



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102013033575-4 A2

(22) Data do Depósito: 27/12/2013

(43) Data da Publicação: 29/12/2015

(RPI 2347)



* B R 1 0 2 0 1 3 0 3 3 5 7 5 A

(54) Título: PROCESSO PARA À
ESTERIFICAÇÃO DE CARGAS VEGETAIS

(51) Int. Cl.: C07C 67/03; C10L 1/18

(52) CPC: C07C 67/03; C10L 1/1817; C10L
2200/0476

(73) Titular(es): PETRÓLEO BRASILEIRO S/A -
PETROBRAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO - UFRJ

(72) Inventor(es): ALINE MACHADO DE
CASTRO, MÁRCIO DE FIGUEIREDO
PORTILHO, MARCO DI LUCCIO, JOSÉ
VLADIMIR DE OLIVEIRA, DÉBORA DE
OLIVEIRA, HELEN TREICHEL, DENISE MARIA
GUIMARÃES FREIRE

(57) Resumo: PROCESSO PARA A
ESTERIFICAÇÃO DE CARGAS VEGETAIS. A
presente invenção descreve um processo para a
esterificação de cargas vegetais, o qual
compreende a reação de uma corrente de
ácidos graxos livres com uma quantidade
estequiométrica ou excesso de um álcool em um
solvente gasoso pressurizado utilizando catálise
enzimática.

PROCESSO PARA A ESTERIFICAÇÃO DE CARGAS VEGETAIS

Campo da invenção:

A presente invenção se aplica na área de produção de biodiesel e descreve um processo para a esterificação de cargas vegetais utilizando catálise enzimática em solventes pressurizados.

Fundamentos da invenção:

A transesterificação de um triglicerídeo é o método convencional de produção de biodiesel. Neste processo químico, um triglicerídeo e um álcool de cadeia curta (que pode ser metanol, etanol, propanol ou butanol) reagem na presença de um catalisador ácido, básico ou enzimático, produzindo uma mistura de monoésteres e glicerina.

Esta reação é reversível e, em vista disso, a produção de biodiesel é diretamente influenciada pela proporção entre os reagentes, tipo de catalisador e demais condições reacionais.

A maior parte do biodiesel comercial é produzida a partir de óleos vegetais na presença de catalisadores homogêneos e básicos, tais como hidróxidos de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, mais comumente de sódio e potássio, ou seus alcóxidos. Há citações na literatura de sólidos capazes de promover a transesterificação, como o aluminato de zinco conforme descrito no pedido de patente US 2007/0066838 A1 da AXENS/IFP, ou os nanotubos de titanatos como descrito no pedido de patente US 2009/0151234 A1 da PETROBRAS.

Catalisadores homogêneos possuem alta velocidade reacional, e na presença de água são capazes de hidrolizar o éster (m)etílico gerado, a partir de óleos vegetais e gorduras animal formando sabões, que são emulsificantes, dificultando a separação de fases entre o éster (m)etílico e a glicerina formada.

Pela transesterificação ser uma reação reversível, se faz necessário o uso de 100% de excesso molar do monoálcool para garantir boa conversão do óleo vegetal e ou gordura animal em monoéster.

Ácidos graxos livres (AGL) nos óleos vegetais não são convertidos em éster pela ação de catalisadores básicos. Nessas condições o catalisador é consumido para formação de sabões.

5 A esterificação de ácidos graxos livres tem sido proposta como meio de desacidificar os óleos e eliminar o problema do consumo do catalisador básico, aumentando o rendimento da catálise alcalina para produção de biodiesel.

Rotas de produção de biodiesel sem catalisador também já foram investigadas, mas são necessárias altas temperaturas, na faixa de 250°C a 400°C e pressões na faixa de 100 a 200 bar para se atingir boas conversões de biodiesel etílico e metílico a partir de óleos vegetais.

O documento CN 102021207 A descreve um processo de preparo de biodiesel a partir de gorduras renováveis por meio de catálise com lipase utilizando um álcool de cadeia curta.

15 O documento EP 1484384 A1 descreve um método de produção de biocombustíveis pela decomposição enzimática de óleos e gorduras, formando ácidos graxos os quais reagem com um álcool inferior para formar ésteres.

O documento BR 9306459 relata novas espécies de micro-organismos e enzimas lipases obtidas a partir desses, bem como a aplicação industrial destas lipases na hidrólise e síntese de ésteres.

