



**Universidade de Aveiro** Departamento de Ambiente e Ordenamento

2014

**Sandra Sofia  
Silva Sorte**

**Biocatálise aplicada à valorização de óleos  
alimentares usados**





**Sandra Sofia  
Silva Sorte**

**Biocatálise aplicada à valorização de óleos  
alimentares usados**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Isabel da Silva Nunes, Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, e sob coorientação científica do Professor Doutor João Coutinho, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



**o júri**

**presidente**

Professora Doutora Ana Paula Duarte Gomes

Professora Auxiliar, Departamento de Ambiente e Ordenamento da  
Universidade de Aveiro

**vogal**

Doutora Maria Jorge Pratas de Melo Pinto

Responsável pelo laboratório da EGEO Solventes

**vogal**

Professora Doutora Maria Isabel da Silva Nunes

Professora Auxiliar, Departamento de Ambiente e Ordenamento da  
Universidade de Aveiro



*Dedico esta dissertação à minha amiga Liliana Valente, que sempre me apoiou nesta caminhada e que se fez notar nos momentos de maiores dificuldades.*





Agradeço a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho, com especial atenção para:

- à minha orientadora Dr. Isabel Nunes, pela oportunidade de trabalhar consigo, orientação e amizade. Agradeço em especial toda a sua disponibilidade e dedicação em acompanhar diariamente o meu trabalho, ajudando-me sempre a contornar os obstáculos. Agradecer ao meu coorientador Professor Doutor João A.P. Coutinho pelos esclarecimentos prestados no decorrer do trabalho;

- à minha “irmã”, Liliana Valente, pelo seu incentivo, amizade e acima de tudo boa disposição ao longo desta caminhada. Muitíssimo obrigado por tudo, sem ti nada disto seria possível;

## **Agradecimentos**

- um especial agradecimento à Mestre Sónia Rocha, pela disponibilidade de que sempre manifestou, pelo seu inestimável apoio e incentivo, e pelas suas valiosos conhecimentos na cromatografia gasosa. Não podendo esquecer do todo o apoio e disponibilidade por parte do Mestre Márcio Duarte em auxiliar-me no cromatógrafo gasoso. O meu muito obrigado a ambos foi um privilégio trabalhar com vocês;

- à Professora Doutora Teresa Nunes, Doutora Célia Alves, Professor Doutor Mário Simões pela disponibilização dos cromatógrafos gasosos, em especial agradecimento à professora Dr. Teresa por partilhar comigo todo o seu conhecimento na área da cromatografia;

- à mestre Ana Rita Costa, Doutor Jorge Pereira, Doutora Maria Jorge Pratas e Doutora Margarita, pela constante disponibilidade para esclarecimento de dúvidas na análise por cromatografia gasosa;

- aos meus irmãos, Nelson Silva, Carlos Silva, Elisabete Magalhães, Rui Carvalho e aos meus pais, por todo o vosso carinho e incentivo ao longo desta caminhada;

- ao meu sobrinho, Diogo Silva, por todo o seu carinho, compreensão da minha ausência, por cada sorriso e abraço que me dava força e coragem de continuar a lutar;

- ao João Peres, por toda a amizade e incentivo na reta final deste trabalho;

- a todos os professores e funcionários do Departamento de Ambiente e Ordenamento, que me acompanharam neste trabalho, a todos o meu muito obrigado por todo o apoio;

- aos meus colegas de laboratórios, Catarina Ribeiro, Catarina Gonçalves, Andreia Sequeira, Hugo Lapa e Elisabete Teixeira, por me apoiar durante este trabalho.



**palavras-chave**

Óleos Alimentares Usados (OAU), *FAME*, Novozyme® 435, biocatálise, regeneração, biorreatores

**resumo**

O crescente consumo de energia, bem como a possibilidade de esgotamento dos recursos não renováveis, tem fomentado a busca de fontes de energia alternativas. O biodiesel é um biocombustível obtido a partir de fontes renováveis e a sua utilização permite reduzir as emissões de gases com efeito de estufa. Nos últimos anos tem-se produzido biodiesel a partir de óleos alimentares usados (OAU), sendo que com esta aplicação valoriza-se um resíduo e simultaneamente produz-se um combustível “verde”. O biodiesel é produzido através das reações de transesterificação e/ou esterificação entre triglicéridos e/ou ácidos gordos livres e um álcool, na presença de um catalisador. O rendimento do processo está estritamente relacionado com o tipo de catalisador e as condições que este opera.

O principal objetivo do presente trabalho consistiu na avaliação do efeito de alguns parâmetros operacionais no desempenho de uma lipase imobilizada (Novozyme® 435), nomeadamente: (i) índice de acidez do óleo, (ii) razão mássica de enzima/óleo e (iii) método regeneração da enzima com vista à sua reutilização. Também foi objeto de estudo do presente trabalho a produção em contínuo, num (bior)reator tubular de leito fixo, de ésteres metílicos de ácidos gordos (*FAME*) usando a referida enzima.

Registou-se um aumento rendimento em com o incremento do índice de acidez do óleo usado, o que indicia que a enzima catalisa simultaneamente as reações de esterificação e transesterificação. Relativamente à razão mássica de enzima/óleo, dentro da gama testada verificou-se um aumento do rendimento em *FAME* com a concentração da enzima em meio reacional. Dos vários solventes testados, a aplicação de solvente tert-butanol na regeneração (com incubação) da enzima foi o que melhores resultados teve. Finalmente, os resultados obtidos no ensaio de produção de *FAME* num biorreator contínuo são motivadores, criando expectativas de uma possível aplicação industrial no futuro.



**keywords**

Waste cooking oil, FAME, Novozyme<sup>®</sup> 435, Biocatalysis, Regeneration, Bioreactors

**abstract**

The increasing energy consumption and the non-renewable resources depletion has encouraged the search for alternative energy sources. Biodiesel is a biofuel obtained from renewable sources which utilization allows aiming the reduction on greenhouse effect gases emissions. In the last few years, biodiesel has been produced from used cooking oil, since this application promotes the valorization of a waste and the production of a green fuel, simultaneously. Biodiesel is produced through transesterification reactions and/or esterification between triglycerides and/or fatty acids and an alcohol, in the presence of an appropriate catalyst. The efficiency of the process is strictly related with the type of catalyst and the operational conditions.

The main goal of this study was to evaluate the effect of some operational parameters in an immobilized lipase's performance (Novozyme<sup>®</sup> 435), namely: (i) oil's acidity index, (ii) enzyme/oil mass ratio and (iii) applied treatment on the enzyme regeneration stage, in order to reutilize it. It was also a goal to study the production in a continuous regime, in a fixed bed bio(reactor), of fatty acid methyl esters (FAME) using the referred enzyme.

It has been registered an increased efficiency on FAME with the oil acidity index rise, which indicates that the enzyme catalyzes simultaneously both the esterification and transesterification reactions. Concerning the enzyme/oil mass ratio, within the tested range, an increase was registered on FAME efficiency with enzyme concentration in the reactional medium. Among several solvents tested on enzyme washing, tert-butanol was the one with the better performance. Finally, the results obtained from the FAME production on a continuous bioreactor essay are motivating, creating some expectations on its possible future application at an industrial level.



