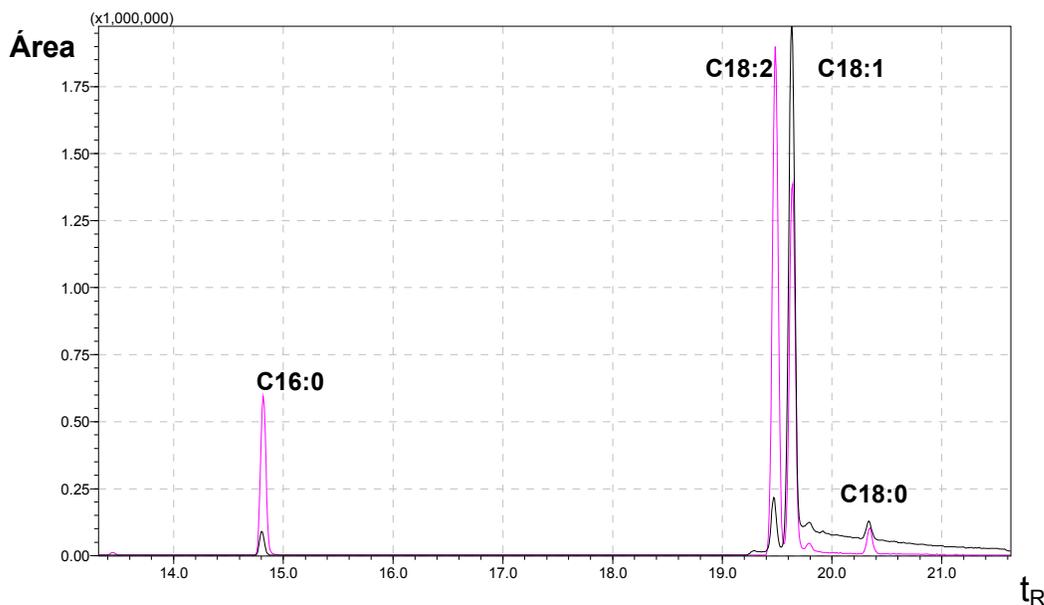


Figura 28 - Cromatograma íon total do óleo de girassol alto oléico (preto) girassol comum (rosa).

4.3 Imobilização da lipase PS em hidrogel

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar da taxa de crescimento do hidrogel para identificar qual o tempo necessário para a formação da esfera. Observou-se na Figura 29, que com 1 h de imersão em água, as esferas triplicavam o seu diâmetro, sendo suficiente para a retenção da lipase em sua superfície. A partir deste estudo, foi realizada a imobilização da enzima PS, como mostra na Figura 30.

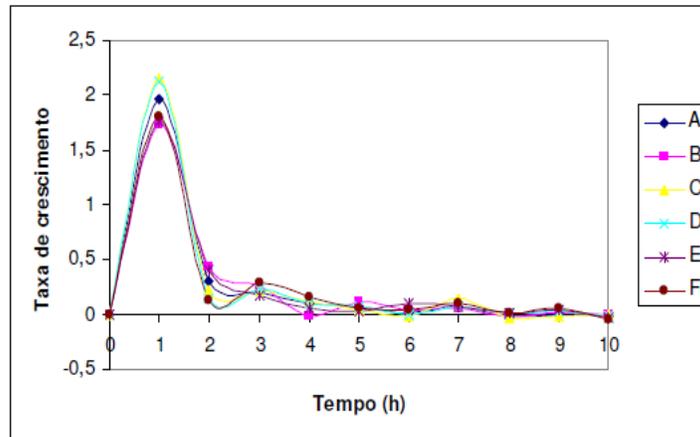


Figura 29 - Taxa de crescimento das 6 esferas de hidrogel , com relação ao diâmetro da esfera hidratada.



Figura 30 - Esfera de hidrogel hidratada com solução de enzima.

4.3.1 Resultados da aplicação das esferas de hidrogel na produção de biodiesel em batelada

Para todos os experimentos de transesterificação realizados com a lipase imobilizada no hidrogel foi obtido conversão parcial dos triacilgliceróis em ésteres metílicos, apresentado no registro fotográfico da cromatoplaça obtida após a separação por CCD (Figura 31).

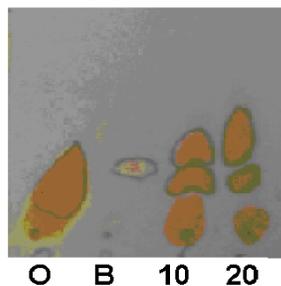
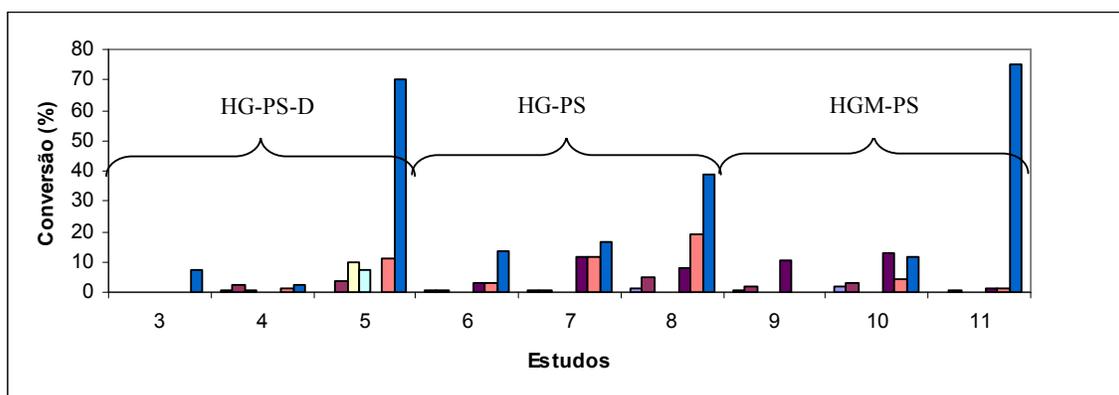


Figura 31 - Cromatograma de CCD do produto de reação de transesterificação (24h) realizada com 10 e 20 esferas de hidrogel com enzima imobilizada (O- óleo; B- Biodiesel; 10 – esferas e 20 esferas).

Uma maior conversão em ésteres foi observado em relação ao tempo de reação e a quantidade de biocatalisador empregada, alcançando-se conversões de aproximadamente 70%. Pesquisadores obtiveram resultados similares, onde foram alcançados conversões de 67% com a mesma lipase porém imobilizada em suporte sol-gel hidrofóbico ⁸⁹. A conversão observada na transesterificação do óleo de girassol foi registrada na Figura 32.



HG-PS-D: Esferas de hidrogel imersas em soluções de enzima.

HG-PS: Esferas de hidrogel imersas em soluções de enzima e posteriormente desidratadas.

HGM-PS: Esferas de hidrogel imersas em soluções de enzima, com a substituição da água por uma solução 1:9 de metanol-água.

Figura 32 - Transesterificação das amostras de óleo de girassol empregando a lipase PS Amano imobilizada em hidrogel (Estudos 3, 6 e 9 com 10 esferas; Estudos 4, 7, 10 com 20 esferas e Estudos 5, 8 e 11 com 40 esferas).

Conforme a Figura 33, a reação apresentou maior conversão quando a lipase imobilizada foi desidratada ou quando no processo de imobilização foi utilizada a lipase em solução 1:9 de metanol e água. Este conteúdo em metanol também deve ser analisado quanto ao equilíbrio de solubilização do mesmo com água e óleo, conforme se supõe a partir da Figura 34.

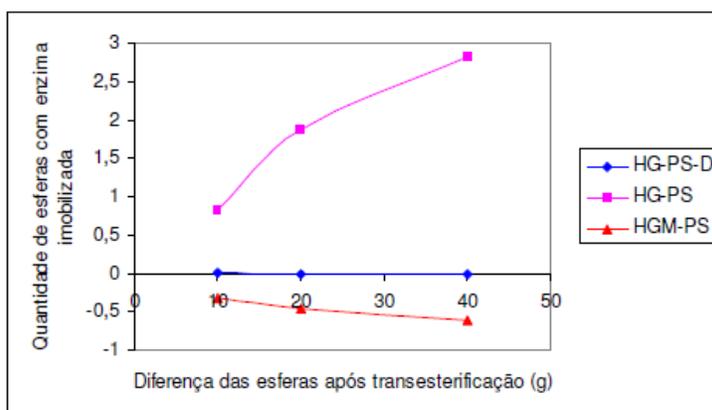


Figura 33 - Diferença de tamanho das esferas de hidrogel com enzima imobilizada após a transesterificação.

Observa-se que existe uma diferença entre as esferas antes do seu emprego como biocatalisadores, ou seja, ocorreu um equilíbrio dos produtos do interior da esfera com o meio reacional. Supõe-se que o emprego de hidrogéis para a imobilização de lipases para a produção de biodiesel seja possível, e que a presença de álcool no processo de imobilização possa ser um fator que facilite a reação de transesterificação. Neste caso, o álcool, que neste trabalho, trata-se do metanol, não precisa ser adicionado no momento da reação. Supõe-se, no entanto, que há uma migração de álcool para o meio reacional, reduzindo a massa das esferas após a reação. Portanto a análise das esferas hidratadas com solução aquosa de lipase (HG-PS) após a transesterificação revela um aumento da massa das mesmas, o que também leva a propor que o equilíbrio entre água, álcool e óleo ocorra em sentido contrário como mostra a Figura 34.

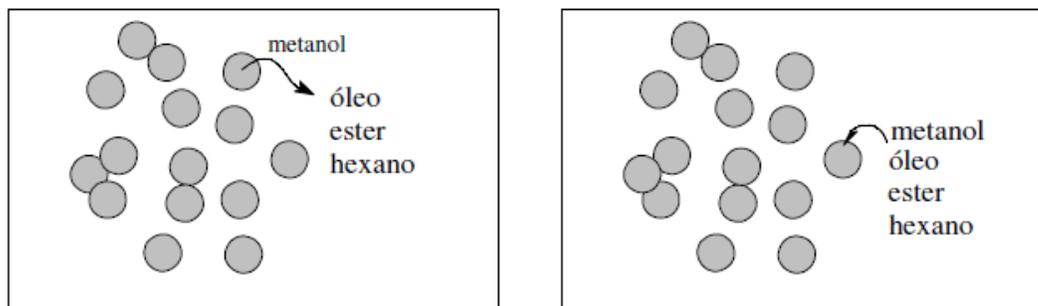


Figura 34 - Proposição de transferência de metanol observado em esferas de hidrogel com enzimas imobilizadas em reações de transesterificação.