No entanto, o processo de transesterificação enzimática apresenta limitações para sua aplicação industrial. A baixa especificidade da grande maioria dos catalisadores enzimáticos encontrados e a diminuição da atividade enzimática pelo glicerol produzido na reação conduzem à baixa conversão dos reagentes no produto final, biodiesel.

Além disso, solventes orgânicos devem ser vaporizados para a recuperação dos ésteres obtidos e, posteriormente, condensados para reaproveitamento no processo.

30 O processo de esterificação da presente invenção, surge como uma

alternativa ao processo enzimático convencional de produção de ésteres a partir de óleos vegetais, que se baseia na reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois primários de cadeia curta.

5 A presente invenção descreve um processo de síntese de ésteres a partir de um processo biotecnológico, utilizando enzimas não comerciais, lipases microbianas, e uso de gases pressurizados que funcionam como solventes, os quais são mais facilmente removidos do sistema e recuperados para reutilização, quando comparados aos solventes líquidos nas mesmas condições operacionais usadas.

10 As enzimas utilizadas na presente invenção não sofrem inativação na presença dos compostos sulfurados contidos na corrente bruta de solvente pressurizado e, como não se produz glicerol, reduzem-se as perdas de rendimento por diminuição da atividade enzimática.

15 O processo pode ser utilizado para pré-tratamento de cargas vegetais com elevada acidez, de forma a adequá-las para entrada em reatores de transesterificação alcalina (processo tradicional) ou ainda de forma independente para produção de biodiesel.

Sumário da invenção:

20 A presente invenção descreve um processo para a esterificação de cargas vegetais, o qual compreende a reação de uma corrente de ácidos graxos livres com uma quantidade estequiométrica ou excesso de um álcool em um solvente gasoso pressurizado utilizando catálise enzimática.

Descrição detalhada da invenção:

25 A presente invenção descreve um processo para a esterificação de cargas vegetais compreendendo ácidos graxos livres, especialmente para a produção de biodiesel.

A esterificação dos ácidos graxos livres é realizada com uma quantidade estequiométrica ou excesso de um álcool, de modo a fornecer uma corrente de saída contendo alquil-ésteres, álcool não reagido e água.
30 A razão molar ácido graxo:álcool pode variar na proporção estequiométrica

de 1:1 até 1:6.

O processo de esterificação da presente invenção é conduzido em solvente gasoso pressurizado, que pode consistir individualmente de propano, n-butano, n-pentano e iso-butano pressurizados e liquefeitos, bem como a misturas desses gases em diferentes proporções. Em uma modalidade preferida da invenção, o solvente é gás liquefeito de petróleo (GLP).

A corrente de alimentação do processo consiste de ácidos graxos livres de cadeia carbônica curta a longa, podendo variar de 4 átomos de carbono até 24 átomos de carbono, (C_4 a C_{24}), saturadas ou insaturadas, puros ou em misturas em quaisquer proporções, ou, ainda, misturas de ácidos graxos livres e triglicerídeos.

Os álcoois utilizados consistem em álcoois alifáticos de cadeia curta, selecionados dentre metanol, etanol, n-propanol e n-butanol, ou misturas dos mesmos.

Como catalisador são utilizadas lipases microbianas, que nesta invenção foram produzidas a partir de linhagens de microrganismos depositadas no *National Microbiology Laboratory, Public Health of Canadá, 1015 Arlington Street, winnipeg, Manitoba Canadá R3E 3R2, IDA of Canadá*, dentre as quais se destacam as lipases de *Candida antarctica*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Penicillium brevicompactum 28f3* (número de acesso 071113-04), *Penicillium sp.*, *Candida sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Thermomyces sp.* e *Yarrowia sp.*

A enzima utilizada pode ser obtida a partir de microrganismos selvagens ou por meio da técnica do DNA recombinante e pode ser utilizada com ou sem purificação prévia, na forma livre ou imobilizada em suportes insolúveis. A enzima pode ser utilizada diretamente após a fermentação de farelos e tortas de resíduos agroindustriais com os microrganismos anteriormente citados. A quantidade de enzima a ser utilizada pode variar de 1 a 50% (m/m) em relação à carga que é uma mistura de

óleo e álcool.

A esterificação é conduzida em um reator fechado com controle de temperatura e pressão, com entrada para a carga contendo ácido graxo livre, outra entrada para o álcool e uma saída para os produtos da reação.