---

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Motivação e relevância do tema	1
1.2	Objetivos e estrutura da dissertação	2
<b>2</b>	<b>Produção de ésteres metílicos de ácidos gordos</b>	<b>3</b>
2.1	Introdução	3
2.2	Reações de transesterificação e esterificação	4
2.3	Catalisadores	7
2.3.1	Químicos	8
2.3.2	Enzimáticos	9
2.3.2.1	Caracterização e classificação das enzimas	11
2.3.2.2	Imobilização de enzimas	14
2.3.2.3	Proteção, pré-tratamento e reutilização das lípases imobilizadas	15
2.3.2.4	Incremento da atividade enzimática	23
2.4	Reagentes	23
2.4.1	Triglicerídeos e ácidos gordos livres	23
2.4.1.1	Índice de acidez	26
2.4.1.2	Pré-tratamento do OAU	28
2.4.2	Álcoois	29
2.5	Outros parâmetros operacionais	32
2.5.1	Teor em água	32
2.5.2	Temperatura	33
2.5.3	Agitação	34
2.5.4	pH	34
2.5.5	Concentração de enzima	34
2.5.6	O subproduto glicerol	38
2.6	Biorreatores	39
2.6.1	Descontínuos	41
2.6.2	Contínuos	43
2.6.2.1	Biorreatores agitados	43
2.6.2.2	Biorreatores de leito fixo	44
2.7	Monitorização do rendimento da reação	51

---

2.8	Conclusão.....	56
<b>3</b>	<b>Procedimento e planeamento experimental .....</b>	<b>59</b>
3.1	Introdução.....	59
3.2	Plano experimental .....	60
3.3	Materiais e equipamentos .....	61
3.4	Metodologia experimental .....	62
3.4.1	Caracterização e pré-tratamento da enzima.....	63
3.4.2	Características da resina Lewatit GF 202.....	66
3.4.3	Caracterização e pré-tratamento do OAU .....	66
3.4.3.1	Densidade OAU e misturas de OAU com ácido oleico .....	66
3.4.3.2	Índice de acidez do OAU e misturas de OAU com ácido oleico.....	67
3.4.3.3	Pré-tratamento do OAU.....	68
3.4.3.4	Massa molar do OAU .....	69
3.4.4	Ensaio em reator descontínuo.....	69
3.4.4.1	Influência do índice de acidez da matéria-prima no desempenho da Novozyme®435 .....	69
3.4.4.2	Influência da razão mássica Novozyme®435/ OAU no rendimento em FAME .....	71
3.4.4.3	Efeito do método regeneração na reutilização da Novozyme®435.....	72
3.4.5	Ensaio em reator contínuo .....	74
3.4.6	Determinação do teor de ésteres metílicos .....	78
3.5	Conclusão.....	81
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>83</b>
4.1	Introdução.....	83
4.2	Caracterização do OAU e de misturas de OAU com ácido oleico .....	83
4.2.1	Densidade.....	83
4.2.2	Índice de acidez .....	83
4.2.3	Massa molar .....	84
4.3	Avaliação do desempenho da Novozyme® 435 na conversão a FAME de OAU com diferentes índices de acidez.....	85
4.4	Influência da razão mássica Novozyme® 435/ OAU no rendimento em FAME.	87
4.5	Efeito do método regeneração na reutilização da Novozyme®435 .....	88
4.6	Produção de FAME em reator contínuo de leito fixo .....	93
4.7	Conclusão.....	95
<b>5</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>99</b>

---



---

5.1	Introdução .....	99
5.2	Conclusões gerais .....	99
5.3	Sugestões para trabalho futuro .....	100
<b>Bibliografia.....</b>		<b>103</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>111</b>
A.1	Massa molar do OAU .....	111
A.2	Índice de acidez da mistura de OAU + ácido oleico.....	113
A.3	Cálculos efetuados na preparação da reação de produção de Biodiesel.....	114
A.4	Ficha técnica da Lewatit® GF 202.....	116
A.5	Valores de caudal obtidos nos testes do caudal da bomba peristáltica .....	117
A.6	Quantidade de Novozyme® 435 necessária para operar num reator tubular de leito fixo.....	118
A.7	Tempos de retenção dos GC.....	119
A.8	Destino dos resíduos produzidos neste trabalho .....	120

---

## Índice de Figuras

Figura 2.1. Reação geral de transesterificação para produção de biodiesel. ....	4
Figura 2.2 Esquema geral das etapas de transesterificação de um triglicerídeo (Rosset 2011).....	6
Figura 2.3 Reação geral de esterificação de um ácido gordo (Rosset I. 2011). ....	6
Figura 2.4 Modelos de interação do substrato com a enzima.: (A) modelo de chave e fechadura; (B) modelo de encaixe induzido (Neto P. 2002).....	10
Figura 2.5. Efeito do metanol (na presença e ausência de solvente) nas moléculas de água à superfície da enzima imobilizada (Fu & Vasudevan 2009).....	16
Figura 2.6 Efeito do tipo método usado na lavagem na enzima ( <i>Novozyme®435</i> ) no rendimento em <i>FAME</i> , ao longo de 4 ciclos de utilização: (A) controlo, i.e., sem lavagem; (B) lavagem com acetona; (C) lavagem com OAU; (D) lavagem com tert-butanol e incubação com OAU (Azócar <i>et al.</i> 2011). 21	
Figura 2.7 Fluxograma das cadeias produtivas de biodiesel (Maurício S. 2008).....	24
Figura 2.8 Rendimento em <i>FAME</i> para diferentes concentrações de ácido linolénico na matéria-prima. As condições operacionais: razão metanol/ óleo de 3:1, 15% <i>Novozyme® 435</i> , 200 rpm, à 35°C e 12h de tempo de reação. As letras “a” e “b” mostram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) (Azócar <i>et al.</i> 2011).....	28
Figura 2.9. Metanólise de óleo vegetal com diferentes quantidades de MeOH, catalisada pela lipase <i>Candida antarctica</i> ( <i>Novozyme® 435</i> ). (Shimada <i>et al.</i> 2002).....	31
Figura 2.10 Efeito da água sobre a metanólise de óleo. As condições de reação: 3% Lipozyme TL IM e 1% <i>Novozyme® 435</i> ; razão molar metanol / óleo de 4:1; razão tert-butanol/ óleo 1:1 (Li <i>et al.</i> 2006). ....	33
Figura 2.11. Efeito de diferentes razões mássicas enzima/ óleo de semente de algodão na concentração de <i>FAME</i> (Wang & Zhang 2010).....	36
Figura 2.12 Efeito da razão mássica de <i>Novozyme® 435</i> /óleo no rendimento em <i>FAME</i> , na metanólise de óleo de colza(Li <i>et al.</i> 2006).....	36
Figura 2.13 O efeito da quantidade de enzima IIT-SARKYME usada na metanólise do OAU, num reator de leito fixo (Chattopadhyay & Sen 2013). ....	37
Figura 2.14. Representação esquemática do reator de leito fixo, em cada etapa de reação usado por (Nie <i>et al.</i> 2006). ....	45

---

Figura 2.15. Metanólise do OAU com adição gradual de metanol (indicado por setas) (Nie <i>et al.</i> 2006). .....	45
Figura 2.16. Estabilidade operacional da lipase imobilizada num reator de leito fixo (Nie <i>et al.</i> 2006). .....	46
Figura 2.17 Esquema do reator de leito fixo usado por (Hajar <i>et al.</i> 2009). .....	46
Figura 2.18 Reutilização de lipase imobilizada Novozyme® 435 do reator de leito fixo contínuo (Hajar <i>et al.</i> 2009). .....	47
Figura 2.19. Esquema experimental do reator de leito fixo simples estágio usado por (Silva 2013). .....	48
Figura 2.20. Rendimento em ésteres na etanólise do óleo de macaúba em reator de leito fixo (lipase B. cepacia ) operando de modo contínuo (Silva 2013). .....	48
Figura 2.21. Esquema experimental do processo de produção de biodiesel contínua numa associação <i>CSTR-PFR</i> usado por (Chattopadhyay & Sen 2013). .....	49
Figura 2.22. O efeito do caudal da mistura de alimentação usada na transesterificação (Chattopadhyay & Sen 2013). .....	50
Figura 2.23 Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico (Douglas <i>et al.</i> 2009). .....	53
Figura 2.24. Representação genérica da reação de silição (Douglas <i>et al.</i> 2009). .....	55
Figura 3.1 Fotografias ilustrativas das várias etapas que compreendem o processo de pré-tratamento da enzima. ....	65
Figura 3.2. Picnómetro com OAU. ....	66
Figura 3.3. Titulador automático. ....	68
Figura 3.4. Fotografias ilustrativas das várias etapas que compreendem o processo de produção de <i>FAME</i> que testam a influência do índice de acidez. ....	71
Figura 3.5. Fotografias ilustrativas das várias etapas que compreendem o processo de produção de <i>FAME</i> que testam o efeito do método de regeneração na reutilização Novozyme® 435. ....	74
Figura 3.6 Fotografia ilustrativa sistema contínuo de leito fixo. ....	76
Figura 3.7. Fotografia ilustrativa do processo de produção de <i>FAME</i> por catálise enzimática num sistema contínuo de leito fixo. ....	77
Figura 3.8 Procedimento adotado na silição e preparação das amostras para análise por GC. ....	78

