



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

**CLARISSA DALLA ROSA**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM MODO  
CONTÍNUO EM MEIO PRESSURIZADO**

**Florianópolis - SC  
Julho de 2009**



**CLARISSA DALLA ROSA**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM MODO  
CONTÍNUO EM MEIO PRESSURIZADO**

Tese de Doutorado a ser submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

**Orientador:**

Prof. D. Ing. Jorge Luiz Ninow

**Co-Orientador:**

Prof. D. Sc José Vladimir de Oliveira

**Florianópolis – SC  
Julho de 2009**



**CLARISSA DALLA ROSA**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM MODO  
CONTÍNUO EM MEIO PRESSURIZADO**

Tese submetida ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, \_\_\_\_ de Julho de 2009.

---

Prof. D. Ing. Jorge Luiz NInow  
Orientador

---

Prof. D. Sc. José Vladimir de Oliveira  
Co - Orientador

**Banca Examinadora:**

---

Prof. D. Sc. Julian Martínez

---

Prof. D. Sc. Débora de Oliveira

---

Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub

---

Prof. D. Sc. Ariovaldo Bolzan



*A todas as pessoas que fizeram parte desta  
jornada, em especial ao meu marido Érico,  
grande companheiro e incentivador,  
que sempre me proporcionou muito amor e  
bondade,  
que me conduziram a construção de mais  
esse sonho.  
Minha profunda admiração e amor por ti!*

*Aos meus pais e irmãos, que são grandes  
modelos de vida. Nossa história de  
superação e amor sempre serão alicerce do  
meu ser.*

*A minha “filhotinha”, ainda aqui dentro e  
já uma grande parceira.*





## AGRADECIMENTOS

Esta tese é parte de minha vida em que muitos deram seus esforços, compreensão e amizade. É também um marco de muitas transformações, amadurecimento, recompensas, bênçãos e alegrias.

Agradeço a Deus, a meus guias espirituais e ao universo, pois sempre conspiram a meu favor, fazendo com que tudo aconteça a seu tempo.

Ao meu marido Érico, pela incansável alegria e amor dedicados. A tua compreensão pela minha ausência em casa, a tua parceria e alegria, teu apoio financeiro, teu consolo durante o meu choro (que não foram poucos) e principalmente teu amor, tornaram essa conquista possível. Que nossa pequena seja abençoada com o teu caráter, tua alegria e tua fé!

A minha mãe Ana Maria, que mesmo não estando entre nós, se faz presente na minha vida. Obrigado por me deixar esse amor por lecionar e estudar. Sou grata por me conduzir a este caminho e fazer com que eu acreditasse que era possível.

Ao meu pai César e minha “boadrasta” Regina, que com muito amor, carinho e dedicação, sempre me incentivaram a trilhar este caminho. Obrigado pelo aconchego das palavras, pelo lar sempre acolhedor e por se manterem sempre presentes.

Meu agradecimento especial ao meu irmão Cézinha e sua “família de Floripa”: Tio Geraldo, Dona Lurdes, Natacha e meninas, Ricardinho, Mégui (in memorian) e Fofinha, por terem me proporcionado um lar e uma família no período que residi em Florianópolis. Os finais de semana em família, a doutrina espiritual, as caminhadas e conversas com meu mano no Campeche foram fonte de força e alegria.

As minhas irmãs e amigas Adriana e Daniela pela participação carinhosa e apoio incondicional. A Carolina pela alegria que trouxe a minha vida com a sua chegada!

A grande figura e pessoa que é meu orientador, Jorge Ninow. Tuas caixinhas de lenço, tua compreensão e atenção ao nosso trabalho me proporcionaram esta conquista. Sempre serei grata pelas conversas amigas e pelo grande apoio!

Ao meu sempre consultor e professor José Vladimir de Oliveira, pelos longos e exaustivos momentos de discussão que só me fortaleceram, por você contribuir tanto ao meu crescimento profissional e pessoal. A tua segurança e parceria foram determinantes nas

conquistas deste trabalho. Serei sempre muito grata pela tua dedicação ao nosso trabalho e principalmente pela amizade que construímos ao longo de tantos anos.

À minha amiga Débora de Oliveira, que dedicou muito do seu tempo e conhecimento a esta tese, participando intensamente de todos os momentos, contribuindo com sua experiência. Os teus conselhos e palavras amigas sempre me guiaram aos bons caminhos.

Aos professores da URI, Altemir Mossi, Helen Treichel, Márcio Mazutti, Geciane Toniazzo, Rogério Cansian, Marco Di Luccio, Eunice Valduga, Marcos Corazza, Fernanda Corazza, Rogério Dallago, Sibebe Pergher, Luciana Venquiaruto e Giovana Ceni pela amizade e pela confiança que sempre depositaram no meu trabalho.

Aos professores da UFSC, Jorge, Sandra Ferreira, Willibaldo, Regina, Edna Amante e demais membros do corpo docente, pelo profundo aprendizado.

A minha bolsista e amiga Lisa. Os méritos deste trabalho devem ser atribuídos muito ao teu esforço e dedicação. Tua responsabilidade e carinho por este trabalho é que nos conduziram por este caminho.

Às minhas amigas e amigos Elisandra Rigo, Iloir Gaio, Gean Delise, Élton, Roberta, Morgana e Lindomar. Obrigado pelos anos de parceria, amizade, conversas, conselhos. A alegria da boa parceria sempre me fortaleceu muito.

Aos colegas do Laboratório de Termodinâmica: Élton, Roberta, Lisa, Graciele, Thiago, Karina, Jarbas, Ale, Claiton, Cláudia, Mara, Ilisandra, Marcus Três e tantos outros que trouxeram auxílio e alegria aos dias de experimento.

Ao programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI, especialmente ao Coordenador do Programa, Marco Di Luccio, por sua dedicação e presteza..

A Secretaria de Pós graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC.

Agradeço a todos que passaram pelas rodas de chimarrão e cafezinho, que foram colegas e amigos em minha permanência no doutorado e que fizeram todos os momentos valerem a pena.

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

A URI e Intecnia pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Campus de Erechim e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química e de Alimentos da UFSC, que possibilitaram minha formação.

*O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.  
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.  
O que for a tua vontade, assim serão teus atos.  
O que forem teus atos, assim será teu destino.*

*Brihadaranyaka Upanishad*



## RESUMO

Este trabalho investiga a produção em modo contínuo de ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de soja em fluidos pressurizados, dióxido de carbono, propano e n-butano, utilizando como catalisador a lipase imobilizada comercial Novozym 435. Para tanto um aparato experimental foi construído para condução das reações. Os experimentos foram executados em um reator onde foram avaliados os efeitos da temperatura (30°C - 70°C), pressão (50 – 150 bar), razão molar óleo:etanol (1:6 - 1:18) e razão mássica solvente:substrato (4:1 - 10:1) que permitiram a determinação das melhores condições experimentais para a produção de biodiesel em modo contínuo. Em contraste com o uso do dióxido de carbono e do n-butano, os resultados mostraram que a alcoólise catalisada por lipase em um reator tubular de leito contínuo em propano pressurizado pode ser uma rota potencial à produção do biodiesel, uma vez que conversões elevadas da reação (em torno de 70%) foram obtidas em condições amenas de temperatura (70°C) e de pressão (60 bar) com o emprego da razão de solvente/substrato (7:1) e razão óleo:etanol (1:12) em períodos de tempo relativamente curtos (aproximadamente 2 horas). Testes com reatores em série utilizando estas condições indicaram que na terceira passagem conversões próximas de 100% em ésteres etílicos foram obtidas demonstrando que esta metodologia apresenta potencial do ponto de vista industrial. Os bons níveis de conversões obtidos neste processo também foram obtidos com outros óleos vegetais, como: óleo bruto de pinhão manso, óleo degomado de soja e óleo de milho.



## ABSTRACT

This work investigates the continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids, namely carbon dioxide, propane and n-butane, using immobilized Novozym 435 as catalyst. The experiments were performed in a packed-bed bioreactor evaluating the effects of temperature in the range of 30°C - 70°C, from 50 to 150 bar, oil to ethanol molar ratio of 1:6 - 1:18 and solvent to substrates mass ratio of 4:1 - 10:1. In contrast to the use of carbon dioxide and n-butane, results showed that lipase-catalyzed alcoholysis in a continuous tubular reactor in compressed propane might be a potential route to biodiesel production as high reaction conversions were achieved at mild temperature (70°C) and pressure (60 bar) conditions in short reaction times (2 h). In an attempt to simulate a system of packed-bed reactor, a three-step alcoholysis reactions were performed at 70°C, 60 bar, oil to ethanol molar ratio of 1:12, and solvent to substrates mass ratio of 7:1, collecting the reaction products up to 4 residence times. Results showed that almost complete conversions to ethyl esters were obtained thus demonstrating that the use of a packed-bed reactor using compressed propane as solvent might be a potential alternative to conventional process, opening possibilities to manipulate process variables as well as reactor configurations towards reaching acceptable yields, like the three-step reaction system adopted in this work. Reaction experiments performed with low-value oils showed that satisfactory yields can be obtained with the same procedure using degummed soybean oil, corn oil and also *Jatropha curcas* oil.





## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 2. 1** - Principais regiões produtoras de soja e porcentagem produzida por região (Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011). ..... 39
- Figura 2. 2** - Balanço oferta x demanda de óleo de soja no Brasil (Abiove – Associação Brasileira de Óleos Vegetais, 2004). Valores de oferta e 1000 toneladas..... 40
- Figura 2. 3** - Representação esquemática da hidrólise de óleos vegetais (Villeneuve *et. al.*, 2000)...... 41
- Figura 2. 4** - Reações catalisadas por lipases..... 44
- Figura 2. 5** - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica. .... 45
- Figura 2. 6** - Diagrama de “fita” da lipase *Candida rugosa* (CRL), com condição aberta e fechada da sobreposição do “lid” (Cygler e Schrag, 1999)..... 48
- Figura 2. 7** - Esquema geral da reação de transesterificação. .... 51
- Figura 2. 8** - Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais..... 52
- Figura 2. 9** - Diagrama P-T para o sistema dióxido de carbono-óleo de soja para diferentes frações mássicas (w) de dióxido de carbono (Ndiaye *et al.*, 2006a). .... 60
- Figura 2. 10** - Diagrama P-T para o sistema propano-óleo de soja (Ndiaye *et al.*, 2006b)..... 61
- Figura 2. 11** - Mudança na atividade enzimática da lipase Novozym 435 em propano, n-butano e em dióxido de carbono pressurizados (Feihrmann *et al.*, 2006). .... 61
- Figura 2. 12** - Efeito da pressão e temperatura sobre a cinética da produção enzimática de ésteres etílicos de óleo de soja em propano pressurizado utilizando a lipase Novozym 435. Fração mássica de solvente:substrato de 2:1, razão molar óleo:etanol de 1:6 e 5%(m/m) de enzima (Dalla Rosa *et al.*, 2008)..... 62

- Figura 2. 13** - Avaliação do efeito de diferentes razões mássicas de solvente:substrato na produção enzimática de ésteres etílicos de soja em propano pressurizado. Temperatura de 65°C, 50 bar, concentração de enzima de 5% (m/m) (Dalla Rosa *et al.*, 2008)..... 63
- Figura 2. 14** - Conversão em biodiesel de soja utilizando duas lipases comerciais variando-se a quantidade de solvente orgânico. .... 64

### CAPÍTULO 3

- Figura 3. 1** - Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática..... 67
- Figura 3. 2** - Diagrama esquemático do aparato experimental modo batelada: cilindro de propano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1, BR2 e BR3) banhos termostáticos, (V1) válvula de segurança para a bomba, (V2) válvula de alimentação do reator, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (CR) comando do controle de agitação, (V3) válvula de alívio, (V4) válvula de amostragem..... 69
- Figura 3. 3** - Vistas da unidade experimental para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado em modo batelada..... 69
- Figura 3. 4** - Diagrama esquemático do aparato experimental: cilindro de propano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BL) bomba de líquidos, (BR1 e BR2) banhos termostáticos, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (TP) transdutor de pressão, (MM) micromisturador, (V1) válvula de alimentação, (V2) válvula de amostragem. .... 73
- Figura 3. 5** - Vista geral do aparato experimental de produção enzimática de biodiesel em propano pressurizado em modo contínuo. .... 74

## CAPÍTULO 4

- Figura 4. 1** - Comportamento da conversão e atividade enzimática da lipase Novozym 435 em ciclos de reuso de 30 dias em modo batelada. Condições experimentais: pressão de 50 bar, temperatura de 65°C, concentração de enzima de 20% (m/m), razão molar óleo:etanol de 1:6 e razão mássica solvente:substrato de 2:1. .... 82
- Figura 4. 2** – Efeito da vazão volumétrica de substratos na conversão em ésteres utilizando propano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 6:1, pressão de 50 bar e temperatura de 70°C. .... 86
- Figura 4. 3** – Efeito da vazão volumétrica de substratos na conversão em ésteres utilizando n-butano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 6:1, pressão de 20 bar e temperatura de 70°C. .... 87
- Figura 4. 4a**– Avaliação do solvente na conversão em ésteres utilizando propano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 50 bar e temperatura de 70°C..... 88
- Figura 4. 5a** – Avaliação do solvente na conversão em ésteres utilizando n-butano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 10:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 20 bar e temperatura de 70°C. .... 90
- Figura 4. 6** – Avaliação do solvente na conversão em ésteres utilizando dióxido de carbono como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 150 bar e temperatura de 70°C. .... 91
- Figura 4. 7** – Avaliação da ausência de solvente na conversão em ésteres. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 10:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 50 bar e temperatura de 70°C..... 92
- Figura 4. 8a** - Resultados da produção de ésteres etílicos do primeiro planejamento de experimentos em leito empacotado

utilizando propano como solvente correspondente aos experimentos utilizando a temperatura de 30°C. “SS” corresponde à razão mássica solvente/substrato e “OE” corresponde à razão molar óleo/etanol. .... 94

**Figura 4. 9** - Gráfico de Pareto avaliando os efeitos das variáveis: temperatura, pressão, razão molar óleo:etanol e razão mássica solvente:substrato na produção de ésteres etílicos em propano pressurizado ( $p < 0,05$ ). Os valores e as condições experimentais podem ser vistos nas Figuras 4.8a, 4.8b e 4.8c e Tabela 3.2. .... 96

**Figura 4. 10** - Resultados do segundo planejamento de experimentos para a produção de ésteres etílicos em reator contínuo em propano pressurizado variando a temperatura e pressão, mantendo fixos a razão molar óleo:etanol 1:12 e razão mássica solvente:substrato de 7:1..... 98

**Figura 4. 11** - Resultado da conversão em ésteres etílicos em tempos de residência maiores à temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica de solvente:substrato de 7:1. .... 99

**Figura 4. 12** - Resultado da conversão em ésteres etílicos em tempos de residência maiores à temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1 com vazão de 5,5 mL.min<sup>-1</sup> .... 100

**Figura 4. 13** - Conversão em ésteres etílicos em tempos de residência maiores à temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1 com vazão de 30 mL.min<sup>-1</sup> .... 101

**Figura 4. 14** - Resultado da conversão em ésteres etílicos do sistema de reatores em série à temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1. .... 102

**Figura 4. 15** - Conversão em ésteres etílicos nas condições do ponto central do segundo planejamento de experimentos, à temperatura de 70 °C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica de solvente:substrato 7:1 utilizando óleo de milho, pinhão manso e soja degomado como substrato. .... 103

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**Tabela 2.1** - Capacidade nominal e produção de biodiesel B100 no Brasil, segundo unidades em 2005..... 36

**Tabela 2.2** - Classificação de obtenção de matérias primas para produção de biodiesel. .... 38

**Tabela 2.3** - Composição química típica do óleo de soja (Lanza, 2004).  
..... 42

**Tabela 2.4** - Propriedades físicas e de transporte associadas a diferentes estados do fluido. .... 57

### CAPÍTULO 3

**Tabela 3.1** - Valores reais e codificados das variáveis do primeiro planejamento de experimentos utilizando propano como solvente..... 77

**Tabela 3.2** - Valores reais e codificados das variáveis do segundo planejamento de experimentos utilizando propano como solvente..... 78

### CAPÍTULO 4

**Tabela 4.1** – Condições experimentais dos trabalhos preliminares..... 87



## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

FSC – Fluidos supercríticos

MP - Biodiesel Puro

ANP – Agência Nacional de Petróleo

EN – Norma Européia

ASTM – Norma Americana

Mpa – Mega Pascal

Kda – Kilo Dalton

HC – Hidrocarbonetos totais

NO<sub>x</sub> – óxido nitroso

SO<sub>x</sub> – óxido de enxofre

$\epsilon$  - constante dielétrica

$\chi$  - solubilidade Hildebrand





# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 Objetivo Geral.....	29
1.2 Objetivos Específicos .....	29

## CAPÍTULO 2

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>31</b>
2.1 Biodiesel, uma alternativa ao diesel de petróleo.....	31
2.2 Breve histórico sobre o biodiesel.....	34
2.3 Métodos analíticos para a aferição da qualidade de biodiesel .....	36
2.4 Óleos potenciais na produção de biodiesel .....	37
2.5 Composição e estrutura de óleos vegetais.....	41
2.6 Biotransformação enzimática.....	42
2.6.1 Especificidades das lipases .....	45
2.6.2 Propriedades e conformação das lipases.....	46
2.6.3 Parâmetros que influenciam a atividade da enzima .....	48
2.7 Técnicas de produção de biodiesel.....	50
2.7.1 Pirólise .....	50
2.7.2 Micro emulsificação .....	51
2.7.3 Aspectos gerais sobre a transesterificação de óleos vegetais.....	51
2.8 Produção de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores.....	53
2.9 Produção de biodiesel em fluidos pressurizados.....	56
2.10 Considerações a respeito do estado da arte .....	64

## CAPÍTULO 3

<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
3.1 Materiais .....	66
3.2 Equipamentos e Metodologia .....	66
3.2.1 Determinação da atividade enzimática de lipases.....	66
3.2.2 Efeito do número de ciclos sobre a atividade da enzima Novozym 435 .....	68
3.2.3 Cálculos preliminares e montagem do aparato experimental de modo contínuo .....	71
3.2.4 Montagem do aparato experimental do reator contínuo de leito empacotado .....	72
3.2.5 Seleção da condição experimental para testes preliminares e checagem do reator .....	75

3.2.6 Planejamento de experimentos.....	76
3.3 Método para determinação da conversão de ésteres .....	79

## **CAPÍTULO 4**

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
4.1 Efeito do número de ciclos sobre a atividade da enzima Novozym 435 .....	81
4.2 Determinação da atividade enzimática de lipases .....	83
4.3 Cálculos preliminares a montagem do aparato experimental.....	84
4.3.1 Exemplo de cálculo da vazão volumétrica de fluido (propano) do processo .....	84
4.3.2 Cálculo do volume do reator .....	84
4.3.3 Cálculo da porosidade do leito.....	84
4.3.4 Cálculo de tempo de residência.....	85
4.4 Avaliação dos experimentos realizados como testes preliminares e checagem do reator .....	85
4.5 Planejamento de experimentos.....	93
4.5.1 Testes com passagem de propano .....	100
4.5.2 Testes do uso de reatores em série .....	102
4.6 Investigação complementar com outros óleos vegetais .....	102

## **CAPÍTULO 5**

<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>105</b>
------------------------------------	------------

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
-------------------------	------------

<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>
<i>Anexo A</i> - Norma de padronização do biodiesel ASTM D 6751 (Estados Unidos).....	117
<i>Anexo C</i> - Propriedades de ácidos e ésteres graxos de maior relevância para o biodiesel .....	128
<i>Anexo D</i> - Principais ácidos graxos (%m/m) de óleos e gorduras e/ou testados como combustíveis diesel alternativo. <sup>a</sup> .....	130
<i>Anexo E</i> - Ficha técnica da enzima Novozym 435 cedida pelo fabricante.....	131
<i>Anexo F</i> - Análise de BET (adsorção de nitrogênio à temperatura de 77K) realizada em equipamento disponível em laboratório da URI-Campus de Erechim (Quatachome, série Nova 2200e).....	132

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

O biodiesel pode ser produzido a partir de várias matérias primas, tais como óleos vegetais, gorduras animais, óleos e gorduras residuais, por meio de diversos processos. Pode, também, ser usado puro ou em misturas com o diesel mineral. A diversidade de matérias-primas, processos e usos se caracterizam como vantajosas, mas cada caso precisa ser analisado de acordo com as suas especificações (Cadernos NAE, 2004).

Considera-se biodiesel todo combustível obtido de biomassa que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil em motores ciclo diesel, automotivos e estacionários. Esta definição é relevante para evitar a discriminação de qualquer rota tecnológica para a obtenção desse combustível de fonte vegetal ou animal, o que permite incluir, além do próprio óleo *in natura*, o obtido por transesterificação etílica ou metílica, por craqueamento, ou ainda por transformação de gases obtidos de biomassa em líquidos (Câmara, 2006).

A crescente demanda mundial de derivados de petróleo, os efeitos ambientais de seu uso nas atividades industriais, de geração de energia e de transporte, além da forte expectativa de desabastecimento futuro de petróleo, têm promovido uma verdadeira revolução no desenvolvimento e uso de energias alternativas (O futuro da indústria: Biodiesel, 2006).

Dentro do segmento de combustíveis automotivos, com os recentes avanços no desenvolvimento e a implementação dos chamados biocombustíveis, sucedâneos aos clássicos combustíveis fósseis, vem se consolidando a substituição crescente de gasolina e de óleo diesel de origem não renovável. A elaboração de programas de desenvolvimento e uso de biodiesel no âmbito governamental em diversos blocos econômicos mundiais, tais como na União Européia, América do Norte e no Mercosul, tem promovido massivo investimento em projetos de produção industrial de biodiesel. Visando maior eficiência desse novo mercado, aproximam-se os segmentos agrícola (produção de grãos), industriais (extração de óleo e de produção de biodiesel) e de distribuição (e venda de combustível), integrando-se, assim, a chamada cadeia produtiva do biodiesel (O futuro da indústria: Biodiesel, 2006).

Para o Brasil, os chamados biocombustíveis, produzidos a partir de óleos vegetais, representam excelente oportunidade de crescimento sócio-econômico em regiões agrícolas pouco exploradas. O potencial da

mamona, presente no Nordeste, bem como do girassol e da soja, cultivados no Centro-Sul, além do potencial de matérias-primas como babaçu, dendê, andiroba, pequi e macaúba, nativos nas regiões amazônicas, cerrado e semi-árido, permitem prever com otimismo uma futura liderança mundial do país na produção de biodiesel.

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

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

A produção e uso do biodiesel representam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social. A dimensão do mercado no Brasil e no mundo assegura uma grande oportunidade para o setor agrícola, assim como contribuirá para o desenvolvimento e a ampliação do parque industrial em consonância com o meio ambiente. O biodiesel apresenta ótimo potencial de ganhos ambientais. Em média, a emissão de poluentes no uso em motores é reduzida em comparação ao diesel. Destaca-se a redução de SO<sub>2</sub>, particulados e hidrocarbonetos. Além disso, por ser renovável, contribui positivamente para reduzir o efeito estufa. O CO<sub>2</sub> emitido na queima do biodiesel é absorvido na etapa agrícola de seu ciclo produtivo (O futuro da indústria: Biodiesel, 2006).

Um dos grandes responsáveis pelo crescente interesse do emprego dos biocombustíveis reside no aspecto ambiental. Os ésteres produzidos a partir de gorduras animais e de óleos vegetais, mistura denominada biodiesel, podem fornecer reduções significativas no teor de monóxido de carbono e nas emissões de particulados e de hidrocarbonetos (Szybist *et al.*, 2005). Por exemplo, tomando-se por base o biodiesel puro (B100) produzido com óleo de soja, seu uso reduz as emissões do monóxido de carbono (CO) em 48%, de material particulado (MP) em 47%, de óxido de enxofre (SO<sub>x</sub>) em praticamente 100% e dos hidrocarbonetos totais (HC) em 67%. Por outro lado, em relação ao diesel de origem fóssil, o uso do biodiesel aumenta em aproximadamente 10% as emissões de óxido de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), o que não deve constituir obstáculo para seu uso devido às grandes vantagens em relação aos poluentes. Ademais, há muitos estudos que visam a

redução de NOx mediante o emprego de catalisadores adequados (Knothe *et al.*, 2006).

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

O biodiesel (alquil éster de ácidos graxos), que pode ser obtido a partir da reação de transesterificação entre um triglicerídeo e um álcool, atraiu atenção considerável durante a década passada como um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Diversos processos para a produção deste combustível foram desenvolvidos, entre eles a transesterificação que usa catalisadores alcalinos e promove níveis elevados de conversão dos triglicerídeos em seus correspondentes alquil ésteres em curtos tempos de reação. Este processo foi utilizado intensamente para a produção de biodiesel em vários países. No entanto, os processos de produção de biodiesel com catalisadores químicos homogêneos, além de requerer o emprego de catalisador, envolvem necessariamente a separação do produto e do catalisador, que resulta em altos custos de processamento e elevado consumo de energia.

Kusdiana e Saka (2001) e Demirbas (2002) propuseram recentemente a produção de biodiesel a partir de óleo vegetal a partir da transesterificação não-catalítica com metanol supercrítico. A reação é completada em tempos de residência muito curtos e, quando comparada aos processos catalíticos, a purificação dos produtos parece ser muito mais simples. Entretanto, a reação requer temperaturas na faixa de 350-400°C e pressões entre 45-65 MPa, valores estes não muito apreciados no ambiente industrial. Além disso, tais temperaturas e pressões elevadas conduzem a excessivos custos iniciais de fabricação, de processamento e de energia (Silva *et al.*, 2007).

Recentemente, a transesterificação enzimática, utilizando lipases como catalisador, tornou-se uma alternativa atrativa para a produção de biodiesel, uma vez que temperaturas amenas são empregadas, aliadas ao fato de que o glicerol produzido como um subproduto pode facilmente ser recuperado e a purificação dos ésteres é relativamente simples de ser realizada (Fukuda *et al.*, 2001). Por outro lado, a transesterificação enzimática exige elevadas proporções de solvente orgânico/substratos para que a reação ocorra a contento. Oliveira (1999) e Faccio (2004)

utilizaram níveis de solvente (n-hexano/substrato) de 40:1 na transesterificação de óleo de dendê, de mamona e soja utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme IM.