5 A temperatura usada na reação de esterificação é na faixa de 20°C a 80°C e a pressão de operação varia na faixa de 5 bar a 200 bar. O tempo de reação varia de 0,5 h a 24 h e a velocidade de agitação pode variar de 100 rpm a 1500 rpm.

10 A recuperação dos alquil ésteres obtidos é realizada pela despressurização da corrente de saída do reator, que segue posteriormente para as etapas de separação dos ésteres do ácido graxo e do álcool não reagido.

O processo pode ser conduzido em batelada ou em modo contínuo. No processo em batelada, a adição do álcool pode ser realizada em modo
15 batelada alimentada.

Produção e obtenção das enzimas:

Para realizar o processo de esterificação da presente invenção, as enzimas lipases de *Penicillium brevicompactum* 28f3 (número de acesso no IDA Canadá 071113-04), *Penicillium simplicissimum* (número de
20 acesso no IDA Canadá 071113-05) e *Rhizomucor miehei* (número de acesso no IDA Canadá 071113-01). são obtidas por meio das metodologias abaixo:

- *Penicillium brevicompactum* (número de acesso no IDA Canadá 071113-04) e *Penicillium simplicissimum* (número de acesso no IDA
25 Canadá 071113-05);

Torta fermentada (PES) seca em estufa a vácuo:

A fermentação é realizada em estado sólido (FES), utilizando farelo de babaçu com 80% de umidade como substrato. Em seguida, a torta fermentada é colocada em placas de petri e seca em estufa a vácuo a
30 40°C, até peso constante.

Torta fermentada (PES) liofilizada:

A fermentação é realizada em estado sólido (FES), utilizando farelo de babaçu com 80% de umidade como substrato. Em seguida, a torta fermentada é disposta em camadas de cerca de 1 cm de espessura em placas de petri e, então, estas são submetidas ao congelamento a - 80°C por 24 h, como fase preparatória ao procedimento de liofilização.

Extrato bruto liofilizado:

O extrato é obtido após extração da enzima do meio de fermentação utilizando solução tampão de fosfato de sódio a 100 mM, pH 7,0, sendo a relação farelo:tampão igual a 1:5, sob incubação por 20 min a 35°C e agitação na velocidade de 200 rpm em agitador orbital, obtendo-se o extrato enzimático bruto.

Em seguida, o extrato bruto é disposto em camadas de cerca de 1 cm de espessura em placas de petri e estas são submetidas ao congelamento a - 80°C por 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização.

Extrato enzimático precipitado e liofilizado:

Para a precipitação do extrato bruto, adiciona-se a esse, sulfato de amônio sólido até uma concentração de 60% de saturação, mantendo-o em banho de gelo a 4°C, com agitação constante, ajustando-se o pH até 7 com a adição de NaOH 20% (p/v).

Em seguida, a amostra é centrifugada a 3000g e mantida a -10°C por 5 h. O sobrenadante é descartado e o precipitado, removido. O extrato precipitado obtido é disposto em camadas de aproximadamente 1 cm de espessura em placas de petri, e então, estas são submetidas ao congelamento a -80°C por 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização.

Extrato enzimático precipitado, liofilizado e imobilizado:

A partir do extrato precipitado liofilizado, o mesmo é imobilizado com alginato de sódio e carvão ativado. A enzima imobilizada apresenta

diâmetro de poro igual a 4,24 nm e volume de poro de 0,1 mL/g.

- *Rhizomucor mieheji* (número de acesso no IDA Canadá 071113-01)

Torta fermentada (PES) liofilizada:

A fermentação é realizada em estado sólido (FES), utilizando farelo
5 de babaçu com 80% de umidade como substrato. Em seguida, a enzima
(PES) é disposta em camadas de aproximadamente 1 cm de espessura
em placas de petri e, então, as mesmas são submetidas ao congelamento
a -80°C por 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização.

Extrato bruto liofilizado:

10 O extrato enzimático bruto é obtido após extração da enzima do
meio de fermentação utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0
(relação farelo:tampão de 1:5) sob incubação por 20 min a 35°C e agitação
a 200 rpm em agitador orbital. Em seguida, o extrato bruto é disposto em
camadas de cerca de 1 cm de espessura em placas de petri e, então, as
15 placas são submetidas ao congelamento a -80°C por 24 h, como fase
preparatória do procedimento de liofilização.