---

---

Figura 3.9. TRACE GC ULTRA acoplado a um espectrômetro de massa DSQ II, da Thermo Scientific. ....	79
Figura 3.10. TRACE GC ULTRA da Thermo Scientific. ....	80
Figura 4.1 Influência do índice de acidez do óleo na concentração em <i>FAME</i> , obtidos por catálise da Novozyme <sup>®</sup> 435.....	86
Figura 4.2. Comparação do rendimento de ésteres para diferentes razões mássicas Novozyme <sup>®</sup> 435/ OAU.....	87
Figura 4.3 Evolução do rendimento em ésteres dos ciclos realizados sem lavagem da Novozyme <sup>®</sup> 435.....	89
Figura 4.4 Concentração de ésteres nos diversos ciclos de utilização da enzima, sem aplicação de algum método de regeneração.....	90
Figura 4.5 Comparação do rendimento em <i>FAME</i> aplicando diferentes métodos de regeneração (entre o 5 <sup>o</sup> e 6 <sup>o</sup> ciclo) da enzima.....	91
Figura 4.6 Fotografias elucidativas do problema que surgiu nas réplicas em que se testava a regeneração da enzima com tert-butanol + H <sub>2</sub> O: (a) separação de fases no reator; (b) separação de fases na amostra recolhida. ....	92
Figura 4.7 Evolução temporal do rendimento em ésteres na produção contínua de biodiesel num reator de leito fixo (sem lavagem da enzima). ....	94
Figura 4.8 Evolução temporal do rendimento em ésteres na produção contínua de biodiesel num reator de leito fixo (depois da regeneração da enzima). ....	94

---

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Estrutura química e características dos ácidos gordos mais comuns e seus ésteres metílicos (Moreira A. 2009).....	5
Tabela 2.2 Comparação dos catalisadores químicos e enzimáticos (Lee <i>et al.</i> 2011). .....	7
Tabela 2.3 Vantagens e desvantagens dos catalisadores químicos usados na produção de biodiesel (Yu <i>et al.</i> 2010; Teixeira J. 2011; Oliveira B. 2010; Lam <i>et al.</i> 2010). .....	9
Tabela 2.4 – Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica (Rosset I. 2011; CHANG 2006; Neto P. 2002).....	12
Tabela 2.5 Exemplos de lipases usadas na produção de biodiesel (Gog <i>et al.</i> 2012). .....	13
Tabela 2.6 Principais características das enzimas livres e imobilizadas (Zhang <i>et al.</i> 2011).....	14
Tabela 2.7. Solventes orgânicos testados na produção de biodiesel, respetivos coeficientes de partição e rendimento em ésteres atingido (Wang & Zhang 2010). .....	17
Tabela 2.8. Composição típica de alguns óleos e gorduras, em ácidos gordos (Felizardo 2003) .....	25
Tabela 2.9 Matérias-primas usadas na produção de biodiesel e respetivo índice de acidez (Teixeira J. 2011; Azócar <i>et al.</i> 2011). .....	26
Tabela 2.10 Teor de AGL máximo recomendado para a transesterificação quando é usado um catalisador básico homogéneo (Lam <i>et al.</i> 2010). .....	27
Tabela 2.11 Pré-tratamentos aplicáveis a óleos vegetais usados na produção de biodiesel (Silva R. 2011). .....	29
Tabela 2.12 Exemplos de estudos de produção de biodiesel por biocatálise em reatores contínuos: volume do reator versus massa de enzima imobilizada (Chattopadhyay & Sen 2013). .....	37
Tabela 2.13 Comparação/resumo dos reatores mais utilizados na produção de biodiesel por biocatálise (Simões A. 2011; Gog <i>et al.</i> 2012). .....	40
Tabela 2.14. Síntese de alguns estudos realizados em reatores descontínuos (escala laboratorial) na produção de biodiesel. ....	41
Tabela 2.15. Síntese de alguns estudos realizados em reatores descontínuos (escala laboratorial) na produção de biodiesel. (cont.) .....	43

---

Tabela 2.16. Síntese dos estudos realizados com reatores tubulares na produção de biodiesel. ....	51
Tabela 3.1 – Resumo do plano experimental do presente trabalho. ....	60
Tabela 3.2. Produtos químicos utilizados na componente experimental deste trabalho.....	61
Tabela 3.3. Equipamentos usados na componente experimental do presente trabalho.....	62
Tabela 3.4 Composição média e atividade das enzimas Novozyme® 435. ....	63
Tabela 3.5. Condições experimentais para os ensaios de avaliação do efeito do índice de acidez e da razão mássica de enzima no rendimento em FAME. .	70
Tabela 3.6. Condições experimentais do ensaio para a avaliação do efeito da razão mássica de enzima no rendimento em FAME. ....	72
Tabela 3.7 . Condições dos ensaios que testam o efeito do método regeneração na reutilização da Novozyme®435. ....	73
Tabela 3.8. Descrição dos volumes dos reatores contínuos de leito fixo. ....	76
Tabela 4.1 Densidade do OAU e das misturas de OAU com ácido oleico. ....	83
Tabela 4.2 Índice de acidez do OAU e das misturas de OAU com ácido oleico. ....	84
Tabela 4.3 Índice de acidez das misturas preparadas para os ensaios de avaliação da influência deste parâmetro no desempenho a Novozyme® 435....	85
Tabela 4.4 Solventes utilizados na regeneração de enzimas Novozyme® 435. ....	88

---

## Nomenclatura

A	Área	[-]
C	Concentração	[mg/mL]
c	Concentração	[mm <sup>2</sup> /s]
V	Volume	[L]
m	Massa	[kg]
M	Massa molar	[g/mol]
$\eta$	Rendimento	[%]
$\rho$	Massa volúmica	[g/L]
t	Tempo	[s]
T	Temperatura	[°C]

---



---

# 1 Introdução

## 1.1 Motivação e relevância do tema

O destino final dos óleos alimentares usados (OAU) de uso doméstico e industrial é um problema crescente em Portugal e em todo o mundo. A presença de OAU no meio ambiente provoca problemas de maus cheiros e impactes negativos ao nível da fauna e flora. A sua descarga nas redes de saneamento públicas pode ainda conduzir a problemas de obstrução de canalizações e corrosão das tubagens. Em Portugal, desde 2009, existe legislação (Decreto-Lei n.º 267/2009 de 29 de setembro) que regulamenta o destino dos OAU.

À semelhança de outros resíduos, os OAU têm sido encarados como um “recurso”, a partir do qual é possível produzir biocombustíveis. Este facto constitui uma alternativa renovável, que resolve simultaneamente dois problemas ambientais: a valorização de resíduos e a diminuição da dependência energética de combustíveis fósseis.

Os biocombustíveis são fontes de energia renováveis de origem biológica e, à semelhança dos outros combustíveis, são materiais usados na conversão energética. Os biocombustíveis podem ser de diversos tipos: bioetanol, biogás, biodiesel, entre outros. O biodiesel está sob pesquisa, nomeadamente ao nível da sua produção, devido à sua menor contribuição para emissão de gases efeito de estufa e excelentes características químicas, tais como, combustível não tóxico, biodegradável e isento de enxofre (Nie *et al.*2006; Yaakob *et al.*2013). Além disso, o biodiesel pode ser utilizado em qualquer motor a diesel convencional, ao contrário dos combustíveis de origem fóssil (Yaakob *et al.*2013).

Atualmente, as principais matérias-primas usadas na produção de biodiesel à escala industrial são sobretudo óleos virgens (e.g. colza, palma, etc.). Além destes, são necessários um álcool e um catalisador (geralmente o hidróxido de sódio ou de potássio). O processo produtivo convencional é relativamente eficiente do ponto de vista de rendimento da reação, mas origina elevados volumes de águas residuais, subprodutos contaminados e o consumo/desperdício do catalisador, por ser economicamente inviável a sua recuperação para posterior reutilização.

---

A comunidade científica tem vindo a desenvolver investigação nesta área, com o propósito de desenvolver outras alternativas de produção de biodiesel que ultrapassem as desvantagens da “via convencional” anteriormente referidas.

## **1.2 Objetivos e estrutura da dissertação**

Com o presente trabalho pretende-se valorizar um OAU, utilizando-o como matéria-prima na produção de biodiesel por catálise enzimática (ou biocatálise). A catálise da reação envolvida na síntese deste biocombustível, constitui uma variável que poderá ser otimizada, e o presente trabalho pretende dar uma contribuição nessa investigação. Assim, será estudado o desempenho de um catalisador enzimático (*Novozyme® 435*). Perspetiva-se otimizar as condições do processo com vista à redução dos consumos energéticos, à minimização da contaminação de subprodutos e de efluentes gerados.