Desta forma, constata-se que é possível a formação de um equilíbrio de solubilização água – álcool durante a reação de transesterificação que pode beneficiar a conversão, uma vez que o álcool é solúvel em óleo e em água, principalmente quando o álcool faz parte da hidratação da esfera, isto reduz o gasto com a rota-evaporação do álcool residual após a reação de transesterificação e aumenta a conversão.

A imobilização de enzimas em hidrogel poderá ser uma possível alternativa para a produção de biodiesel por processo enzimático, sendo que este apresentou resultados satisfatórios, principalmente com 24 horas de reação. Os sistemas estudados podem ser modificados quanto à presença de metanol na etapa de imobilização, tempo de reação e quantidade de enzima. Da mesma forma, com a enzima imobilizada em hidrogel, seguida de desidratação, há a possibilidade de conversão, do óleo em éster e, assim, com a imobilização da enzima em hidrogel têm-se dois caminhos alternativos para a produção de biodiesel.

Por outro lado (hidrogel + álcool), o emprego de lipase imobilizada em hidrogel, seguida de desidratação, pode ser um caminho para a realização desta reação de transesterificação em sistema contínuo.

A partir desta etapa da pesquisa coube a otimização de métodos de transesterificação cíclicos e, para tanto, foi utilizado a lipase comercial imobilizada em um suporte polimérico e não a lipase imobilizada em hidrogel desidratado. Isto ocorreu devido à necessidade de maior massa de lipase imobilizada e de um liofilizador com maior capacidade de desidratação das esferas.

Assim, foi dada continuidade dos estudos com o óleo de girassol e com a lipase Novozym 435.

4.4 Produção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando Novozym 435

Visando otimizar o sistema contínuo de transesterificação enzimática do óleo de girassol, foram realizados experimentos em batelada, para selecionar as condições de reação, como temperatura, proporção óleo-álcool e biocatalisador. Após, foram desenvolvidos quatro protótipos em sistema cíclico e contínuo.

4.4.1 Produção de biodiesel por batelada

Pode-se verificar por CCD que após a reação de transesterificação por batelada foi observado para os produtos da reação o mesmo Rf do padrão de éster metílico (B) do óleo de girassol (Figura 35).

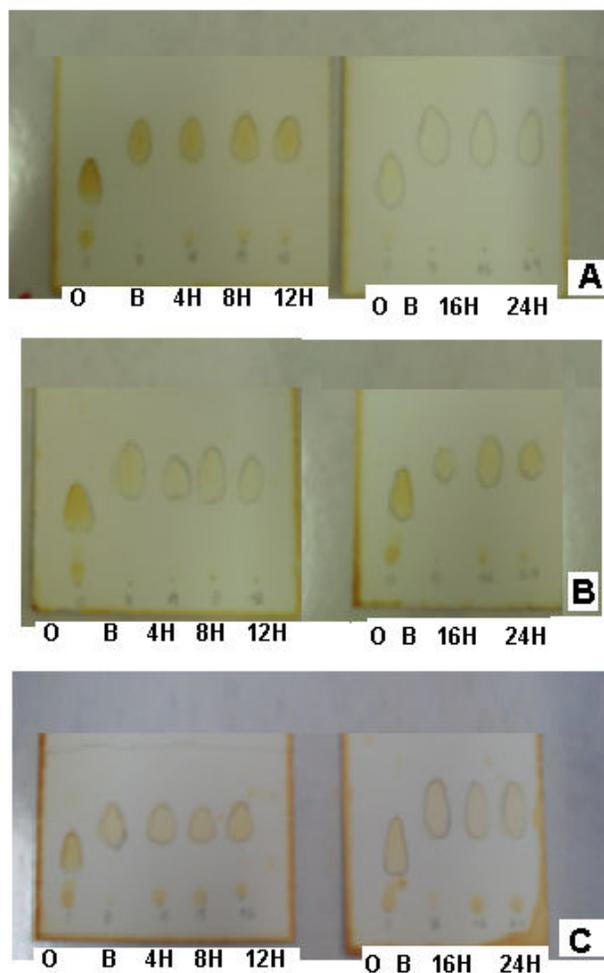


Figura 35 - Cromatograma de CCD das amostras em triplicata da reação de transesterificação por sistema batelada do óleo de girassol, onde O- óleo de girassol, B- ésteres metílicos (Biodiesel do óleo de girassol).

A Figura 36 apresenta o gráfico dos resultados obtidos por cromatografia gasosa da reação de transesterificação por sistema batelada do óleo de girassol, podendo observar que nos tempo de reação de 6h para o experimento E7 (65°C, 20% enzima, 1:4 óleo/álcool, sem a presença de água) e 18 h para os experimentos E3 (55°C, 20% enzima, 1:10 óleo/álcool, sem a presença de água) e E1 (55°C, 5% enzima, 1:4 óleo/álcool, sem a presença de água) obteve-se um alto grau de conversão.

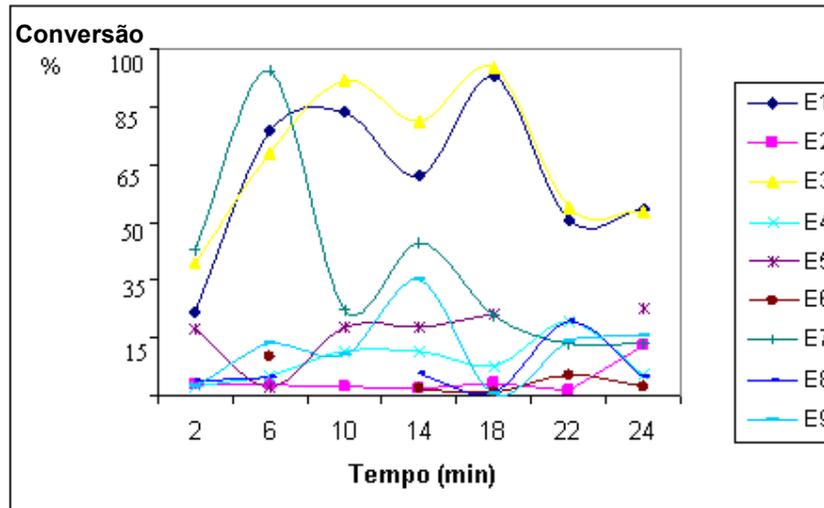


Figura 36 - Grau de conversão do óleo de girassol em biodiesel por biocatálise.

Quanto à transformação do óleo em ésteres metílicos foram possíveis conversões superiores a 80% em tempos de reação de até 24h. As curvas construídas no gráfico da Figura 37 apresentam os resultados que indicam que desde o início da reação ocorre uma alta taxa de conversão.

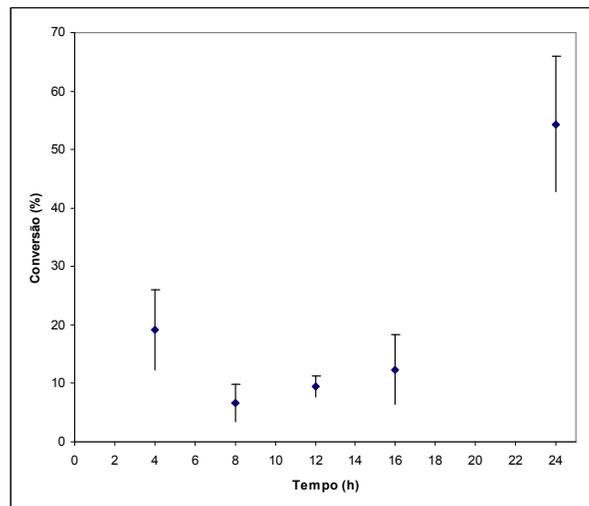


Figura 37 - Conversão do óleo de girassol por etanolise enzimática por batelada.

Como padrão foi utilizado o óleo transesterificado por catálise básica empregando como catalisador o BF_3 -metanol. Através do resultado das análises

por CG-EM pode-se observar que os picos presentes na mistura de ésteres etílicos do B100 obtido por catálise química também estavam nos produtos das reações de etanolise enzimática. A conversão dos óleos em ésteres etílicos por sistema de batelada foram parciais. Observou-se que após 4 h de reação por batelada houve uma redução do percentual de conversão, que aumentou após 16h. Com a redução do solvente orgânico no meio reacional a conversão foi menor do que a observada em experimentos anteriores já realizados com 40 mL de hexano e até 24h de reação ¹³Erro! Indicador não definido. No entanto, estes resultados são importantes para que os estudos sejam direcionados a otimização de outras variáveis como sistema de agitação e tempo de reação superior a 24 h.

4.4.2 Produção de Biodiesel por Sistema Semi-contínuo Cíclico e Contínuo

A seguir são apresentados os resultados da transesterificação empregando quatro protótipos diferentes:

Protótipo 1 – Cíclico, Semi-contínuo, transesterificação metílica, solvente orgânico.

Protótipo 2 – Cíclico, Semi-contínuo, transesterificação metílica, solvente orgânico, com pequenas alterações em relação ao protótipo 1.

Protótipo 3 - Cíclico, Semi-contínuo, transesterificação etílica, solvente orgânico.

Protótipo 4 – Contínuo, transesterificação etílica.

4.4.2.1 Protótipo 1 e Protótipo 2

Foi possível verificar que esses modelos de reatores semi-contínuos apresentaram um potencial para a produção do biodiesel, porém a reação de transesterificação enzimática ocorreu de forma parcial. Por esse motivo deu-se continuidade na pesquisa de outros modelos de reatores buscando uma melhor conversão da reação.

Como resultado obtido destaca-se a obtenção de um material facilmente separado do biocatalisador. E as amostras foram analisadas inicialmente por CCD, observando-se que todas as conversões foram parciais. Estas amostras

foram analisadas por espectroscopia no infravermelho conforme Figura 38B, onde se observa a existência dos grupamentos funcionais diferentes dos que há no óleo de girassol de partida Figura 38A. No óleo de partida observaram-se as bandas características dos triacilgliceróis derivados do ácido linoléico, que compõem cerca de 65 % do óleo de girassol, principalmente referente aos grupamentos éster e da ligação dupla e nos produtos observaram-se às bandas características as ligações C-O de ésteres metílicos formados em 1000 a 1400 cm^{-1} com uma diferenciação em 1029 cm^{-1} .

A descrição completa das principais bandas obtidas no espectro de infravermelho (Figuras 38 A e B) está apresentada na Tabela 8.