Extrato enzimático precipitado e liofilizado:

Para a precipitação do extrato enzimático bruto, adiciona-se a esse
sulfato de amônio sólido até atingir uma concentração de 60% de
20 saturação, mantendo-o em banho de gelo a 4°C, com agitação constante,
em pH 7 e adição de solução NaOH 20% (p/v).

Em seguida, a amostra é colocada em tubo de centrífuga e mantida
a -10°C por 5 h para permitir a separação, centrifugando-se então esta a
3000g de rotação por 15 min. O sobrenadante é descartado e o
25 precipitado, reservado. O extrato precipitado obtido é disposto em
camadas de aproximadamente 1 cm de espessura em placas de petri, e
então, estas são submetidas ao congelamento a -80°C por 24 h, como
fase preparatória do procedimento de liofilização.

Extrato enzimático precipitado, liofilizado e imobilizado:

30 A partir do extrato precipitado liofilizado, o mesmo é imobilizado com

alginate de sódio e carvão ativado. A enzima de *R. miehei* imobilizada apresenta diâmetro de poro igual a 4,24 nm e volume de poro de 0,1 mL/g.

Exemplos da invenção:

Com o propósito de melhor ilustrar a invenção, são exemplificadas
5 duas esterificações.

Exemplo 1 – Síntese de oleato de etila em GLP pressurizado em modo batelada alimentada utilizando carga ácida:

Uma mistura de 9 g de ácido oleico e 1 g de óleo de soja foi adicionada a uma quantidade estequiométrica equivalente a um terço de
10 etanol e lipase de *Rhizomucor miehei* (número de acesso no IDA Canadá 071113-01) na forma liofilizada, em quantidade suficiente para se obter uma concentração de 20% em massa de enzima em relação à mistura reacional.

Esta mistura foi alimentada a um reator para trabalho em alta
15 pressão (de 5 a 200 bar) de 100 mL. O reator foi fechado e alimentado com 60 mL de GLP, ajustando-se a temperatura do meio reacional para 40°C. Após 2 h, 1/3 da quantidade estequiométrica de etanol foi novamente adicionada ao reator e, após 2 h, a quantidade final para atingir todo o valor estequiométrico do etanol, foi adicionada ao reator, totalizando
20 um tempo de reação de 6 h.

O sistema foi agitado mecanicamente a uma velocidade de 1000 rpm. Nestas condições, a conversão de ácido oleico em oleato de etila foi de 46%.

**Exemplo 2 – Síntese do oleto de etila em GLP pressurizado em
25 batelada simples:**

Uma mistura de 10 g de ácido oleico foi adicionada a uma quantidade estequiométrica de etanol e um preparado enzimático de *Rhizomucor miehei* (número de acesso no IDA Canadá 071113-01) ou de *Penicillium brevicompactum* 28f3 (número de acesso no IDA Canadá
30 071113-04) em diferentes formas de apresentação, em quantidade

suficiente para se obter uma concentração de 20% em massa de enzima em relação à mistura reacional.

Esta mistura foi alimentada a um reator de alta pressão (de 5 a 200 bar) de 100 mL. O reator foi fechado e alimentado com 60 mL de GLP, ajustando-se a temperatura do meio reacional para 40°C.

Nestas condições, as conversões de ácido oleico em oleato de etila foram aquelas apresentadas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Conversões obtidas com as diferentes formas de apresentação da enzima.

Forma de apresentação da enzima	Conversões obtidas (%)	
	<i>Penicillium brevicompactum 28f3</i> (número de acesso no IDA Canadá 071113-04)	<i>Rhizomucor miehei</i> (número de acesso no IDA Canadá 071113-01)
Farelo bruto (PES) seco em estufa	23,1	28,5
Farelo bruto (PES) liofilizado	24,7	26,5
Extrato precipitado liofilizado	30,9	28,7
Extrato bruto liofilizado	32,8	26,1
Enzima imobilizada	24,7	27,2

10 - Dosagem da atividade enzimática de esterificação:

A atividade das enzimas de *Penicillium brevicompactum 28f3* (número de acesso no IDA Canadá 071113-04) e *Rhizomucor miehei* (número de acesso no IDA Canadá 071113-01) é quantificada pelo consumo de ácido na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol com razão molar ácido-álcool de 1:1 à temperatura de 40°C.