No presente trabalho, pretende-se:

- avaliar a influência das variáveis operatórias: índice de acidez do OAU, razão mássica enzima/ OAU no rendimento da reação;
- selecionar o método regeneração da enzima com vista à sua reutilização;
- produzir o biodiesel num sistema contínuo, em reator de leito fixo.

Com vista a atingir os objetivos propostos, iniciou-se este trabalho com uma revisão à bibliografia existente, no que diz respeito à produção de ésteres metílicos (ou etílicos) de ácidos gordos, e que se apresenta no Capítulo 2. No terceiro capítulo é apresentado o procedimento e planeamento experimental, tendo como referência os estudos realizados por outros autores. Os resultados experimentais obtidos neste trabalho e sua discussão são apresentados no Capítulo 4. Por fim, no Capítulo 5, são tecidas as considerações finais deste trabalho e são feitas sugestões para futuros trabalhos.

---

## 2 Produção de ésteres metílicos de ácidos gordos

### 2.1 Introdução

Na valorização de resíduos orgânicos é possível obter biocombustíveis como o biogás, bioálcoois e o biodiesel. Nesta valorização resolvem-se simultaneamente diversos problemas ambientais, entre eles a diminuição da dependência de energética de origem fóssil, e conseqüentemente são reduzidos os índices de poluição atmosférica, e a valorização de um resíduo em detrimento da sua eliminação.

Segundo a Diretiva 2003/30/CE, entende-se por biodiesel, os ésteres metílicos (ou etílicos) de ácidos gordos derivados de óleos ou gorduras, de qualidade de combustível para motor diesel.

Como fonte de ácidos gordos para a obtenção de biodiesel existem as gorduras animais (e.g. sebo), os óleos de fritura e as sementes oleaginosas (e.g. cardo, girassol, a colza, sésamo, palma, etc.). São vários os processos que têm vindo a ser desenvolvidos para o aproveitamento de óleos vegetais como combustível, tais como:

- a microemulsão - uma alternativa que permite diminuir a viscosidade dos óleos através da adição de solventes;
- condições supercríticas – aplicam-se quando se pretende suprir a utilização de catalisadores nas reações de transesterificação, nomeadamente os químicos, a purificação dos produtos de reação torna-se facilitada;
- a pirólise ou craqueamento térmico - uma reação de decomposição térmica, geralmente provocada pela ausência de oxigénio;
- a esterificação - uma reação química reversível na qual um ácido carboxílico reage com um álcool produzindo um éster (combustível) e água;
- a transesterificação - reação entre um álcool de os triglicerídeos tendo como produtos ésteres de ácidos gordos (combustível), e glicerol. Esta reação é normalmente catalisada por catalisadores químicos ou biológicos (Felizardo *et al.*2006).

Dos processos anteriores, a reação de transesterificação é mais comumente usada na produção de biodiesel. A presença de mono-, di- e/ou triglicerídeos na mistura reacional final, compromete a qualidade do biodiesel obtido, evidenciando que a reação de transesterificação não foi completa. Para que a referida reação tenha o rendimento maximizado é necessário ter em consideração vários fatores, sendo o catalisador e o álcool

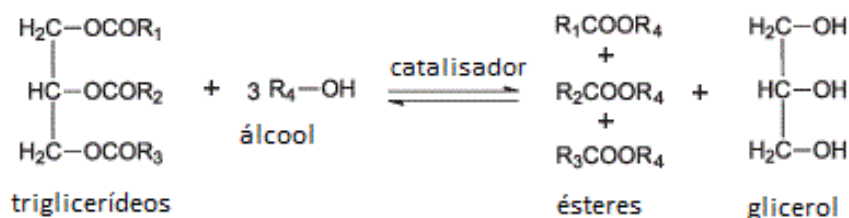
usado os mais relevantes. Estes fatores afetam não só a extensão da reação, mas também a qualidade do produto final, uma vez que facilitam ou dificultam a separação dos produtos da reação. Os álcoois usados normalmente são os de cadeia curta, como o metanol e o etanol por serem mais reativos.

A mistura reacional é processada em reatores, onde deverão ser mantidas condições ótimas para que o catalisador apresente o máximo de sua atividade catalítica. Estes catalisadores podem ser homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos, também denominados de biocatalisadores, que podem encontrar-se imobilizados ou não (vide secção 2.3.2) .

Atendendo a que o trabalho desenvolvido nesta dissertação envolveu o estudo de diversos parâmetros que influenciam a produção de biodiesel por biocatálise, nas seções seguintes apresenta-se o estado da arte referente a reação de transesterificação e esterificação (vide seção 2.2), os catalisadores (vide seção 2.3) e os biorreatores (vide seção 2.6) possíveis de utilizar, bem como outras variáveis processuais relevantes.

## 2.2 Reações de transesterificação e esterificação

O biodiesel é normalmente produzido através da reação de transesterificação, esquematizada na Figura 2.1. Esta reação ocorre entre triglicerídeos e álcoois de cadeia curta, sendo esta geralmente catalisada, originando a formação de ésteres monoalquílicos de ácidos gordos (correntemente denominados de *FAME – Fatty Acid Methyl Ester* ou *FAEE – Fatty Acid Ethyl Ester*, consoante o álcool seja metanol ou etanol, respetivamente) e glicerol. Os catalisadores por sua vez, podem ser homogêneos (ácidos ou alcalinos), heterogêneos (óxidos metálicos, etc.) e enzimas (imobilizadas ou não) (Fu & Vasudevan 2009).



**Figura 2.1. Reação geral de transesterificação para produção de biodiesel (Moreira A. 2009).**

Na Figura 2.1, os grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, e R<sub>3</sub> correspondem a cadeias de ácidos gordos, sendo as mais comuns a palmítica, esteárica, oleica, linoleica e linolénico (Moreira A. 2009).

Estas cadeias são designadas por uma letra e dois números (acrónimo comum). O primeiro refere-se ao número de átomos de carbono presentes na cadeia, e o segundo refere-se ao número de ligações duplas.

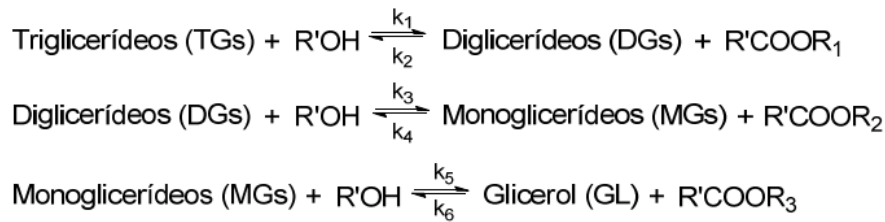
Na Tabela 2.1, encontram-se listados o peso molecular, o ponto de fusão destes ácidos gordos e dos respetivos ésteres metílicos. É de salientar que quanto maior o grau de insaturação, menor o ponto de fusão do éster metílico. Esta característica é especialmente importante quando se pretende comercializar o biodiesel em países cujas temperaturas ambiente são inferiores às temperaturas de fusão de alguns dos ésteres que o constituem.

**Tabela 2.1. Estrutura química e características dos ácidos gordos mais comuns e seus ésteres metílicos (Moreira A. 2009).**

Ácido gordo/éster metílico	Fórmula química <sup>1</sup>	Acrónimo comum	Peso molecular	Ponto de fusão (°C)
Ácido palmítico	R-(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -CH <sub>3</sub>	C 16:0	256,428	63-64
Metil palmitato			270,457	30,5
Ácido esteárico	R-(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -CH <sub>3</sub>	C 18:0	284,481	70
Metil estereato			298,511	39
Ácido oleico	R-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>	C 18:1	282,465	16
Metil oleato			296,495	-20
Ácido linoleico	R-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	C 18:2	280,450	-5
Metil linoleato			294,479	-35
Ácido linolénico	R-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	C 18:3	278,434	-11
Metil linoleneato			292,463	-52

A reação de transesterificação não é elementar, sendo constituída por várias reações consecutivas, onde os triglicerídeos (TGs) são convertidos em diglicerídeos (DGs), estes são depois convertidos em monoglicerídeos (MGs) e, finalmente, estes últimos são convertidos em ésteres de ácidos gordos, de acordo com o esquema da Figura 2.2.