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

Observando os aspectos de transesterificação enzimática utilizando solventes pressurizados e avaliando as informações disponíveis na literatura sobre a alta solubilidade do óleo de soja em propano, o aumento da atividade enzimática da lipase imobilizada Novozym 435 neste solvente, e ainda a inexistência de dados sobre reações de transesterificação enzimática em propano, Dalla Rosa *et al.* (2008) investigaram a produção de biodiesel a partir de óleo de soja e etanol em propano pressurizado, utilizando uma lipase comercial como catalisador em sistema batelada, utilizando condições amenas de operação sem penalizar a conversão da reação.

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

O reator de leito empacotado é geralmente o mais empregado para os sistemas contínuos que contenham catalisador heterogêneo, porque: (I) facilita o contato e a separação subsequente, (II) e a remoção contínua de inibidores; (III) permite o reuso da enzima sem a necessidade de uma separação prévia; (IV) permite o uso de grandes volumes de substratos de baixa solubilidade; (V) conduz a uma qualidade de produto mais consistente e à estabilidade da enzima é melhorada devido à facilidade de automatização e do controle; (VI) é apropriado para a produção a longo prazo e em escala industrial,

diferentemente de um reator em batelada, onde os grânulos de enzimas (suportadas/imobilizadas) são susceptíveis a quebra por causa do estresse causado pela agitação mecânica. Um aspecto bastante relevante trata-se da relação entre o substrato e a enzima que é muito maior em um reator de leito empacotado do que em reatores convencionais em batelada, resultando em um desempenho mais elevado da reação (Laudani *et al.*, 2007).

Diante deste cenário e das investigações prévias realizadas é que se fundamenta a proposta deste trabalho, cujo objetivo geral e os objetivos específicos são apresentados a seguir.

## **1.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a produção de biodiesel em modo contínuo empregando enzimas imobilizadas como catalisadores utilizando solventes pressurizados.

## **1.2 Objetivos Específicos**

Em consonância com o cenário apresentado, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. Estudar a da reutilização (número de ciclos) de uma enzima comercial em meio propano pressurizado na reação de alcoólise de óleo de soja em modo batelada como forma de investigação do comportamento deste catalisador frente a períodos prolongados de reação;
2. Montagem do aparato experimental para condução de reações enzimáticas em fluidos pressurizados em modo contínuo;
3. Estudar o efeito das variáveis temperatura, pressão, razão molar óleo-etanol, tempo de residência, relação solvente:substratos sobre a conversão da reação de produção de ésteres etílicos de soja em propano em modo contínuo com o objetivo de otimizar a produção de ésteres neste sistema;
4. Estudar a da influência do emprego de outros solventes pressurizados na produção de biodiesel. Neste sentido, o n-butano

torna-se um solvente potencial para realização dos experimentos por propiciar valores de pressão de transição de fases mais amenas do que o propano. O dióxido de carbono é também um dos solventes a ser investigado por apresentar características (compressibilidade volumétrica, por exemplo), que possam conduzir a melhores taxas de transferência de massa;

Como forma de embasamento do presente trabalho, primeiramente será apresentado o estado da arte sobre o assunto, procurando evidenciar os resultados e lacunas presentes na literatura referentes ao tema do presente estudo. O Capítulo 3 apresenta os métodos analíticos utilizados no decorrer deste trabalho bem como a montagem do aparato experimental e o procedimento utilizado para realização dos experimentos. No Capítulo 4 serão apresentados e discutidos os resultados obtidos e no Capítulo 5 serão apresentadas algumas conclusões decorrentes da realização deste trabalho e sugestões para etapas futuras. As referências bibliográficas utilizadas no decorrer do presente estudo são citadas no capítulo 6.



## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Existe um grande interesse em fontes de energia alternativa, visto que a maior parte da energia consumida no mundo é oriunda de fontes não renováveis limitadas (Martín e Otero, 2007). É com base nesta compreensão e nos fins estratégicos de muitos países que se torna relevante o estudo e pesquisa na área de biocombustíveis ou matrizes energéticas alternativas.

A seguir é apresentada como forma de fundamentação teórica deste trabalho uma breve explanação sobre o contexto do biodiesel como alternativa ao diesel de petróleo e sua conjuntura no Brasil e no mundo, bem como um histórico sucinto sobre o tema e um breve apontamento dos óleos vegetais potenciais na produção de biodiesel. O presente capítulo contempla também alguns conceitos e métodos utilizados para produção de biodiesel. A leitura do estado da arte mostra a existência de trabalhos versando sobre o emprego de catalisadores homogêneos e heterogêneos (ácidos/bases, enzimas e suportes porosos modificados) e a produção de biodiesel em fluidos pressurizados, bem como informações de caráter fundamental para o escopo deste trabalho, a saber: o comportamento de fases a alta pressão de alguns óleos vegetais, medidas de atividade de lipases comerciais em fluidos pressurizados, bem como resultados de conversão em biodiesel em modo batelada e em modo contínuo.

#### **2.1 Biodiesel, uma alternativa ao diesel de petróleo**

O Brasil, pela abundância de seus recursos naturais renováveis e da riqueza de sua biomassa, pode e deve ter uma matriz energética diversificada. A energia de origem fóssil (petróleo, carvão e gás) responsável pela deterioração ambiental do planeta, deve ser substituída com urgência por energias limpas como: solar, eólica e oriunda do emprego da biomassa (Holanda, 2004).

Segundo a publicação Balanço Energético Brasileiro 2000, do Ministério de Minas e Energia, o óleo diesel produzido no Brasil não é suficiente para atender o mercado interno, sendo que no ano de 2000, o Brasil consumiu cerca de 37,5 bilhões de litros de óleo diesel.

Além disso, o diesel produzido no país apresenta um baixo

número de cetano, o qual define o poder de auto-inflamação e de combustão do motor, condicionando o desempenho global do mesmo. Para a obtenção de diesel com número de cetano aceitável, torna-se necessário o emprego de aditivos, resultando em aumento de custos do produto. Deve-se salientar também o impacto ambiental causado pela emissão de dióxido de carbono e enxofre na atmosfera quando da queima do óleo diesel (Albuquerque, 2006).

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

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

Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, a utilização direta de óleos vegetais em motores diesel é muito problemática. Estudos demonstram que a sua combustão direta conduz à carbonização do bico injetor, resistência à ejeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas destes problemas foram atribuídas à polimerização dos triglicerídeos, através das suas ligações duplas, que conduzem a formação de depósito, assim como, a baixa volatilidade. A alta viscosidade é também razão importante porque os óleos vegetais ou gorduras são transesterificados a biodiesel, uma vez que altas viscosidades conduzem a problemas no bombeamento e atomização do combustível (Albuquerque, 2006).

Conseqüentemente, outras formas vêm sendo consideradas para

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

A diferença nas propriedades entre o diesel e os óleos vegetais resulta, principalmente, da diversidade molecular entre estes dois tipos de substâncias. O diesel é constituído de hidrocarbonetos com número médio de carbonos em torno de quatorze. Os óleos vegetais são triésteres da glicerina, ou seja, produtos naturais da condensação da glicerina com ácidos graxos, cujas cadeias laterais de ácidos graxos têm números de carbonos entre dez e dezoito, com valores médios de quatorze e dezoito, para os tipos de óleos mais abundantes (Ramos *et al.*, 2001).

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

O biodiesel obtido a partir de óleo vegetal não produz óxido de enxofre, minimiza a emissão de particulados em até três vezes e aumenta significativamente a lubrificidade em comparação com o combustível derivado do petróleo. Em função destas vantagens técnicas e ambientais, vislumbra-se o biodiesel como um combustível substituto ou pelo menos como aditivo ao diesel convencional (Mamuro *et al.*, 2001).

Dependendo do óleo vegetal utilizado, pode-se obter biodiesel com número de cetano bem superior ao óleo diesel, justificando seu uso como aditivo ao diesel fóssil (Albuquerque, 2006).

## 2.2 Breve histórico sobre o biodiesel

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

Os países que iniciaram o desenvolvimento da produção de biodiesel foram a Alemanha e a França. Atualmente, a Alemanha é responsável por mais da metade da produção européia com um produto mais barato que o óleo diesel, já que há completa isenção de tributos em toda a cadeia produtiva deste biocombustível. Possui 30 unidades industriais voltadas à produção de biodiesel e cerca de 800 postos de venda, sendo a maior produtora de biodiesel do mundo, com uma capacidade de produção de 1 milhão de toneladas anuais (Albuquerque, 2006).

A França é o segundo maior produtor, com capacidade de 460 mil toneladas anuais. Nos Estados Unidos, os estados de Minnessota e Carolina do Norte aprovaram uma lei que obriga a adição de 2% de biodiesel no óleo diesel desde 2002, porém a capacidade nacional instalada está entre 210 e 280 milhões de litros anuais, insuficiente para atender a prerrogativa legal. Gradativamente o país dá atenção aos biocombustíveis. O Programa Americano de Biodiesel é baseado em pequenos produtores e consumidores. Existem cerca de 15 empresas não especializadas que produzem biodiesel para uso próprio ou para a comercialização em todo o país (Albuquerque, 2006).

Além dos principais países produtores – Alemanha, França e Itália, nessa ordem, outros países da União Européia, inclusive por orientação do Parlamento Europeu, já desenvolvem ações visando estimular o uso do biodiesel e de outros sucedâneos de combustíveis fósseis, especialmente para o setor de transportes. Dentre essas ações, merecem destaque as que buscam estabelecer padrões mínimos de qualidade para a oferta desse combustível, havendo, de modo geral, estreita articulação com os fabricantes de veículos e peças visando acelerar a realização de testes de funcionamento (Ramos *et al.*, 2001).

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

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

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

Paralelamente ao surgimento do Pró-Álcool cogitou-se sobre o lançamento de um programa paralelo com o intuito de se produzir outro combustível proveniente de fontes renováveis, porém, à base de matérias-primas oleaginosas visando a substituição parcial do diesel de petróleo ou petrodiesel, na matriz veicular de combustíveis. Inicialmente, esse programa foi chamado de “Pró-Óleo” por uns, ou de “Pró-Diesel” por outros (Câmara, 2006).

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

Entretanto, como efetiva política pública federal, o “Pró-Óleo” permaneceu apenas como um projeto ou idéia para o futuro. Recentemente, o atual governo federal decidiu-se pelo relançamento do antigo “Pró-Diesel”, denominando-o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (Câmara, 2006).

A partir de 24 de novembro de 2004, a ANP editou as Resoluções ANP nº 41 e nº 42, as quais estabeleceram, respectivamente, a obrigatoriedade de autorização da ANP para a atividade de produção do biodiesel, e as especificações técnicas para a produção e comercialização do biodiesel. Em 13 de janeiro de 2005, o Governo Federal promulgou a Lei do Biodiesel, que introduz o biodiesel na matriz energética brasileira e amplia o escopo de atuação da ANP, que passou a regulamentar também as atividades de produção e comercialização de biocombustíveis. Além disso, essa lei fixou

percentuais mínimos obrigatórios de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado aos consumidores finais, determinando que o percentual de adição mínimo deverá ser de 2,0% (v/v) de 2008 a 2012, atingindo 5,0% (v/v) até 2013. Atualmente o Brasil conta com diversas empresas produtoras de biodiesel em várias regiões do país, conforme dados da ANP apresentados na Tabela 2.1 ([www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br), maio 2007).

**Tabela 2.1** - Capacidade nominal e produção de biodiesel B100 no Brasil, segundo unidades em 2005.

Unidade <sup>1</sup>	Município (UF)	Capacidade Nominal <sup>2</sup> (m <sup>3</sup> /ano)	Produção <sup>3</sup> (m <sup>3</sup> )
Total		85320	736,2
Agropalma	Belém (PA)	24000	510,4
Biolix	Rolândia (PR)	9000	25,6
Brasil Biodiesel	Floriano (PI)	27000	150,9
Brasil Biodiesel (filial)	Teresina (PI)	600	5,5
Fertibon	Catanduva (SP)	6000	-
Nutec	Fortaliza (CE)	720	-
Renobras	Dom Aquino (MT)	6000	-
Soyminas	Cássia	12000	43,8

Fonte: ANP/SRP, conforme a Portaria ANP n° 54/01.

<sup>1</sup> Unidades produtoras autorizadas pela ANP em 2005

<sup>2</sup> Considerou-se 300 dias de operação.

<sup>3</sup> Biodiesel puro ou B100, conforme Resolução ANP n° 42/2004.

### 2.3 Métodos analíticos para a aferição da qualidade de biodiesel

Nos últimos 10 anos vários estudos vêm sendo conduzidos visando o desenvolvimento de métodos para análise do biodiesel, suas impurezas e subprodutos. Esses estudos incluem a cromatografia gasosa, a separação de fase sólida, a cromatografia de filme líquido, a cromatografia de líquido de alta precisão, a refractometria, entre outros. As técnicas de análise necessitam ser precisas, confiáveis, reprodutivas,

rápidas e simples, utilizando equipamentos disponíveis (Biodiesel e Inclusão Social, 2004).

Durante o processo de transesterificação, gliceróis intermediários como mono- e diacilgliceróis são formados, sendo que uma pequena quantidade destes pode permanecer retida no produto final (ésteres metílicos ou quaisquer outros alquil ésteres). Além destes gliceróis parcialmente reagidos, triacilgliceróis não reagidos bem como glicerol, ácidos graxos livres (AGL), álcool e catalisador residuais podem contaminar o produto final. Portanto, especificações, como as Européias (EN 14214; EN 14213) e a dos Estados Unidos (ASTM D6751) limitam a quantidade de contaminantes permitida no biodiesel (vide Apêndice A). Sob estas especificações, restrições são colocadas para estes contaminantes, como glicerina livre e glicerina total para limitar o teor de glicerol e acilgliceróis, ponto de fulgor para limitar o álcool residual, acidez para limitar o teor de AGL e o teor de cinzas para limitar o catalisador residual (Mittelbach, 1996).

Para atender as exigências das especificações, não é necessária a quantificação de componentes individuais do biodiesel, mas a quantificação de diferentes classes de componentes é fundamental. Por exemplo, para a determinação de mono-, di- ou triacilgliceróis, não é necessário saber que ácidos graxos estão ligados à molécula do glicerol. Nenhum método analítico atual atinge a rigidez destes objetivos, portanto, é necessário selecionar um ou mais métodos para analisar o biodiesel ou monitorar a reação de transesterificação (vide Apêndice A). (Knothe *et al.*, 2006).

Até o momento, a cromatografia gasosa tem sido o método mais utilizado para análise de biodiesel porque apresenta precisão geralmente alta para a quantificação de componentes minoritários, como o método para quantificação de metil ou etil ésteres, EN 14103 (vide Apêndice B) (Knothe *et al.*, 2006).

## 2.4 Óleos potenciais na produção de biodiesel

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

Podem-se classificar em quatro as categorias, origens e processos de obtenção de matéria prima para a produção de biodiesel.

**Tabela 2. 2** - Classificação de obtenção de matérias primas para produção de biodiesel.

CATEGORIAS			
Óleos e Gorduras de animais	Óleos e Gorduras vegetais	Óleos Residuais de frituras	Matérias Graxas de efluentes
ORIGENS			
Matadouros Frigoríficos e Curtumes	Agricultura Temporárias e Permanentes	Cocção Comercial e Industrial	Água Residual das Cidades e de algumas Indústrias
OBTENÇÃO			
Extração com Água e Vapor	Extração mecânica Extração Solvente Extração Mista	Acumulações e Coletas	Processos em fase de Pesquisa e Desenvolvimento

Fonte: O Biodiesel e a Inclusão Social, 2003.

A escolha da matéria prima para a produção de biodiesel depende largamente de fatores geográficos. Dependendo da origem e da qualidade da matéria prima, mudanças no processo de produção podem ser necessárias.

Apesar da riqueza e da diversidade de oleaginosas no país, o desenvolvimento tecnológico para elas é muito variável. Podem-se citar como principais oleaginosas com domínio tecnológico, o amendoim, algodão, mamona, soja, girassol, gergelim, canola e dendê. Como as principais oleaginosas com baixíssimo domínio tecnológico e/ou com exploração extrativista, têm-se: o pinhão-manso, macaúba, babaçu, oiticica, etc. Vale ressaltar que, para atender à demanda do Programa de Biodiesel do Governo, será necessário estabelecer políticas públicas para a expansão de áreas para o cultivo de oleaginosas com domínio tecnológico e avaliar as suas capacidades de produção de acordo com a vocação regional (O Futuro da Indústria: Biodiesel, 2006).

Para cumprir as metas legais, seria preciso produzir cerca de 800 milhões de litros anuais de biodiesel em 2008, na fase inicial do Programa. Com a autorização das usinas, cuja solicitação tramita na Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a capacidade de produção do País seria suficiente para 2008, mas terá que



umentar significativamente até 2013 para atender à exigência legal de adicionar 5% de biodiesel ao petrodiesel (Plano Nacional de Agroenergia, 2006-2011).

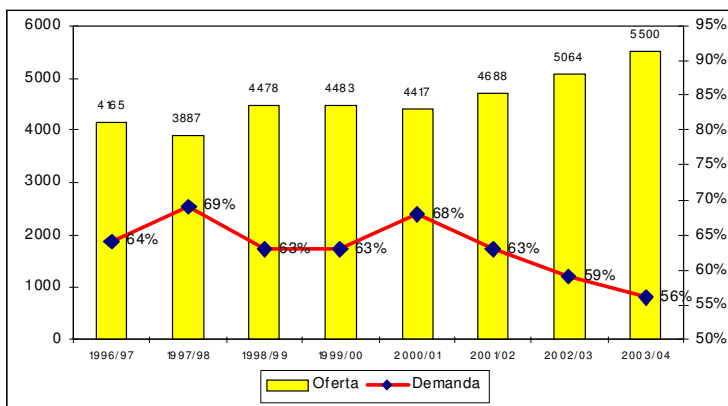
A respeito da cultura da soja, pode-se dizer que o Brasil apresenta tradição neste cultivo, além de uma boa estruturação nas fases da cadeia produtiva. A Figura 2.1 apresenta as principais regiões produtoras de soja e suas respectivas contribuições de produção no contexto nacional.



**Figura 2.1** - Principais regiões produtoras de soja e porcentagem produzida por região (Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011).

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

A este respeito, é possível relatar que várias culturas que servem de fonte de óleos vegetais vêm ganhando mercado com um apelo de valores nutricionais mais vantajosos, ou seja, óleos com maior grau de diferenciação por possuírem em sua composição, por exemplo, ômega 3 e ômega 6 (como é o caso da canola e do girassol), têm despontado as vendas de óleos vegetais. Com relação à soja, pode-se dizer que é uma das culturas mais eficientes para a produção de farelo e existem limitações técnicas para a substituição total deste produto por outros farelos (como o de algodão) na alimentação de aves e suínos (Lazzarini e Nunes, 2000). Na verdade, a demanda por grão de soja está alicerçada na necessidade de proteínas para a indústria de ração animal. O mercado de proteínas encontra-se em ascensão, o que levou a uma situação de excesso de óleo de soja no mercado nacional, como indicam os dados da Figura 2.2.



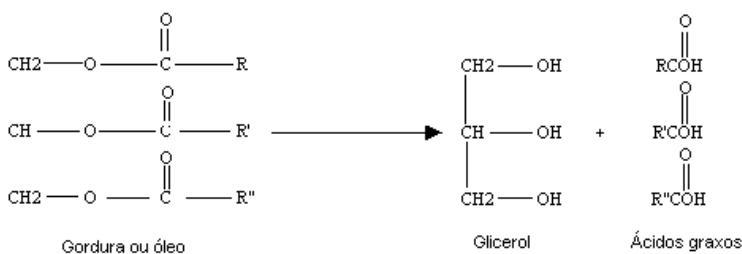
**Figura 2.2** - Balanço oferta x demanda de óleo de soja no Brasil (Above – Associação Brasileira de Óleos Vegetais, 2004). Valores de oferta e 1000 toneladas.

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

## 2.5 Composição e estrutura de óleos vegetais

De um modo geral, os óleos vegetais são definidos como substâncias líquidas à temperatura ambiente e as gorduras como substâncias sólidas. Os lipídeos são compostos de origem biológica que dissolvem em solventes apolares, tais como o clorofórmio e o éter dietílico. O nome lipídeo vem do grego *lipos*, que significa gordura. Diferentemente dos carboidratos e das proteínas, que são definidos em termos de suas estruturas, os lipídeos são definidos pela operação física utilizada para isolá-los. Portanto, não é surpreendente que os lipídeos incluam uma variedade de tipos de estruturas, como os triacilgliceróis. Apenas uma pequena parcela da fração do lipídeo total obtida pela extração com um solvente apolar consiste de ácidos carboxílicos de cadeia longa. A maioria dos ácidos carboxílicos, de origem biológica, é encontrada como ésteres de glicerol, isto é, como triacilgliceróis (Villeneuve *et al.*, 2000).

A hidrólise de uma gordura ou óleo produz uma mistura de ácidos graxos:



**Figura 2.3** - Representação esquemática da hidrólise de óleos vegetais (Villeneuve *et. al.*, 2000).

A maioria dos ácidos graxos naturais possui cadeia não-ramificada e, como são sintetizados a partir de unidades de dois carbonos, há um número par de átomos de carbono. A Tabela 2.3 apresenta os ácidos graxos majoritários que compõem o óleo de soja, de particular interesse na proposta deste trabalho.

No Apêndice C, apresenta-se uma compilação das propriedades de ácidos e ésteres graxos de maior relevância para o biodiesel e no Apêndice D, a tabela com os principais ácidos graxos de óleos e gorduras utilizados e/ou testados como combustível alternativo ao diesel de petróleo.

**Tabela 2. 3** - Composição química típica do óleo de soja (Lanza, 2004).

Ácidos Graxos	Quantidade (% m/m)
Palmítico (C16:0)	11,2
Palmitoléico (C16:0)	traços
Esteárico (C18:0)	3,45
Oléico (C18:1)	23,41
Linoléico (C18:2)	54,21
Linolênico (C18:3)	5,75
Linolênico (C18:3) trans	1,06
Lignocérico	traços
Behêncio (C22:0)	0,49
Araquídico (C20:0)	0,43

## 2.6 Biotransformação enzimática

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

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

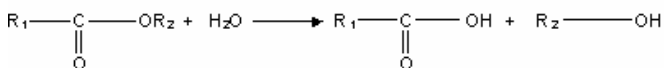
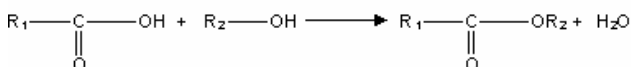
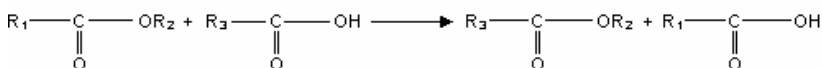
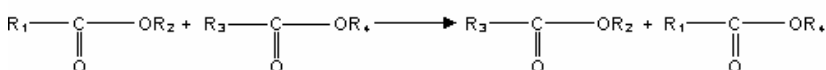
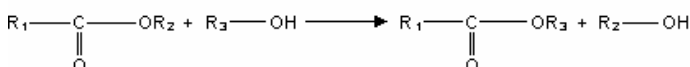
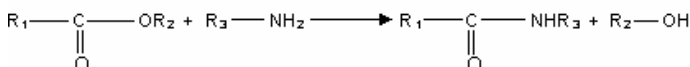
Enquanto o número de companhias que comercializam enzimas está próximo do milhar, o número de produtores é muito inferior. Ao todo, nos Estados Unidos e parte oeste da Europa, existem apenas cerca de 30 indústrias produtoras de enzimas. Muitos produtores são do ramo da indústria químico-farmacêutica, para os quais o lucro proveniente da comercialização das enzimas desempenha um papel pouco significativo no seu faturamento global. Cerca de 90% da produção anual provém das

maiores empresas produtoras de enzimas, como Novozymes com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos (Castro *et al.*, 2004).

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

Nos últimos anos, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas visando o desenvolvimento da área de biotransformações, como, por exemplo, imobilização, modificação enzimática por engenharia genética ou via interação não covalente (*imprinting*), reincubação do produto ou do substrato, inibição enantioselectiva, modificação do substrato, mapeamento do sítio ativo, estudo da variação do solvente (*solvent engineering*) e estudo da variação dos doadores acila em reações de transesterificação. Destas, a técnica que utiliza o estudo da variação do solvente é a que apresenta menor custo, maior flexibilidade e velocidade na execução (Costa e Amarin, 1999).

As lipases (EC 3.1.1.3) são biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. Um elevado número de compostos de alta e baixa massa molecular também pode ser substrato dessa enzima, tais como tioésteres, amidas, poliidroxiésteres/hidroxiácidos, etc. Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (Figura 2.4) (Villeneuve *et al.*, 2000).

Hidrólise :Síntese de ésteres :Acidólise :Interesterificação :Alcoólise :Aminólise :**Figura 2.4** - Reações catalisadas por lipases.

Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Figura 2.4) (Yahia *et al.*, 1998).

Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade. O uso deste biocatalisador em aminólise de ésteres, em meios anidros, tem sido bem sucedido na síntese de peptídeos e amidas de ácidos graxos. Esses resultados são promissores para a utilização de

tecnologia de lipases em síntese de peptídeos opticamente ativos, polímeros, surfactantes e novos detergentes com baixo custo. A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (Villeneuve *et al.*, 2000).

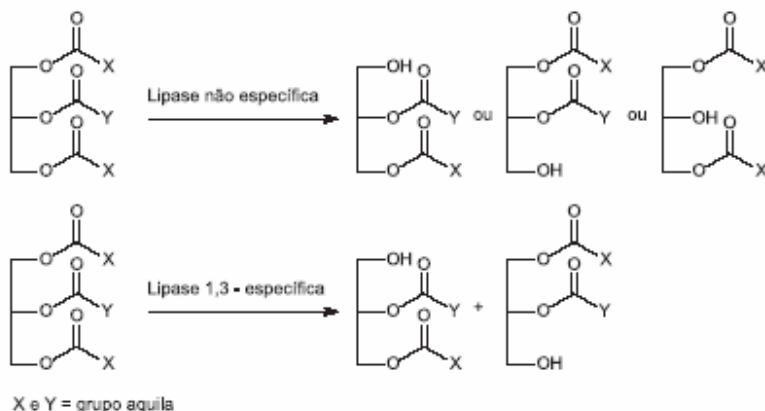
### 2.6.1 Especificidades das lipases

Conforme a classificação das enzimas, as lipases são divididas da seguinte forma:

I. Regiosseletivas - subdivididas em:

II. lipases não-específicas - hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;

III. lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (Figura 2.5). Existem, no entanto, alguns estudos na literatura sobre a lipase A de *Candida antarctica* que hidrolisa a posição 2 (Paques e Macedo, 2006).



**Figura 2.5** - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica.

Em se tratando de aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. Lipases não específicas (ex: produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium*

*viscosum* e *Pseudomonas* sp.) quebram as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior (Castro *et al.*, 2004).