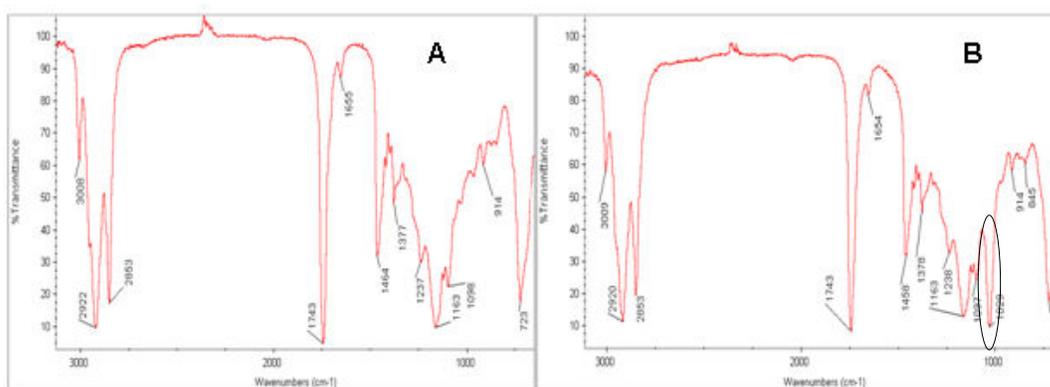


Figura 38 - Espectro no infravermelho de óleo de girassol (A) e éster metílico do óleo de girassol (B).

O resultado obtido na análise por cromatografia gasosa do protótipo 1 está demonstrado no cromatograma conforme Figura 39, onde os picos presentes na amostra de biodiesel produzido são os mesmos da mistura de ésteres metílicos padrão. O produto obtido na reação apresentou as mesmas características do padrão analisado evidenciando a formação dos produtos esperados.

Tabela 8 - Descrição das bandas do infravermelho do óleo puro e biodiesel.

	Óleo	Biodiesel
Especificação	Sinal (cm ⁻¹) - intensidade	Sinal (cm ⁻¹) - intensidade
v-CH ₂ assimétrico	3008- forte	3009- forte
v-CH ₂ simétrico	2922-forte	2920-forte
v-C-H	2853-fracá	2853-fracá
v-C=O	1743-forte	1743-forte
δ-CH ₂	1464-média	1458-média
v-C=C	1655-fracá	1654-fracá
-	-	1029-forte
Ester C-O assimétrico	1237-média	1238-média
Ester C-O simétrico	1098-média	1097-média
δ-CH ₂ (Rock)	722-média	722-média
δ-CH ₃	1377-fracá	1378-fracá

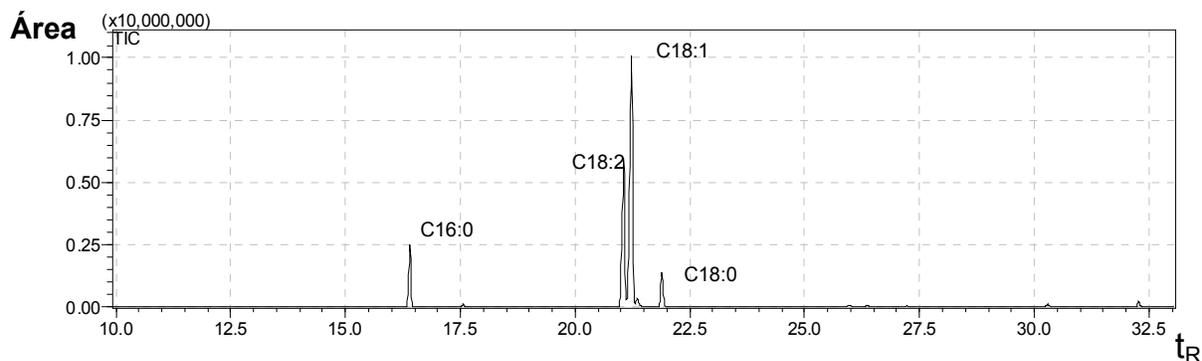


Figura 39 - Cromatograma íon total do produto de reação de transesterificação do sistema semi-contínuo - Protótipo 1.

Conforme resultados da CCD das amostras do protótipo 1 apresentados na Figura 40, de 4 horas, 6 horas e 9 horas de reação respectivamente, pode-se verificar que as amostras apresentaram as mesmas características do padrão porém todas as conversões foram parciais.

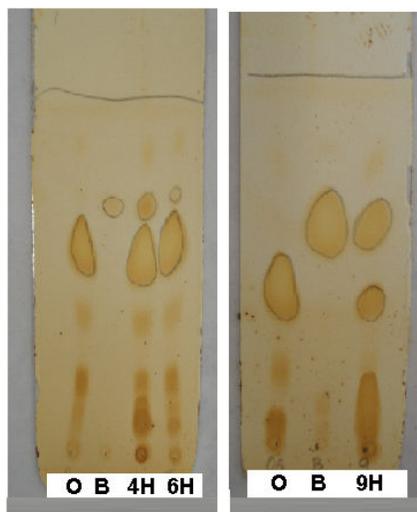


Figura 40 - Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema semi-contínuo enzimático realizado com Protótipo 1, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).

Da mesma forma, o resultado obtido na CCD do protótipo 2 está demonstrado na Figura 41, onde as amostras coletadas em 6, 8, 12 e 16 horas de reação, apresentam conversões parciais.

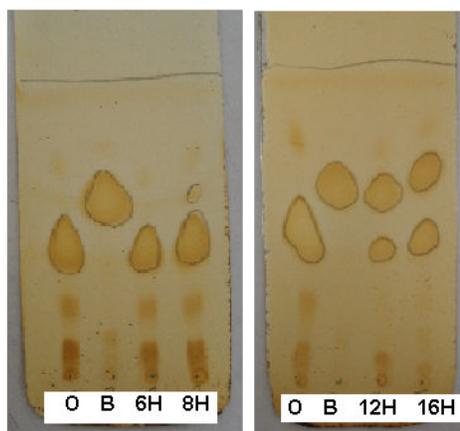


Figura 41 - Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema semi-contínuo enzimático realizado com Protótipo 2, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).

Em função da análise dos resultados da cromatografia em camada delgada não terem sido satisfatórios, não foi dado segmento para as análises em cromatografia gasosa.

4.4.2.2 Protótipo 3

No processo semi-contínuo de reação de transesterificação enzimática utilizando o reator de vidro (Protótipo 3), além de todos os equipamentos já utilizados nos modelos anteriores, foi necessário também o uso de uma bomba de ar para agitação do biocatalisador sendo esta de fundamental importância, pois nos protótipos anteriores um dos problemas enfrentados era a agitação magnética que quebrava o suporte da enzima imobilizada em resina acrílica. Utilizou-se também uma bomba de aquário mergulhada no banho termostatizado para manter o reator aquecido à 55 °C.

Conforme resultados da CCD das amostras do protótipo 3 apresentados na Figura 42, de 4 horas, 9 horas, 14 horas e 24 horas de reação respectivamente, pode-se verificar que as amostras iniciais quase não sofreram conversões e as amostras de 14 e 24 horas, apresentaram conversões parciais.

Este protótipo não foi muito promissor para a reação de transesterificação enzimática em sistema contínuo, pois não obtivemos conversões satisfatórias, visto que, havia a necessidade de uma grande quantidade de lipase, o que não poderíamos dispensar nestes testes, devido à indisponibilidade e dificuldade de compra da mesma. Além disso, o reator estudado necessitava de uma grande quantidade de solvente orgânico (hexano) para homogeneização.

A adição de hexano não era desejada na pesquisa porque além de deixar o método menos sustentável, também poderia desnaturar a enzima.

Apesar de não ter sido dado continuidade aos estudos com este reator, salienta-se que ele, poderá no futuro ser testado com maior quantidade de lipase e etanol e menor volume de hexano, uma vez que, este modelo apresenta uma boa agitação da lipase.

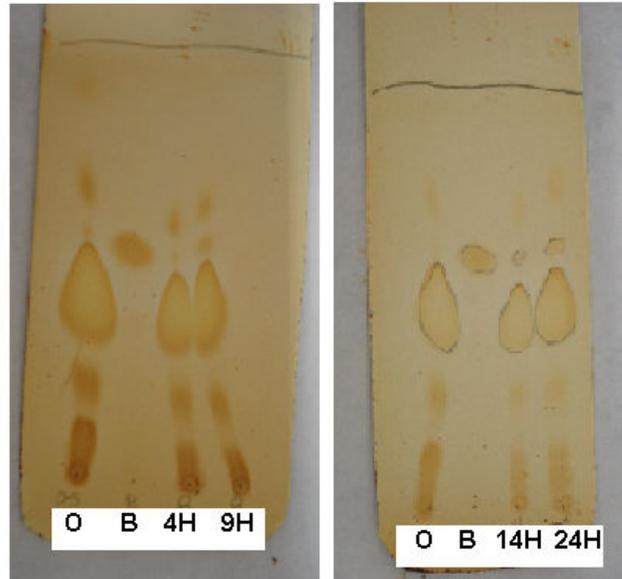


Figura 42 - Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema semi-contínuo enzimático realizado com Protótipo 3, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).

4.4.2.3 Protótipo 4

Com este protótipo 4 os resultados foram mais satisfatórios empregando o etanol como único solvente. Foi possível verificar que o modelo do reator de aço inoxidável, com a enzima empacotada apresentou um bom potencial para a produção do biodiesel, ocorrendo conversão total do óleo de girassol em ésteres etílicos.

O fluxo dos substratos passando pela coluna foi um dos fatores otimizados. Inicialmente avaliou-se diferentes fluxos com base nas faixas permitidas para bomba empregada no processo. Neste estudo verificou-se que a reação deveria ser conduzida na menor velocidade permitida pela bomba peristáltica utilizada, de 6 mL h^{-1} .

O produto obtido da reação de transesterificação foi um material facilmente separado do biocatalisador, sendo que o glicerol, co-produto da reação, foi separado por decantação no reservatório final.

As amostras do sistema contínuo com um reator foram analisadas inicialmente por CCD conforme Figura 43, observando-se que as conversões foram totais até 16 horas de reação, e o restante parcial até completar 24 horas. Este resultado se deve ao pouco tempo de contato entre a enzima e o substrato, por este motivo, no próximo experimento já utilizamos 2 reatores no sistema.

Pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios da conversão enzimática do óleo de girassol ao biodiesel em um sistema livre de solvente utilizando a lipase imobilizada comercial da *Candida antarctica* (Novozym® 435) para sintetizar o biodiesel do óleo de girassol. As circunstâncias ótimas para o transesterificação foram encontradas: 45 °C, 3% da enzima baseada no peso do óleo, proporção molar 3:1 metanol e óleo e sem água adicionada no sistema. Sob estas circunstâncias, > 99% da conversão do óleo ao éster metílico de ácido graxo foi conseguido após 50 h da reação, mas a atividade da lipase imobilizada foi diminuindo⁹⁰.