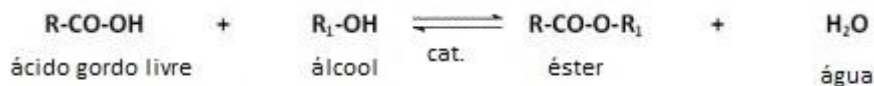
<sup>1</sup> Para os ácidos gordos R= COOH e para os ésteres metílicos R=COOCH<sub>3</sub>.



**Figura 2.2 Esquema geral das etapas de transesterificação de um triglicerídeo (Rosset I. 2011).**

São vários os parâmetros que influenciam o rendimento da reação de transesterificação, nomeadamente: o tipo de óleo usado, o catalisador usado (homogêneos, heterogêneos e enzimático), o peso molecular do álcool, a relação estequiométrica estabelecida entre álcool e óleo vegetal/residual, a temperatura a que decorre a reação, o grau de pureza dos reagentes (principalmente o teor em água) e o índice de ácidos gordos do óleo vegetal (Rosset I. 2011).

O biodiesel, tanto pode ser obtido pela reação transesterificação de triglicerídeos presentes em óleos vegetais e gorduras animais, como pela esterificação de ácidos gordos livres, AGL (Figura 2.3). Esta última é comumente usada na etapa de pré-tratamento dos óleos (virgens ou usados), para a reação de transesterificação via catalise básica, para converter os ácidos gordos livres em ésteres; dessa forma evitando a saponificação, especialmente quando o teor de ácidos gordos livres é superior a 3%.



**Figura 2.3 Reação geral de esterificação de um ácido gordo (Rosset I. 2011).**

Em geral, a reação de esterificação de ácidos gordos é menos complexa do que a transesterificação de triglicerídeos. Isso porque a esterificação de ácidos gordos ocorre em uma única etapa (vide Figura 2.3), enquanto na transesterificação de triglicerídeos consistem em três etapas (vide Figura 2.2).

Industrialmente é usado o ácido sulfúrico na catálise da reação de esterificação.

A etapa de pré-tratamento anteriormente referida pode ser prescindível caso seja usado um catalisador capaz de catalisar ambas as reações (transesterificação e esterificação), convertendo TGs e os ácidos gordos livres a ésteres de ácidos gordos.

---

Os álcoois, geralmente são usados em excesso para permitir deslocar o equilíbrio da reação (ambas as reações descritas anteriormente) no sentido da formação do produto. Estes são álcoois simples, de baixo peso molecular, tais como o metanol, etanol, propanol e butanol. Entre os álcoois mencionados, os mais utilizados são o metanol e o etanol, uma vez que o rendimento da transesterificação decresce com o aumento da cadeia de álcool (Antczak *et al.* 2009).

### 2.3 Catalisadores

A reação de transesterificação é muito lenta, motivo pelo qual se recorre normalmente à utilização de um agente que a acelere. Este agente é denominado de catalisador, sendo uma substância que aumenta a velocidade de uma reação, sem sofrer alterações permanentes na sua estrutura. O catalisador a usar deve ser adequado ao tipo de óleo a transesterificar, uma vez que este influencia tanto o rendimento como a velocidade da reação (Melo 2012).

Como foi referido anteriormente, os catalisadores utilizados na reação de transesterificação podem ser químicos e enzimáticos, e na Tabela 2.2 é feita uma comparação entre ambos.

**Tabela 2.2 Comparação dos catalisadores químicos e enzimáticos (Lee *et al.* 2011).**

<b>Característica</b>	<b>Catalisadores químicos</b>	<b>Enzimas</b>
Especificidade ao substrato	Baixa	Alta
Natureza de estrutura	Simple	Complexa
Sensibilidade à temperatura	Baixa	Alta
Condições de reação (T e pH)	Drásticas	Suaves
Custo de obtenção (isolamento e purificação)	Moderado	Alto
Natureza do processo	Descontínuo e contínuo	Descontínuo e contínuo
Consumo de energia	Alto	Baixo
Formação de subproduto (glicerol)	Alta	Baixa
Velocidade de reação	Alta	Baixa

---

### 2.3.1 Químicos

Embora, a catálise química seja que a se encontra amplamente aplicada ao nível industrial, devido ao seu alto rendimento, o processo apresenta alguns inconvenientes, tais como o consumo elevado de energia, inadequação a óleos com alto teor de ácido gordos livres, elevado grau de contaminação do subproduto glicerol, elevado consumo de água na purificação dos *FAME*, recuperação para posterior reutilização do catalisador (homogéneo alcalino) economicamente inviável, e necessidade de tratamento de um volume significativo de águas residuais alcalinas (Bajaj *et al.*2010; Royon *et al.*2007; Wang & Zhang 2010; Da Rós *et al.*2010).

Com o objetivo de minimizar vários destes inconvenientes, tem vindo a ser desenvolvidos e publicados diversos trabalhos científicos de aplicação de biocatalisadores na produção de biodiesel. Dependendo do rendimento conseguido com este tipo de catalisadores, poderá ser prescindível a etapa de lavagens (com água) dos ésteres de ácidos gordos, e conseqüentemente não é necessário o tratamento de águas residuais (Bajaj *et al.*2010; Dossat *et al.*1999; Halim *et al.*2009). Para além disso, pode haver diminuição de gastos com energia e a minimização da degradação térmica dos compostos, quando comparado com as via química tradicional (Royon *et al.*2007).

Uma das maiores razões de sucesso ou fracasso do processo de produção de biodiesel está no tipo e catalisador usado. Na Tabela 2.3 resumem-se algumas das vantagens e desvantagens de diferentes tipos catalisadores químicos usados na produção de biodiesel.



**Tabela 2.3 Vantagens e desvantagens dos catalisadores químicos usados na produção de biodiesel** (Yu et al. 2010; Teixeira J. 2011; Oliveira B. 2010; Lam et al. 2010).

Catalisador químico	Vantagens	Desvantagens	
<i>Natureza química</i>	Alcalino	Elevada atividade catalítica na reação de transesterificação; baixo custo do químico; tempos de reação baixos; condições de reação moderadas	Não catalisa a reação de esterificação; exigência de baixo teor de AGL; condições anidras; exigência de elevada razão molar de álcool/ óleo; formação de emulsões; elevado volume de águas residuais a tratar
	Ácido	Catalisa a reação de esterificação	Elevadas temperaturas de reação; longos tempos de reação; fraca atividade catalítica na transesterificação
<i>Estado físico no meio reacional</i>	Homogéneo	Limitações difusionais “inexistentes”; baixo custo	Recuperação economicamente inviável
	Heterogéneo	Facilidade de separação; vida útil mais longa	Limitações de difusão; elevado custo.

No sentido de ultrapassar as limitações/desvantagens dos catalisadores químicos empregues na produção de biodiesel, têm sido desenvolvidos diversos trabalhos de investigação com catalisadores enzimáticos. A aplicação destes encontra-se ainda à escala laboratorial e piloto. Na secção seguinte apresenta-se informação mais detalhada sobre os mesmos, visto que eles são de particular interesse para o presente trabalho.

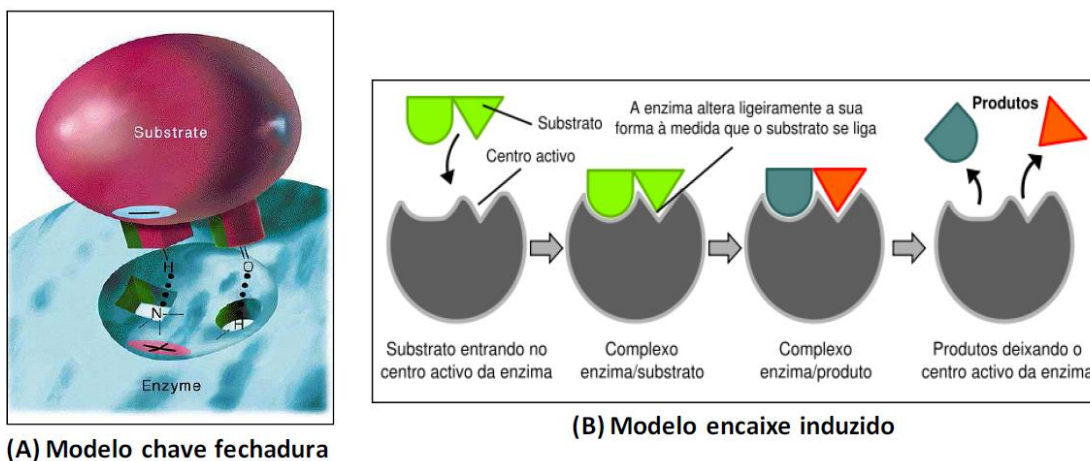
### 2.3.2 Enzimáticos

Os catalisadores enzimáticos, ou biocatalisadores, são catalisadores biológicos de natureza proteica, constituídos por longas cadeias de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, segundo um arranjo tridimensional.