Lipases 1,3 específicas (ex: de *Aspergillus niger*, *Mucorjavanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*) liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regioesletivas, ou mesmo pelo catalisador químico. Lipases específicas para ácido graxo são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (Castro *et al.*, 2004).

Também merece referência a estereoespecificidade, ou seja, a capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica. A especificidade estrutural ou regioesletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima, ou seja, de sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais. Desse modo, a catálise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir formas enantiômeras. Lipases têm sido empregadas para resolução de racematos, resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos opticamente puros (Castro *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Propriedades e conformação das lipases

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, podendo ser produzidas por fermentação usando várias espécies



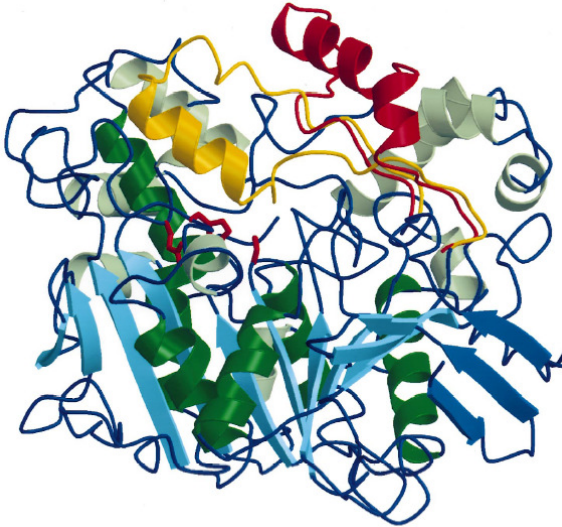
de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de *Tulopsis* sp e *Cândida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp., *Staphylococcus* sp., etc. Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis do que as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento. Entre as lipases, as de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas glumae*, *Candida rugosa* (anteriormente denominada *Candida cylindracea*), *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, lipase pancreática de cavalo, lipase pancreática humana e lipase pancreática bovina têm sua estrutura determinada (Dalla Vecchia *et al.*, 2004).

Em contraste com as esterases, que apresentam atividade de Michaelis- Menten normal, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato [S] aumenta, até um limite por saturação, as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração micelar crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de *ativação interfacial*. O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima (Costa *et al.*, 1999).

A massa molecular destas enzimas varia de 20-75 kDa. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente ácidas, com pI entre 4 e 5. O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/ Glu, que se repete em todas as estruturas e é freqüentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (Cygler e Schrag, 1999).

Estudos de raio-X realizados com a lipase da *Candida antarctica* revelaram a existência de uma “tampa” similar recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp. Mais recentemente, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro

lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica (Yahia *et al.*, 1998).



**Figura 2.6** - Diagrama de “fita” da lipase *Candida rugosa* (CRL), com condição aberta e fechada da sobreposição do “lid” (Cyglér e Schrag, 1999).

Na Figura 2.6 a composição central na forma  $\beta$  é azul brilhante e a menor forma  $\beta$  que possui a terminação N é azul escuro. As hélices as quais revestem em sentido oposto a forma  $\beta$  central são verde escuro. A conformação do “lid” fechada é amarelo e a aberta é vermelho. Os resíduos formados da tríade catalítica são mostrados em vermelho (não helicoidal).

### 2.6.3 Parâmetros que influenciam a atividade da enzima

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionada para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliadas e otimizadas (Dalla Vecchia *et al.*, 2004).

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo

de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (Dalla Vecchia *et al.*, 2004).

O teor de água presente no catalisador é mais importante para manter a atividade catalítica do que a quantidade total contida no sistema. Alguns trabalhos como os de Nelson *et al.* (1996), Almeida *et al.* (1998), Knez e Habulin (2002), Knez *et al.* (1998), Noureddini *et al.* (2005), Mesiano *et al.* (1999), Mateo *et al.* (2007), entre outros, têm mostrado o efeito da atividade da água em reações catalisadas por lipases.

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente. Na literatura, não existe um consenso claro com relação à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. Porém, o parâmetro mais frequentemente utilizado é o  $\log P_{\text{oct}}$ , definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água (Dalla Vecchia *et al.*, 2004).

Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}} \leq 2$  são denominados hidrofílicos e não são considerados adequados para a biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}}$  superior a 4 são denominados hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, mantendo o biocatalisador no seu estado ativo. Parâmetros como constante dielétrica ( $\epsilon$ ), polarizabilidade, bem como o parâmetro de solubilidade de Hildebrand ( $\delta$ ) e o de solubilidade tridimensional – uma derivação do parâmetro de Hildebrand – têm sido propostos para avaliar a influência do solvente nas reações catalisadas por enzimas imobilizadas ou não (Dalla Vecchia *et al.*, 2004).

## 2.7 Técnicas de produção de biodiesel

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

Dentre os processos para produção de biodiesel, três deles têm sido mais intensamente investigados na tentativa de superar tais desvantagens e permitir a utilização de óleos vegetais como matéria-prima: a pirólise, a micro emulsificação e a transesterificação enzimática e supercrítica (Fukuda *et al.*, 2001).

### 2.7.1 Pirólise

A pirólise ocorre pela mudança química causada pela aplicação de energia térmica na presença de ar ou nitrogênio. Muitos investigadores estudaram a pirólise de triglicerídeos com a finalidade de obter combustíveis satisfatórios para os motores diesel. A decomposição térmica dos triglicerídeos produz combinações de várias classes, incluindo alcanos, alquenos, alcadienos e ácidos carboxílicos. Diferentes tipos de óleos vegetais conduzem a diferenças significativas em composição, quando estes são submetidos ao tratamento térmico (Fukuda *et al.*, 2001).

Os produtos da pirólise possuem baixa viscosidade e um alto número de cetano comparados aos óleos vegetais puros. Porém, enquanto óleos vegetais que sofrem pirólise possuem quantidades aceitáveis de enxofre e água, eles são inaceitáveis em termos de cinza, resíduos de carbono e ponto de névoa. Embora os produtos formados sejam quimicamente semelhantes aos derivados de petróleo, cabe salientar o difícil controle da composição do produto final obtido. É provável que os mecanismos de decomposição térmica dos triglicerídeos sejam complexos por causa das muitas estruturas e multiplicidade de possíveis reações que podem ocorrer com os triglicerídeos neste processo (Ma e Hanna, 1999).

### 2.7.2 Micro emulsificação

O uso de micro emulsões com solventes como metanol, etanol e 1-butanol é utilizado como meio de resolver o problema de viscosidade alta dos óleos vegetais. As micro emulsões são isotrópicas, claras ou translúcidas, dispersões termodinamicamente estáveis de óleo, um surfactante e freqüentemente uma molécula anfifílica pequena, chamada de cosurfactante (Fukuda *et al.*, 2001).

Combustíveis a base de micro emulsões às vezes são também conhecidos pelo termo “combustíveis híbridos” (Knothe *et al.*, 2002). As micro emulsões podem ser classificadas como não-iônicas ou iônicas, dependendo do surfactante presente (Knothe *et al.*, 2002). O uso de micro emulsões tem a desvantagem de levar a formação de depósitos de carbono.

### 2.7.3 Aspectos gerais sobre a transesterificação de óleos vegetais

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

Quimicamente, transesterificação é a reação que ocorre entre um álcool e um triglicerídeo. Em geral, esta reação é realizada na presença de catalisador para promover e/ou acelerar a reação e, como resultado, obtém-se a glicerina e uma mistura de ésteres etílicos (biodiesel) (Demirbas, 2002).

Um esquema geral da reação de transesterificação é apresentado na Figura 2.7.

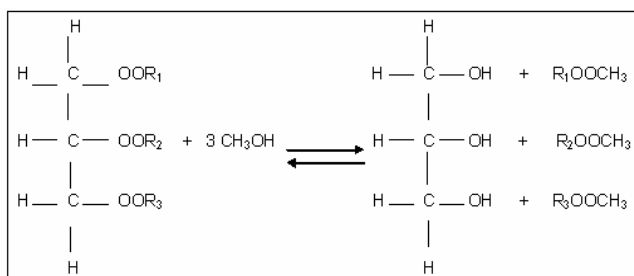
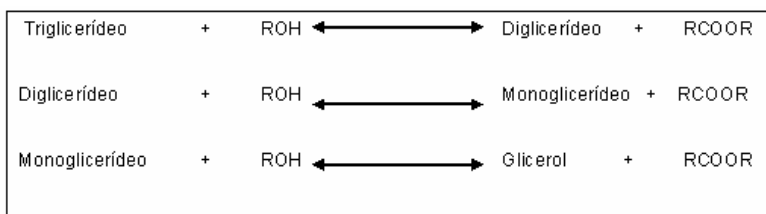


Figura 2.7 - Esquema geral da reação de transesterificação.

Acredita-se que três sucessivas e reversíveis reações aconteçam. O primeiro passo é a conversão de um triglicerídeo a um diglicerídeo, seguido pela conversão de um diglicerídeo a monoglicerídeo e de monoglicerídeo para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (Srivastava e Prasad, 2000), conforme representado na Figura 2.8.



**Figura 2.8** - Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais.

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

Alguns parâmetros são de fundamental importância na reação de transesterificação, entre eles destacam-se:

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

- o efeito da relação molar entre os reagentes está associado ao tipo de catalisador e ao tipo de óleo que é empregado na reação. Na catálise alcalina, utilizando óleo de soja e butanol, por exemplo, é requerida uma relação de óleo/etanol de 1:6, enquanto para atingir a mesma conversão com catalisador ácido, necessita-se de uma razão molar óleo:etanol de 1:30 (Fukuda *et al.*, 2001).

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

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

catalisadas por ácidos e bases.

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

Neste sentido, alguns estudos são encontrados na literatura a respeito dos fatores que influenciam a reação de produção de ésteres etílicos, utilizando NaOH como catalisador, dentre eles pode-se citar a investigação de Oliveira *et al.* (2005a), tendo encontrado conversão de até 96,2% para óleo de mamona. No emprego deste óleo, os parâmetros otimizados foram: temperatura de 70°C, 0,5% (m/m) de catalisador e razão molar óleo:etanol de 1:3. Já para o emprego de óleo de soja nas reações de produção alcalina de ésteres, os mesmos autores reportam conversão de 94,1%, nas condições de temperatura de 70°C, 0,5% (m/m) de catalisador e razão molar óleo:etanol de 1:9.

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

Visando superar os inconvenientes da transesterificação via catálise alcalina e ácida, Kusdiana e Saka (2001) propuseram a produção de biodiesel a partir da transesterificação não-catalítica de óleos vegetais com metanol supercrítico. Os autores verificaram que a conversão da reação é praticamente completa, com tempos de residência bastante curtos. Comparado com os processos catalíticos, a purificação dos produtos aparenta simplicidade e é ambientalmente correta. Entretanto, a reação requer temperaturas na faixa de 350-400°C e pressões de 45-65 MPa, que não são atualmente viáveis no contexto industrial. Além disso, tais temperaturas e pressões elevadas conduzem a elevados custos iniciais de fabricação, processamento e de energia (Silva *et al.*, 2007).

## **2.8 Produção de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores**

Enzimas são geralmente biocatalisadores efetivos por apresentar especificidade ao substrato, grupo funcional específico e estereo especificidade em meio aquoso (Mamuro *et al.*, 2001). A utilização de lipases imobilizadas como catalisadores para produção de biodiesel apresenta grande potencial comparado com o uso de catalisadores

alcalinos e ácidos, tendo em vista que a operação necessária para a separação do glicerol e do catalisador é bastante facilitada (Du *et al.*, 2004). A ação de lipases sobre ligações ésteres tem sido muito estudada com o intuito de explorar as vantagens deste biocatalisador na modificação de óleos e gorduras. Neste sentido, verifica-se que alguns parâmetros influenciam significativamente as reações catalisadas por lipases.

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

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

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

Vários estudos sobre o tipo de álcool e as diferentes concentrações testadas em reações catalisadas por lipases podem ser encontrados na literatura. Nelson *et al.* (1996) realizaram a catálise enzimática empregando diversos óleos vegetais, álcoois e também diferentes espécies de lipases. A lipase de *Mucor miehei* foi a mais eficiente para converter triglicerídeos em ésteres utilizando álcool primário, considerando que a lipase de *C. antarctica* foi a mais eficiente utilizando álcool secundário. Conversões máximas de 94,8 – 98,5% foram obtidas para as reações com álcoois primários, como metanol,



etanol, propanol, butanol e isobutanol e também 2-butanol, empregando n-hexano como solvente. Os autores observaram que os rendimentos com metanol e etanol diminuíram na ausência de solvente: quando comparado ao obtido com n-hexano, o rendimento com metanol foi da ordem de 20%.

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

No estudo de Nouredini *et al.* (2005), citado anteriormente, os autores reportam que uma quantidade de álcool em excesso causa inibição por substrato na reação, diminuindo os níveis de conversão. As melhores quantidades adicionadas, em razão molar óleo:etanol, foram de 1:15,25, atingindo níveis de concentração de ésteres de 65%. Para a razão molar óleo:metanol, a melhor relação foi de 1:7,5, quando se atingiram níveis de concentração de ésteres de 67%.

A respeito do uso de solventes em reações de transesterificação enzimática, alguns trabalhos são encontrados na literatura. A atividade enzimática depende do tipo de fluido utilizado, provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações de hidrogênio e iônicas. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (Knez e Habulin, 2001).

Os critérios para determinação da hidrofobicidade de um solvente estão, no entanto, sujeitos a controvérsias. Illanes (1994) aponta como um dos indicadores de hidrofobicidade a constante dielétrica que é responsável pelas interações específicas entre a enzima e o solvente. Admite-se que a diminuição da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula de enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade

interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. A modificação do valor da constante dielétrica também altera o valor de pKa dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer no sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada (Monot, 1994).

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

A produção de ésteres etílicos a partir de óleo de mamona e de soja usando n-hexano como solvente e duas lipases comerciais (Novozym 435 e Lipozyme IM) foi realizado por Oliveira *et al.* (2004, 2005b). Diversos trabalhos descrevem a produção de ésteres por via enzimática utilizando lipases como catalisadores, e em todos os casos conversões satisfatórias foram observadas quando da utilização de uma razão mássica de solvente:substrato em torno de 40:1. Esta elevada relação é, sem dúvida, uma das principais desvantagens do uso de enzimas como catalisadores da transesterificação de óleos vegetais em solventes orgânicos. Relações inferiores a apresentada ou mesmo a ausência de solvente têm se mostrado inadequadas à reação de transesterificação enzimática, possivelmente, dado à significativa resistência à transferência de massa (Dalla Rosa *et al.*, 2009).

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

## 2.9 Produção de biodiesel em fluidos pressurizados

A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da

característica que muitos gases apresentam de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (McHugh e Krukoni, 1994).

Nestas condições, passa-se diretamente do estado gasoso a um estado denominado supercrítico, onde as propriedades do fluido são intermediárias entre as dos estados líquido e as do gasoso. No caso do CO<sub>2</sub>, o ponto crítico é alcançado sobre a curva líquido-gás à temperatura de 31,3 °C e pressão aproximada de 73 bar.

A combinação das propriedades das fases líquida e vapor (Tabela 2.4), pode ser extremamente vantajosa para a utilização dos fluidos supercríticos (FSC) como solventes. O FSC nas vizinhanças do ponto crítico possui densidade próxima a do líquido (o que fortalece as suas propriedades de solvente). Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo. Todas estas propriedades singulares fazem dos FSC um meio bastante interessante para reações químicas. Tais propriedades de transporte, semelhantes a dos gases, facilitam as taxas de transferência de massa entre reagentes e catalisadores. Em reações limitadas pela difusão, a cinética, em geral, será mais favorecida em fluidos supercríticos do que em solventes líquidos convencionais (Messiano *et al.*, 1999).

**Tabela 2. 4** - Propriedades físicas e de transporte associadas a diferentes estados do fluido.

Propriedades	Líquido	Supercrítico	Gás
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1	0,2 - 0,9	0,001
Viscosidade (cp)	0,5 - 1	0,05 - 0,1	0,01
Difusividade (cm <sup>2</sup> /s)	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>

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

O uso de fluidos comprimidos como solventes para reações de catálise enzimática, investigados primeiramente por Randolph *et al.* (1985), Hammond *et al.* (1985) e Nakamura *et al.* (1985), é uma área de

pesquisa muito fértil que teve grande destaque na década de 80.

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

Desta forma, a substituição de um solvente orgânico, tal como o n-hexano, por um fluido supercrítico em reações enzimáticas, poderá resultar em maiores taxas de transferência de massa devido às propriedades de transporte favoráveis. Além das vantagens já citadas, é possível um controle mais apurado das variáveis que conduzem a reação. Um benefício adicional do emprego de fluidos supercríticos na catálise enzimática é a presença de um meio adequado à recuperação dos produtos e reagentes (Oliveira e Oliveira, 2000, 2001).

Dentre os diversos fluidos supercríticos, o dióxido de carbono tem sido apontado como o mais adequado, pois as escalas de temperatura usadas no emprego deste solvente são compatíveis com o uso das enzimas como catalisadores. Além disso, ele é o solvente mais aceito para aplicações industriais, uma vez que oferece algumas vantagens sobre os solventes orgânicos, quais sejam: atoxicidade, não inflamabilidade, baixo custo, facilidade de recuperação do produto, reduzida resistência à transferência de massa e elevadas taxas de reações.

Muitas reações têm sido estudadas nesta área, incluindo a oxidação de fenóis pela polifenol oxidase (Hammond *et al.*, 1985) e a conversão de p-nitrofenilfosfato e p-nitrofenol por uma fosfatase alcalina (Randolph *et al.*, 1988). Dentre os estudos encontrados na literatura sobre o uso de dióxido de carbono como solvente, verifica-se o de Knez e Habulin (2001), que investigaram a estabilidade de diversas lipases, entre elas as de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *porcine pancreas* e de *Candida rugosa* frente ao dióxido de carbono supercrítico e propano pressurizado, expostos a 300 bar e 40°C por 24 horas. Neste mesmo estudo, os autores submeteram a enzima de *Candida rugosa* à reação de esterificação do ácido n-butírico em CO<sub>2</sub> supercrítico, propano e sem solvente. Verificou-se que as taxas iniciais de reação dependem fortemente da escolha do solvente a ser utilizado. Ocorreu uma diferença significativa entre a atividade da lipase em CO<sub>2</sub> supercrítico e em propano, sendo que em CO<sub>2</sub> a atividade das

lipases diminuiu notadamente.

A alcoólise de óleos vegetais em CO<sub>2</sub> supercrítico a partir do óleo de milho e a utilização do glicerol (subproduto da reação) para a obtenção de mono- e diglicerídeos foi relatada por King *et al.* (1995).

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

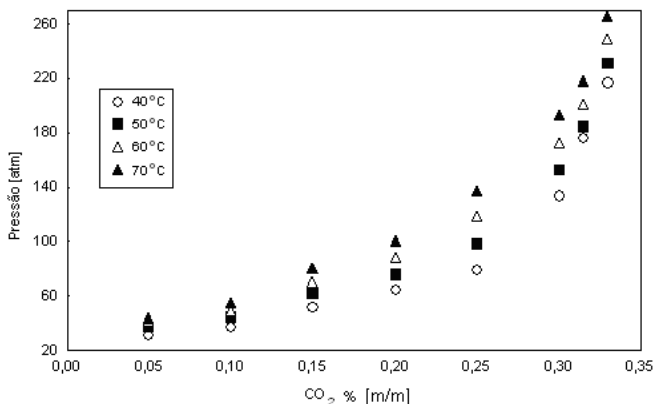
Em um outro estudo, Oliveira e Oliveira (2000) otimizaram as condições de produção de ésteres de óleo de palma e obtiveram conversões de 100% para as reações catalisadas pela Novozym 435 e conversões de 31% com a enzima Lipozyme IM.

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

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

Em se tratando de biodiesel, o comportamento de fases a alta pressão de óleos vegetais em solventes pressurizados é um aspecto importante. Lanza (2004) investigou o comportamento de fases a alta pressão do óleo de soja em solventes pressurizados, como propano e dióxido de carbono. Os resultados obtidos mostraram que o tipo de equilíbrio observado depende do sistema e que para o sistema óleo de soja - propano foi identificada uma ampla região em composição

contendo uma única fase, com pressões de transição inferiores a 40bar em toda a faixa composicional, indicando um meio propício para as reações de transesterificação enzimática. Por outro lado, o estudo do sistema dióxido de carbono-óleo de soja revelou a existência de elevadas pressões de transição de fase, segundo Ndiaye *et al.* (2006a), conforme apresentado na Figura 2.9.

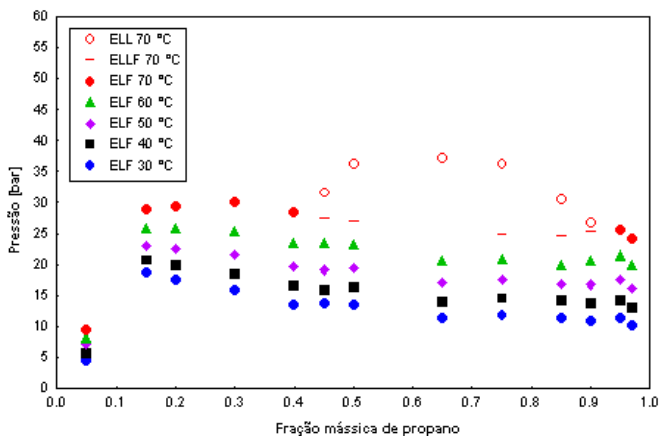


**Figura 2.9** - Diagrama P-T para o sistema dióxido de carbono-óleo de soja para diferentes frações mássicas (w) de dióxido de carbono (Ndiaye *et al.*, 2006a).

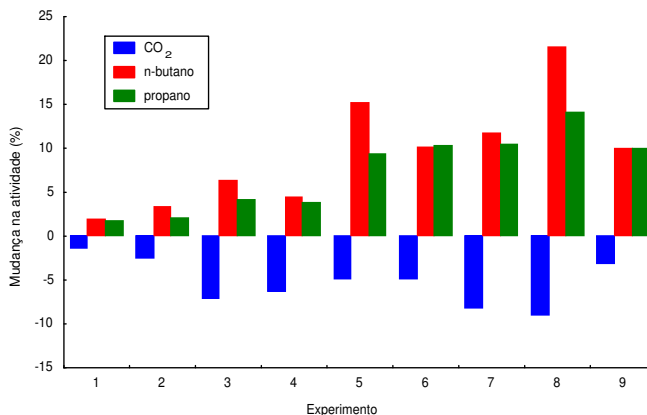
Na Figura 2.10 é apresentado o diagrama pressão – composição para o sistema propano-óleo de soja. Cabe observar que as pressões de transição apresentadas são relativamente baixas, variando de 4 a cerca de 40 bar (Ndiaye *et al.*, 2006b).

Além do estudo do equilíbrio de fases dos sistemas a serem investigados para alcoólise em fluidos pressurizados, é também de fundamental importância avaliar a atividade enzimática de lipases em fluidos pressurizados. Feihrmann *et al.* (2006) investigaram a influência de variáveis operacionais sobre a atividade de lipases imobilizadas - Lipozyme IM e Novozym 435 - empregando distintos solventes pressurizados. Estes autores observaram que a enzima Novozym 435 demonstrou grande potencial para catalisar reações de modificação de óleos vegetais em meio pressurizado, pois foi a única a exibir ganho de atividade em dois solventes, (propano e n-butano) ao passo que com a lipase Lipozyme IM, a perda de atividade foi observada nos três solventes – dióxido de carbono, propano e n-butano. A título de exemplificação, apresenta-se a Figura 2.11, que reproduz os resultados encontrados por Feihrmann *et al.* (2006) sobre a atividade da Novozym 435 em uma ampla faixa de pressão, temperatura, tempo de exposição

ao fluido pressurizado e taxa de decompressão do mesmo.



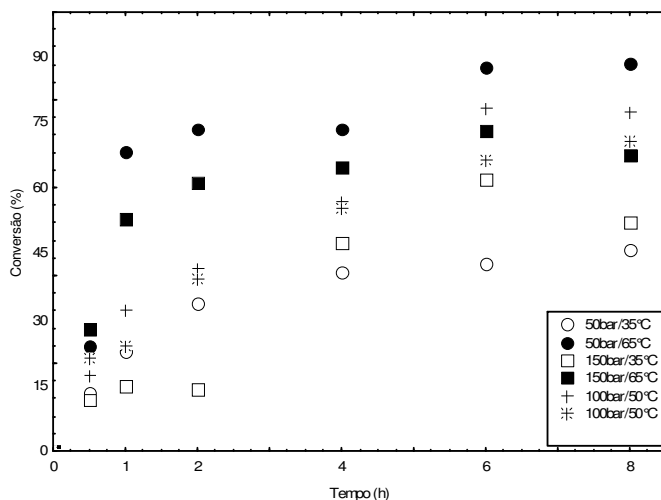
**Figura 2. 10** - Diagrama P-T para o sistema propano-óleo de soja (Ndiaye *et al.*, 2006b).



**Figura 2. 11** - Mudança na atividade enzimática da lipase Novozym 435 em propano, n-butano e em dióxido de carbono pressurizados (Feihmann *et al.*, 2006).

Quando da utilização dos solventes pressurizados, os autores concluíram que o dióxido de carbono é o solvente que acarreta maior perda de atividade enzimática, diferentemente do propano e n-butano que se mostra um solvente potencial para utilização em reações enzimáticas a altas pressões.

Corroborando os dados de Feihmann *et al.* (2006) e Ndiaye *et al.* (2006a, b), apresentam-se os resultados obtidos por Dalla Rosa *et al.* (2008) concernentes à produção de ésteres etílicos utilizando a lipase comercial Novozym 435, óleo de soja e propano em modo batelada. Com relação ao estudo da influência da temperatura e pressão, Dalla Rosa, *et al.* (2008) verificaram que as melhores conversões são obtidas na faixa de temperatura entre 50°C e 65°C, conforme dados da Figura 2.12, faixa esta de temperatura relacionada à região de temperatura na qual a atividade da Novozym 435 é máxima.