A fim de melhorar a estabilidade das enzimas, Ognjanovic e colaboradores⁹⁰ utilizaram acetato de metila ao invés do metanol, tendo como resultado uma alta conversão de óleo em éster metílico de ácido graxo (95,65%) e o aumento de meia vida da lipase imobilizada em aproximadamente 20,1 vezes em comparação ao metanol. O reator de leito fixo utilizado por estes autores operou por até 72 h com quase nenhuma perda na produtividade.

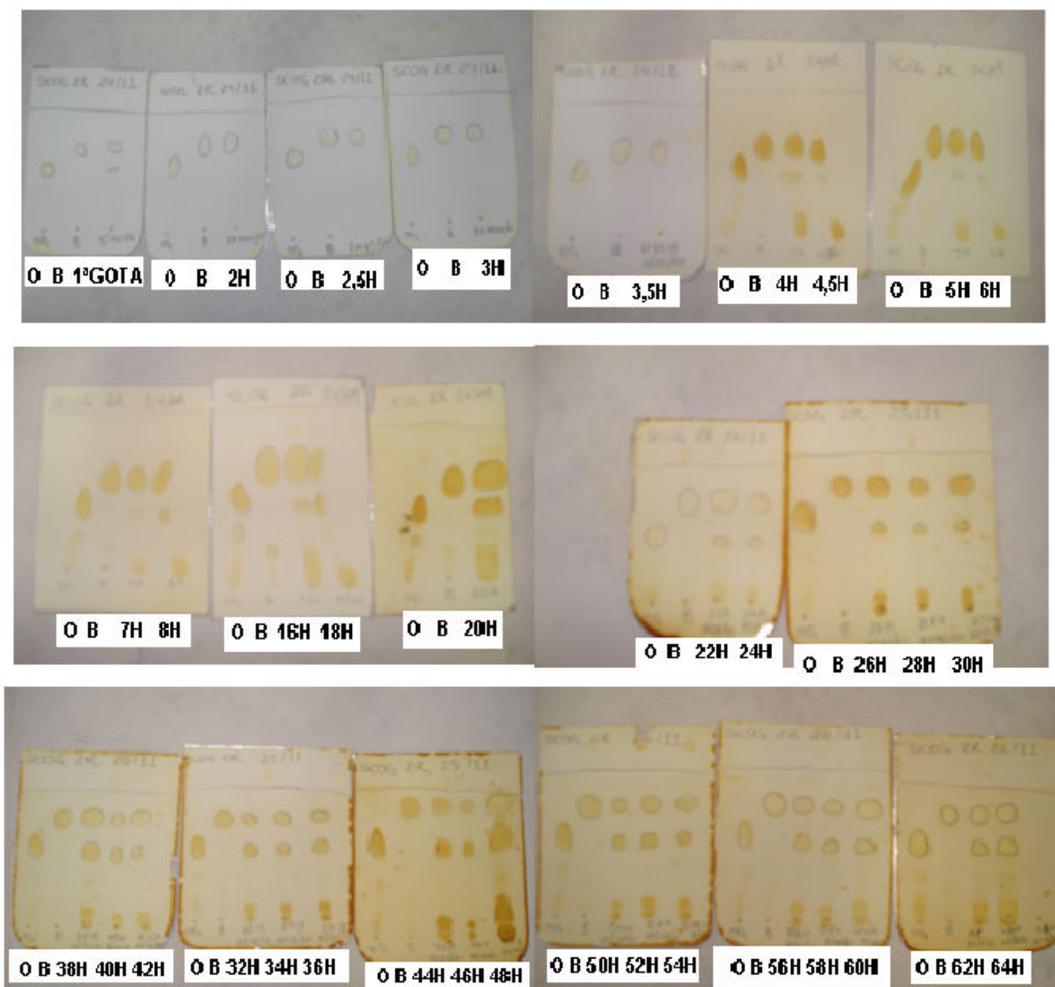
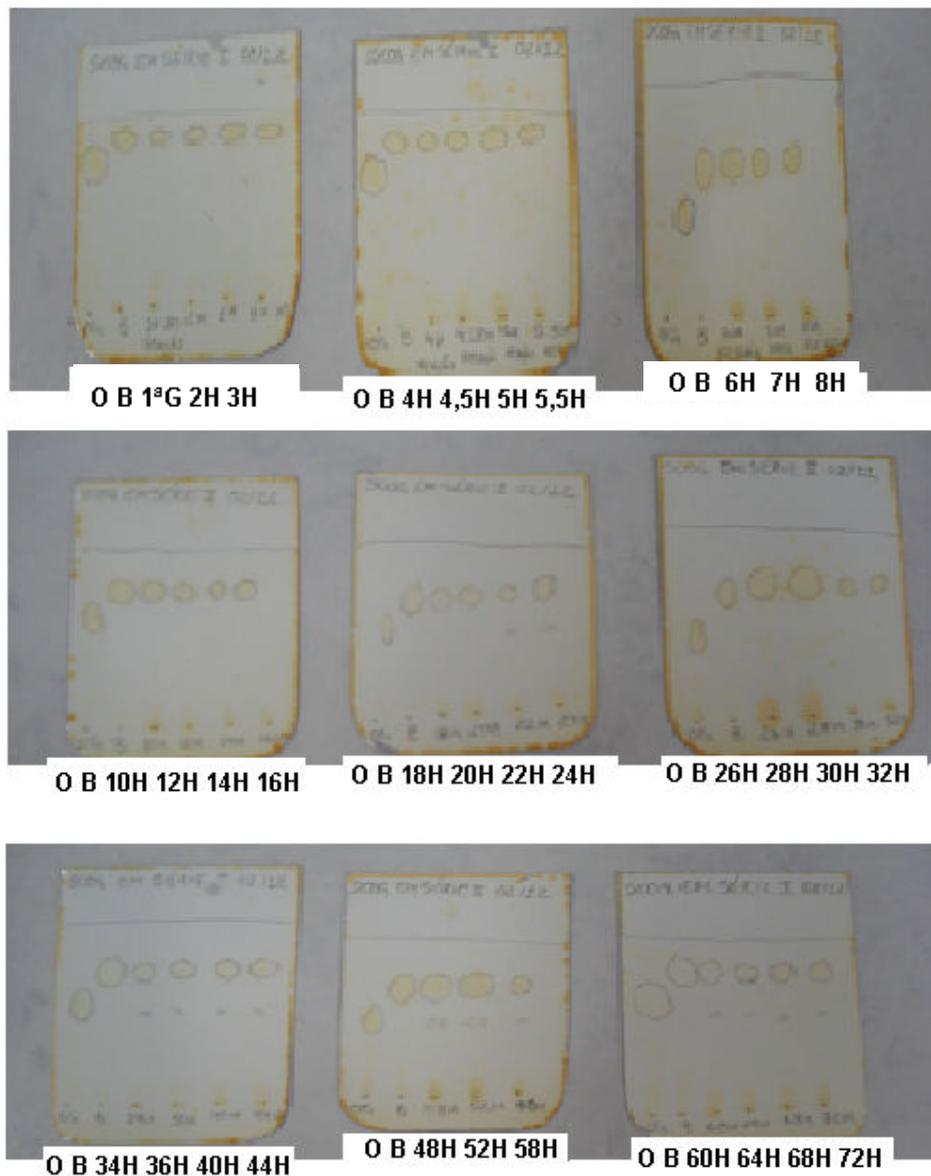


Figura 43 - Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema contínuo enzimático realizado com 1 reator, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).

As amostras do Sistema Contínuo com 2 Reatores foram analisadas inicialmente por CCD e posteriormente por CG, onde os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 44. Com a adição de mais um reator no sistema, podemos observar que as conversões totais duraram muito mais tempo, 72 horas, conforme demonstrado nos cromatogramas da Figura 44, o sistema permaneceu ligado por 388 horas obtendo conversões parciais. Durante a realização destes experimentos foram retiradas amostras em variados tempos, para análise da conversão. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa. O gráfico das conversões do sistema

contínuo enzimático utilizando 2 reatores e 388 horas de reação estão apresentados na Figura 44.



continua...

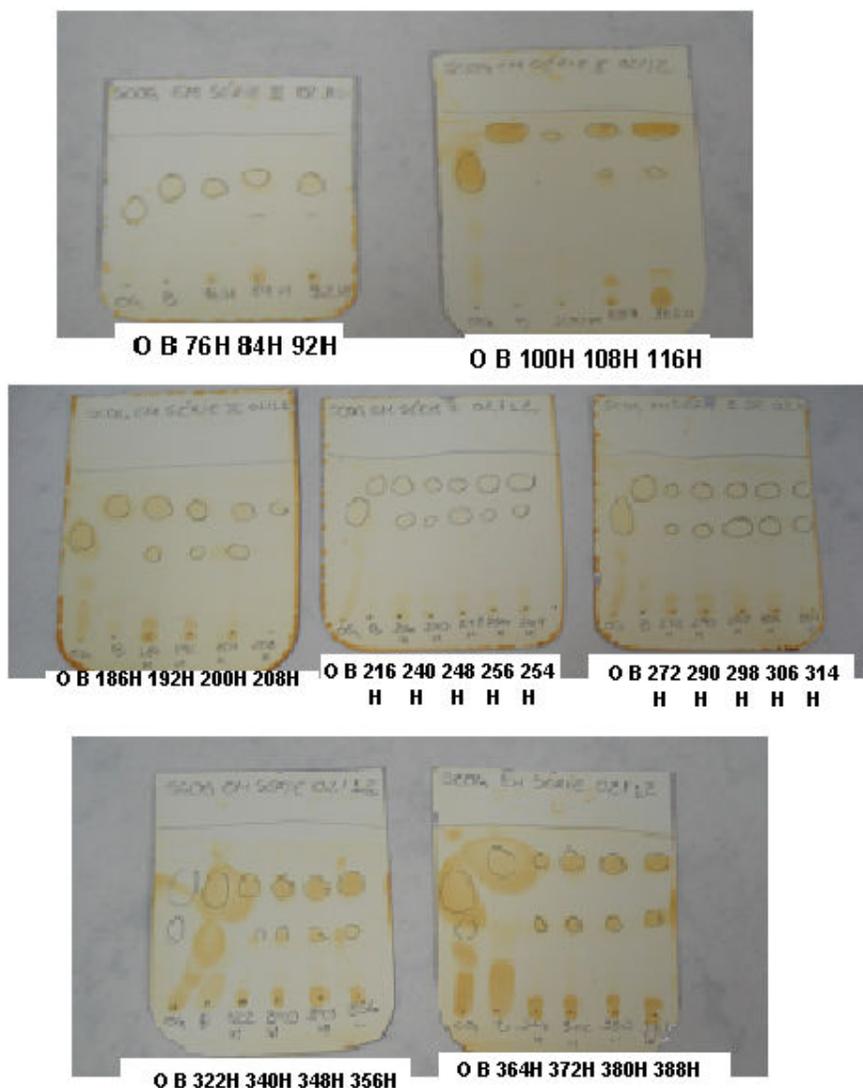


Figura 44 - Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema contínuo enzimático realizado com 2 reatores, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).