A função de um catalisador é acelerar a velocidade de uma reação, através da diminuição da energia ativação da mesma, sem alterar a termodinâmica envolvida. A velocidade é

medida pela quantidade de substrato consumido que é dependente da temperatura e do pH a que é realizada, i.e., quanto maior for a temperatura, maior será a velocidade de reação. Porém, na catálise enzimática este aumento de temperatura atinge um ponto “ótimo”, a partir do qual a velocidade da reação começa a diminuir por desnaturação das enzimas (Felizardo *et al.* 2006).

Grande parte do poder catalítico das enzimas deve-se à sua capacidade de interagirem com o substrato na formação dos complexos enzima-substrato (ES). As enzimas são moléculas muito grandes, que têm um centro ativo semelhante a uma cavidade onde a reação ocorre. O substrato, a molécula sobre a qual a enzima age, encaixa-se na cavidade da enzima como “uma chave se encaixa numa fechadura”. No entanto, ao contrário de uma fechadura comum, a molécula de proteína distorce-se ligeiramente quando a molécula de substrato se encaixa. A capacidade da realização da distorção correta é determinante para o sucesso da catálise (vide Figura 2.4 A). Esse refinamento do modelo original chave-fechadura é conhecido como mecanismo de ajuste induzido da ação enzimática (vide Figura 2.4 B). O produto é libertado na etapa seguinte ficando a enzima livre para receber a(s) molécula(s) do substrato (Atkins & Jones 2006).



**Figura 2.4 Modelos de interação do substrato com a enzima.: (A) modelo de chave e fechadura; (B) modelo de encaixe induzido (Neto P. 2002).**

A atividade da enzima é destruída se um substrato estranho se ligar muito fortemente ao centro de reação, porque este fica bloqueado e deixa de estar disponível para o substrato. Além disso, a atividade enzimática pode ser diminuída, por compostos inibidores, de uma forma irreversível (modificações químicas da molécula enzimática, levando a uma inativação definitiva) ou reversível (após a dissociação com o inibidor, a enzima retorna a

---

sua atividade). A inibição reversível pode ser de três tipos (Rosset I. 2011; Atkins & Jones 2006):

- i. Competitiva – quando o inibidor compete com o substrato pelo centro ativo da enzima, quando ambos apresentam estruturas semelhantes. A inibição depende da concentração e afinidade relativas da enzima para o substrato e para o inibidor;
- ii. Não competitiva – quando o inibidor se liga à enzima num sítio próprio, podendo este estar ligado ao mesmo tempo que o substrato. O grau de inibição, neste caso, depende da concentração do inibidor e da sua afinidade com a enzima;
- iii. Mista – provocam a diminuição simultânea da afinidade da enzima para o substrato e da velocidade máxima da reação.

Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas são muito seletivas e catalisam as reações em condições muito simplificadas, geralmente em soluções aquosas neutras (Neve *et al.* 2006). Existem ainda outras limitações à catálise enzimática, como a agitação (não deve ser demasiado elevada, para não provocar a inativação da enzima) e o tipo álcool a usar no processo, no caso da sua aplicação na produção de biodiesel.

Relativamente ao álcool, normalmente os problemas colocam-se com o de cadeia mais curta, i.e., o metanol desnatura as enzimas usadas na catálise da(s) reação(ões) de produção de biodiesel. Na secção 2.3.2.3 este tema será discutido com maior detalhe.

#### 2.3.2.1 Caracterização e classificação das enzimas

As enzimas podem ser produzidas por via animal, vegetal e microbiana. Contudo, são as fontes microbianas que possuem maior relevância a nível industrial, sendo possível a produção realizar-se ao nível extra ou intracelular.

As enzimas microbianas extracelulares são retiradas do meio de cultura e posteriormente purificadas, enquanto que as intracelulares distinguem-se por serem retiradas de dentro ou das paredes das células (Robles-Medina *et al.* 2009). Atualmente, também se produzem as chamadas enzimas recombinantes, que resultam da incorporação do gene pretendido (produtor da enzima) no microrganismo hospedeiro (Silva W. (2013)).

O desempenho das enzimas é avaliado através da sua atividade. A atividade catalítica depende do tempo e das condições em que ocorre a reação. A unidade internacional de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto, e é designada por “U” (Melo 2012).

As enzimas são classificadas de acordo com o composto sobre o qual atuam ou o tipo de reação que catalisam, contendo sempre a terminação, “ases” na sua nomenclatura. Devido ao número de enzimas conhecidas, a União Internacional de Bioquímica (IUB) criou um sistema de divisão onde estabeleceu seis classes de enzimas, de acordo com o tipo de reação química que catalisam (Chang & Goldsby 2013; Rosset I. 2011). A classificação resultante encontra-se na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4 – Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica (Rosset I. 2011; CHANG 2006; Neto P. 2002).**

Classe de enzimas	Algumas subclasses	Tipo de reação
Oxirredutases	Desidrogenases; oxidases e redutases	Reações de oxirredução
Transferases	Quimases; transaminases	Transferência de grupos químicos entre moléculas
Hidrólases	Lípases; nucleases; protéases	Reação de hidrólise – formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, anidridos, glicosídeos
Ligases	Aldolases; transaldolases; glicosidases; ransaminases	Formação de novas moléculas por ligação de duas já existentes
Isomerases	Epimerases	Reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos

Destas classes de enzimas, as lípases são as que têm aplicação no processo de produção de biodiesel, podendo catalisar simultaneamente as reações de esterificação e transesterificação, i.e., a conversão de ácidos gordos livres e triglicerídeos, respetivamente, a ésteres de ácidos gordos.

As lípases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp.*, por leveduras de *Tulopsis sp.* e *Cândida sp.* e bactérias como *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.* e *Staphylococcus sp.* (Tosa M. 2000; Li *et al.* 2012).

Do ponto de vista económico, e para aplicação industrial, as lípases produzidas por microrganismos são preferíveis às de fontes animais e vegetais, devido ao alto custo do seu isolamento (Christopher & Zambare 2014; Sharma *et al.* 2001).

Com base na sua especificidade e seletividade, as lípases podem ser divididas em três classes: regioespecíficas, específicas do tipo de ácido gordo e específicas para uma determinada classe glicerídeos (mono-, di- ou triglicéridos). Em termos de regioespecificidade, i.e., a posição da ligação éster, as lípases foram classificadas em:

- i. sn 1,3 específica - hidrolisa ligações éster nas posições R1 ou R3 dos triglicerídeos;
- ii. sn -2-específica - hidrolisa ligação éster na posição R2 dos triglicerídeos;
- iii. inespecífica - não distingue as posições de ligações éster a ser separadas/hidrolisadas.

Muitos trabalhos foram publicados na literatura sobre o uso de enzimas para a produção de biodiesel. Na Tabela 2.5 apresentam-se alguns onde foram usadas lípases no processo de produção de biodiesel.

**Tabela 2.5 Exemplos de lípases usadas na produção de biodiesel (Gog *et al.*2012).**

Lípase	Matéria prima	Álcool	Rendimento (%)	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	Óleo de soja	Metanol	80-90	Shimada <i>et al.</i> 1999
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de soja	Metanol	80	Fukuda <i>et al.</i> 2001
<i>Cândida cylindracea</i>	Óleo Palma	Metanol	78	Park <i>et al.</i> 2004
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Óleo de Jatrofa	Etanol	73	Shah <i>et al.</i> 2004
<i>Mucor miehe</i>	Óleo Palma	Metanol	45,4	Al-Zuhair <i>et al.</i> 2006
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de Jatrofa	Etanol	70	Shah <i>et al.</i> 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ácido oleico	Metanol	~95	Chen <i>et al.</i> 2006
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de soja	Etanol	96	Wada <i>et al.</i> 2008
<i>Candida antarctica</i>	Óleo semente de algodão	Metanol	97	Royon <i>et al.</i> 2007

Numa análise à Tabela 2.5 conclui-se que as lípases podem ser usadas numa vasta gama de óleos vegetais, cuja composição química pode variar significativamente. Este facto, traduz-se numa ampliação das matérias-primas possíveis de utilizar na produção de

---

biodiesel. No entanto, existem vários desafios técnicos que precisam ser superados para melhorar a viabilidade econômica do processo, nomeadamente o alto custo das enzimas, perda de atividade durante o processo de inibição da enzima por reagentes e produtos, e as taxas de reação lentas (Christopher & Zambare 2014).