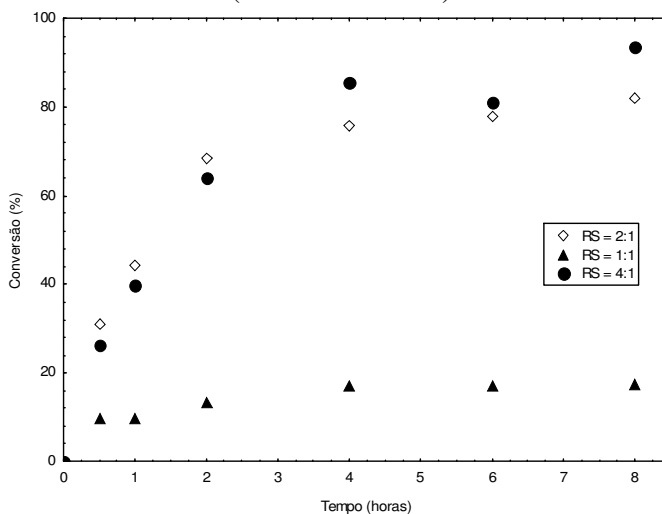
**Figura 2.12** - Efeito da pressão e temperatura sobre a cinética da produção enzimática de ésteres etílicos de óleo de soja em propano pressurizado utilizando a lipase Novozym 435. Fração mássica de solvente:substrato de 2:1, razão molar óleo:etanol de 1:6 e 5%(m/m) de enzima (Dalla Rosa *et al.*, 2008).

Verificou-se também naquele estudo que a pressão não exerce influência significativa na conversão e na cinética de reação, para as reações realizadas a 50 bar e 150 bar. Conforme Ndiaye *et al.* (2006), o sistema óleo de soja – propano, nas faixas de pressão e temperatura investigados, apresenta-se em uma única fase. Dentro da faixa experimental daquele trabalho o propano encontra-se como líquido pressurizado, de forma que a pressão apresenta pouca influência sobre as propriedades do solvente, por conseguinte sobre a conversão da reação.

Os resultados do estudo de Dalla Rosa *et al.* (2008) podem ser visualizados na Figura 2.13 e revelam uma interação positiva entre a



enzima e o meio reacional (solvente:substrato).

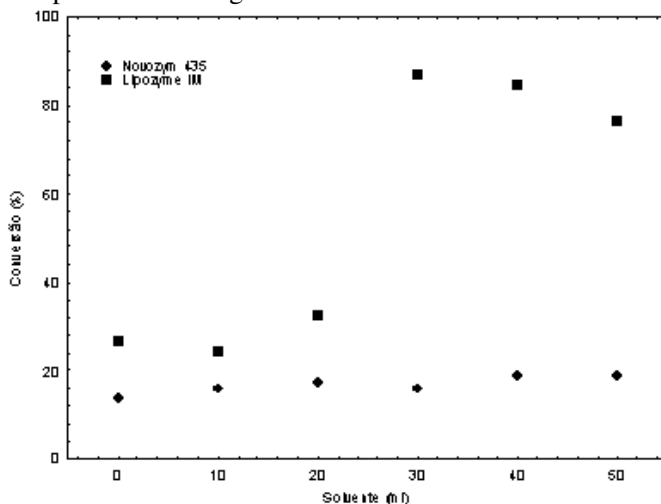


**Figura 2.13** - Avaliação do efeito de diferentes razões mássicas de solvente:substrato na produção enzimática de ésteres etílicos de soja em propano pressurizado. Temperatura de 65°C, 50 bar, concentração de enzima de 5% (m/m) (Dalla Rosa *et al.*, 2008).

Os resultados mostram que baixas conversões são obtidas quando a relação solvente:substrato é baixa e que conversões elevadas, da ordem de 90%, são atingidas quando o meio reacional dispõe de uma maior quantidade de propano. Conforme atesta a literatura, possivelmente, as interações da enzima com os substratos sejam facilitadas com o excesso de solvente, ou seja, até certo limite, quanto maior a quantidade de solvente empregada no sistema, mais facilitado será o contato da enzima com o substrato, promovendo o bom desempenho da enzima no meio reacional. O estudo indica então que o propano favorece o curso da reação e que em função das suas características, propicia condições de operação mais amenas. Desta forma, o propano pode ser visto como um solvente potencial para as reações de transesterificação de óleos vegetais catalisadas pela lipase Novozym 435.

Pode-se salientar ainda que a razão solvente:substrato comumente empregada na literatura para se obter bons níveis de conversão em meio (solvente/líquido) orgânico, é cerca de 40:1, segundo relato de Mittelbach (1990) e verificados por Dalla Rosa *et al.* (2009), conforme Figura 2.14. Cabe ainda mencionar o desempenho superior obtido pelo

uso da enzima Lipozyme IM, quando comparado a Novozym 435 em reações de alcoólise de óleo de soja, conforme observados por et. al. (2009) e reproduzido na Figura 2.14.



**Figura 2.14** - Conversão em biodiesel de soja utilizando duas lipases comerciais variando-se a quantidade de solvente orgânico.

## 2.10 Considerações a respeito do estado da arte

A literatura aponta que o Brasil possui tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecidos. Avalia-se que paralelo ao excedente do óleo de soja no mercado, verifica-se a crescente demanda de óleos vegetais para a produção de combustíveis alternativos, devido à necessidade emergente de implantação de unidades produtoras de biodiesel. Diante deste cenário, o uso do óleo de soja para a produção de biodiesel torna-se uma alternativa interessante no contexto nacional atual.

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

Os fluidos pressurizados possuem várias vantagens sobre os solventes orgânicos líquidos, como a alta difusividade, que pode

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

Diante deste cenário, da carência de dados na literatura e da relevância científica e tecnológica, nos círculos acadêmico e industrial, é que se alicerça a proposta deste trabalho, que consiste na construção de um sistema e a produção de biodiesel em modo contínuo utilizando lipases como catalisador em meio pressurizado.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

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

#### 3.1 Materiais

Para a realização das reações foi utilizado óleo de soja refinado comercial marca SOYA, álcool etílico Merck (99,9% de pureza), lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435), imobilizada em resina de éster metacrílico, a qual atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo, lipase de *Rhizomucor mihei* (Lipozyme IM) imobilizada em resina de troca iônica, a qual apresenta especificidade nas posições 1,3 do triglicerídeo, gentilmente cedidas pela Intecnial S.A., Erechim, Brasil.

Os solventes utilizados foram propano, n-butano e dióxido de carbono, todos de procedência White Martins S.A. (com 99,5% pureza, fase líquida). As propriedades críticas dos solventes utilizados, dióxido de carbono, propano e n-butano foram tomadas de Reid *et al.* (1997).

Para as análises cromatográficas foram utilizados padrões do metil éster do ácido nervônico (C24:1) e o metil éster do ácido mirístico (C14) e como padrão interno foi adotado o ácido heptadecanoato de metila (C17:0), todos de procedência Sigma-Aldrich. Para o preparo das soluções foi utilizado como solvente n-heptano marca Merck, (99,9%), cuja pureza segue a Norma Européia EN14103.

#### 3.2 Equipamentos e Metodologia

##### 3.2.1 Determinação da atividade enzimática de lipases

O procedimento adotado para determinação da atividade enzimática das lipases foi aquele descrito por Feirhmann (2006). Sucintamente, a atividade das enzimas foi quantificada pelo consumo de

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



**Figura 3.1** - Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática.

A seguinte equação foi empregada para o cálculo da atividade das lipases:

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{[(V_0 \text{ NaOH}) - (V_{40} \text{ NaOH})] \times N \times 103}{t \times m_a} \quad (\text{III.1})$$

onde:

N = normalidade da solução de NaOH;

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

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

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

t = tempo de reação (min);

1 U = 1  $\mu\text{mol}$  de ácido/min.

A atividade das enzimas foi determinada no início e ao final das reações em todos os experimentos realizados, com o intuito de acompanhar as alterações da atividade das enzimas testadas quando do seu emprego na reação de transesterificação do óleo de soja em propano pressurizado.

### **3.2.2 Efeito do número de ciclos sobre a atividade da enzima Novozym 435**

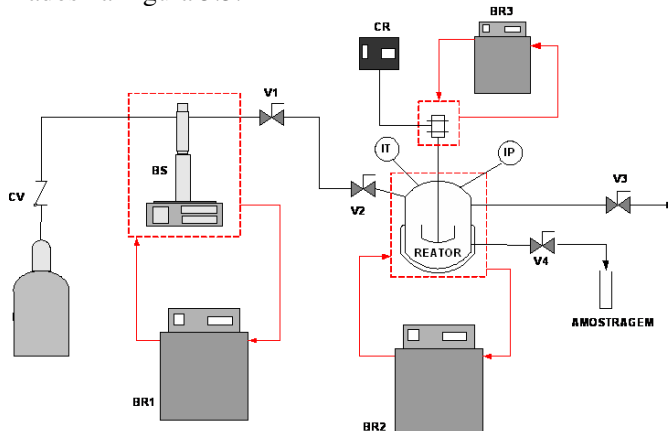
Em projetos de reatores tubulares empacotados com enzimas, torna-se relevante avaliar a estabilidade dos mesmos através do comportamento da atividade da enzima utilizada no leito do reator. Neste sentido, realizou-se um estudo que consistiu na re-utilização da enzima através de ciclos de reação de transesterificação e de purificação do catalisador em reator modo batelada.

O objetivo desta etapa foi verificar o comportamento da atividade da Novozym 435 após ser submetida a consecutivos tempos reacionais (6 horas de reação) durante 30 dias, nas condições de pressão de 50 bar, temperatura de 65 °C, razão molar óleo:etanol de 1:6 e razão mássica solvente:substrato de 2:1. Esta condição experimental, bem como a enzima comercial Novozym 435 foram selecionadas após ampla investigação realizada por Dalla Rosa *et al.* (2008).

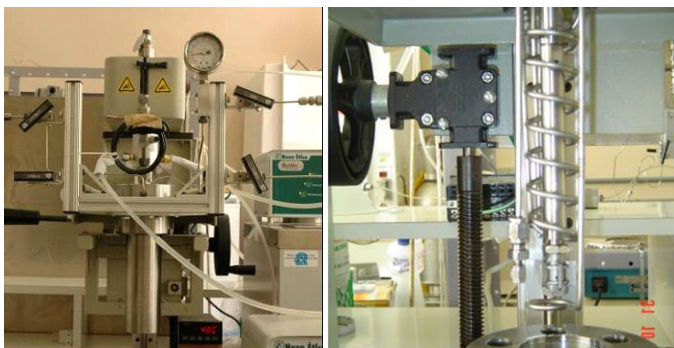
O aparato experimental consiste basicamente de um reator de aço inox de 300 mL, um cilindro de propano e uma bomba de alta pressão (ISCO, modelo 500 D). O reator era dotado de agitação mecânica e de uma serpentina interna para controle da temperatura. Três banhos termostáticos eram acoplados à unidade experimental, um empregado no sistema de agitação do reator, o qual era mantido a 10°C para evitar o aquecimento de tal sistema. Um segundo banho era conectado à serpentina interna do reator para controlar a temperatura da reação, enquanto que o terceiro banho era acoplado à bomba de seringa para manter constante a temperatura de alimentação do propano, permitindo

assim, computar a massa de solvente adicionada ao reator. Válvulas de esfera, de agulha e de uma via (*check-valves*), além de indicadores de temperatura e de pressão completavam a unidade experimental.

A Figura 3.2 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental, enquanto que detalhes da unidade experimental a respeito do sistema de amostragem, serpentina interna do reator para controle da temperatura, bem como uma vista geral da unidade podem ser visualizados na Figura 3.3.



**Figura 3.2** - Diagrama esquemático do aparato experimental modo batelada: cilindro de propano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BR1, BR2 e BR3) banhos termostáticos, (V1) válvula de segurança para a bomba, (V2) válvula de alimentação do reator, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (CR) comando do controle de agitação, (V3) válvula de alívio, (V4) válvula de amostragem.



**Figura 3.3** - Vistas da unidade experimental para transesterificação enzimática de óleo de soja em propano pressurizado em modo batelada.

O procedimento experimental consistia nos seguintes passos: primeiramente o banho BR1, conectado à bomba de alta pressão (BS), era acionado na temperatura de 7°C. Após o banho termostático (BR1) atingir a temperatura estabelecida, a “check valve” (CV) conectada ao cilindro de propano era aberta e adicionava-se uma carga deste solvente na bomba (BS), a fim de que o propano estivesse liquefeito. Este procedimento demorava em torno de 2 horas. Checavam-se as válvulas V1, V2, V3 e V4 para que estivessem fechadas, impedindo a passagem de gás para a linha. Neste intervalo de tempo, foram realizadas a determinação da atividade enzimática da Novozym 435 antes da reação, conforme descrito no item 3.2.1. O banho termostático BR2 conectado à serpentina do reator e o banho termostático BR3 conectado ao sistema de agitação eram ligados.

As quantidades de enzima, etanol e óleo de soja determinadas pelo estudo de Dalla Rosa *et al.* (2008), eram pesadas e adicionadas ao reator. A enzima era adicionada ao sistema por último e após sua adição o sistema era imediatamente fechado e pressurizado. A válvula V1 era então aberta e a linha era pressurizada na condição de pressão estabelecida para o experimento até a válvula V2. Após atingir a pressão desejada, anotava-se o volume de propano da bomba, a fim de controlar o volume que era adicionado no reator. A válvula V2 era então aberta com vazão constante de 20 mL/min. Após atingir a pressão desejada, o volume de propano adicionado era computado pelo decaimento do volume de solvente na bomba de seringa. O procedimento para preencher o reator com solvente e pressurizar o sistema demandava em média 5 minutos. Quando o sistema de agitação (CR) era acionado, anotava-se o início do tempo reacional, quando se promovia a interação do solvente com o substrato, propiciando as condições para que a reação tivesse início. Monitorava-se constantemente o vazão da bomba (BS), a pressão (IP) e a temperatura (IT) do sistema.

Depois de cumprido o tempo estabelecido para amostragem de 6 horas, amostras eram retiradas através da válvula V4 e recebidas em balões volumétricos de 10 mL e preparadas para análise cromatográfica. Ao final do tempo de reação, o sistema era despressurizado manualmente através da válvula de alívio V3. O sistema demandava em média 1 hora para sua total despressurização. O sistema era aberto e o vaso do reator desconectado do mesmo. O conteúdo do reator era filtrado a vácuo com o auxílio de n-hexano, a fim de lavar e reter a enzima utilizada na reação. Com uma fração da enzima retida, foi realizada a determinação da atividade enzimática final do ciclo e o restante da enzima foi novamente introduzido no ciclo reacional seguinte.



### 3.2.3 Cálculos preliminares e montagem do aparato experimental de modo contínuo

#### Determinação do volume total do reator

Sendo o reator construído a partir de tubos de aço inox 316 L, com o diâmetro externo de 1/4 de polegada, calcula-se o volume do reator através de seu diâmetro interno (0,360 cm) e comprimento utilizado (206,9 cm).

#### Cálculo da porosidade do leito

A porosidade do leito foi determinada de duas formas. Primeiramente a porosidade foi determinada através da via seca, com a melhor precisão possível e com o diâmetro de proveta que mais se aproxima do diâmetro do reator. Determina-se o peso de uma proveta ( $m_1$ ), então uma amostra de enzima é colocada na proveta, anotando-se novamente o peso da proveta com a enzima ( $m_2$ ) e o volume lido na proveta ( $V$ ) após nivelar a superfície superior da mesma.

O procedimento de empacotamento da amostra de sólido na proveta é o mesmo mencionado para preencher o reator. A densidade do sólido é previamente estabelecida dividindo-se uma certa massa de enzima por um determinado volume.

De posse da densidade do sólido ( $\rho_s$ ) calcula-se a porosidade do leito,  $\epsilon_L$ , pela seguinte equação:

$$\epsilon_L = 1 - \left( \frac{m_2 - m_1}{V \times \rho_s} \right) \quad (\text{III.2})$$

Outra metodologia utilizada para determinação da porosidade do leito consistiu em adicionar o cômputo da porosidade interna da enzima. Neste caso, a porosidade do leito deve considerar o volume do soluto (enzimas) que ocupa o leito do reator e o volume de poros da enzima, como mostra a seguinte equação:

$$\epsilon_L = 1 - \left( \frac{V_E - V_P}{V_R} \right) \quad (\text{III.3})$$

onde:

$V_E$  = volume ocupado pelas enzimas no leito do reator

$V_R$  = volume do leito do reator

$V_P$  = volume de poros das enzimas que ocupam o leito do reator

Para o cálculo do volume ocupado pelas enzimas ( $V_E$ ) obtiveram-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa (realizado manualmente) e diâmetro médio das partículas da enzima (calculado pela média da observação do resultado de análise de MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura).

O volume de poros ( $V_P$ ) é obtido multiplicando a massa da amostra de enzima empacotada no leito do reator pelo volume médio específico de poros. Neste caso, foram adotados dois diferentes valores de volume de poros:

$V_{P1}$  = dado pela ficha técnica do fabricante da enzima (0,5 mL/g).

$V_{P2}$  = dado pela análise de BET (adsorção de nitrogênio à temperatura de 373K) realizada em equipamento disponível no Laboratório da URI-Campus de Erechim (Quatachome, série Nova 2200e), tendo resultado em 0,3 mL/g. (Apêndice F).

### **Cálculo do tempo de residência**

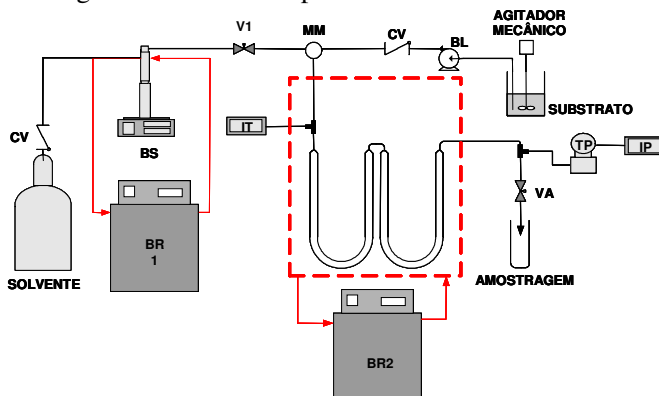
O tempo de residência adotado no presente trabalho considera a porosidade do leito multiplicado pelo seu volume e dividido pela vazão de alimentação de substratos a ser utilizada no processo.

$$\tau = \frac{\epsilon_L \times V_R}{q} \quad (\text{III.4})$$

#### ***3.2.4 Montagem do aparato experimental do reator contínuo de leito empacotado***

A unidade experimental utilizada para produção de biodiesel etílico a partir de óleo de soja com a enzima Novozym 435 em fluido pressurizado em modo contínuo consiste basicamente de um reator tubular de aço 316, um cilindro de propano e uma bomba de alta pressão (ISCO, modelo 500 D) e uma bomba de líquidos (Acuflow Series III Pump). Dois banhos termostáticos eram acoplados à unidade

experimental, um banho era empregado para imersão do reator para controlar a temperatura da reação, enquanto que o segundo banho era acoplado à bomba de seringa para manter constante a temperatura de alimentação do propano, permitindo assim, computar a massa de solvente adicionada ao reator. Válvulas de esfera, de agulha e de uma via (*check-valves*), além de indicadores de temperatura e de pressão completavam a unidade experimental. A Figura 3.4 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental, enquanto que na Figura 3.5, uma vista geral da unidade é apresentada.



**Figura 3.4** - Diagrama esquemático do aparato experimental: cilindro de propano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BL) bomba de líquidos, (BR1 e BR2) banhos termostáticos, (IT) indicador de temperatura, (IP) indicador de pressão, (TP) transdutor de pressão, (MM) micromisturador, (V1) válvula de alimentação, (V2) válvula de amostragem.

O procedimento experimental consistia nas seguintes etapas: primeiramente o banho BR1, conectado à bomba de alta pressão (BS), era acionado na temperatura de 5°C. Após o banho termostático (BR1) atingir a temperatura estabelecida, a “check valve” (CV) conectada ao cilindro de gás era aberta e adicionava-se uma carga deste solvente na bomba (BS), a fim de que o gás estivesse liquefeito. Este procedimento durava em torno de 2 horas. Checavam-se as válvulas V1 e V2 para que estivessem fechadas, impedindo a passagem de gás na linha. O banho termostático (BR2) era acionado à temperatura estabelecida para realizar a reação. Os recipientes contendo os substratos eram submetidos a um banho ultrasônico pelo período de 30 minutos afim de eliminar bolhas de ar e após conectado a bomba de líquidos (BL). A enzima era empacotada no leito do reator sob a ação de um agitador magnético, a fim de realizar um empacotamento mais eficiente, conforme Rodriguez

*et al.* (2005). Realizado o empacotamento, o reator era acoplado ao sistema reacional e imerso no banho termostático (BR2).



**Figura 3. 5** - Vista geral do aparato experimental de produção enzimática de biodiesel em propano pressurizado em modo contínuo.

Com o aparato pronto para operação, iniciava-se o aumento de pressão lentamente através da bomba (BS). Depois de estabilizada a pressão, anotava-se o volume de gás da bomba. A válvula V1 era então aberta e a linha e o reator eram pressurizados na condição de pressão estabelecida para o experimento até a válvula V2. Após atingir a pressão desejada, anotava-se o volume de propano da bomba, afim de controlar o volume que havia sido adicionado no reator. Após atingir a pressão desejada, o volume de gás adicionado era computado pelo decaimento do volume de solvente na bomba de seringa. O procedimento para preencher o reator com solvente e pressurizar o sistema demandava em média 20 minutos. A válvula V2 era então aberta permanentemente com vazão estabelecida. Após estabilizada esta vazão, acionava-se a bomba de líquidos que captava e misturava o óleo e etanol nas proporções pré estabelecidas.

Quando a bomba de líquidos era acionada, anotava-se o início do tempo reacional, quando se promovia a interação do solvente com o substrato, propiciando as condições para que a reação tivesse início. Monitorava-se constantemente a vazão da bomba (BS), a pressão (IP) e a temperatura (IT) do sistema.

Depois de cumprido o tempo estabelecido para amostragem, as

amostras eram retiradas através da válvula V2 e recebidas em recipientes apropriados e preparadas para análise cromatográfica. Ao final do tempo de reação, o sistema era despressurizado manualmente através da válvula V2, o que demandava em média 30 minutos para total despressurização. O sistema era aberto e o reator desconectado do mesmo. O conteúdo do reator era filtrado a vácuo com o auxílio de n-hexano, a fim de lavar e reter a enzima utilizada na reação. Com uma fração da enzima retida, foi realizada a determinação da atividade enzimática final.

### ***3.2.5 Seleção da condição experimental para testes preliminares e checagem do reator***

Inicialmente alguns testes preliminares com o dióxido de carbono, propano e n-butano foram realizados a fim de identificar o solvente e as condições de vazão mais apropriadas para a condução das reações de transesterificação em leito empacotado.

Para determinar as condições deste estudo, alguns trabalhos da literatura foram considerados. Oliveira e Oliveira (2001) realizaram a alcoólise do óleo de dendê em dióxido de carbono supercrítico, utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme IM como catalisadores e observaram resultados superiores quando foi empregada a primeira lipase. Feihrmann *et al.* (2006), ao avaliar o comportamento da atividade destas duas lipases em propano comprimido, também observaram que a Novozym 435 apresentou desempenho superior à Lipozyme IM. Dalla Rosa *et al.* (2008) investigaram a produção de ésteres etílicos em modo batelada em propano pressurizado a partir de óleo de soja, utilizando como catalisadores as lipases Novozym 435 e Lipozyme IM e observaram que a lipase Novozym 435 apresentou resultados superiores. Desta forma, para o desenvolvimento deste estudo preliminar empregou-se a lipase Novozym 435.

Lanza (2004) observou que em pressões acima de 40 bar o sistema composto por óleo de soja e propano encontra-se em uma única fase em temperaturas entre 30 e 70°C em toda a faixa de composição da mistura. Considerando que o sistema reacional era formado, no decorrer da reação, também por glicerol, optou-se por conduzir as reações na pressão de 50 bar. Os sistemas contendo n-butano e dióxido de carbono foram submetidos à mesma avaliação para escolha da faixa de trabalho e segundo Lanza (2004), nos sistemas contendo óleo de soja e n-butano, em pressões acima de 20 bar o sistema se encontra em uma única fase

em temperaturas entre 30 e 70°C em toda a faixa de composição, já para o dióxido de carbono, a pressão de trabalho deve ser no mínimo 150 bar e 70 °C para contemplar uma região de uma única fase, para teores de CO<sub>2</sub> inferiores a 30% (m/m).

Em relação à temperatura, a faixa ótima de operação da Novozym 435 na reação padrão para medida da atividade situa-se em torno de 70°C. Assim sendo, optou-se por fixar o nível superior da temperatura em 70°C. Dalla Rosa *et al.* (2008) avaliaram o efeito da razão molar óleo:etanol e do efeito da razão solvente:substrato sobre a transesterificação de óleo de soja e constataram que ambas as variáveis foram significativas na conversão da reação, obtendo os melhores resultados com a razão molar óleo:etanol de 1:6 e de solvente:substrato de 2:1. Neste sentido, a fim de avaliar o sistema investigado e checar a operação do equipamento, as variáveis significativas deste estudo foram extrapoladas e as condições experimentais foram assim definidas como trabalho preliminar.

Um estudo para investigar a melhor vazão a ser empregada no sistema foi conduzido utilizando propano, n-butano e dióxido de carbono, variando a vazão de substratos em 0,5, 1 e 2 mLmin<sup>-1</sup>, nas seguintes condições: para todos os gases a razão molar óleo:etanol de 1:6, razão solvente:substrato de 2:1 e temperatura de 70°C. A pressão empregada para o propano foi de 50 bar, para o n-butano 20 bar e o dióxido de carbono, 150 bar.

Para todas as condições experimentais foram retiradas amostras nos intervalos de tempos de residência a fim de avaliar a cinética da reação, até que se tivesse volume de gás suficiente para conduzir a reação. O experimento com dióxido de carbono com razão mássica de solvente:substrato de 10:1 não foi realizado porque não haveria volume de gás suficiente para atingir um único tempo de residência completo.

### 3.2.6 Planejamento de experimentos

Com base nos resultados obtidos, foi realizado um planejamento de experimentos completo, que compreendeu a avaliação do efeito das seguintes variáveis na conversão em biodiesel: temperatura (30 à 70°C), pressão (50 à 150 bar), razão molar óleo:etanol (1:6 à 1:18) e razão solvente:substrato (4:1 à 10:1), conforme a Tabela 3.2.

**Tabela 3. 1** - Valores reais e codificados das variáveis do primeiro planejamento de experimentos utilizando propano como solvente.