Por CG-EM pode-se observar as conversões obtidas com o protótipo 4 com dois reatores. A Figura 45, contendo o gráfico com as conversões obtidas até 350 h de reação indica que a atividade da enzima foi reduzindo.

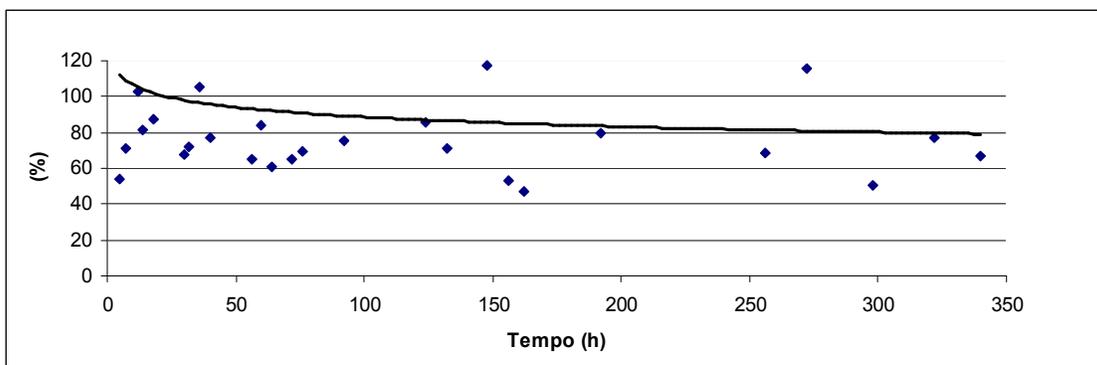


Figura 45 - Gráfico das Conversões do Sistema Contínuo Enzimático utilizando 2 reatores.

Conforme o tempo utilizado para o escoamento da primeira gota no sistema utilizando lipase nova, foi possível determinar que em média um ciclo de transesterificação neste sistema é de 75 min, o que nos leva a calcular o número de ciclos que a enzima permanece ativa, sendo de 87 vezes e após perder uma parte da atividade, conforme observado em CCD, foi possível verificar que ainda ocorreram 224 ciclos, os quais podem ser utilizados com recirculação, desta forma alcançando a conversão máxima.

Este resultado demonstra que foi possível a conversão máxima empregando o protótipo 4, sem adição de hexano e com o emprego de etanol no lugar de metanol, o mais utilizado para a produção de biodiesel.

Desta forma, o protótipo final foi otimizado em escala de bancada, sendo ainda necessário a avaliação dos impactos ambientais associados ao seu uso.

4.5 Consumo de energia do sistema contínuo

Conforme apresentado na Tabela 9 as medições do gasto energético foram com todas as etapas do processo: aquecimento, reação e rota-evaporação. Pode-se concluir que a energia gasta durante 24 horas de reação foi de 416 W. Assim, como o Protótipo 4 permaneceu ligado durante 388 horas, o gasto energético foi de 161,05 kW.

Tabela 9 - Gasto energético do Sistema Enzimático Contínuo em Bancada
Protótipo 4.

Etapas do Processo	Equipamento	Tempo (min)	Consumo (W)
Pré-aquecimento do sistema	Chapa de aquecimento (banho de óleo) + Banho termostaticado	35	348
Reação	Banho de óleo +banho termostaticado + bomba peristáltica	1440	68
Rota-evaporação (70°C)	Rotaevaporador + Banho termostaticado	30	396

O gráfico da Figura 46, apresenta o gasto energético das etapas de pré-aquecimento e reação do sistema enzimático contínuo do protótipo 4. Pode-se observar que o sistema teve maior gasto de energia durante os primeiros 35 minutos, fase de pré-aquecimento. Após, o consumo energético manteve-se constante, no entanto houve um aumento no momento em que a chapa de aquecimento religava. Estes resultados no futuro poderão ser comparados em escala piloto com os resultados também em escala piloto empregando catálise química.

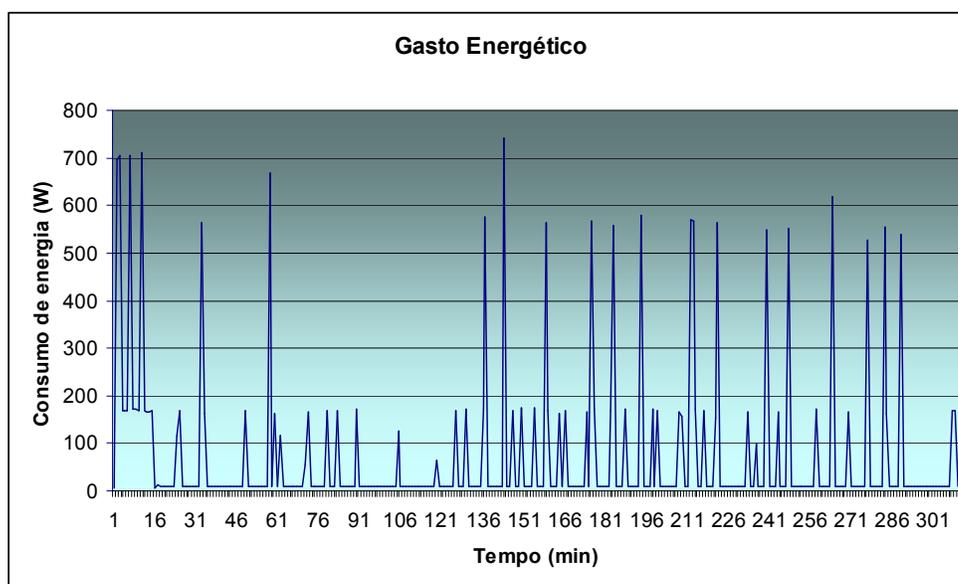


Figura 46 - Gráfico do gasto energético do Sistema Enzimático Contínuo em Bancada Protótipo 4.

4.6 Avaliação do processo utilizando Planilha de Leopold

O processo contínuo de produção de biodiesel utilizando dois reatores (Protótipo 4), óleo de girassol, etanol e como biocatalisador a lipase Novozym 435, foi avaliado quanto aos impactos ambientais identificados a partir da Matriz de Interação de Leopold, como mostra a Tabela 10.

Nesta planilha podem ser observadas no eixo horizontal as características ambientais relativas ao meio físico, biótico e antrópico enquanto que no eixo vertical podem ser percebidas as etapas do processo e as respectivas atividades impactantes. Na Matriz de Interação foram identificadas 15 ações de impacto, sendo que as mesmas foram multiplicadas por 13 fatores ambientais resultando em 195 possíveis relações de impacto, sendo destes, identificados 57.

Com outros sistemas, empregando catálise química e metanol, tem-se um caminho que emprega reagentes de fonte não renovável. Estes reagentes são de fonte renovável e portanto, grande parte dos impactos relacionados a eles na produção de biodiesel, identificados por Kaercher ⁹¹ foram reduzidos no protótipo 4.

Comparativamente ao encontrado por Kaercher ⁹¹, observa-se que o emprego de processo enzimático, conforme o protótipo 4 desenvolvido neste trabalho, reduz em 42 % as relações de impacto totais, e em 83% a redução de impactos identificados. Destas relações que permanecem apenas 19% são direta e 81% indireta, 16% dos impactos são positivos e 84% negativos, apenas 12% são locais e 88% regionais, 9% dos impactos são a médio prazo, 35% são a curto prazo e 56% são a longo prazo, 35% são impactos cíclicos e 65% são temporários, não tendo nenhum impacto permanente, como mostra a Figura 47.

Para redução dos impactos do protótipo otimizado para produção de biodiesel ainda são necessários alguns ajustes quanto a consumo de energia como foi visto anteriormente. Os impactos remanescentes são difíceis de serem completamente suprimidos do processo, uma vez que muitos deles já são hipotéticos. Isto significa que os impactos são previstos como aqueles que são inevitáveis e aqueles que podem acontecer, dependendo do manuseio do material.

Sabendo que estes impactos podem ou não acontecer, cabe aos operadores terem cuidado e desta forma a interação deste processo produtivo com o ambiente torna-se muito pequeno. Ainda fica o impacto do consumo de energia, o qual não é possível evitar, no entanto existem alternativas para reduzi-lo visando a sustentabilidade energética da mesma. Um exemplo é a implementação de uma estação de energia obtida através da aquisição de um gerador, utilizando como combustível o biodiesel ao invés do diesel de petróleo ou outras formas de energia não renováveis.

Tabela 10 - Planilha de interação de Leopold obtida a partir da produção de biodiesel por sistema contínuo (Protótipo 4) utilizando como matéria-prima o óleo de girassol e etanol e como catalisador a lipase Novozym 435.

CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS RELEVANTES														
Etapas	Atividades Impactantes	Meio Físico				Meio Biótico	Meio Antrópico							
		Ar		Recurso Hidrico	Recurso Edáfico	Flora/ Fauna	Económico Local	Infra-Estrutura	Tecnologia	Qualidade de Vida	Saúde	Desenvolvimento Regional	Paisagismo	Qualid. Prod. Final
		Partículas Solidas	Gases e Vapores	Contaminação	contaminação do solo	Diminuição da Diversidade								
Recepção das Materias-Primas	Recepção/Usó Etanol	-	NDLCTV	NILOTV	NILOTV	NILOTV	PIRMTV	-	PILMTV	-	-	PIRMTV	-	-
	Recepção Óleo	-	-	NILOTV	NILOTV	NILOTV	PIRMTV	-	PILMTV	-	-	PIRMTV	-	-
Preparação do Processo da Matéria-Prima	Quantificação do Etanol	-	NDLOTV	NILOTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	-	-	-	-	PDLCTV
	Carregamento do Óleo	-	-	NILOTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação de transesterificação	Fuga de Vap.de Etanol	-	NDLCTV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vazam. Mat.da Reação	-	-	NILOTV	NILOTV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retirada / Armazena-gem Glicerol	Derrame de Glicerol	-	-	NILOTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	NILOTV	NILOTV	-	NILOTV	-
	Liber.de Vap.de Etanol	-	NDLCTV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recuperação do Alcool	Derrame de Etanol	-	NDLCTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Liber.de Vap.de Etanol	-	NDLCTV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Armazenagem dos Ésteres	Derrame de Ésteres	-	-	NILOTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	NILOTV	NILOTV	-	-	-
Destinação	Derrame de Ésteres	-	-	NILOTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	NILOTV	NILOTV	-	NILOTV	-
	Derrame de Glicerol	-	-	NILOTV	NILOTV	NILOTV	-	-	-	NILOTV	NILOTV	-	NILOTV	-
	Transporte Glicerol	-	-	NDRCTV	NDRCTV	NIROTV	PDLCTV	-	-	-	-	PDLCTV	-	-
	Descarte da enzima	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LEGENDA: P - positivo; N - negativo; D - direto; I - indireto; L - local; R - regional; E - estratégico; C - curto prazo; M - médio prazo; O - longo prazo; T - temporário; Y - cíclico; A - permanente; V - reversível; S - irreversível.