15 A enzima estava presente a 2% p/p e foi mantida sob agitação de

100rpm por 10 a 50 minutos.

A reação é iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em agitador rotativo. Alíquotas de 500 μL , em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após o tempo adequado de reação
5 (variando de 5 a 60 min., dependendo do tipo de enzima e da eficiência de imobilização), foram diluídas em 20 mL de acetona:etanol (1:1). As alíquotas foram utilizadas para titulação contra uma solução de NaOH 0,045N e determinação da concentração de ácido oléico consumido.

A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por
10 titulação com NaOH 0,045N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μmol de ácido oleico por minuto nas condições experimentais descritas.

A seguinte equação foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$15 \quad \text{Atividade (U/g)} = \frac{[(V_{\text{NaOH}}^0) - (V_{\text{NaOH}}^t)] \times N \times 10^3 \times V_t}{t \times m_a \times V_a}$$

Em que:

V^0 = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL),

20 V^t = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após o tempo de reação (mL),

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio,

V_t = volume total,

t = tempo de reação (min),

25 m_a = massa de enzima utilizada na reação (g),

V_a = volume da alíquota,

1U = 1 μmol de ácido/minuto.

A atividade da enzima é determinada antes e após as reações em todos os experimentos realizados, objetivando o acompanhamento da
30 alteração da sua atividade quando submetida ao GLP pressurizado.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a esterificação de cargas vegetais **caracterizado** pelo fato de compreender a reação de uma corrente de ácidos graxos livres com uma quantidade estequiométrica ou excesso de um álcool em um
5 solvente gasoso pressurizado utilizando catálise enzimática.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a corrente de ácidos graxos consiste em ácidos graxos livres de cadeia carbônica variando de C₄ a C₂₄, saturadas ou insaturadas, na forma pura ou em misturas de quaisquer proporções ou misturas de ácidos
10 graxos livres e triglicerídeos.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o álcool é um álcool alifático de cadeia curta selecionado do grupo que consiste em metanol, etanol, n-propanol, n-butanol ou misturas dos mesmos.
- 15 4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de que a razão molar do ácido em relação ao álcool varia de 1:1 a 1:6.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente gasoso pressurizado consiste em metano, etano, eteno,
20 propano, propeno, n-butano, iso-butano, iso-butenos e pentano pressurizados e liquefeitos ou a mistura destes gases em diferentes proporções.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o solvente gasoso pressurizado é o gás liquefeito de petróleo (GLP).
- 25 7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a catálise enzimática é realizada por lipases microbianas, purificadas ou não.
8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as lipases microbianas são selecionadas do grupo que consiste nas
30 lipases de *Candida antarctica*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*,

Penicillium brevicompactum, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium sp.*, *Candida sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Thermomyces sp.* e *Yarrowia sp.*

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, **caracterizado** pelo fato de que as lipases microbianas estão na forma livre ou imobilizadas em suportes insolúveis.
- 5
10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7, 8 ou 9, **caracterizado** pelo fato de que as lipases microbianas são obtidas a partir de microorganismos selvagens ou por meio da técnica do DNA recombinante.
- 10
11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7, 8, 9 ou 10, **caracterizado** pelo fato de que a enzima está presente na faixa que varia de 1 a 50% (m/m) em relação à carga de óleo e álcool.
12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** por ser executado no modo em batelada ou contínuo.
- 15
13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que, quando executado no modo em batelada, a adição do álcool é realizada em modo batelada alimentada.
14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de que é conduzido em um reator fechado com
- 20 controle de temperatura e pressão por um intervalo de tempo que varia de 0,5 a 24 h, sob agitação.
15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a temperatura varia na faixa de 20 °C a 80°C.
16. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato
- 25 de que a pressão varia na faixa de 5 a 200 bar.
17. Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a velocidade de agitação varia na faixa de 100 a 1500 rpm.
18. Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que os ésteres obtidos são recuperados pela despressurização da
- 30 corrente de saída do reator.

RESUMO

PROCESSO PARA A ESTERIFICAÇÃO DE CARGAS VEGETAIS

A presente invenção descreve um processo para a esterificação de cargas vegetais, o qual compreende a reação de uma corrente de ácidos graxos livres com uma quantidade estequiométrica ou excesso de um

5 álcool em um solvente gasoso pressurizado utilizando catálise enzimática.