Ensaio	Razão mássica solvente/substrato	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Razão molar óleo/etanol
1	-1 (4:1)	-1(30)	-1(50)	-1(1:6)
2	1(10:1)	-1(30)	-1(50)	-1(1:6)
3	-1 (4:1)	1(70)	-1(50)	-1(1:6)
4	1(10:1)	1(70)	-1(50)	-1(1:6)
5	-1(4:1)	-1(30)	1(150)	-1(1:6)
6	1(10:1)	-1(30)	1(150)	-1(1:6)
7	-1(4:1)	1(70)	1(150)	-1(1:6)
8	1(10:1)	1(70)	1(150)	-1(1:6)
9	-1(4:1)	-1(30)	-1(50)	1(1:18)
10	1(10:1)	-1(30)	-1(50)	1(1:18)
11	-1(4:1)	1(70)	-1(50)	1(1:18)
12	1(10:1)	1(70)	-1(50)	1(1:18)
13	-1(4:1)	-1(30)	1(150)	1(1:18)
14	1(10:1)	-1(30)	1(150)	1(1:18)
15	-1(4:1)	1(70)	1(150)	1(1:18)
16	1(10:1)	1(70)	1(150)	1(1:18)
17	0(7:1)	0(50)	0(100)	0(1:12)
18	0(7:1)	0(50)	0(100)	0(1:12)
19	0(7:1)	0(50)	0(100)	0(1:12)

Considerando os efeitos das variáveis obtidas neste planejamento, foi realizado um segundo planejamento de experimentos completo com faixas mais estreitas de temperatura (60 à 80°C) e pressão (40 à 80 bar), sendo que as outras variáveis foram fixadas no ponto central do primeiro planejamento, conforme apresentado na Tabela 3.3. O software Statistica 6.0 foi utilizado para auxiliar na análise das informações experimentais, adotando em todos os casos investigados um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Observando os dados obtidos no planejamento acima, alguns testes complementares foram propostos visando aprimorar ou mesmo manter os níveis de conversões obtidos até o momento. Para tanto, observou-se que as conversões da reação mantiveram-se estáveis até aproximadamente 4 tempos de residência, havendo depois uma queda em direção a patamares inferiores. De um ponto de vista prático, um conjunto de reatores poderia ser usado, intercalando cargas de

alimentação, com a retirada dos produtos do reciclo e/ou passagem dos mesmos através de outros reatores afim de melhorar os rendimentos em termos de conversão de ésteres.

**Tabela 3. 2** - Valores reais e codificados das variáveis do segundo planeamento de experimentos utilizando propano como solvente.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
1	-1(60)	-1(40)
2	1(80)	-1(40)
3	-1(60)	1(80)
4	1(80)	1(80)
5	0(70)	0(60)
6	0(70)	0(60)
7	0(70)	0(60)

Poder-se-ia ainda, periodicamente, interromper a alimentação dos substratos do reator de leito empacotado para que este sofresse uma carga de propano pressurizado em uma vazão que promovesse a remoção do glicerol envolto na superfície das enzimas, melhorando assim o desempenho da reação em termos de atividade da enzima. A reação poderia então ser reiniciada bombeando os substratos novamente e dando prosseguimento à reação.

Neste sentido, testes com a passagem de propano para remoção do glicerol estagnado e testes com passagem dos produtos da reação em novo leito de reator, foram realizados.

### Testes com passagem de propano

Testes com passagem de propano foram realizados com o intuito de aprimorar o rendimento do processo ou manter os níveis de rendimentos atingidos até o quarto tempo de residência. A interrupção da passagem de carga de substratos foi substituída pela passagem apenas do solvente, mantendo o mesmo reator de leito empacotado. Após a passagem do solvente, o teste teve prosseguimento por mais quatro tempos de residência.

Para tanto, duas vazões de passagem do solvente foram avaliadas. Uma das vazões corresponde à vazão de passagem de solvente durante



os experimentos, sem que fosse necessário perturbar o sistema, apenas interrompendo a passagem dos substratos, sendo que um (1) tempo de residência foi adotado como o tempo de passagem do solvente. Os valores do volume de propano utilizados nessa passagem de “limpeza” foram anotados.

Outra vazão avaliada foi a de sobrecarga, adotando-se uma vazão cinco vezes maior da utilizada no primeiro experimento. Após o quarto tempo de residência, repetiu-se a interrupção da passagem dos substratos e o tempo de passagem do solvente foi determinado em função do volume de propano, para que fosse correspondente ao empregado no primeiro teste.

### **Testes de passagem de produtos em novo leito**

Nestes testes, a cada quatro tempos de residência a reação foi interrompida e todos os componentes que saíram da passagem do leito do reator foram coletados e submetidos à corrente de nitrogênio à 50°C para evaporação de etanol e centrifugação à 5000 rpm para precipitação do glicerol. O material evaporado e centrifugado era circulado em um novo leito de reator, com enzimas não utilizadas.

### **3.3 Método para determinação da conversão de ésteres**

Após a coleta da amostra em frascos apropriados, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, evaporou-se o etanol com uma corrente de nitrogênio, onde a amostra era aquecida sob chapa de aquecimento à 50°C até peso constante. Uma alíquota de 0,250 g da amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Sobre esta amostra foi adicionado 5 mL de solução de padrão interno de heptadecanoato de metila em concentração de 10 mg/mL com auxílio de uma pipeta graduada. A amostra foi agitada e uma alíquota (cerca de 1 mL) transferida para os vials dando seqüência a análise cromatográfica.

A solução era então injetada em triplicata em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo 2010) equipado com uma coluna capilar apolar modelo RT-WAX (contendo polietileno glicol na fase estacionária), de 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 150°C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, taxa de aquecimento de

10°C/min até atingir a temperatura final da coluna de 250°C, permanecendo por 1 minuto nesta condição. A temperatura do injetor e do detector foram estabelecidas em 250°C. A quantidade da solução de amostra injetada foi de 1 µL.

As informações aqui reportadas sobre os preparos de soluções, bem como as condições cromatográficas, tipo de coluna e demais detalhes do procedimento para determinação da conversão de ésteres, seguem as especificações da Norma Européia EN14103, segundo documento oficial publicado em 01/06/01 com número de projeto: 1999/00751, que pode ser observado no Apêndice G.

A equação a seguir expressa em porcentagem a conversão de ésteres:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ei}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei}}{W} \times V_{ei} \times 100$$

Onde:

$\sum A$  = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1.

$A_{ei}$  = é a área correspondente ao pico do padrão interno, C17:0.

$C_{ei}$  = é a concentração, em mg/mL, da solução de padrão interno, C17:0.

$V_{ei}$  = é o volume da solução de padrão interno adicionada a amostra.

$W$  = é a massa, em mg, da amostra de biodiesel.

Alguns exemplos de cálculos, bem como seus respectivos cromatogramas podem ser observados no Apêndice G.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

Os resultados do efeito do número de ciclos de utilização da enzima em reação em modo batelada bem como os resultados de conversão dos testes preliminares e dos planejamentos de experimentos em modo contínuo serão apresentados neste capítulo. Buscou-se ainda neste capítulo um melhor detalhamento dos cálculos preliminares, a montagem do aparato experimental e dos métodos analíticos empregados.

#### 4.1 Efeito do número de ciclos sobre a atividade da enzima Novozym 435

As reações de transesterificação foram realizadas durante 30 dias em uma sucessão de etapas de 6 h de reação utilizando propano pressurizado como solvente em modo batelada, seguida por uma etapa de recuperação do catalisador usando o solvente n-hexano como agente enxaguante. Assim, a enzima não foi substituída durante os 30 dias de investigação. A reação foi conduzida na condição de pressão de 50 bar, temperatura de 65°C, concentração de enzima de 20% (m/m), razão molar óleo:etanol de 1:6 e razão mássica solvente:substrato de 2:1.

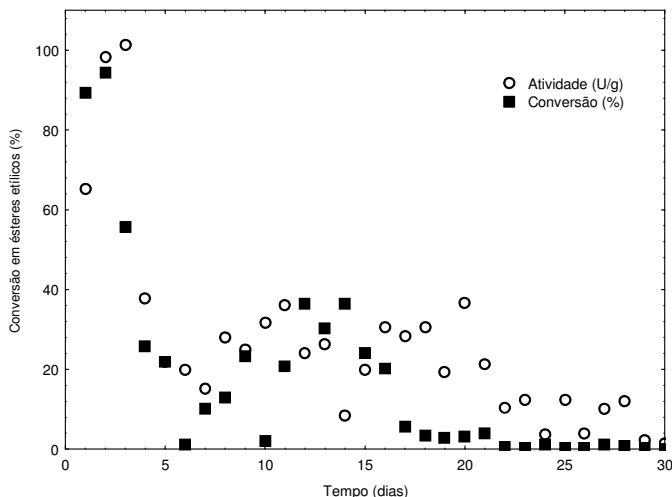
Os resultados de atividade enzimática e de conversão em ésteres etílicos estão apresentados na Figura 4.1.

Observou-se que inicialmente a atividade da enzima era de 120 U/g e a conversão de ésteres etílicos após a primeira etapa de reação era de 89,4%. Quando a conversão de ésteres etílicos da reação é comparada à atividade da enzima, ambas em função do número de ciclos reacionais, notou-se um declínio mais acentuado de ambos resultados a partir da quarta etapa onde a conversão em ésteres observada era de 25,8% e a atividade da enzima de 37,7 U/g. A partir desta etapa os níveis de atividade enzimática mantiveram-se sem grandes alterações até a última fase do ciclo (30 ciclos) e a conversão apresentou um decréscimo gradativo.

A perda de atividade da enzima coincidiu com a redução do desempenho da reação, com isso, observou-se que a lipase imobilizada de *Candida antarctica* se mostrou instável em períodos prolongados de reação nas condições investigadas.

Laudani *et al.* (2007) pesquisaram a produção em modo contínuo

de n-octil oleato utilizando dióxido de carbono como solvente e a lipase Lipozyme IM como catalisador, realizando um estudo sobre o ciclo de vida desta enzima. A conversão permaneceu constante em torno de 90% durante os 50 dias.



**Figura 4.1** - Comportamento da conversão e atividade enzimática da lipase Novozym 435 em ciclos de reuso de 30 dias em modo batelada. Condições experimentais: pressão de 50 bar, temperatura de 65°C, concentração de enzima de 20% (m/m), razão molar óleo:etanol de 1:6 e razão mássica solvente:substrato de 2:1.

Knez *et al.* (1998) observaram, na síntese de oleil oleato, utilizando Lipozyme IM e diferentes gases comprimidos como solvente, em várias faixas de temperatura e pressão, que não houve perda de atividade da lipase em pressões de até 300 bar por tempos de até 350 min de reação. Neste mesmo estudo, os autores reportam que quanto menor o diâmetro das partículas da enzima (menor valor investigado de 250  $\mu\text{m}$ ) maior é o incremento da taxa inicial de reação para este sistema.

Dossat *et al.* (1999) investigaram o fenômeno associado com a perda de atividade enzimática com a presença de glicerol adsorvido no suporte em reação de transesterificação de óleo de soja utilizando a lipase Lipozyme IM em solvente orgânico n-hexano em reator batelada, e observaram que para cada composto polar adsorvido no suporte (glicerol), havia um decréscimo da atividade da enzima e quanto maior a quantidade de glicerol adsorvida, mais marcante era este efeito.

No estudo realizado por Knez e Habulin (2001), referente ao ciclo de uma lipase de pâncreas suíno submetida à propano pressurizado a 100 bar e temperatura de 40°C utilizando como substratos ácido butírico e etanol, observou-se que a conversão decresceu pela metade após 10 ciclos reacionais. Os autores relatam que o aumento da concentração de água remanescente da reação na superfície da enzima pode ser uma das razões para este decréscimo de conversão.

A fim de evitar tais interferentes, Lozano *et al.* (2004) investigaram a síntese de butil butirato em dióxido de carbono supercrítico em lipases imobilizadas em CALB a temperatura de 60°C e pressão de 8 MPa. A atividade da lipase se manteve estável durante os 8 ciclos, que correspondiam a 6 horas de reação contínua.

Os resultados obtidos acerca do número de ciclos de utilização da enzima Novozym 435 apontam que sua reutilização em ciclos prolongados pode levar ao decréscimo da sua atividade enzimática com correspondente queda nos níveis de produção de ésteres. Embora tais resultados não possam ser diretamente estendidos ao uso da referida enzima em modo contínuo, devido principalmente ao menor estresse mecânico em tal operação, prevê-se com base em tais dados que seu emprego deverá também ocasionar redução gradual da conversão da reação, fato a ser explorado no presente trabalho.

## 4.2 Determinação da atividade enzimática de lipases

No que concerne à oscilação da atividade enzimática observada no início e ao final das reações em modo contínuo é possível relatar que houve alteração na atividade da lipase, sendo que a atividade inicial manteve-se estável em 120 U/g e a atividade final em todos os experimentos que se seguiram até o final deste estudo, foram muito similares (em torno de 90 U/g). Num contexto mais amplo, as conversões obtidas estão relacionadas a todas as condições do processo e não somente à atividade enzimática, conforme relatou Oliveira (1999), quando avaliou a atividade enzimática da Lipozyme IM e da Novozym 435 em diferentes condições experimentais em CO<sub>2</sub> supercrítico, num sistema reacional completo (substrato, produtos, enzima e solvente). Ainda, cabe salientar que o processo de desempacotamento do reator para retirada das enzimas e posterior análise, era realizado de forma possivelmente danosa ao catalisador, não sendo possível portanto, associar com confiança a perda de atividade sugerida com as condições da reação.

### 4.3 Cálculos preliminares a montagem do aparato experimental

#### 4.3.1 Exemplo de cálculo da vazão volumétrica de fluido (propano) do processo

No estudo de Dalla Rosa *et al.* (2008) verificou-se que a razão molar óleo:etanol mais adequada para as reações de produção de biodiesel, modo batelada, com óleo de soja utilizando enzima Novozym 435 como catalisador e propano como solvente em modo batelada, foi de 1:6. A razão mássica solvente:substrato que apresentou as melhores conversões foi de 2:1.

Como base para algumas reações preliminares deste estudo, foram fixadas as melhores condições obtidas no estudo do referido grupo. Considerando uma vazão de operação de substratos viável pela bomba de líquidos de 0,5 mL/min e dados do ítem 4.4, calculou-se a partir da porcentagem volumétrica para cada um dos componentes, a vazão mássica para os substratos (total): 0,258g/min.

Então, para a relação mássica de propano:substrato de 2:1, obtém-se imediatamente 0,516 g/min de propano. Sendo a densidade do propano à temperatura de 5°C e pressão de 50 bar de 0,531 g/cm<sup>3</sup>, obtém-se a vazão volumétrica de operação deste fluido como: 0,97 mL/min.

#### 4.3.2 Cálculo do volume do reator

O emprego da equação clássica para cálculo do volume do reator,  $V_R$ , resultou em  $V_R = 21,06$  mL.

#### 4.3.3 Cálculo da porosidade do leito

##### Porosidade via seca

Primeiramente, a porosidade foi determinada conforme explicado no ítem 3.2.3. Após o cálculo de densidade do sólido, obteve-se a porosidade do leito através da Equação (III.2):  $\epsilon_L = 0,51$ .

### Porosidade considerando volume de poros da enzima

Empregou-se a Equação (III.3) para o cálculo da porosidade do leito, considerando os seguintes valores para o volume de poros:

$$V_{P1} = 0,5 \text{ mL/g} \quad \Longrightarrow \quad \epsilon_{L1} = 0,86$$

$$V_{P2} = 0,3 \text{ mL/g} \quad \Longrightarrow \quad \epsilon_{L2} = 0,78$$

#### 4.3.4 Cálculo de tempo de residência

Aplicando a Equação (III.4), para a vazão estabelecida de 0,5 mL/min, conforme ítem 4.4, obtém-se, respectivamente, para  $\epsilon_{L1}$  e  $\epsilon_{L2}$ :

$$\tau_1 = 36,22 \text{ min} \quad \text{e} \quad \tau_2 = 32,85 \text{ min}$$

Nos experimentos que seguem, será adotado o tempo de  $\tau_1 = 32,85 \text{ min}$ , em que a porosidade do leito calculada utilizou o volume de poros da enzima analisada por BET.

### 4.4 Avaliação dos experimentos realizados como testes preliminares e checagem do reator

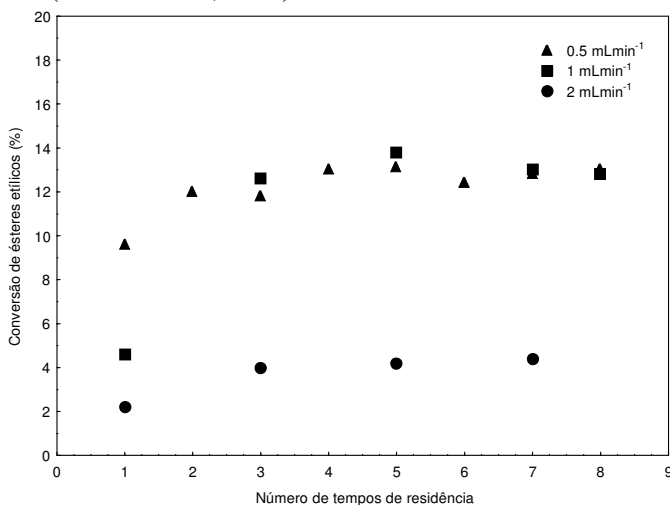
Alguns testes preliminares com o dióxido de carbono, propano e n-butano foram realizados a fim de identificar o solvente e as condições de vazão mais apropriadas para a condução das reações de transesterificação em leito empacotado.

#### Estudo das condições de vazão

Um estudo para investigar a melhor vazão de substratos a ser empregada no sistema foi conduzido utilizando propano e butano, variando a vazão em 0,5, 1 e 2 mLmin<sup>-1</sup>.

Primeiramente, as reações foram conduzidas em propano pressurizado a 50 bar e 60°C, razão molar óleo:etanol de 1:6 e razão mássica solvente:substrato de 2:1. Os resultados que expressam as condições de vazão testadas estão representados na Figura 4.2, onde

observa-se que conversões similares, próximas a 15%, foram alcançadas para os vazão de 0,5 e 1 mLmin<sup>-1</sup>, quando vazões mais elevadas foram empregadas, 2 mLmin<sup>-1</sup>, observou-se uma significativa redução na conversão da reação. Um dos fatores que pode justificar tal comportamento é o baixo contato das enzimas com os substratos nesta conformação do reator tubular dada pela alta velocidade superficial dos substratos (Laudani et al., 2007).

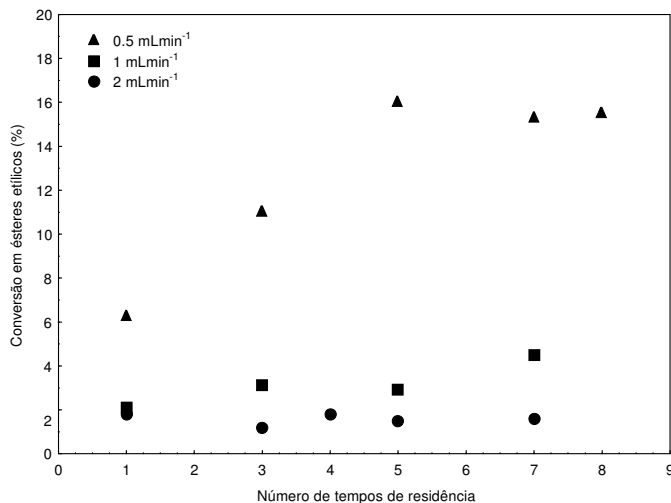


**Figura 4. 2** – Efeito da vazão volumétrica de substratos na conversão em ésteres utilizando propano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 6:1, pressão de 50 bar e temperatura de 70°C.

Para o n-butano, as reações foram realizadas nas mesmas condições do experimento com propano, mas a 20 bar de pressão. Essa pressão foi selecionada com base nos dados de equilíbrio de fases, conforme mencionado anteriormente, e ainda porque esta pressão conduziu a um valor de densidade do n-butano (0,539 gcm<sup>-3</sup>) próximo ao utilizado pelo propano (0,456 gcm<sup>-3</sup>).

Pode-se observar através dos resultados obtidos para o n-butano (Figura 4.3) e novamente a vazão de 0,5 mLmin<sup>-1</sup> apresentou resultados mais interessantes. Esta vazão foi adotada para os experimentos que seguem neste trabalho. É necessário admitir que, até o momento, as conversões obtidas não são expressivas para aplicações industriais para ambos os solventes.





**Figura 4.3** – Efeito da vazão volumétrica de substratos na conversão em ésteres utilizando n-butano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 6:1, pressão de 20 bar e temperatura de 70°C.

### Avaliação do solvente e operação do reator

A fim de avaliar o sistema investigado e checar a operação do equipamento, selecionaram-se algumas condições experimentais que foram assim definidas como trabalho preliminar e podem ser observadas na Tabela 4.1, como citado no Capítulo 3.

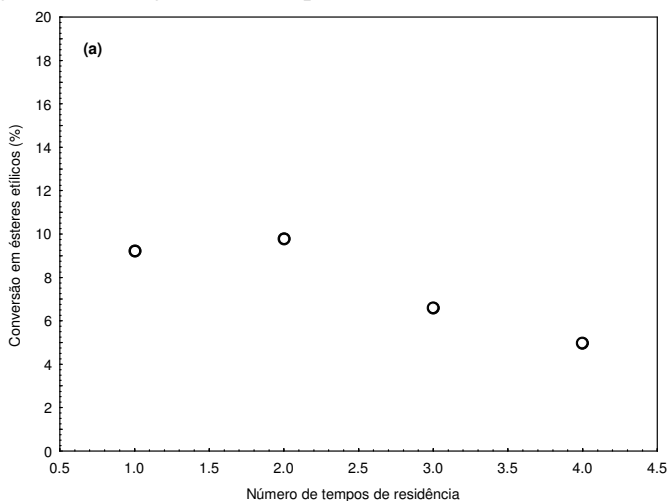
**Tabela 4.1** – Condições experimentais dos trabalhos preliminares

	Razão molar óleo:etanol	Razão mássica solv.: subst.	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
Propano - 1	20:1	10:1	50	70
Propano - 2	20:1	4:1	50	70
n-butano - 1	20:1	10:1	20	70
n-butano - 2	20:1	4:1	20	70
CO <sub>2</sub> - 1	20:1	4:1	150	70
Sem solvente	20:1	-	50	70

Parece pertinente citar que o aparato experimental, como um todo, apresentou boa condição do ponto de vista operacional, no que se refere à montagem e desmontagem do reator, de fácil empacotamento, manutenção/estabilização da vazão e estabilidade da temperatura e pressão do sistema. Viabiliza a recuperação das enzimas facilmente ainda quando este se encontra no leito do reator. Entretanto, necessita de aprimoramento na técnica de desempacotamento do leito de reator de forma a facilitar a recuperação das enzimas utilizadas no processo.

Esta etapa tem como intuito avaliar melhor a eficiência do processo quando este é submetido a um aumento significativo da razão mássica solvente:substrato e da razão molar óleo:etanol. A idéia implica testar os limites superiores da atividade da enzima relatados pela Ficha Técnica desta enzima (Apêndice E) para avaliar a possível inibição da enzima pelo excesso de substratos e ainda verificar se com o aumento da relação solvente:substrato ocorre a formação de algum tipo de instabilidade na vazão interna do reator.

Os resultados para o propano (densidade de  $0,425 \text{ gcm}^{-3}$ ) à temperatura de  $70^\circ\text{C}$ , pressão de 50 bar, razão molar óleo:etanol de 1:20 e razão mássica de solvente:substrato de 4:1 e de 10:1 são apresentados nas Figura 4.4a e Figura 4.4b, respectivamente.



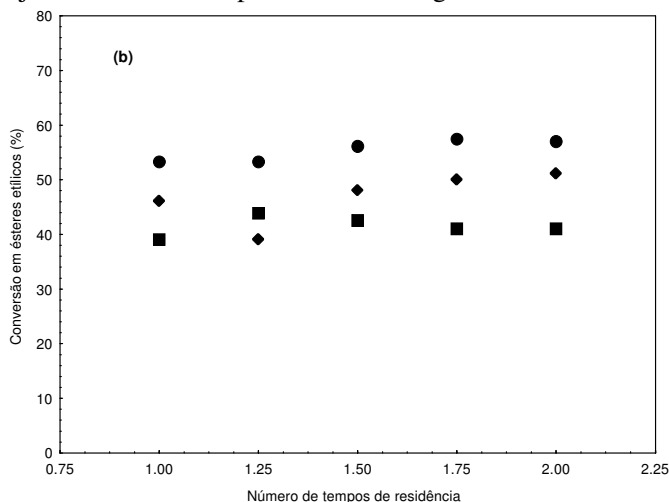
**Figura 4. 4a**– Avaliação do solvente na conversão em ésteres utilizando propano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 50 bar e temperatura de  $70^\circ\text{C}$ .

Observa-se que com o aumento da razão solvente:substrato de 4:1 (Figura 4.4a) para 10:1 (Figura 4.4b), a conversão da reação tem um acréscimo significativo. Os baixos valores (~10%) passam a ser substituídos por valores consideráveis, de cerca de 50%, apontando que este solvente merece uma investigação mais aprofundada.

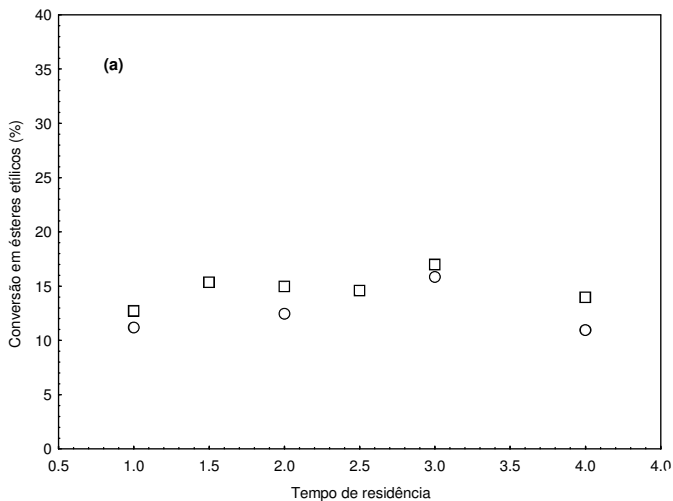
Deve-se observar ainda que a reprodutibilidade dos dados experimentais dos experimentos realizados em triplicata (Figura 4.4b) parecem satisfatórios, reafirmando a confiabilidade das informações extraídas deste trabalho.

É oportuno neste momento salientar que pode ser de grande importância para a exploração do trabalho a manutenção da conversão em mais tempos de residência. Adicionalmente, vale salientar a boa estabilidade operacional do sistema em modo contínuo.

O mesmo teste foi conduzido para o n-butano (densidade de  $0,519 \text{ gcm}^{-3}$ ) à temperatura de  $70^\circ\text{C}$ , pressão de 20 bar, razão molar óleo:etanol de 1:20 e razão mássica de solvente:substrato de 4:1 e de 10:1, cujos resultados são apresentados na Figura 4.5a.