No âmbito da viabilidade econômica da biocatálise, e de modo a torná-la mais competitiva, reside a possibilidade da reutilização das enzimas. Neste sentido, desenvolveram-se técnicas de imobilização, onde as enzimas são “fixadas” em diferentes suportes sólidos.

### 2.3.2.2 Imobilização de enzimas

A imobilização das enzimas consiste no seu confinamento físico, no qual são mantidas suas atividades catalíticas, tanto em processos de operação contínua ou descontínua (Volpato G. 2009; Silva W. 2013).

Comparativamente com as enzimas imobilizadas em suporte sólido, as enzimas livres são mais fáceis de preparar e apresentam um custo de preparação muito menor. No entanto, as enzimas na forma solúvel só têm uma única utilização. Por esta razão, é economicamente mais vantajosa a imobilização das enzimas tornando-as uma fase independente no sistema reacional e possibilitando a sua recolha e reutilização (Al-Zuhair, 2007). Na Tabela 2.6 apresenta as principais características das enzimas na forma livre e imobilizada (Zhang *et al.* 2011).

**Tabela 2.6 Principais características das enzimas livres e imobilizadas (Zhang *et al.* 2011).**

<b>Enzima livre</b>	<b>Enzima imobilizada</b>
Dificuldade de recuperação e reutilização; Alto custo, baixa eficiência e insolúvel em meio não aquoso; Atividade instável, influenciada pela temperatura e pH.	Fácil separação substrato / produto; Facilidade de recuperação e reutilização do catalisador, o que reduz os custos das enzimas; Possibilidade de ser utilizado em sistemas contínuos; Atividade estável em uma ampla faixa de temperatura e pH.

As técnicas de imobilização de enzimas surgem como uma estratégia promissora, pois permitem melhorar as suas propriedades, tais como: a estabilidade operacionalidade, seletividade, especificidade e a redução da inibição pelos componentes do meio reacional (Ranganathan *et al.* 2008).

---

---

De modo geral, os processos de imobilização enzimática podem ser classificados em duas categorias:

- **Método químico** - a enzima é fixada no suporte por ligação covalente com formação de ligação cruzada;
- **Método físico**- onde são usadas interações fracas entre a enzima e o suporte ou a sua (da enzima) retenção mecânica. Assim, a enzima pode ficar retida no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes

A recuperação de lipases imobilizadas depende do tempo de semivida da enzima, que após certo tempo precisa de purificação antes de ser reutilizada (Souza L. 2010; Xu *et al.* 2003; Bisatto R. 2012).

#### 2.3.2.3 *Proteção, pré-tratamento e reutilização das lipases imobilizadas*

Do ponto de vista da cinética química, o metanol é o álcool mais reativo, assegurando maiores velocidades de reação, e por isso eleito para a produção de biodiesel. Porém, quando é implementada a biocatálise (com lipases imobilizadas) o referido álcool não é aconselhável porque provoca a inativação da enzima. Esta desativação é potenciada pela imiscibilidade entre os triglicérides e os álcoois, o que promove o contacto do álcool em concentrações mais elevadas com as moléculas de água que revestem a superfície da enzima, sendo a consequência final a anulação do efeito catalítico desta. Além disso, a polaridade do metanol, tende a remover a água dos sítios ativos da enzima levando a enzima a desativação (Shimada *et al.* 2002).

Fu & Vasudevan (2009) descreveram e ilustraram (vide Figura 2.5) o efeito de desativação da enzima imobilizada provocada pelo metanol.

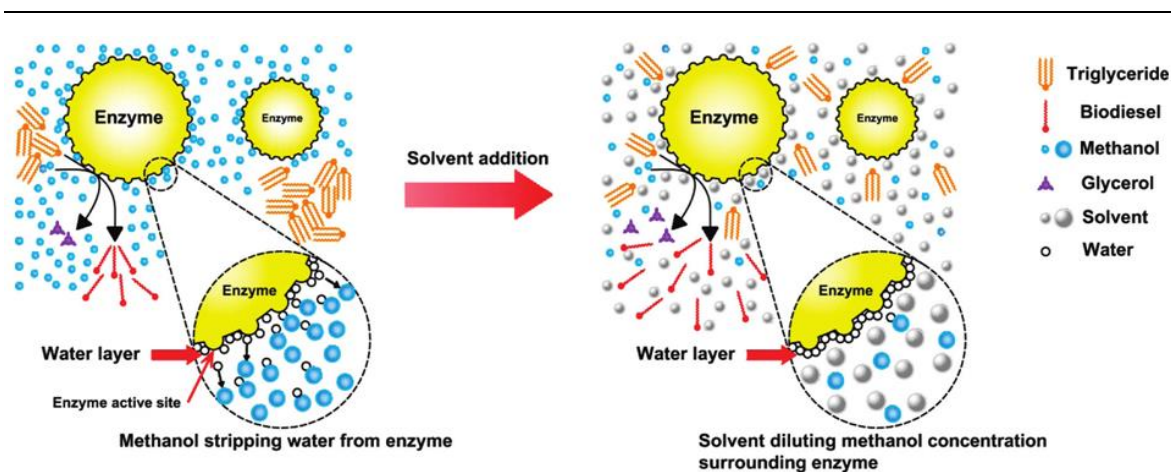


Figura 2.5. Efeito do metanol (na presença e ausência de solvente) nas moléculas de água à superfície da enzima imobilizada [adaptado (Fu & Vasudevan 2009)].

O grau desativação das lípases é inversamente proporcional ao número de átomos de carbono nos álcoois lineares de cadeia curta. Os álcoois que apresentam quatro ou mais carbonos na sua estrutura verifica-se uma predominância da parte apolar, e por isso apresentam uma menor solubilidade em água (Mendes *et al.* 2011). Nestes álcoois a sua ação na remoção das moléculas de água existentes à superfície da enzima (e a sua consequente inativação), descrito anteriormente, é reduzido ou mesmo inexistente.

Com vista a contornar a limitação da utilização do metanol na produção de biodiesel via catálise enzimática, encontram-se na literatura dois métodos alternativos:

- i. **Adição de metanol por estágios** – onde o metanol é adicionado gradualmente ao longo do tempo, de modo a assegurar uma concentração baixa deste reagente no meio reacional. No entanto, neste método, as velocidades da reação são baixas o que poderá inviabilizar a produção de biodiesel em larga escala (Samukawa *et al.* 2000);
- ii. **Uso de um solvente orgânico** – permite simultaneamente ultrapassar duas limitações: (1) aumentar a solubilidade do óleo e do metanol e (2) limitar a concentração de metanol que rodeia a enzima (vide Figura 2.5). O solvente neste caso deverá funcionar como um agente emulsionante dos dois reagentes (metanol e óleo) (Fu & Vasudevan 2009).

São vários os estudos encontrados na literatura que usam o método de adição de metanol por estágios (Shimada *et al.* 2002; Li *et al.* 2006; Wang & Zhang 2010; Antczak *et al.* 2009; Jegannathan *et al.* 2010; Li *et al.* 2012), bem como o uso de solventes orgânicos (Royon *et al.* 2007; Nie *et al.* 2006; Zhang 2003; Liu *et al.* 2009; Modi *et al.* 2007; Chen & Wu 2003).



---

Noutros estudos foi usada a sílica para libertar gradualmente o álcool e adsorver o glicerol. Os autores, (Li *et al.* 2006; Lee *et al.* 2011), testaram o uso de sílica gel na mistura reacional, com o objetivo de adsorver o glicerol à medida que era produzido. Porém, Melo S. (2012) testou a sílica no seu caso de estudo, do qual conclui que a presença da sílica no meio reacional conduziu a uma diminuição da velocidade da reação e do rendimento em ésteres, tendo concluído que a sílica terá adsorvido o metanol, não o libertando novamente para o meio reacional, tendo sido o reagente limitante.