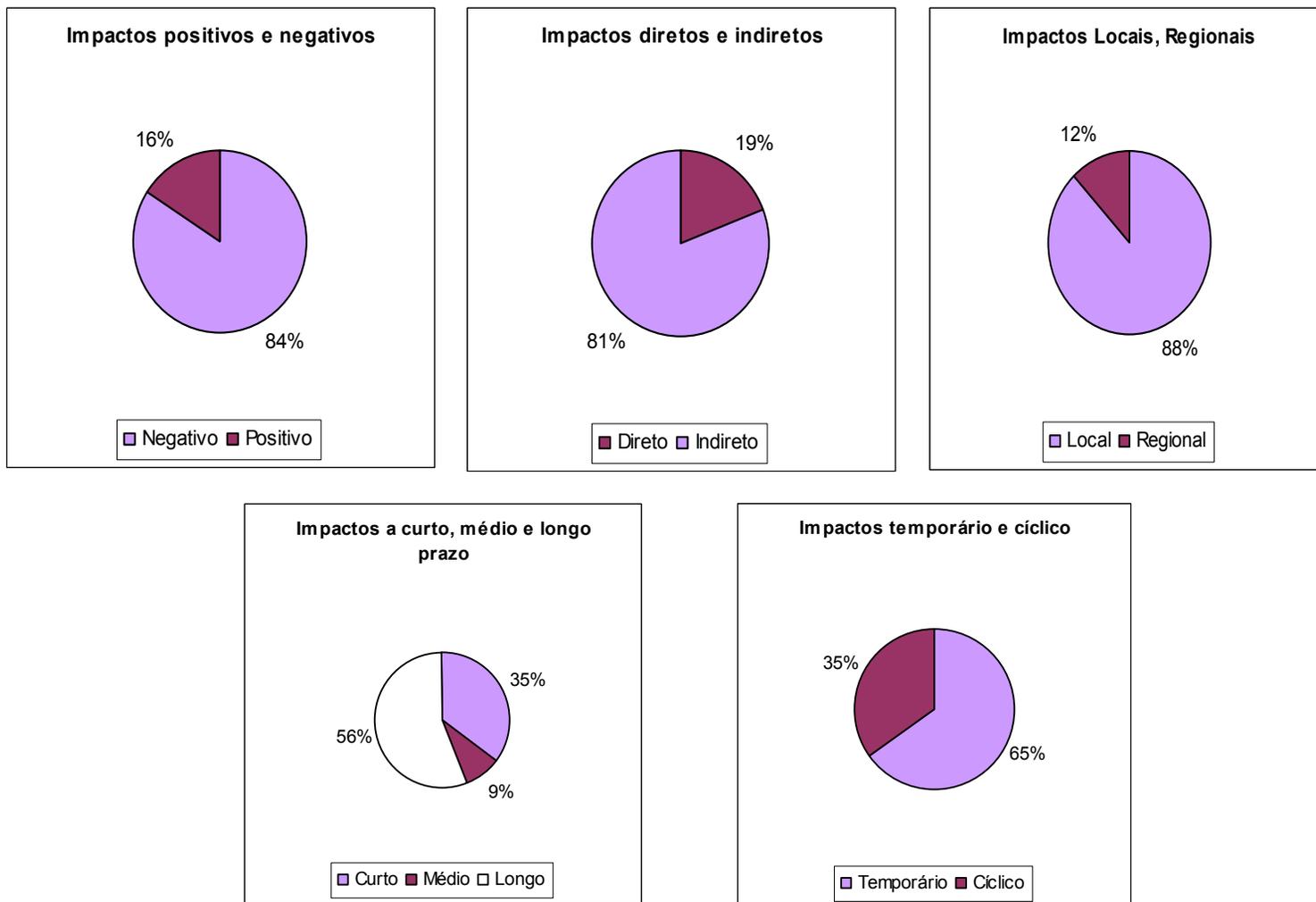


Figura 47 - Gráfico dos Impactos Ambientais do protótipo 4 de produção de biodiesel por transesterificação enzimática contínua.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Destaca-se que a transformação enzimática (transesterificação), diferente da transformação por catálise química, contribui para minimização da geração de resíduos e aumento o potencial de reaproveitamento em novas reações, além de contribuir para produção de substâncias de fontes renováveis que possam substituir derivados do petróleo. Na comparação da transesterificação enzimática com a química, observa-se que a reação com catálise básica, mais clássica, realizada anteriormente pelo grupo de pesquisa, apresenta um excelente grau de conversão, no entanto, a catálise enzimática é promissora por ser uma tecnologia limpa.

As enzimas testadas foram na sua maioria muito eficientes, ocorrendo variações nas atividades de cada uma, devido à mudança no substrato das reações e às características particulares de cada uma. Destaca-se o uso da Novozym 435, como lipase biocatalisadora nos sistemas contínuos, sendo uma alternativa de extrema importância, pois aumenta assim a possibilidade de reaproveitamento deste biocatalisador em pesquisas futuras.

A imobilização de enzimas em hidrogel poderá ser uma possível alternativa para a produção de biodiesel por processo enzimático, sendo que apresentou resultados satisfatórios, principalmente com 24 horas de reação e com adição de metanol na solução de imobilização. Com os hidrogéis desidratados também é possível o emprego na produção de biodiesel, pois se elimina a água adicionada no meio reacional e pode-se no futuro usar este método de imobilização associado ao protótipo otimizado para sistema contínuo, com dois reatores em coluna.

No protótipo 4, o sistema foi o mais eficiente e com ele, a lipase imobilizada manteve-se ativa por mais tempo. O processo contínuo de reação de transesterificação enzimática, foi realizado utilizando apenas etanol e óleo de girassol como substrato da reação, evitando a presença de um solvente orgânico como o hexano, a reação foi realizada adicionando 1g de *lipase Candida antarctica B* (Novozym ® 435) no reator de aço pré-aquecida a 55 °C na estufa por 1 hora para sua ativação. Foi utilizado inicialmente 20g de óleo de girassol e

80 mL de etanol, sendo que o reservatório foi realimentado sempre que necessário. As temperaturas do banho de óleo e da água mantiveram-se constante em 55 °C.

Avaliando os impactos ambientais do emprego de transesterificação enzimática com o protótipo 4 constatou-se que foi possível obter um processo de produção de biodiesel mais limpo que o obtido por métodos químicos convencionais.

6 Trabalhos Futuros

A pesquisa realizada esteve focada em otimizar um sistema contínuo para produção de biodiesel em bancada. Para dar continuidade sugere-se:

- Estudo do reaproveitamento da enzima.
- Sistema contínuo enzimático em escala piloto.
- Aplicação da lipase imobilizada em hidrogel no sistema contínuo otimizado.
- Uso das outras enzimas para produção de biodiesel.