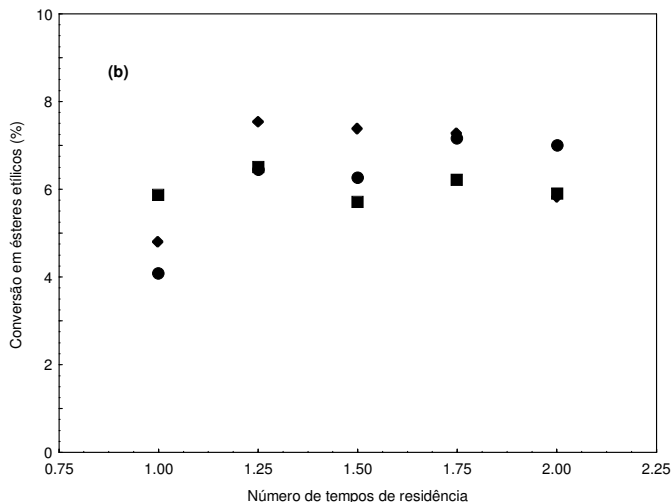
**Figura 4. 4b** – Avaliação do solvente em triplicata de experimento na conversão em ésteres utilizando propano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 10:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 50 bar e temperatura de  $70^\circ\text{C}$ .



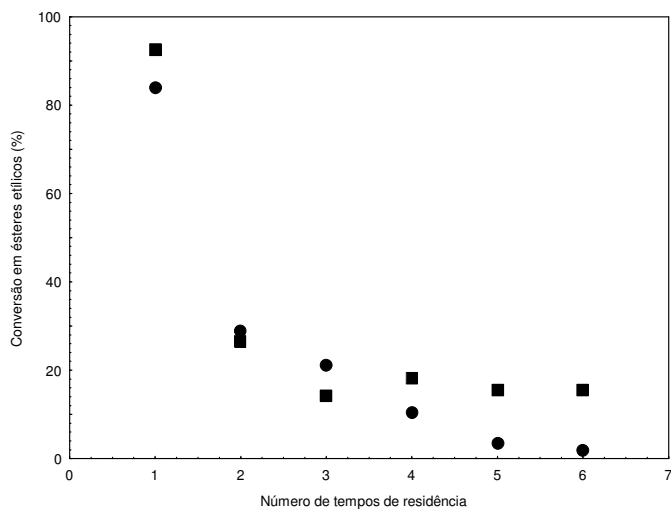
**Figura 4. 5a** – Avaliação do solvente na conversão em ésteres utilizando n-butano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 10:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 20 bar e temperatura de 70°C.

Observa-se que as razões solvente:substrato de 4:1 (Figura 4.5a) e 10:1 (Figura 4.5b) não apresentaram resultados satisfatórios se comparados com o propano, significando que o aumento da relação solvente/substrato não implicou em aumento relevante nas conversões da reação. Este aspecto induz a crer que o n-butano não demonstra potencial que justifique a realização de um estudo mais aprofundado.

As reações em modo contínuo foram igualmente empregadas com o uso de dióxido de carbono (densidade de 0,504 gcm<sup>-3</sup>) à temperatura de 70°C, pressão de 150 bar, razão molar óleo:etanol de 1:20 e razão mássica de solvente:substrato de 4:1. Os resultados de duplicata de experimentos são apresentados na Figura 4.6, onde pode-se observar que uma conversão relativamente elevada da reação foi obtida em baixos tempos de residência, seguida por uma diminuição acentuada na conversão em ésteres etílicos. Isto pode ser explicado pela perda de atividade da enzima devido à ação de um solvente mais hidrofílico quando comparado ao propano.



**Figura 4. 5b** – Avaliação do solvente em triplicata de experimento na conversão em ésteres utilizando n-butano como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 20 bar e temperatura de 70°C.

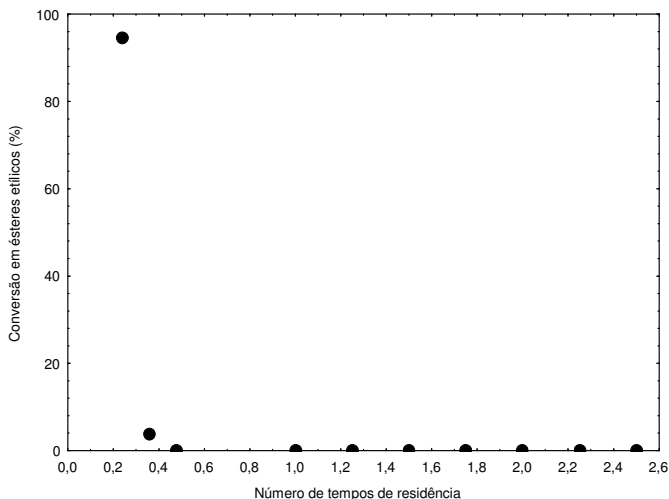


**Figura 4. 6** – Avaliação do solvente na conversão em ésteres utilizando dióxido de carbono como solvente. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 4:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 150 bar e temperatura de 70°C.

Observando os valores de hidrofobicidade conforme  $\log(P)$ , o dióxido de carbono pressurizado pode ser classificado como solvente hidrofílico, com valores de  $\log(P)$  menores que 2 sendo que um aumento da hidrofobicidade ocorre com o decréscimo da pressão, conforme relatado por Nakaya *et al.* (2001). Consequentemente, o dióxido de carbono supercrítico poderia remover a monocamada de água que recobre a enzima, causando a desativação da mesma, havendo partição da água entre a enzima e o solvente (Habulin *et al.*, 2001, Knez e Habulin 2002 e Kamat *et al.*, 1995).

Outra razão para a diminuição de conversão dos ésteres etílicos pode estar relacionada ao acúmulo de glicerol formado ao redor da enzima durante o curso da reação devido às baixas vazões empregadas, afetando o contato dos substratos com o centro ativo da enzima. Algumas outras condições experimentais foram testadas com dióxido de carbono, como a passagem apenas do gás (na ausência de substratos) com vazões e tempos de residência variados, mas o mesmo comportamento foi verificado e assim seu uso como solvente da reação foi descartado no trabalho que segue.

As reações em modo contínuo foram também realizadas na ausência de solvente à temperatura de 70°C, pressão de 50 bar, razão molar óleo:etanol de 1:20. Os resultados deste experimento são apresentados na Figura 4.7.



**Figura 4.7** – Avaliação da ausência de solvente na conversão em ésteres. Condições experimentais: razão mássica solvente:substrato de 10:1, razão molar óleo:etanol 20:1, pressão de 50 bar e temperatura de 70°C.

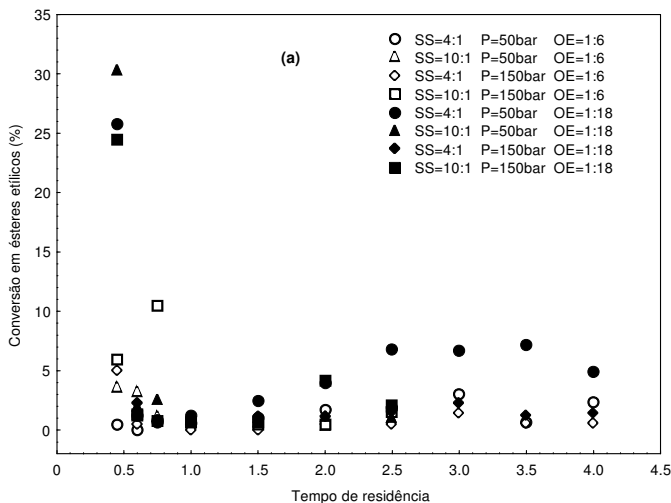
Pode-se observar que uma conversão relativamente elevada da reação foi obtida na primeira amostragem, seguida por uma diminuição acentuada na conversão em ésteres etílicos, permanecendo nos patamares onde não ocorreu mais a produção destes ésteres. Isto pode ser explicado pela grande disponibilidade de enzimas frente aos primeiros contatos de substratos que percorreram o leito do reator. A queda acentuada da conversão em ésteres que seguiram ao longo da reação, justificam o uso de solventes pressurizados nos experimentos que seguem.

#### 4.5 Planejamento de experimentos

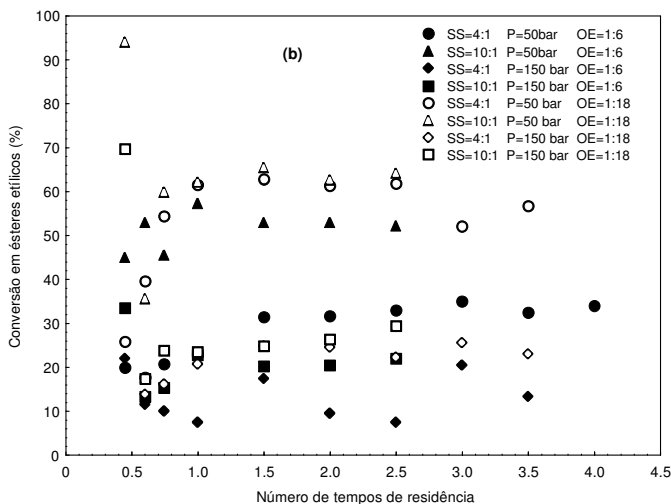
Com base nos resultados apresentados, foi realizado um planejamento de experimentos completo, que compreendeu as seguintes variáveis: temperatura (30 à 70°C), pressão (50 à 150 bar), razão molar óleo:etanol (1:6 à 1:18) e razão solvente:substrato (4:1 à 10:1), conforme a Tabela 3.2 do Capítulo 3.

As Figuras 4.8a, 4.8b e 4.8c apresentam conversão em ésteres, ou seja, a dependência da conversão em ésteres pelo tempo de residência, resultados da execução do planejamento 1. Em geral, pode-se observar que as conversões baixas obtidas estiveram relacionadas com as condições apresentadas na Figura 4.8a, onde todas as temperaturas empregadas foram de 30°C, ainda que em alguns casos conversões satisfatórias tenham sido observadas em curtos tempos de residência. A Figura 4.8b demonstra que resultados promissores foram obtidos à temperatura de 70°C em alguns experimentos. A triplicata do ponto central do planejamento de experimentos 1, apresentado na Figura 4.8c, apontou reprodutibilidade satisfatória dos dados experimentais.

Observando os resultados expressos na Figura 4.8a e comparando com a Figura 4.8b, pode-se verificar que a influência da temperatura é determinante para a manutenção do desempenho das reações enzimáticas em meio pressurizado, ainda que em tempos de residência menores, ou onde havia grande disponibilidade de substratos (razão molar óleo:etanol de 1:18), observa-se valores maiores de conversão.



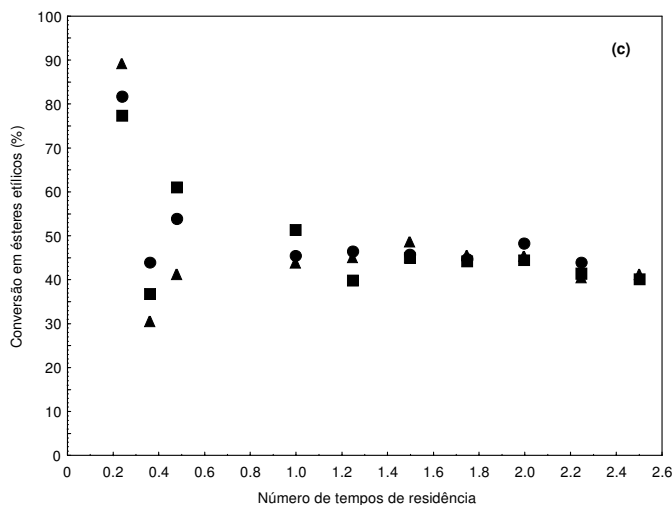
**Figura 4. 8a** - Resultados da produção de ésteres etílicos do primeiro planeamento de experimentos em leito empacotado utilizando propano como solvente correspondente aos experimentos utilizando a temperatura de 30°C. “SS” corresponde à razão mássica solvente/substrato e “OE” corresponde à razão molar óleo/etanol.



**Figura 4. 8b** - Resultados da produção de ésteres etílicos do primeiro planeamento de experimentos em leito empacotado utilizando propano como solvente correspondente aos experimentos utilizando a temperatura de 70°C.



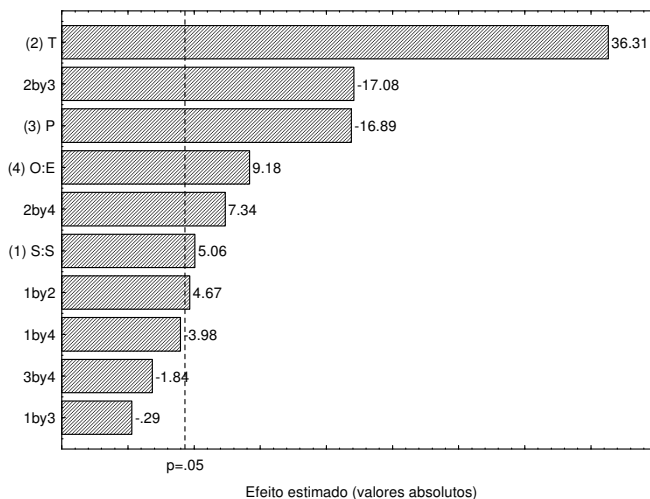
Na Figura 4.8b verifica-se os melhores resultados de conversão em ésteres etílicos. Tal fato pode ser atribuído ao valor de temperatura estar inserido dentro da faixa de temperatura na qual a atividade da Novozym 435 é máxima. Nota-se ainda que em tempos reduzidos foram alcançadas conversões da ordem de 90% nas condições de 50 bar de pressão, razão mássica de solvente:substrato de 10:1 e razão molar óleo:etanol de 1:18.



**Figura 4.8c** - Resultados da produção de ésteres etílicos do primeiro planejamento de experimentos em leito empacotado utilizando propano como solvente correspondente aos experimentos utilizando a temperatura de 50°C (ponto central: pressão de 100 bar, razão mássica solvente:substrato de 7:1 e razão molar óleo:etanol de 1:12).

A Figura 4.8c apresenta os resultados da triplicata do ponto central do primeiro planejamento de experimentos, onde é possível observar uma reprodutibilidade satisfatória dos dados obtidos. Os níveis de conversão que começaram em patamares satisfatórios, apresentaram estabilidade após o primeiro tempo de residência em conversões da ordem de 50%.

Os dados obtidos no planejamento de experimentos foram tratados estatisticamente em 1,5 números de tempos de residência.



**Figura 4.9** - Gráfico de Pareto avaliando os efeitos das variáveis: temperatura, pressão, razão molar óleo:etanol e razão mássica solvente:substrato na produção de ésteres etílicos em propano pressurizado ( $p < 0,05$ ). Os valores e as condições experimentais podem ser vistos nas Figuras 4.8a, 4.8b e 4.8c e Tabela 3.2.

Avaliando o gráfico de Pareto, (Figura 4.9) verifica-se que a pressão não exerceu influência significativa na conversão e na cinética de reação (Figura 4.8a, Figura 4.8b), apesar de ser um parâmetro estatisticamente significativo. Isso pode ser verificado pela pequena diferença observada de conversão para as reações realizadas a 50 bar e 150 bar. Dalla Rosa *et al.* (2008) observaram que nas reações utilizando a lipase comercial Novozym 435 em reator batelada utilizando o propano como solvente não foram observadas diferenças significativas na reações realizadas a 50 bar e 150 bar de pressão.

Conforme Ndiaye *et al.* (2006) o comportamento do sistema óleo de soja – propano, nas faixas de pressão e temperatura investigados, apresentam-se em uma única fase. Dentro da faixa experimental deste trabalho o propano encontra-se como líquido comprimido e, neste sentido, apresenta pouca variação de densidade. Conseqüentemente, a pressão apresenta pouca influência sobre as conversões já que as propriedades do solvente variam pouco.

Com relação à influência da razão molar óleo:etanol, dentre os diversos estudos que relatam a influência de álcoois em reações não pressurizadas com lipases, encontra-se o de Abigior *et al.* (2000), que

descrevem as conversões de ésteres obtidas a partir de óleo de palma usando a lipase de *P. cepacia*, obtendo 72% de conversão fazendo uso de etanol e 15% de conversão fazendo uso de metanol, na presença e ausência de solvente.

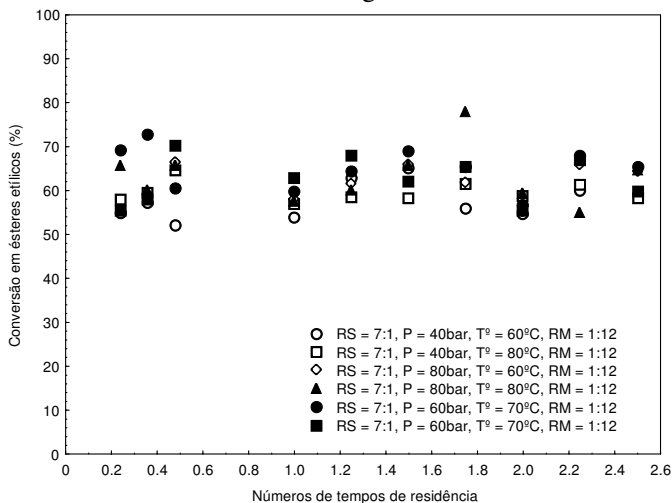
Poucos trabalhos são apresentados na literatura no que diz respeito ao efeito do teor de etanol em reações em sistemas pressurizados. Dentre eles, destaca-se o estudo de Oliveira e Oliveira (2000, 2001), que realizaram reações com a Novozym 435 utilizando como substrato óleo de palma. Os resultados obtidos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

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que valores mais elevados de álcool na relação molar óleo:etanol podem provocar a inibição por excesso desse substrato, como verificado na transesterificação do óleo de palma pela enzima Novozym 435 em dióxido de carbono pressurizado por Oliveira e Oliveira (2000). Os resultados obtidos por Dalla Rosa (2006) na transesterificação de óleo de soja em propano pressurizado sugerem que a razão molar óleo:etanol de 1:3 à 1:9 afeta positivamente o processo, mas para a razão molar 1:15, a reação parece passível de inibição por excesso de etanol.

Quanto à razão mássica solvente substrato, conforme a literatura, as interações enzima-substrato podem ser facilitadas quando uma determinada quantidade adicional de solvente é empregada (Laudani *et al.*, 2007). O contato eficiente da enzima com os substratos parece promover um bom desempenho do catalisador no meio reacional. Este fato pode ser explicado porque estas interações no propano pressurizado podem afetar a atividade da lipase. Também é possível que relações de solvente mais elevadas auxiliem a remoção de glicerol (subproduto inibidor da reação) no reator de leito empacotado, evitando que a enzima seja recoberta pelo glicerol.

Levando em consideração os efeitos das variáveis do primeiro planejamento, foi realizado um segundo planejamento de experimentos completo 2<sup>2</sup>, com faixas mais estreitas de temperatura (60 à 80°C) e pressão (40 à 80 bar), mantendo fixos os parâmetros que não tiveram

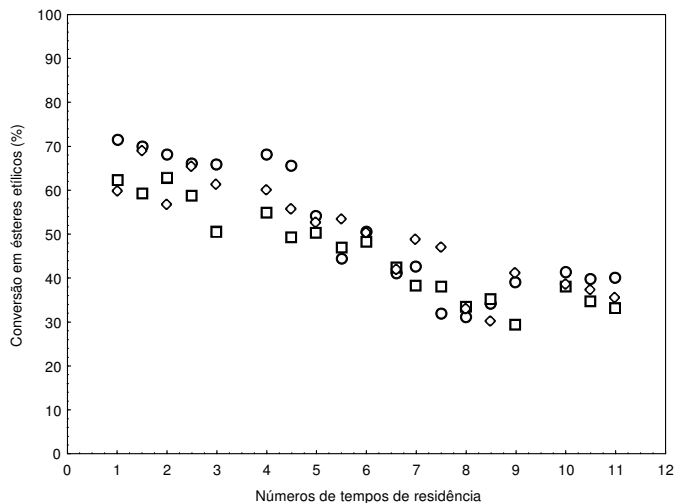
efeito pronunciado, sendo eles, a razão solvente:substrato (7:1), razão molar óleo:etanol (1:12), afim de melhorar a eficiência da reação. Os resultados são apresentados na Figura 4.10, onde pode-se observar que conversões da ordem de 70% em ésteres etílicos foram obtidas e se mantiveram estáveis até o maior tempo de residência avaliado (2,5), podendo tal resultado se constituir em grande interesse industrial.



**Figura 4. 10** - Resultados do segundo planejamento de experimentos para a produção de ésteres etílicos em reator contínuo em propano pressurizado variando a temperatura e pressão, mantendo fixos a razão molar óleo:etanol 1:12 e razão mássica solvente:substrato de 7:1.

Baseado nos desvios dos dados obtidos na duplicata do ponto central nestes experimentos e em resultados obtidos em outros pontos experimentais, nenhuma variável estatisticamente significativa foi encontrada.

Visando avaliar o comportamento da reação em tempos de residência maiores, reações em longos tempos de residência foram realizadas, adotando as condições do ponto central do segundo planejamento de experimentos, temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1. Para este caso especial, três bombas da seringa 500D e um jogo de válvulas foram empregados para executar os experimentos até 11 tempos de residência, o que significou aproximadamente 6 horas da reação. Os resultados dos experimentos em triplicata são apresentados na Figura 4.11.



**Figura 4.11** - Resultado da conversão em ésteres etílicos em tempos de residência maiores à temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica de solvente:substrato de 7:1.

Pode-se observar que as conversões da reação mantiveram-se estáveis até aproximadamente 4 tempos de residência, com posterior queda a patamares inferiores. No trabalho a estabilidade da lipase imobilizada é um parâmetro importante em um processo industrial, porque afeta diretamente o custo.

O estudo de Nie et al. (2006) mostra a estabilidade da lipase *Candida sp.* imobilizada utilizando solvente orgânico e reatores de leito empacotado de até 4 horas de reação com rendimentos de até 80%. A estabilidade da lipase imobilizada mostrou ser maior de 120 horas, em valor de rendimento de 79-80% quando utilizou-se terc-butanol como solvente em uma razão molar de 1:1 (solvente:óleo) em condições de pressão ambiente.

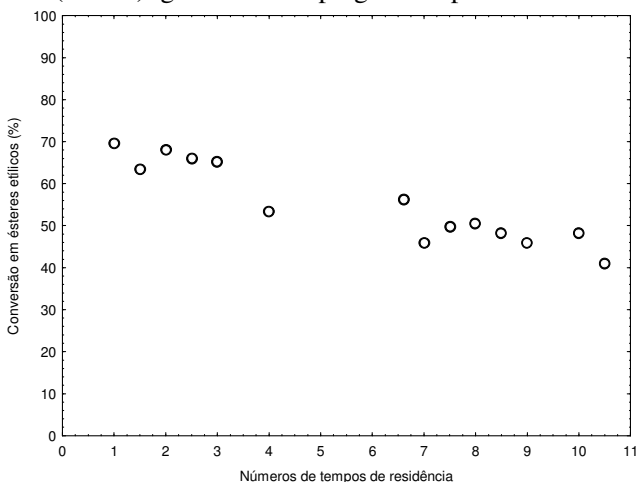
Em meio enzimático tradicional para a produção do biodiesel (solvente orgânico ou alguns solventes hidrofóbicos como meio reacional), uma quantidade de glicerol muito elevada foi encontrada na superfície das lipases imobilizadas que conduziu à vida operacional mais curtas (Halim et al., 2009).

### 4.5.1 Testes com passagem de propano

Com base nos resultados obtidos, testes com passagem de propano foram realizados com o intuito de melhorar o processo e manter os bons níveis de rendimentos atingidos até o quarto tempo de residência, com a interrupção da passagem de substratos pela passagem apenas do solvente, mantendo o mesmo reator de leito empacotado. Após a passagem do solvente, o teste teve prosseguimento por mais quatro tempos de residência.

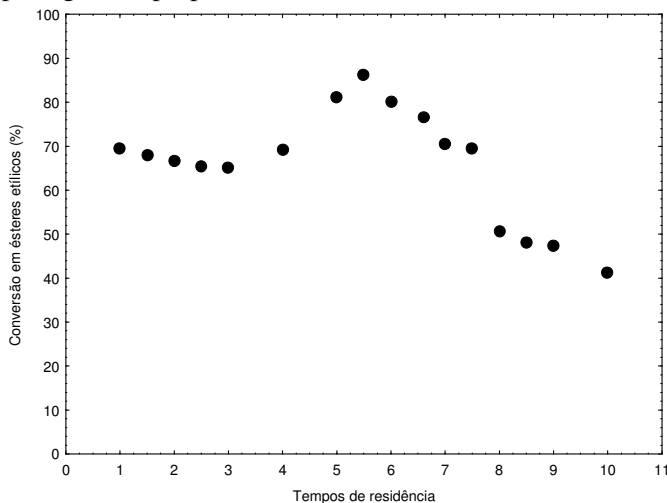
Para tanto, duas vazões de passagem do solvente foram avaliadas. Uma das vazões corresponde à vazão de passagem de solvente durante os experimentos ( $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), sem que fosse necessário perturbar o sistema, apenas interrompendo a passagem dos substratos (Figura 4.12), sendo que um (1) tempo de residência (32,85 min) foi adotado como o tempo de passagem do solvente. O valor do volume de propano (65 ml) utilizado nessa passagem de “limpeza” foi anotado.

Outra vazão avaliada foi uma vazão de sobrecarga, onde uma vazão cinco vezes maior da utilizada no primeiro experimento foi testada ( $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) (Figura 4.13). Após o quarto tempo de residência, repetiu-se a interrupção da passagem dos substratos e o tempo de passagem do solvente (2,2 min) foi determinado em função do volume de propano (65 mL) igualmente empregado no primeiro teste.



**Figura 4. 12** - Resultado da conversão em ésteres etílicos em tempos de residência maiores à temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$ , pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1 com vazão de  $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Na Figura 4.12 observa-se que a vazão de propano de  $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  empregado não promoveu a remoção do glicerol na camada que recobre a enzima, impedindo que o centro ativo da enzima estivesse completamente livre para o contato com os substratos. Essa avaliação é feita a partir da observação da queda progressiva dos níveis da produção de ésteres observadas ao longo dos tempos de residência que seguiram após a passagem do propano.