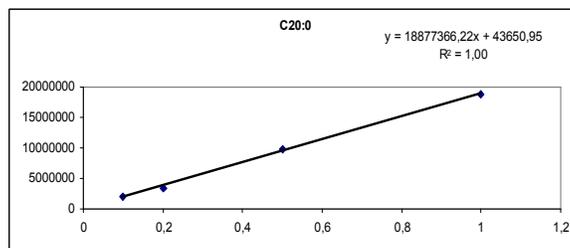
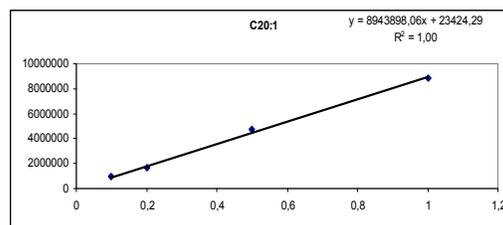
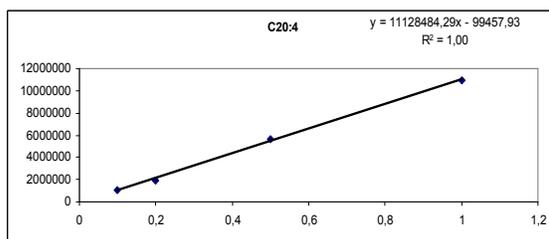
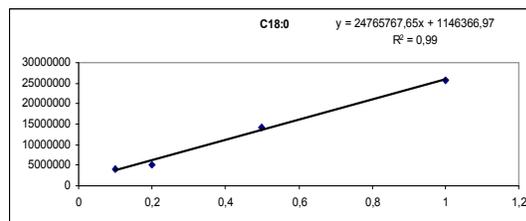
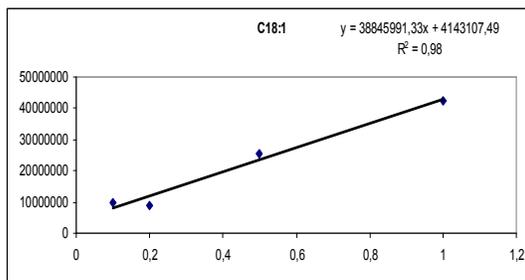
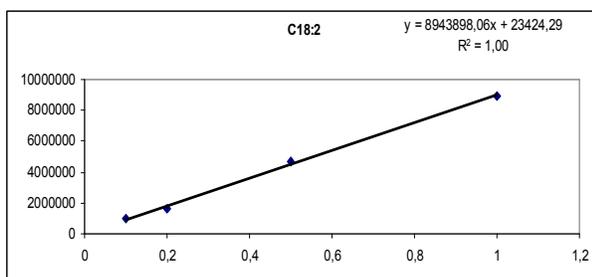
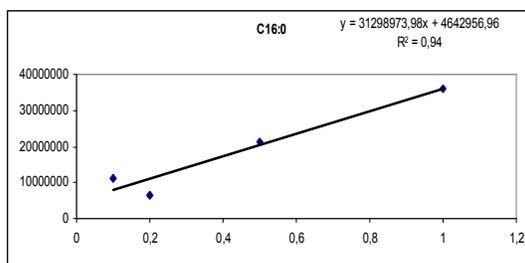
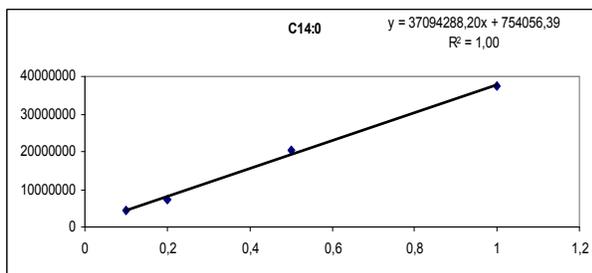
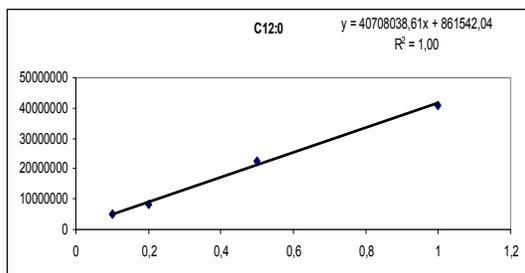
- ²¹ Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, Volume 27, nº 4, p.623-630, 2004.
- ²² Ramos, Luiz P.; Zagonel, Guliano F.; Rossi, Luciano F.S.; Neto, Pedro R.C. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*. Volume 23 nº 4, págs 531-537, 2000.
- ²³ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*. 3^o Edition; Springer-Verlog; New York; 1997.
- ²⁴ Schuchardt et al., 1998 - Schuchardt, U.; Serchelia, R.; Vargas, R. Transesterification of Vegetable Oils: a Review, *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 9, p. 199-210, 1998.
- ²⁵ Ramos, L. P.; Kucek, K. T.; Domingos, A K.; Wilhelm, H. M. Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, nº 31, p. 28-37, 2003.
- ²⁶ *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, nº 32- janeiro/junho 2004 – p. 40 American institute of biological sciences; Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento.
- ²⁷ Smith M.K.: Processo of producing esters. US Patent 2, 444-486, 1949
- ²⁸ Zagonel, G. F.; Ramos, L. P. (2001) Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleos vegetais. *Revista de Química Industrial*, 717, 17-26.
- ²⁹ Zhou, H.; McCammon, J. A. The gates of ion channels and enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, In Press, Corrected Proof, Available online 18 November 2009.
- ³⁰ Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica*, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, cap. 4.
- ³¹ Hickman, Alison Burgess; M. A. A. Namboodiri, Klein, David C.; Dyda Fred; The Structural Basis of Ordered Substrate Binding by Serotonin N-Acetyltransferase: Enzyme Complex at 1.8 Å Resolution with a Bisubstrate Analog. *Cell*, Volume 97, Issue 3, 1999, p. 361-369.
- ³² Fu X., Parkin K.L.; Selectivity of fatty acid incorporation into acylglycerols in esterification reactions using *Rhizomucor miehei* and *Burkholderia cepacia* lipases, *Food Research International*, Volume 37, Issue 7, 2004, p. 651-65.
- ³³ Aggarwal, Varinder K.; Astle, Christopher J.; Iding, Hans; Wirz, Beat; Rogers-Evans, Mark. Separation of pyrrolidine allylation products by diastereoselective enzymatic ester hydrolysis. *Tetrahedron Letters*, Volume 46, Issue 6, 2005, p. 945-94.
- ³⁴ CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, Volume 26, nº 1, p.75-80, 2003.
- ³⁵ Bitencourt T. B.; Moreira, M. A.; Nascimento, M.G. Optimization of chemo-enzymatic epoxidation of ciclohexene mediated by lipases. *Synthetic Communications*, nº 35, Volume 15, p.2107-2114, 2005.
- ³⁶ Staniszewski, Marek ; Koter, Stanisław. Theoretical analysis of steady states for ester hydrolysis in an enzymatic membrane reactor with product retention. *Desalination*, Volume 246, Issues 1-3, 2009, p. 545-55.
- ³⁷ Shnyrov, Valery L.; Martínez, Luis Diez; Roig, Manuel G.; Lyubarev, Arkady E.; Kurganov, Boris I.; Villar, Enrique. Irreversible thermal denaturation of lipase B from *Candida rugosa*. *Thermochimica Acta*, Volume 325, Issue 2, 1999, p.143-149

- ³⁸ Soares, C. M.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; Appl. Biochem. Biotechnol. 1999, 77, 745.
- ³⁹ Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- ⁴⁰ <http://www.cape.canterbury.ac.nz/> acesso em 10/11/2009.
- ⁴¹ Nascimento, M.G.; Soldi, V.; Dalla-Vecchia, R.; Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Química Nova, Volume 27, No. 4, 623-630, 2004.
- ⁴² Nascimento, M. G.; Jesus, P.; João, J.J.; Silva, P.; Burlin, G.; Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. Quím. Nova Volume 20 nº 6 São Paulo, 1997.
- ⁴³ Paula, A.; Moreira, A.; Braga, L.; Castro, H.; Bruno, L.; Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias; *Quím. Nova*, Volume 31, No. 1, São Paulo, 35-40, 2008.
- ⁴⁴ Bruno, L. M.; Coelho, J. S.; Melo, E. H. M.; Lima-Filho, J. L.; *World J. Microb. Biotechnol.* 2005, 21, 189.
- ⁴⁵ Peterson, C.L.; Hustrulid, T. Carbon Cycle for Repeased, 1998
- ⁴⁶ Knothe G. et al., Manual de biodiesel, São Paulo: Ed. Blücher, 2006.
- ⁴⁷ Vianna, Fernanda C.; Análise de Ecoeficiência: Avaliação do Desempenho Econômico-Ambiental do Biodiesel e Petrodiesel. Mestrado da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Mestre de Engenharia. São Paulo 2006.
- ⁴⁸ Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005a. 118p.
- ⁴⁹ Schneider, R. C. S. Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino. 2003. 214 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado) – Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- ⁵⁰ Loughilin, W. A.: Biotransformations in Organic Synthesis. Bioresource Technology. nº 74; p.49-62; 2000.
- ⁵¹ Leopold, L.B et al., A procedure for evaluating environmental impact. Washintong, D.C., Geological Survey Circular, 1971. 645p.
- ⁵² Mann, P.; In: Commercialization of biodiesel: Producing a Quality Fuel; Conference Proceedings; Boise, Idaho, USA; 09 a 10 de julho, 1997; p. 13
- ⁵³ Linko, Y., Liimsii, M., Wu, X., Uosukainen, W., Sappiilli, J., and Linko, P.: Biodegradable products by lipase biocatalysis. J. Biotechnol., 66, 41-50, 1998.
- ⁵⁴ De, B.K.; Bhattacharyya, D.K.; Bandhu, C.; Enzymatic Synthesis of Fatty Alcohol Esters by Alcoholysis; Journal of the American Oil Chemists' Society; Volume 76, Number 4, p. 451-453, 1999.
- ⁵⁵ Selmi, B. and Thomas, D.: Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 691-695, 1998.
- ⁵⁶ Breivik, H., Haraldsson, G. G., and Kristinsson, B.: Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 1425-1429, 1997.
- ⁵⁷ Wu, W. H., Foglia, T. A., Marmer, W. N., and Phillips, J. G.: Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. J. Am. Oil Chem. Soc., 76, 517-521, 1999.
- ⁵⁸ Nelson, L. A., Foglia, A., and Marmer, W. N.: Lipase-catalyzed production of biodiesel. J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 1191-1195, 1996.
- ⁵⁹ Mittelbach, M.: Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 67, 1688-170, 1990.