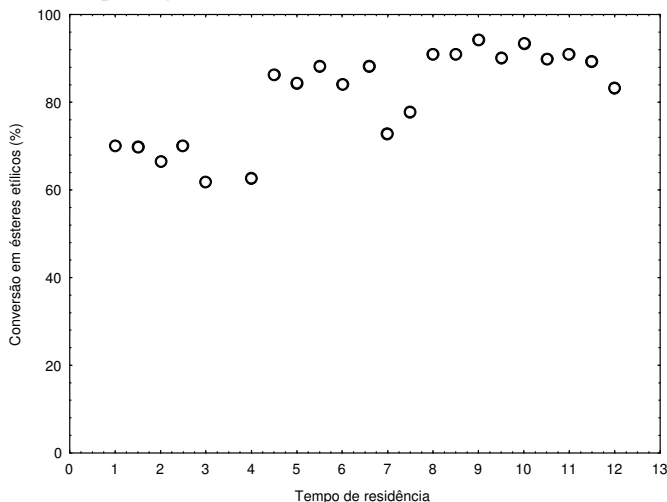
**Figura 4.13** - Conversão em ésteres etílicos em tempos de residência maiores à temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$ , pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1 com vazão de  $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Na Figura 4.13 observa-se que conversões da ordem de 80% foram obtidas após a passagem do propano, mostrando que a passagem do solvente parece ter promovido uma melhora nas condições do meio reacional e que a vazão de  $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pode ter sido suficiente para a remoção da camada de glicerol que recobre as enzimas que compõem o leito do reator. Cabe salientar que este desempenho manteve-se por mais quatro tempos de residência aproximadamente, onde uma nova queda nos níveis de conversão podem ser visualizadas.

Logo, tais testes podem ser de grande interesse industrial, pois apontam que os níveis de conversão desse processo podem ser mantidos com a aplicação de lavagens de solvente em tempos de residência programados.

### 4.5.2 Testes do uso de reatores em série

Nestes testes, a cada quatro tempos de residência a reação foi interrompida e todo o material que passou pelo leito do reator foi coletado e submetido à corrente de nitrogênio a 50°C para evaporação de etanol e centrifugação a 5000 rpm para precipitação do glicerol. O material evaporado e centrifugado foi empregado na reação em um novo leito de reator, com enzimas frescas. Este procedimento se repetiu até que houvesse material suficiente (parte era retirado nas amostragens) para uma nova passagem.



**Figura 4. 14** - Resultado da conversão em ésteres etílicos do sistema de reatores em série à temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1.

A Figura 4.14 mostra os resultados obtidos em 3 passagens de quatro tempos de residência cada. Observa-se que a cada nível de passagem as conversões apresentaram melhora nos resultados, sendo que na terceira passagem, conversões próximas a 100% em ésteres etílicos foram obtidas, demonstrando que este procedimento também pode ser interessante do ponto de vista industrial.

### 4.6 Investigação complementar com outros óleos vegetais

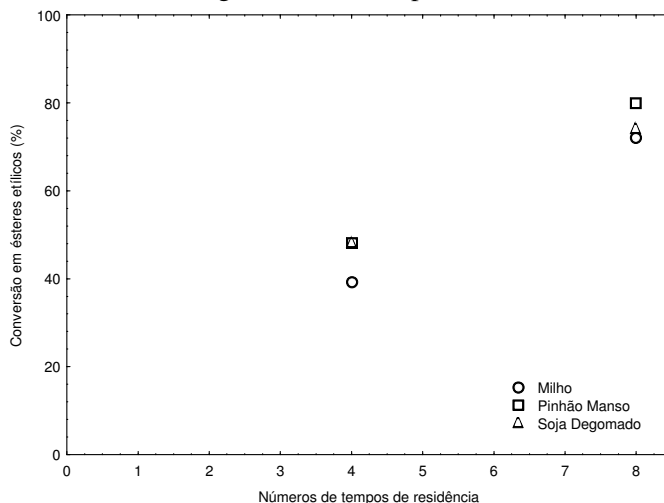
Com o intuito de ampliar as investigações a cerca do processo



investigado, alguns óleos vegetais foram selecionados para a realização de testes no reator contínuo de leito empacotado, fazendo uso dos reatores em série, nas condições otimizadas pelos planejamentos de experimentos realizados com o óleo de soja refinado.

Os testes consistiram em substituir o óleo de soja refinado utilizado até o presente momento, por óleos potenciais para produção de biodiesel no contexto brasileiro atual. Uma única condição experimental foi realizada, o ponto central do segundo planejamento de experimentos, ou seja, temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1 utilizando óleo de milho, pinhão manso e soja degomado. Para tanto, foram realizados novos cálculos com a densidade com os valores de peso molecular dos óleos vegetais (densidade à 20°C: óleo de milho: 0,876 mg/mL, pinhão manso: 0,910 mg/mL, soja degomado: 0,871 mg/mL) a serem investigados afim de respeitar as razões utilizadas no estudo anterior.

A Figura 4.15 apresenta os resultados obtidos na produção de ésteres etílicos utilizando óleo de milho como substrato, sendo que apenas um ponto de amostragem foi coletado ao final de cada passagem, onde verifica-se que foram possíveis duas passagens e conversões da ordem de 72% foram atingidas ao final do processo.



**Figura 4.15** - Conversão em ésteres etílicos nas condições do ponto central do segundo planejamento de experimentos, à temperatura de 70 °C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica de solvente:substrato 7:1 utilizando óleo de milho, pinhão manso e soja degomado como substrato.

Para o óleo de pinhão manso, conversões da ordem de 80% são observadas ao final da segunda passagem por novo leito do reator (Figura 4.15). Estes níveis de conversões satisfatórios já eram esperados, pois a composição química do óleo de pinhão manso é muito similar ao do óleo de soja (Foidl *et al.*, 1996), justificando assim o bom desempenho do óleo de pinhão manso ao longo do processo. Cabe salientar que foi utilizado óleo de pinhão manso não degomado, conforme extraído da prensagem, com elevado teor de acidez.

Na Figura 4.15 são observados ainda os valores de conversão para o óleo de soja degomado. Os níveis de conversão ficaram na ordem de 74% ao final da segunda passagem pelo leito do reator. Estes resultados são expressivos, pois o óleo de soja degomado tem custo reduzido em relação ao óleo de soja refinado. Várias etapas do processo de refino do óleo são eliminadas (clarificação, desodorização, branqueamento), tornando o óleo degomado interessante para ampliar as investigações a cerca do processo.

Os resultados observados por este estudo complementar utilizando outros óleos potenciais para a produção de biodiesel no contexto brasileiro atual nos indicam que os óleos investigados devem ser avaliados de uma forma mais detalhada, pois bons níveis de conversão foram observados ao final do processo, tornando-os potenciais para uma aplicação em escala industrial.

Neste sentido, ainda pode-se citar a carência de trabalhos na literatura referentes à produção de biodiesel em modo contínuo a alta pressão utilizando enzimas em leito empacotado empregando óleos de milho, pinhão manso e soja degomado.

As diferenças verificadas em termos de conversão em ésteres pela aplicação dos óleos de milho, pinhão manso e soja degomado podem, talvez, ser atribuídas às diferenças de composição em ácidos graxos e demais características como índice de acidez, presença de fosfatídeos, entre outros.

Decorrente da realização da presente pesquisa, recentemente, foi aceito o seguinte trabalho para publicação no periódico *Bioresource Technology*: "Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids", autores C. Dalla Rosa, M. B. Morandim, J. L. Ninow, D. Oliveira, H. Treichel e J. Vladimir Oliveira.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho investigações preliminares em um reator em modo batelada para produção de ésteres etílicos em meio pressurizado foram realizadas a fim de fornecer suporte e prover um sistema de referência para a produção de ésteres etílicos em modo contínuo, alvo da presente investigação. Tais informações permitiram avançar para a construção de um reator e posterior estudo de um sistema contínuo de processo de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja em meio pressurizado utilizando lipases como catalisadores onde os efeitos de algumas variáveis foram avaliados.

O estudo do número de ciclos de utilização da enzima Novozym 435 em um reator modo batelada indicou que sua reutilização em ciclos prolongados pode levar ao decréscimo da sua atividade enzimática com correspondente queda nos níveis de produção de ésteres. Observou-se um decréscimo das conversões em ésteres ao longo do processo também no sistema em modo contínuo, que não puderam ser relacionadas exclusivamente à perda de atividade enzimática, pois o processo de desempacotamento do reator para posterior análise era realizado de forma danosa ao catalisador, não sendo possível, portanto associar com confiança a perda de atividade sugerida com as condições da reação.

A respeito do aparato experimental empregado na operação em modo contínuo, como um todo, o mesmo apresentou boa condição do ponto de vista operacional, no que se refere à montagem e desmontagem do reator, de fácil empacotamento, manutenção/estabilização da vazão e estabilidade da temperatura e pressão do sistema. Permitiu manipular facilmente as variáveis de processo assim como as configurações do reator para o alcance de rendimentos aceitáveis. Além disso, mostrou ser confiável quanto à reprodutividade dos dados obtidos.

Para a realização de reações em meio pressurizado, vários testes preliminares foram realizados, tornando possível a montagem e utilização do aparato experimental não somente para a condução de reações de transesterificação enzimática de óleos vegetais, mas também com aplicação a várias outras reações em meio pressurizado, demonstrando sua flexibilidade.

Um destes estudos mostrou os resultados da não utilização de solvente nas reações em meio pressurizado catalisadas por lipases em modo contínuo. A queda acentuada na conversão e a manutenção da

ausência de ésteres que seguiram ao longo da reação, justificou o uso de solventes pressurizados neste sistema.

Os resultados do estudo da avaliação do solvente mostraram que a alcoólise catalisada pela lipase comercial Novozym 435 em dióxido de carbono e n-butano no sistema contínuo não apresentaram resultados satisfatórios. Este aspecto induz a crer que o n-butano e o dióxido de carbono não demonstram potencial que justifique a realização de um estudo mais aprofundado. Entretanto, os estudos realizados com propano pressurizado apontaram que esta substância pode se constituir uma alternativa potencial ao processo convencional, pois bons níveis de conversão da reação foram obtidos em condições amenas de temperatura e pressão.

Avaliando a perspectiva da utilização de propano pressurizado como solvente para reações enzimáticas de interesse e devido a uma carência encontrada na literatura no que se refere a transesterificação enzimática em meio pressurizado em modo contínuo, um estudo sobre estas reações em óleos vegetais, bem como a influência das variáveis e otimização do processo, foram realizados neste trabalho.

O presente estudo permitiu uma avaliação da cinética do processo e os efeitos das variáveis estabelecidas pelo estudo. Diante disso, conclui-se que:

- A razão molar óleo:etanol de 1:12 apresentou melhor resultado, e esta foi mantida para o segundo planejamento, pois este parâmetro não apresenta efeito positivo sobre a conversão da reação.

- A razão mássica solvente:substrato de 7:1 foi suficiente para promover conversões de até 72%, tendo sido tal parâmetro mantido fixo para o segundo planejamento, pois não teve efeito pronunciado.

- A condição de temperatura de 70°C propiciou a obtenção de melhores conversões, devido à faixa ótima de temperatura de trabalho da Novozym 435 (50°C - 70°C).

- A pressão adequada estabelecida foi 60 bar, sendo que pressões acima deste valor não apresentaram variações no resultado das reações conduzidas com propano, possivelmente devido à pequena variação da densidade do propano e pelo fato de que o sistema óleo de soja - propano se apresenta como monofásico na condição de pressão na faixa de temperatura estudada.

Reações em longos tempos de residência foram realizadas, adotando as condições do ponto central do segundo planejamento de experimentos, temperatura de 70°C, pressão de 60 bar, razão molar óleo:etanol de 1:12, e razão mássica solvente:substrato de 7:1 levaram a níveis de conversão da ordem de 70% até 4 tempos de residência.

Testes com reatores em série utilizando a condição otimizada indicaram que a cada nível de passagem as conversões apresentaram melhora nos resultados, sendo que na terceira passagem, conversões próximas a 100% em ésteres etílicos foram obtidas, demonstrando que este procedimento também pode ser interessante do ponto de vista industrial, o que permite vislumbrar o aprimoramento deste processo em maior escala.

Os bons níveis de conversão obtidos neste processo com óleo de soja refinado também foram obtidos com outros óleos vegetais, sendo eles: milho, pinhão manso e soja degomado. Cabe salientar que foi utilizado óleo de pinhão manso não degomado, conforme extraído da prensagem, com elevado teor de acidez e óleo de soja degomado, que possui um custo reduzido em relação ao óleo de soja refinado.

As investigações exploratórias realizadas com torta fermentada e extrato bruto liofilizado não apresentaram resultados significativos e levam a crer que estudos aperfeiçoando o processo produtivo destas lipases devem ser melhor explorados.

### **Sugestões**

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

- Ampliação da investigação com outros extratos brutos e ou tortas fermentadas na produção de ésteres etílicos em modo contínuo utilizando propano como solvente;
- ampliação do estudo realizado neste trabalho para outros óleos vegetais, tais como mamona e dendê;
- realização das análises de mono, di e triglicerídeos, glicerol e etanol, afim de contemplar a modelagem cinética de produção enzimática de biodiesel em fluidos pressurizados em modo contínuo;
- aprimoramento referente à configuração do sistema reacional para emprego na produção enzimática de biodiesel em fluidos pressurizados;
- estudo de rotas para o aproveitamento da glicerina produzida;
- estudo da viabilidade econômica da produção enzimática de biodiesel em fluidos pressurizados em modo contínuo.

## REFERÊNCIAS

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (2004). [www.abiove.com.br](http://www.abiove.com.br)

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

ALBUQUERQUE, G. A. **Obtenção e Caracterização Físico-química do Biodiesel de Canola (*Brassica napus*).** Dissertação de Ms., Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brasil, 2006.

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

CADERNOS NAE – NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Biocombustíveis. N.2, 2004.

CÂMARA, G. M. S. **Biodiesel Brasil – Estado Atual da Arte.** Piracicaba: ESALQ. p. 105 -121, 2006.

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

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

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

COSTA, V. E. U; AMORIM, H. L. N. **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica:**

**aspectos gerais sobre a influência do solvente.** Química Nova, v. 22, p. 863 - 873, 1999.

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

DALLA ROSA, C., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V., DARIVA, C. **The role of organic solvent amount in the lipase-catalized biodiesel production.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

2004.

FEIHRMANN, A. F.; OLIVEIRA, D.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids, v. 38, nº 3, p. 373-382, 2006.

FOIDL, N.; FOIDL, G.; SANCHEZ, M.; MITTELBACH, M. ; HACKEL, S. **Jatropha curcas l. as a source for the production of biodiesel in Nicaragua**. Bioresource Technology, v. 58, p. 77-82, 1996.

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

**LAUDANI, C. G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E.** Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **The Journal of Supercritical Fluids, v.41, p 74 – 81, 2007.**

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

- MA, F.; HANNA, M.A. **Biodiesel production: a review**. Bioresource Technology, v. 70, p. 1-15, 1999.
- MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. **Synthesis of biodiesel in supercritical fluids**. Fuel, v. 83, p. 2029-2033, 2004.
- MAMURO, I. A.; CHENB, B.; EGUCHI, M. KUDO, T.; SUREKHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 16, p. 53-58, 2001.
- MARTY, A.; CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; WILLEMOT, R. M. e DURANG, G. **Comparison of lipase-catalyzed esterification is supercritical carbon dioxide and in-hexane**. Biotechnology Letters, v. 12, n. 1, p. 11-16, 1990.
- MARTÍN, E. H.; OTERO, C. **Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM**. Bioresource Technology. 2007.
- McHUGH, M. e KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extration**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.
- MESSIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Supercritical Biocatalysis**. Chemical Reviews, v. 99, p. 623-633, 1999.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **O Futuro da Indústria de Biodiesel**. Coletânea de Artigos. Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior, n° 14. Brasília – DF, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, SECRETARIA DA PRODUÇÃO E AGROENERGIA. **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011**. Brasília – DF, 2006.
- MITTELBAACH, M. ; **Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel**. Bioresource Technology, v. 86, p. 7 – 11, 1996.
- MONOT, F. **La catalyze enzymatique in milieu organique**. Revue de

l'Institut Français du Pétrole, v.9, n. 2, p. 187-208, 1994

NAKAYA, H.; MIYAWAKI, O.; NAKAMURA, K. **Determination of log P for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction.** Enzyme and Microbial Technology , v. 28, p. 176 - 182, 2001.

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

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

NDIAYE, P. M.; LANZA, M.; TAVARES, F.W.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of olive and soybean oils in compressed propane and n-butane.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, n. 3, p. 405-415, 2006b.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RANDOLPH, T.W.; CLARK, D.S.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, J.M.; WILKE, C.R. **Cholesterol aggregation and interaction with cholesterol oxidase in supercritical carbon dioxide**. Proceedings of

National Academy Science , USA, v. 85, p. 2979, 1988.

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

RELATÓRIO FINAL PETROBRAS – ETAPA AGRIBUSSINES.

**Projeto: Otimização do processo de produção de biodiesel**. Realizado pela Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim / Centro Tecnológico – Departamento de Ciências Agrárias, 2003.

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

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

RODRIGUEZ, J. C.; LANÇAS, F. M. **Preparation of packed capillary columns using supercritical carbon dioxide on cyclone-type slurry reservoir**. Journal of Crhomatography A, v. 1009, p. 172-177, 2005.

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

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

SILVA, C.; WESCHENFELDER, T. A.; ROVANI, S.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; J. V. OLIVEIRA. **Continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol**, Ind. Eng. Chem. Res., v.46, p. 5304-5309, 2007.

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

SZYBIST, J. P.; BOEHMAN, A. L.; TAYLOR, J. D.; McCORMICK,

**R. L. Evaluation of formulation strategies to eliminate the biodiesel NOx effect.** Fuel Processing Technology, v.86, p. 1109-1126, 2005.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J., HAAS, M. J. **CUSTOMIZING LIPASES FOR BIOCATALYSIS: A SURVEY OF CHEMICAL, PHYSICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES REVIEW.** JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC, v. 9, p. 113-148, 2000.

WATANABE, Y., SHIMADA, Y. SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. **ENZYMATIC CONVERSION OF WASTE EDIBLE OIL TO BIODIESEL FUEL IN A FIXED-BED BIOREACTOR.** JOURNAL OF AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY, v. 78, p. 703-707, 2001.

[www.petrobras.com.br](http://www.petrobras.com.br)

<http://www.biodiesel.gov.br/docs/relatoriofinal.pdf>

## ANEXOS

### *Anexo A* - Norma de padronização do biodiesel ASTM D 6751 (Estados Unidos)

<b>Propriedade</b>	<b>Método de teste</b>	<b>Limites a</b>	<b>Unidade</b>
Ponto de fulgor (em frasco fechado)	D 93	130,0 min	°C
Água e sedimentos	D 2709	0,050 máx	% volume
Viscosidade cinemática, 40°C	D 445	1,9-6,0	mm <sup>2</sup> /s
Cinzas sulfatadas	D 874	0,020 máx	% massa
Enxofre	D 5453	0,0015 máx or 0,05 máx <sup>a)</sup>	% massa
Corrosão da lâmina de cobre	D 130	n°. 3 máx	
Número de cetano	D 613	47 min	
Ponto de névoa	D 2500	Anotar	°C
Resíduo de carbono (100% da amostra)	D 4530	0,050 máx	% massa
Acidez	D 664	0,80 máx	mg KOH/g
Glicerina livre	D 6584	0,020 máx	% massa
Glicerina total	D 6584	0,240 máx	% massa
Conteúdo de fósforo	D 4951	0,001 máx	% massa
Temperatura de destilação, temperatura equivalente atmosférica, 90% recuperados	D 1160	360 máx	°C

Norma Européia EN 14213 para uso de biodiesel como óleo de aquecimento (óleo combustível)

Propriedade	Método de teste	Limites		Unidade
		min.	máx.	
Teor de ésteres	EN 14103	96,5		% (m/m)
Densidade; 15°C	EN ISO 3675 EN ISO 12185	860	900	kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade; 40°C	EN ISO 3104 ISO 3105	3,5	5,0	mm <sup>2</sup> /s
Ponto de fulgor	pr EN ISO 3679	120		°C
Teor de enxofre	pr EN ISO 20846 pr EN ISO 20884		10,0	mg/kg
Resíduo de carbono (resíduo de destilação de 10%)	EN ISO 10370		0,30	% (m/m)
Cinzas sulfatadas	ISO 3987		0,02	% (m/m)
Teor de água	EN ISO 12937		500	mg/kg
Contaminação total	EN 12662		24	mg/kg
Estabilidade oxidativa, 110°C	EN 14112	4,0		h
Acidez	EN 14104		0,50	mg KOH/g
Índice de iodo	EN 14111		130	g iodo/100g
Teor de FAME com 4 ou mais duplas ligações			1	
Teor de monoglicerídeos	EN 14105		0,80	% (m/m)
Teor de diglicerídeos	EN 14105		0,20	% (m/m)
Teor de triglicerídeos	EN 14105		0,20	% (m/m)
Glicerina livre	EN 14105 EN 14106		0,02	% (m/m)
Ponto de entupimento de filtro a frio	EN 116			°C
Ponto de fluidez	ISO 3016		0	°C
Poder calorífico	DIN 51900-1 DIN 51900-2 DIN 51900-3	35		MJ/kg



## Norma EN 14214 (Europa)

Propriedade	Método de teste	Limites		Unidade
		mín.	máx.	
Teor de ésteres	EN 14103	96,5		% (m/m)
Densidade; 15°C	EN ISO 3675 EN ISO 12185	860	900	kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade; 40°C	EN ISO 3104 ISO 3105	3,5	5,0	mm <sup>2</sup> /s
Ponto de fulgor	pr EN ISO 3679	120	°C	
Teor de enxofre	pr EN ISO 20846 pr EN ISO 20884		10,0	mg/kg
Resíduo de carbono (10% de destilado residual)	EN ISO 10370		0,30	% (m/m)
Número de cetano	EN ISO 5165	51		
Cinzas sulfatadas	ISO 3987		0,02	% (m/m)
Teor de água	EN ISO 12937		500	mg/kg
Contaminações totais	EN 12662		24	mg/kg
Corrosão da lâmina de cobre (3h, 50°C)	EN ISO 2160	1		
Estabilidade oxidativa, 110°C	EN 14112	6,0		h
Acidez	EN 14104		0,50	mg KOH/g
Índice de iodo	EN 14111		120	g iodo/100g
Teor de ácido linoléico	EN 14103		12	% (m/m)
Teor de FAME com 4 ou mais duplas ligações			1	% (m/m)
Teor de metanol	EN 14110		0,20	% (m/m)
Teor de monoglicérides	EN 14105		0,80	% (m/m)
Teor de diglicérides	EN 14105		0,20	% (m/m)
Teor de triglicérides	EN 14105		0,20	% (m/m)
Glicerina livre	EN 14105 EN 14106		0,02	% (m/m)
Glicerina total	EN 14105		0,25	% (m/m)
Metais alcalinos (Na + K)	EN 14108 EN 14109		5,0	mg/kg
Metais alcalino-terrosos (Ca + Mg)	prEN 14538		5,0	mg/kg
Teor de fósforo	EN 14107		10,0	mg/kg

**Anexo B – Draft for public comment****Draft for Public Comment**FORM 36  
Version 4.4 March 2000

**Head office**  
389 Chiswick High Road  
London W4 4AL  
Telephone: 020 8996 9000  
Fax: 020 8996 7400  
www.bsi.org.uk

DPC no.: 01/707542DC

Date: 01/06/01

Origin: E

**Latest date for receipt of comments: end of August 2001**

Project no.: 1999/00751

Responsible committee: AW/11 Animal and vegetable fats and oils  
Interested committees:

Draft: prEN 14103  
Title: Fats and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents

**WARNING: THIS IS A DRAFT AND MUST NOT BE REGARDED OR USED AS A BRITISH STANDARD.  
THIS DRAFT IS NOT CURRENT BEYOND ITS EXPIRY DATE FOR COMMENTS.**

This draft is issued to allow comments from interested parties; all comments will be given consideration prior to publication. **See overleaf for information on commenting.**

No copying is allowed, in any form, without prior written permission from BSI except as permitted under the Copyright, Designs and Patent Act 1988 or for circulation within a nominating organization for briefing purposes. Electronic circulation is limited to dissemination by e-mail within such an organization by committee members.

Further copies of this draft may be purchased from BSI Customer Services, at the Head Office address above, telephone 020 8996 9001, fax 020 8996 7001, e-mail [orders@bsi.org.uk](mailto:orders@bsi.org.uk).

NOTE British, International and foreign standards are also available from Customer Services.

Information on the co-operating organizations represented on the committees referenced above may be obtained from the responsible committee secretary.

**Cross-references**

The British Standards which implement International or European publications referred to in this draft may be found by referring to the British Standards Online Service on the BSI website under the 'International Relationship' information. This information is also available within the BSI catalogue (paper version) and the BSI Standards Electronic Catalogue (CD).

The Online Service can also be used to find information on draft standards related to International or European publications.

Responsible BSI committee Secretary: W N A King

Direct tel: 020 7 208 5511

E-mail address: [Contact@fosfa.org](mailto:Contact@fosfa.org)

No. 28, 01/06/01

1

COPYRIGHT European Committee for Standardization

Licensed by Information Handling Services

## Draft for Public Comment



**Head office**  
389 Chiswick High Road  
London W4 4AL  
Telephone: 020 8996 9000  
Fax: 020 8996 7400  
www.bsi.org.uk

DPC no.: 01/707542DC

Date: 01/06/01

Origin: E

---

**Latest date for receipt of comments: end of August 2001**

Project no.: 1999/00751

Responsible committee: AW/11 Animal and vegetable fats and oils  
Interested committees:

---

Draft: prEN 14103  
Title: Fats and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents

**WARNING: THIS IS A DRAFT AND MUST NOT BE REGARDED OR USED AS A BRITISH STANDARD.  
THIS DRAFT IS NOT CURRENT BEYOND ITS EXPIRY DATE FOR COMMENTS.**

This draft is issued to allow comments from interested parties; all comments will be given consideration prior to publication. **See overleaf for information on commenting.**

No copying is allowed, in any form, without prior written permission from BSI except as permitted under the Copyright, Designs and Patent Act 1988 or for circulation within a nominating organization for briefing purposes. Electronic circulation is limited to dissemination by e-mail within such an organization by committee members.

Further copies of this draft may be purchased from BSI Customer Services, at the Head Office address above, telephone 020 8996 9001, fax 020 8996 7001, e-mail [orders@bsi.org.uk](mailto:orders@bsi.org.uk).

NOTE British, International and foreign standards are also available from Customer Services.

Information on the co-operating organizations represented on the committees referenced above may be obtained from the responsible committee secretary.