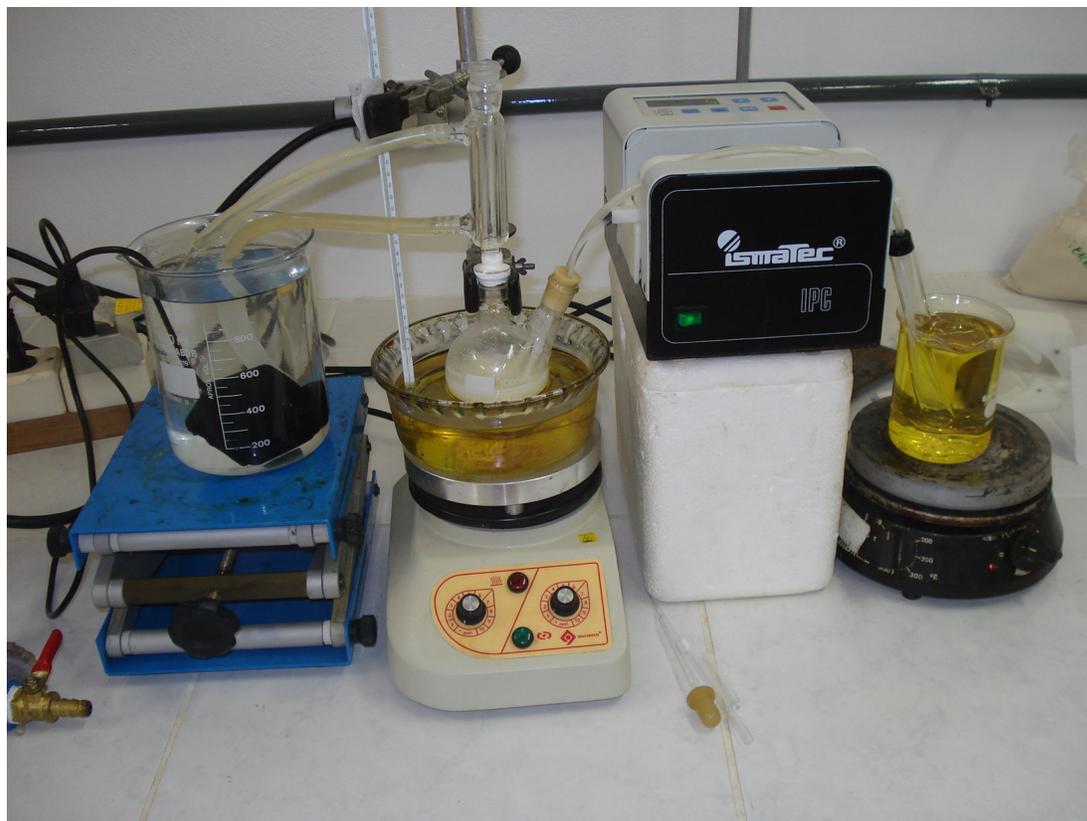
- ⁶⁰ Abigor, R, Uadia, P., Foglia, T., Haas, M., Jones, K., Okpefa, E., Obibuzor, J., and Bafor, M.: Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Sot. Trans.*, 28,979-981, 2000.
- ⁶¹ Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H.; Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils; 2001.
- ⁶² Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugibara, A., Noda, IL, Fukuda, I-I., and Tominaga, Y.: Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Cundidu untarcticu* lipase. *J. Am. Oil Chem. Sot.*, 76, 789-793, 1999.
- ⁶³ Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., and Tominaga, Y.: Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Sot.*, 77, 355-360, 2000.
- ⁶⁴ Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H.: Pretreatment of immobilized *Cundidu antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 180-183, 2000.
- ⁶⁵ Silva, Elias. Apostila do Curso de Engenharia Florestal 685, Análise e Avaliação de Impactos Ambientais. Viçosa, 1996. 68p.
- ⁶⁶ Nouredini, H.; Gao, X.; Philkana, R. S. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, v. 96, p.769-777, 2005.
- ⁶⁷ Schneider, R. C.; Lara, L. R. S.; Ceolin, M. M.; Schmatz, W. L.; Coberllini, V. A.; Produção de biodiesel em sistema enzimático e contínuo. XXXI Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Aidis. Argentina, 2008.
- ⁶⁸ Cahoon, Edgar B.; Schmid, Katherine M.; Metabolic Engineering of the Content and Fatty Acid Composition of Vegetable Oils, *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 1, 2008, p. 161-200.
- ⁶⁹ Dossat V., Combes D., Marty A.; Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 25, Issues 3-5, August 1999, p.194-200.
- ⁷⁰ 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*, Volume 43, Issues 1-4, 2006, p. 142-147.
- ⁷¹ Leevijit T., Tongurai C., Prateepchaikul G., Wisutmethangoon W.; Performance test of a 6-stage continuous reactor for palm methyl ester production. *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 1, January 2008, p. 214-221.
- ⁷² Joelianingsih, M. H., Hagiwara S., Nabetani H., Sagara Y., Soerawidjaya T., Tambunan A., Abdullah K.; Biodiesel fuels from palm oil via the non-catalytic transesterification in a bubble column reactor at atmospheric pressure: A kinetic study; *Renewable Energy*, Volume 33, Issue 7, July 2008, p. 1629-1636.
- ⁷³ Kojima S., Park E., Sato M., Kojima S.; Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant. *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 8, May 2008, p. 3130-3135.
- ⁷⁴ Shamel M., Ramachandran K.B., Hasan M., Al-Zuhair S.. Hydrolysis of palm and olive oils by immobilized lipase using hollow fibre reactor. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 34, Issue 3, June 2007, p. 228-235.
- ⁷⁵ Cao P., Dubé M., Tremblay A., Methanol recycling in the production of biodiesel in a membrane reactor; *Fuel*, Volume 87, Issue 6, May 2008, p. 825-833.
- ⁷⁶ SILVA, C. H. C.; et al. Purification and characterization of alow molecular weight xylanase from solid-statecultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia*, v. 25, p. 152-156, 2000.

- ⁷⁷ Ferrão, M. F.; Carvalho, C.W.; Müller, E.I.; Davanzo, C.U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. *Ciênc. Tecnol. Alimen.*, 2004, v.24, p.333-340.
- ⁷⁸ Sampling and analysis of commercial fats and oils, AOCS Official Method, cd 1d – 92, reapproved 1997, Iodine Value of fats and oil cyclohexane – Acetic Acid Method.
- ⁷⁹ Costa Neto, Pedro R.; Rossi, Luciano F. S.; Zagonel, Giuliano F.; Ramos, Luiz P. – *Revista Química Nova*, 23(4)2000.
- ⁸⁰ Feuge FO, Grose T (1949). Modification of vegetable oils. VII. Alkali catalyzed interesterification of Peanut oil with ethanol. *JAOCS* 26: 97- 102
- ⁸¹ Oliveira, D.;Oliveira,J.V.;*J.of Supercritical Fluids*,2001,19,41.
- ⁸² Leopold, L. B et al. A procedure for evaluating environmental impact Washington, D.C., Geological Survey Circular 1971. 645p.
- ⁸³ Silva, Elias; Apostila do Curso de Engenharia Florestal 685 – Análise e Avaliação de Impactos Ambientais; Viçosa:Ed. UFV, 2008,189p.
- ⁸⁴ Gunstone, Frank D., Hamilton, Richard J. , *Oleochemical Manufacture and Applications*, 2001, Editora Sheffield Academic Press
- ⁸⁵ BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Associação Nacional dos Fabricantes de Rações. *Compêndio brasileiro de alimentação animal*. São Paulo: ANFAR/CBNA/SDR, 2005.
- ⁸⁶ Bellaver, C. e Zanotto, D.L. 2004. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal. In: Conferencia Apinco de Ciencia e Tecnologia Avícolas, 2004, Santos, SP. Anais. Campinas: FACTA, 2004. V.1, p.79-102.
- ⁸⁷ Augusta, Ivanilda M., Santana, Djalva M., Avaliação da qualidade das manteigas tipo extra comercializadas no estado do Rio de Janeiro; *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol. 18 n. 4 Campinas Oct./Dec. 1998.
- ⁸⁸ Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V.; Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis; *Journal of Biotechnology*, Volume 119, Issue 3, 29 September 2005, p. 291-299.
- ⁸⁹ Nouredini, H.; Harkey, D.; Medikonduru, V. A. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Volume 75, p. 1775-1783, 1998.
- ⁹⁰ Ognjanovic, N., Dejan Bezbradica, Zorica Knezevic-Jugovic; Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability; *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 21, November 2009, p. 5146-5154
- ⁹¹ Kaercher, Jonas Álvaro; Produção de biodiesel em escala piloto e avaliação dos impactos ambientais; *Mestrado em Tecnologia Ambiental*; 2009, UNISC –RS.

ANEXO A – Curvas analíticas de cada éster identificado nas amostras



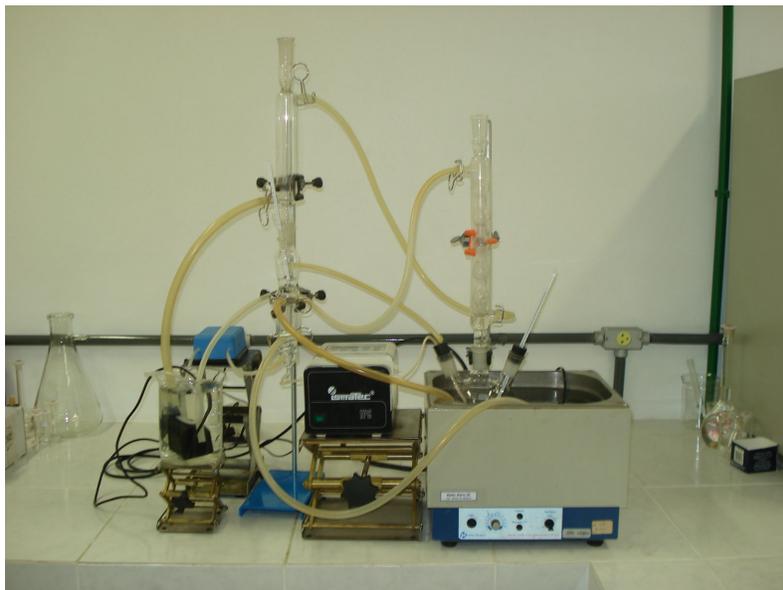
ANEXO B – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 1).



ANEXO C – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 2).



ANEXO D – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema semi-contínuo cíclico (Protótipo 3).



ANEXO E – Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 1 Reator (Protótipo 4).



Registro fotográfico da produção de biodiesel de óleo de girassol produzido em sistema contínuo 2 Reator (Protótipo 4).



ANEXO F - Registro Fotográfico do Reator do Protótipo 4.



ANEXO G - Procedimento do teste índice de iodo – Método Oficial Erro! Indicador não definido.

Primeiramente fez-se o preparo da solução de tiosulfato, foi realizada com a dissolução de 24,9 g de tiosulfato de sódio pentahidratado (Nuclear®) e 0,2 g de carbonato de sódio anidro (Nuclear®) em 1L de água previamente fervido. Deixou-se decantar por 24h e então a solução foi padronizada. A padronização da solução de tiosulfato, foi realizada com a adição de aproximadamente 200 mg de dicromato de potássio (Synth®) em um recipiente de 500 mL em 25 mL de água deionizada, 5 mL de ácido clorídrico (Vetec®) concentrado e 20 mL de solução de iodeto de potássio (Nuclear®) 10%. Agitou-se a solução por alguns instantes e deixou-se em repouso por 5 min e então se adicionou 100mL de água.

Fez-se então a titulação com a solução de tiosulfato de sódio (Vetec®) até que a cor amarela desapareceu. Após adicionou-se 2 mL de solução de indicador de amido 1% e deu-se continuidade a titulação até que a cor azul desapareceu. O volume gasto de titulante foi utilizado no cálculo da concentração molar.

Para o preparo da solução de iodeto de potássio a 10 %, pesou-se 100 g de iodeto de potássio e transferiu-se para um balão de 1000 mL e completando até o menisco com água deionizada.

Para o preparo da solução aquosa de amido 1 %, pesou-se 1 g de amido solúvel e em seguida adicionou-se um volume de água deionizada suficiente para formar uma pasta, logo após adicionou-se em um balão de 100 mL e completou-se com água deionizada previamente fervida.

Para a realização do teste de iodo, inicialmente pesou-se cerca de 0,20 g de amostra, adicionou-se 15 mL de solução de ácido acético/ciclohexano 1:1 (v/v). Pipetou-se 25 mL de solução de wijs (Synth®) para dentro do frasco contendo a amostra, sendo este fechado imediatamente. O erlenmeyer ficou ao abrigo da luz por 1 h, após adicionou-se 20 mL de solução de iodeto de potássio a 10 % e 150 mL de água deionizada. Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio previamente padronizada, adicionando-a lentamente até obter uma cor

laranja. Então se adicionou 2mL de solução aquosa de amido 1 % e continuou-se a titulação até o desaparecimento da coloração azul.

Para aplicação da equação (Equação 2) foram anotados os valores gastos na titulação da amostra e do branco. O índice de iodo é expresso em gramas de iodo absorvido por 100 g de amostra.

$$\text{Índice de iodo} = (B-A) \times N \times 12,69/M$$

Equação 2

Onde:

B= volume gasto na titulação do branco

A= volume gasto na titulação da amostra

N= normalidade da solução de tiosulfato.

M= massa da amostra em gramas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)