**Cross-references**

The British Standards which implement International or European publications referred to in this draft may be found by referring to the British Standards Online Service on the BSI website under the 'International Relationship' information. This information is also available within the BSI catalogue (paper version) and the BSI Standards Electronic Catalogue (CD).

The Online Service can also be used to find information on draft standards related to International or European publications.

---

**Responsible BSI committee Secretary:** W N A King

Direct tel: 020 7 208 5511

E-mail address: [Contact@fosfa.org](mailto:Contact@fosfa.org)

No. 28, 01/06/01

FORM 36  
Version 4.4 March 2000

## Commenting on drafts

### Introduction

This draft standard is based on European discussions in which the UK took an active part. Your comments on this draft are welcome and will assist in the preparation of the consequent British Standard. If no comments are received to the contrary, then the UK will approve this draft and implement it as a British Standard. Comment is particularly welcome on national legislative or similar deviations that may be necessary.

Even if this draft standard is not approved by the UK, if it receives the necessary support in Europe, the UK will be obliged to publish the official English Language text unchanged as a British Standard and to withdraw any conflicting standard.

### UK vote

Please indicate whether you consider the UK should submit a negative (with reasons) or positive vote on this draft.

### Format

The guidance given below is intended to ensure that all comments receive efficient and appropriate attention by the responsible BSI committee. ~~Annotated drafts are not acceptable and will be rejected.~~

Each comment shall make one point only, be clearly separated from the others and be structured as follows in clause order:

- clause/sub-clause;
- paragraph/table/figure number;
- type of comment (general, technical or editorial);
- comment (with rationale);
- proposed change.

### Submission

All comments should be submitted directly to the delegated secretariat at the address below, preferably electronically via e-mail or on diskette (MS-DOS compatible, 1.44 megabytes). Comments should be compatible with Version 6.0 or Version 97 of Microsoft® Word for Windows™, if possible; otherwise comments in ASCII text format are acceptable. Any comments not submitted electronically should still adhere to the format requirements given above. No acknowledgement will normally be sent.

Microsoft and MS-DOS are registered trademarks, and Windows is a trademark of Microsoft Corporation.

Mr W N A King, FOSFA International, 20 St Dunstons Hill London EC3R 8NQ

**Table for submission of comments**

Please use the attached table for submission of comments.  
 A blank electronic version of this table can be downloaded from the BSI web site at  
<http://www.bsi.org.uk/bsi/products/standards/development/public-comment.xhtml> or it is available from the committees secretary.

FORM 56  
 Version 4.1 March 2000

Draft no:	Project no.: 1999/00761	DPC no.: 01/07/542DC
Short title:	Commentator:	Date:

Clauses/ subclause	Paragraph/ Figure/ Table	Type of comment (General/ technical/editorial)	Comment (with rationale)	Proposed change
<b>Examples:</b>				
3.1	1st definition	Editorial	Definition is ambiguous and needs clarifying.	Amend to read '... so that the mains connector to which no connection ...'
6.4	2nd paragraph	Technical	The use of the UV photometer as an alternative cannot be supported as serious problems have been encountered in its use in the UK, giving rise to misleadingly high results.	Delete reference to UV photometer.

### Table for submission of comments

Please use the attached table for submission of comments.

A blank electronic version of this table can be downloaded from the BSI web site at <http://www.bsi.org.uk/bsi/products/standards/development/public-comment.html> or it is available from the committee secretary.

Draft no:	Project no.: 1999/00751	DPC no.: 01707542DC
Short title:	Commentator:	Date:

Clause/ subclause	Paragraph/ Figure/ Table	Type of comment (General/ technical/ editorial)	Comment (with rationale)	Proposed change
Examples:				
3.1	1st definition	Editorial	Definition is ambiguous and needs clarifying.	Amend to read '... so that the mains connector to which no connection ...'
6.4	2nd paragraph	Technical	The use of the UV photometer as an alternative cannot be supported as serious problems have been encountered in its use in the UK, giving rise to misleadingly high results.	Delete reference to UV photometer.

No. 28, 01/06/01

iii

Page 2  
prEN 14103:2001

### **Foreword**

This document has been prepared by CEN /TC 307, "Oilseeds, vegetable and animal fats and oils and their by products - Methods of sampling and analysis".

This document is currently submitted to the CEN Enquiry.

This document has been prepared under a mandate given to CEN by the European Commission and the European Free Trade Association, and supports essential requirements of EU Directive(s).

For relationship with EU Directive(s), see informative annex Z, which is an integral part of this document.

---

---

## 1 Scope

The purpose of this document is to determine the ester content of fatty acid methyl esters intended for incorporation into diesel oil. It also allows to determine the linolenic acid methyl ester content.

It allows one to verify that the ester content of vegetable oil methyl esters is greater than 96,5 % by mass (*M<sub>24</sub>*).

This method is suitable for FAME which contain methyl esters between C<sub>14</sub> and C<sub>24</sub>.

## 2 Normative references

This European Standard incorporates by dated or undated references, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this European Standard only when incorporated in it by amendment or revision. For undated references the latest edition of the publication referred to applies.

EN ISO 5508, *Animal and vegetable fats and oils - Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids*.

---

## 3 Principle

Determination of the percentage of methyl esters of fatty acids present in the sample by gas chromatography according to EN ISO 5508 with internal calibration (methyl heptadecanoate).

Determination of the percentage of linolenic acid methyl ester present in the sample by gas chromatography according to EN ISO 5508.

## 4 Glassware

4.1 Screw-cap vials with PTFE-faced septa, 10 ml capacity.

4.2 Volumetric flask, 50 ml capacity.

4.3 Pipette, of 5 ml capacity.

## 5 Reagents

5.1 Heptane of analytical grade.

5.2 Methyl heptadecanoate of known purity (99 % minimum).

5.3 10 mg/ml methyl heptadecanoate solution : accurately weigh approximately 500 mg of methyl heptadecanoate (5.2) in a 50 ml volumetric flask (4.2) and make up to mark with heptane (5.1).

## 6 Apparatus

Usual laboratory apparatus and, in particular, the apparatus described in EN ISO 5508.

## 7 Preparation of the sample

Accurately weigh approximately 250 mg of sample in a 10 ml vial (4.1), then add 5 ml of methyl heptadecanoate solution (5.3) using a graduated pipette (4.3).



Page 4  
prEN 14103:2001

## 8 Chromatographic analysis

Refer to EN ISO 5508 and to Annex A which described, by way of indication, analysis conditions which may be used.

The chromatographic conditions (injected quantity, oven temperature, carrier gas pressure and split flow rate) shall be adjusted so as to correctly visualize the methyl ester peaks of the lignoceric ( $C_{24}$ ) and nervonic ( $C_{24:1}$ ) acids.

The integration shall be carried out as from the methyl myristate ( $C_{14}$ ) peak up to that of the methyl ester in  $C_{24:1}$  taking all the peaks into consideration, including the minor ones.

**NOTE** If some unknown peaks are found (others than saturated and mono-unsaturated FAME) between the linolenic acid ( $C_{18:3}$ ) and the nervonic acid ( $C_{24:1}$ ), presence of fish oil in the sample can be suspected.

## 9 Expression of results

### 9.1 Determination of ester content

The ester C content, expressed in percentage (*M/M*), is calculated using the following formula :

$$C = \frac{\sum A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{W} \times 100$$

where

$\sum A$  is the total peak area from the methyl ester in  $C_{14}$  to that in  $C_{24:1}$  ;

$A_{EI}$  is the peak area corresponding to methyl heptadecanoate ;

$C_{EI}$  is the concentration, in milligrams per millilitre, of the methyl heptadecanoate solution (5.3) being used ;

$V_{EI}$  is the volume, in millilitres, of the methyl heptadecanoate solution (5.3) being used ;

$W$  is the weight, in milligrams, of the sample.

**NOTE 1** In the case of vegetable oils, the result of the calculation based on relative areas is considered to represent a percentage by mass.

**NOTE 2** If the average of two determinations is higher than 100,8 % than discard the results and verify the experimental conditions as well as the purity of internal standard by using this method to determine the ester content of a commercial or prepared mixture.

Express the result to one decimal place.

## Anexo C - Propriedades de ácidos e ésteres graxos de maior relevância para o biodiesel

Nome trivial (sistemático); Acrônimo	Massa molar	P. F. <sup>a</sup> (°C)	P. E. <sup>a,b</sup> (°C)	Número de cetano	Viscosidade Cinemática <sup>c</sup> (40°C; mm <sup>2</sup> /s = cSt)	HG <sup>d</sup> (kg-cal/mol)
Ácido caprílico (Octanóico); 8:0	144,213 158,240 172,268 200,322	16,5 -43,1	239,3 193 208,5	33,6 (98,6) <sup>e</sup> 39,6 (98,7) <sup>e</sup>	1,16; 0,99 <sup>k</sup> ; 1,37 (25°C) <sup>k</sup>	1313 1465
Ácido cáprico (Decanóico); 10:0	172,268 186,295 200,322 214,349 214,349 228,376	31,5 -20	270 224 243-5	47,6 (98,0) <sup>e</sup> 47,2 (98,1) <sup>e</sup> ; 47,9 <sup>f</sup> 51,2 (99,4) <sup>e</sup> 52,9 (98) <sup>e</sup> 46,6 (97,7) <sup>e</sup> 54,6 (98,6) <sup>e</sup>	1,69; 1,40 <sup>k</sup> 1,99 (25°C) <sup>j</sup>	1453,07 (25°) 1625 1780
Ácido láurico (Dodecanóico); 12:0	200,322 214,349 228,376	44 5 -1,8fr	131 <sup>1</sup> 266/ <sup>64</sup> 163 <sup>25</sup>	61,4 (99,1) <sup>e</sup> ; 60,8 <sup>f</sup>	2,38; 1,95 <sup>k</sup> ; 2,88 <sup>k</sup>	1763,25 (25°) 1940 2098
Ácido mirístico (Tetradecanóico); 14:0	228,376 242,403 256,430 284,484	58 18,5 12,3	250,5 <sup>100</sup> 295 <sup>41</sup> 295	66,2 (96,5) <sup>e</sup> ; 73,5 <sup>f</sup> 66,9 (99,3) <sup>e</sup> 69,4 (99,0) <sup>g</sup>	3,23; 2,69 <sup>k</sup>	2073,91 (25°) 2254 2406
<b>Ácido palmítico (Hexadecanóico); 16:0</b>	<b>254,430</b>	<b>43</b>	<b>350</b>			<b>2384,74 (25°)</b>
Metil éster	270,457	30,5	415-8 <sup>747</sup>	74,5 (93,6) <sup>e</sup> ;	4,32; 3,60 <sup>k</sup> ;	2550
Etil éster	284,484	19,3/24	191 <sup>10</sup>	85,9 <sup>g</sup> ; 74,3 <sup>f</sup>		2717
Propil éster	298,511	20,4	190 <sup>12</sup>	93,1 <sup>g</sup>		
Iso-propil éster	298,511	13-4	160 <sup>2</sup>	85,0 <sup>g</sup>		
Butil éster	312,538	16,9		82,6 <sup>g</sup>		
2-butil éster	312,538			91,9 <sup>g</sup>		
Iso-butil éster	312,538	22,5,	199 <sup>9</sup>	84,8 <sup>g</sup>		
Triacilglicerol	807,339	28,9 66,4	310-20	83,6 <sup>g</sup> 89 <sup>h</sup>		7554
Ácido palmitoléico (9(Z)-Hexadecenóico); 16:1	254,412 268,439			51,0 <sup>g</sup>		2521
Ácido esteárico (Octadecanóico); 18:0	284,484 298,511 312,538 312,538 312,538 326,565 326,565 326,565 891,501	71 39 31-33,4 27,5 73	360 <sup>d</sup> 442-3 <sup>747</sup> 199 <sup>10</sup> 343	61,7 <sup>f</sup> 86,9 (92,1) <sup>e</sup> ; 101; 75,6 <sup>f</sup> 73,5 <sup>f</sup> 76,8 <sup>f</sup> ; 97,7 <sup>g</sup> 69,9 <sup>f</sup> ; 90,9 <sup>g</sup> 96,5 <sup>g</sup> 80,1 <sup>f</sup> ; 92,5 <sup>g</sup> 97,5 <sup>g</sup> 99,3 <sup>g</sup> 85 <sup>h</sup>	5,61; 4,74 <sup>k</sup>	2696,12 (25°) 2859 3012 8558
Ácido oléico (9(Z)-Octadecenóico); 18:1	282,468 296,495 310,522 324,547 324,547 338,574 338,574 338,574 885,453	16 -20 -5,5	286 <sup>100</sup> 218,5 <sup>20</sup> 216-7 <sup>151</sup> 235-40 <sup>18</sup>	46,1 <sup>f</sup> 55; 59,3 <sup>g</sup> 53,9 <sup>f</sup> ; 67,8 <sup>g</sup> 55,7 <sup>f</sup> ; 58,8 <sup>g</sup> 86,6 <sup>g</sup> 59,8 <sup>f</sup> ; 61,6 <sup>g</sup> 71,9 <sup>g</sup> 59,6 <sup>g</sup> 45 <sup>h</sup>	4,45; 3,73 <sup>k</sup> 5,50 (25°C) <sup>k</sup>	2657,4 (25°) 2828 8389

## Anexos

Nome trivial (sistemática); Acrônimo	Massa molar	P.F. <sup>a</sup> (°C)	P.E. <sup>a,b</sup> (°C)	Número de cetano	Viscosidade Cinemática <sup>c</sup> (40°C; mm <sup>2</sup> /s = cSt)	HG <sup>d</sup> (kg-cal/mol)
Ácido linoléico [9Z,12Z-Octadecadienóico]; 18:2	280,452	-5	229-30 <sup>16</sup>	31,4	3,64; 3,05 <sup>5</sup>	2794
Metil éster	294,479	-35	215 <sup>20</sup>	42,2; 38,2 <sup>9</sup>		
Etil éster	306,506		270-5 <sup>180</sup>	37,1; 39,6 <sup>9</sup>		
Propil éster	322,533			40,6; 44,0 <sup>9</sup>		
Butil éster	336,560			41,6; 53,5 <sup>9</sup>		
Triacilglicerol	879,405			32 <sup>9</sup>		
Ácido linoléico [9Z,12Z,15Z-Octadecatrienóico]; 18:3	278,436	-11	230-2 <sup>17</sup>	20,4	3,27; 2,65 <sup>5</sup>	2750
Metil éster	292,463	-57/-52	109 <sup>0,018</sup>	22,7		
Etil éster	306,490		174 <sup>2,5</sup>	26,7		
Propil éster	320,517			26,8		
Butil éster	324,544			28,6		
Triacilglicerol	873,357			23		
Ácido erúico (13Z-Docosênico); 22:1	338,574	33-4	265 <sup>15</sup>		7,21; 5,91 <sup>4</sup>	3454
Metil éster	352,601		221-2 <sup>5</sup>			
Etil éster	366,628		229-30 <sup>5</sup>			

### Anexo D - Principais ácidos graxos (% m/m) de óleos e gorduras e/ou testados como combustíveis diesel alternativo.<sup>a</sup>

Óleo ou gordura	Índice de Iodo	Índice de saponificação	Composição em ácidos graxos (% m/m)									
			8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	22:1
Babaçu	10-18	245-256	2,6-7,3	1,2-7,6	40-45	11-27	5,2-11	1,8-7,4	9-20	1,4-6,6		
Canola	110-126	188-193					1,5-6	1-2,5	52-66,9	16,1-31	6,4-14,1	1-2
Coco	6-12	248-265	4,6-9,5	4,5-9,7	44-51	13-20,6	7,5-10,5	1-3,5	5-8,2	1,0-2,6	0-0,2	
Milho	103-140	187-198					0-0,3	7-16,5	1-3,3	20-43	39-62,5	0,5-1,5
Algodão	90-119	189-198					0,6-1,5	21,4-26,4	2,1-5	14,7-21,7	46,7-58,2	
Linhaça	168-204	188-196						6-7	3,2-5	13-37	5-23	26-60
Azeitona	75-94	184-196					0-1,3	7-20	0,5-5,0	55-84,5	3,5-21	
Palma	35-61	186-209			0-0,4	0,5-2,4	32-47,5	3,5-6,3	36-53	6-12		
Amendoim	80-106	187-196					0-0,5	6-14	1,9-6	36,4-67,1	13-43	0-0,3
Colza	94-120	168-187					0-1,5	1-6	0,5-3,5	8-60	9,5-23	1-13 5-64
Açafrão	126-152	175-198						5,3-8,0	1,9-2,9	8,4-23,1	67,8-83,2	
Açafrão, rica em ácido oléico	90-100	175-195						4-8	2,3-8	73,6-79	11-19	
Gergelim	104-120	187-195						7,2-9,2	5,8-7,7	35-46	35-48	
Soja	117-143	189-195						2,3-13,3	2,4-6	17,7-30,8	49-57,1	2-10,5 0-0,3
Girassol	110-143	186-194						3,5-7,6	1,3-6,5	14-43	44-74	
Sebo (bovino)	35-48	218-235					2,1-6,9	25-37	9,5-34,2	14-50	26-50	

a) Estes óleos ou gorduras podem conter pequenas quantidades de outros ácidos graxos que não se encontram listados nesta tabela. Por exemplo, o óleo de amendoim contém 1,2% de C20:0, 2,5% de C22:0, e 1,3% de C24:0 (Gunstone et al. 1994).

## Anexo E - Ficha técnica da enzima Novozym 435 cedida pelo fabricante

### Lewatit VP OC 1600

#### Product Information

Lewatit VP OC 1600 is a macroporous, DVB-crosslinked polymer in spherical bead form, based on methacrylic esters.

#### Applications

Enzyme immobilization, especially for immobilizing lipases.

#### General Description

Ionic form (as supplied)	neutral
Functional group	none
Matrix	crosslinked methacrylate
Structure	porous beads
Appearance	white, opaque

#### Physical and chemical properties

Bead size*	min 90%	mm	0.315 - 1.000
Effective size*		mm	0.35 - 0.45
Uniformity coefficient*		max.	1,8
Fines*	<0.315 mm	max.%	10
Coarse beads*	>1.000 mm	max.%	5
Bulk weight		g/l	650 - 800
Surface area	BET	m <sup>2</sup> /g	130
Pore diameter	average	nm	15
Pore volume		ml/g	0,5
Temperature stability		°C	-10 - 100
Operating pH range			5 - 9
Storage temperature	recommended	°C	1 - 40
Storability ex. delivery time		years	2

\* Specification values subjected to continuous monitoring

Metric - Units

## Anexo F - Análise de BET (adsorção de nitrogênio à temperatura de 77K) realizada em equipamento disponível em laboratório da URI-Campus de Erechim (Quatachome, série Nova 2200e)

Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
URI Campus Erechim  
Quantachrome NovaWin2 ©1994-2003, Quantachrome Instruments v2.1

Quantachrome  
INSTRUMENTS

Optimizing particle performance

\*\*\* This report was generated by an unaudited system \*\*\*

### Analysis

Operator:Caroline

Sample ID: NOVOZYM 435 3

Date:2007/09/07

Filename: C:\QCdata\physisorb\Nalane\NOVOZYM 435 3.qps

### Report

Operator:Caroline

Date:8/27/2007

## Volume/Area summary

### Surface Area Data

MultiPoint BET.....	8.510e+01 m <sup>2</sup> /g
Langmuir surface area.....	1.442e+02 m <sup>2</sup> /g
B.J.H.method cumulative adsorption surface area.....	6.050e+01 m <sup>2</sup> /g
B.J.H.method cumulative desorption surface area.....	7.074e+01 m <sup>2</sup> /g
DH.method cumulative adsorption surface area.....	6.165e+01 m <sup>2</sup> /g
DH.method cumulative desorption surface area.....	7.184e+01 m <sup>2</sup> /g
t.method external surface area.....	8.510e+01 m <sup>2</sup> /g

### Pore Volume Data

Total pore volume for pores with Radius less than 189.21 Å at P/Po = 0.946537.....	1.988e-01 cc/g
B.J.H.method cumulative adsorption pore volume.....	1.834e-01 cc/g
B.J.H.method cumulative desorption pore volume.....	1.894e-01 cc/g
DH.method cumulative adsorption pore volume.....	1.799e-01 cc/g
DH.method cumulative desorption pore volume.....	1.853e-01 cc/g
HK.method cumulative pore volume.....	2.879e-02 cc/g
SF.method cumulative pore volume.....	2.997e-02 cc/g

### Pore Size Data

Average pore Radius.....	4.673e+01 Å
B.J.H.method adsorption pore Radius (Mode).....	1.898e+01 Å
B.J.H.method desorption pore Radius (Mode).....	1.534e+01 Å
DH.method adsorption pore Radius (Mode).....	1.898e+01 Å
DH.method desorption pore Radius (Mode).....	1.534e+01 Å
DA.method pore Radius (Mode).....	9.600e+00 Å
HK.method pore Radius (Mode).....	5.487e+00 Å
SF.method pore Radius (Mode).....	1.001e+01 Å

## Total Pore Volume data

### Total Pore Volume

Total pore volume = 1.988e-01 cc/g for pores smaller than 189.2 Å (Radius) at P/Po = 0.94654

Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
 URI Campus Erechim  
 Quantachrome NovaWin2 ©1994-2003, Quantachrome Instruments v2.1

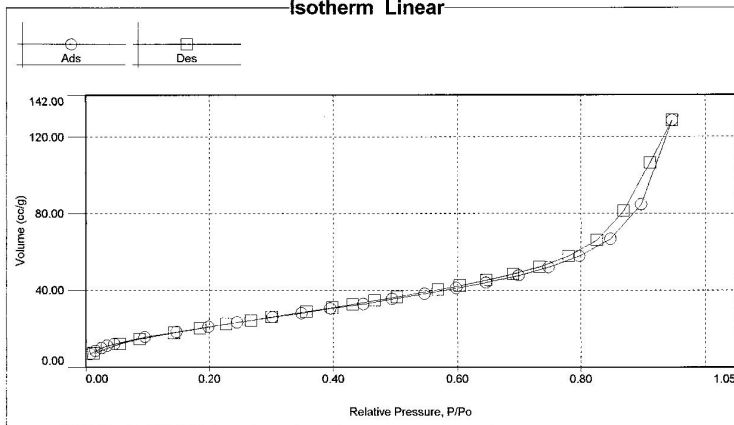
Quantachrome  
 INSTRUMENTS

Optimizing particle performance

\*\*\* This report was generated by an unaudited system \*\*\*

<b>Analysis</b>		<b>Report</b>	
Operator: Caroline	Date: 2007/08/07	Operator: Caroline	Date: 8/27/2007
Sample ID: NOVOZYM 435 3	Filename: C:\QCdata\physisorb\Naiatane\NOVOZYM 435 3.qps	Comment:	
Sample Desc:		Sample Volume: 0.1161 cc	Sample Density: 1.0000 cc/g
Sample weight: 0.1133 g		OutgasTemp: 100.0 C	Analysis gas: Nitrogen
Outgas Time: 3.0 hrs		End of run: 2007/08/07 18:22:08	Instrument: Nova Station B
Analysis Time: 430.1 min		Press. Tolerance: 0.100/0.100 (ads/des)	Equil time: 60/60 sec (ads/des)
Bath Temp: 273.0 K			

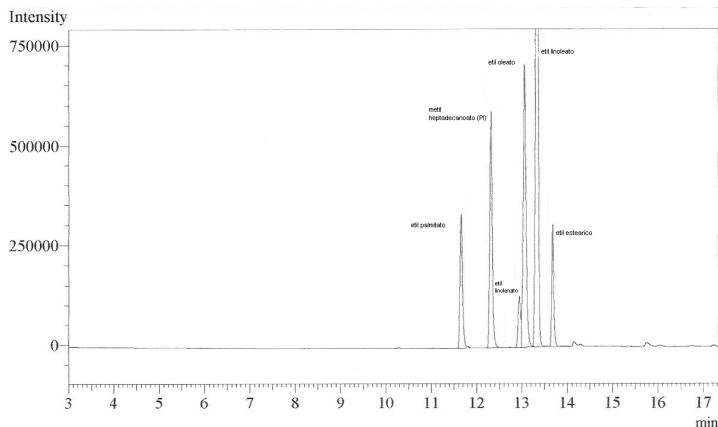
### Isotherm Linear



### Isotherm

Relative Pressure	Volume [cc/g]	Relative Pressure	Volume [cc/g]	Relative Pressure	Volume [cc/g]
8.06400e-03	6.7103	5.97758e-01	40.9958	6.04571e-01	42.2682
1.58510e-02	8.4796	6.45978e-01	43.9988	5.68975e-01	40.2293
2.53160e-02	9.8822	6.98323e-01	47.7009	5.02897e-01	36.4638
3.56480e-02	11.0488	7.47135e-01	51.9306	4.67241e-01	34.5237
4.62880e-02	12.0284	7.96651e-01	57.5969	4.31413e-01	32.5522
9.64030e-02	15.5074	8.46466e-01	66.4710	3.98153e-01	30.8337
1.47618e-01	18.3758	8.97321e-01	84.4695	3.56305e-01	28.7250
1.98334e-01	20.9421	9.48537e-01	128.5513	3.01002e-01	25.9968
2.45444e-01	23.2053	9.11323e-01	106.4682	2.67186e-01	24.3137
3.02057e-01	25.8534	8.68472e-01	81.1445	2.27426e-01	22.3152
3.48705e-01	28.0175	8.24475e-01	65.9736	1.85460e-01	20.1514
3.95517e-01	30.3936	7.79115e-01	57.5772	1.43081e-01	17.8741
4.48889e-01	32.7489	7.32617e-01	52.2181	8.75600e-02	14.5626
4.95260e-01	35.4155	6.90701e-01	48.4176	5.49960e-02	12.1965
5.47471e-01	38.1363	6.47296e-01	45.1471	1.32380e-02	7.1773

**Anexo G** - Exemplo de cromatograma e cálculo de ésteres referentes as análises de ésteres realizadas segundo a EN 14103.



As áreas obtidas no cromatograma acima, juntamente com as massas e concentrações utilizadas no preparo da amostra são aplicadas na seguinte equação:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ei} \times \frac{C_{ei} \times V_{ei}}{W}}{A_{ei}} \times 100$$

onde,

$\sum A$  = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1.

$A_{ei}$  = é a área correspondente ao pico do padrão interno, C17:0.

$C_{ei}$  = é a concentração, em mg/mL, da solução de padrão interno, C17:0.

$V_{ei}$  = é o volume da solução de padrão interno adicionada a amostra (mL)

$W$  = é a massa, em mg, da amostra de biodiesel.

$$C = \frac{(14385068 - 2306625)}{2306625} \times \frac{(8,428 \times 5)}{251,5} \times 100 = 88,3\%$$