No caso do método do uso do solvente, e como foi acima referido, a seleção do solvente orgânico adequado é fundamental, sendo que ele deve garantir simultaneamente uma boa solubilidade dos substratos/ reagentes e manter atividade enzimática (protegendo a enzima do metanol). O coeficiente de partição<sup>2</sup> ( $\log P$ ) do solvente deverá ser superior a 2 (Nie *et al.* 2006). Os solventes com valor baixo de  $\log P$  são muito hidrofílicos, pelo que terão uma ação muito semelhantes à do metanol na remoção das moléculas de água da superfície da enzima, logo são indesejáveis. Alguns dos solventes orgânicos testados na produção de biodiesel, via catálise enzimática, encontram-se resumidos na Tabela 2.7.

**Tabela 2.7. Solventes orgânicos testados na produção de biodiesel, respetivos coeficientes de partição e rendimento em ésteres atingido (Wang & Zhang 2010).**

<b>Solvente</b>	<b><math>\log P</math></b>	<b>Rendimento em ésteres [%]</b>
Acetona	-0,24	40
Benzeno	2	63
Clorofórmio	2	83
Tolueno	2,5	85
Éter de petróleo	≈3	93
Ciclohexano	3,2	94
n-Hexano	3,5	96
n-Heptano	4	94

---

<sup>2</sup> Coeficiente de partição é dado pela razão entre a concentração da substância na fase orgânica e a concentração da substância na fase aquosa.

---

---

Os solventes orgânicos hidrofóbicos (apolares) são os mais indicados na biocatálise (aplicada à produção de biodiesel), tais como o isoctano, n-heptano, éter de petróleo, n-hexano e ciclo-hexano. Contudo, como glicerol é polar acaba por permanecer no reator, causando os mesmos problemas no sistema como se não existisse solvente. Já os solventes orgânicos hidrofílicos, como o tert-butanol e a acetona, dada a sua polaridade acabam por inibir os efeitos negativos do álcool e do glicerol, atingindo-se rendimentos de conversão elevados e elevada estabilidade da lipase (Christopher & Zambare 2014).

Por exemplo, Royon *et al.* (2007) verificaram que na presença de tert-butanol no meio reacional da metanólise gerou um aumento significativo na conversão em ésteres. A presença do álcool de cadeia mais longa aumenta a solubilidade do metanol e também da glicerina no meio reacional, e conseqüentemente reduz os efeitos da inibição das lípases. Assim, um pré-tratamento da enzima em álcoois de cadeia mais longa atenua o problema da inativação.

O método do uso do solvente implica uma etapa adicional no processo de purificação do biodiesel, correspondendo à separação do solvente (p.ex. por destilação), o que é considerado por alguns autores como uma desvantagem, uma vez que tem implicações ao nível do consumo energético.

#### Preparação (pré-tratamento) da enzima imobilizada para primeira utilização

O pré-tratamento das lípases imobilizadas tem como finalidade aumentar o diâmetro do seu suporte (em alguns estudos definem como o efeito *swelling*), o que, por sua vez, permite incrementar a superfície de contacto das enzimas com o substrato. Além disso, os processos de pré-tratamento são combinados com a finalidade de obter uma maior atividade da lipase e obter a máxima conversão de triglicérides (Tan *et al.* 2010). Esta etapa poderá interferir com as lípases, e possivelmente, aumentar a transferência de massa na camada superficial e também “proteger” a enzima da inibição pelos álcoois (Christopher & Zambare 2014).

Na literatura consultada encontraram-se diversos métodos de pré-tratamento para as lípases, quer livres quer imobilizadas, com o objetivo de melhorar a sua atividade, estereoselectividade e estabilidade.

---

Genericamente, os compostos usados no pré-tratamento podem ser classificados (mas não se limitando) em quatro tipos (Oliveira B. (2010):

1. Substratos ou seus análogos, que podem aumentar a atividade da enzima em solventes orgânicos envolvendo regularização do sítio ativo da enzima por impressão molecular;
2. Solventes orgânicos, que podem aumentar a atividade total de duas formas:
  - (i) eliminando outras proteínas das lípases;
  - (ii) causando uma mudança configuracional no sítio ativo da "forma fechada" para a "forma aberta";
3. Sais, cuja incorporação com a proteína molecular poderá manter a configuração da lípase e evitar a grande mudança do pH ótimo. Os sais incluindo o cálcio ou cloreto de magnésio são usados para estabilizar a molécula de proteína e aumentar a resistência de inibição do metanol.;
4. Enzimas lipoprotetoras, cuja ligação com o sítio ativo da lípase, durante a fase de desidratação, poderá mantê-lo numa configuração cataliticamente ativa.

Vários investigadores (Royon *et al.* 2007; Azócar *et al.* 2011; Samukawa *et al.* 2000; Chen & Wu 2003) sugerem a imersão das lípases em álcoois com três ou mais carbonos como uma medida de aumentar a sua atividade na síntese de ésteres metílicos.

O uso de solventes orgânicos no pré-tratamento das lípases, é o método mais reportado na literatura. Por exemplo, os autores, Lai *et al.* (2005), obtiveram ao fim de 7h de reação, o teor de *FAME* alcançado no caso da enzima pré-tratada foi de 98%, sendo de 48%, quando a enzima não sofreu qualquer tipo de tratamento prévio.

Yu *et al.* (2010) pré-trataram uma *Candida antarctica* (Novozyme® 435) por radiação ultrassônica com vibração e obteve rendimentos de ésteres na ordem dos 96%, após cinco ciclos repetidos. Este é um exemplo de método alternativo ao uso de compostos químicos no pré-tratamento de enzimas.

---

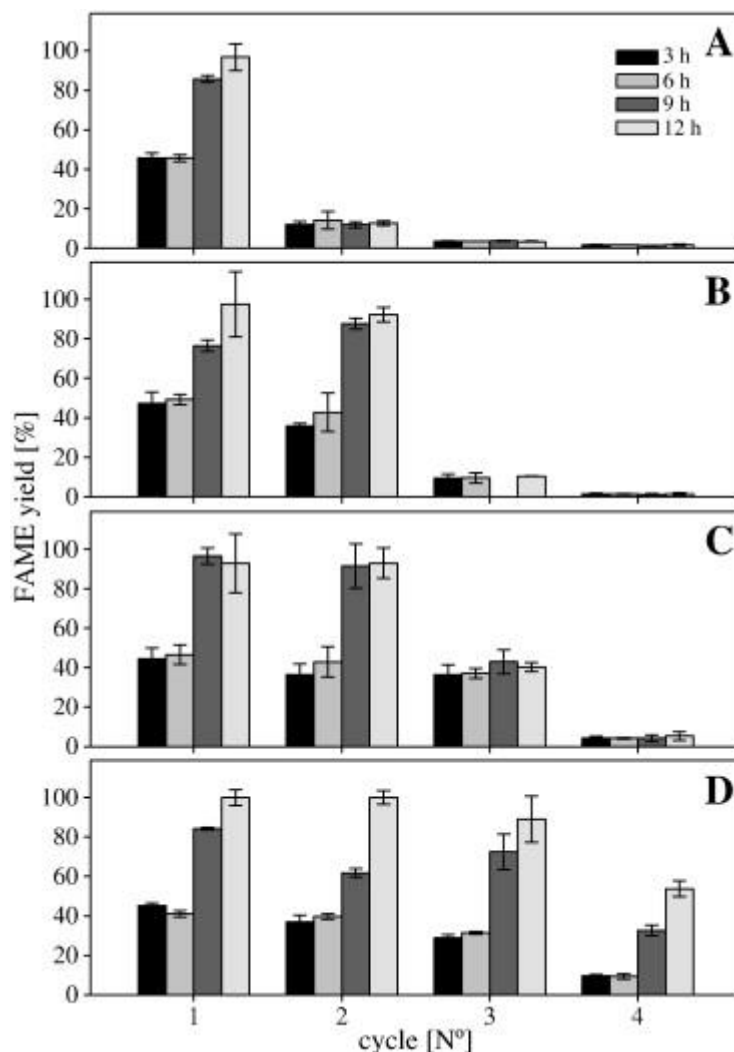
### Tratamento (regeneração) da enzima imobilizada usada com vista à sua reutilização

A imobilização das enzimas facilita a sua recuperação do meio reacional, possibilitando sua posterior reutilização. Porém, na utilização de enzimas suportadas (imobilizada) os problemas de resistência à transferência de massa podem surgir, sobre tudo com o avanço da reação. A deposição de glicerol na superfície do suporte + enzima é uma realidade, e que conduz a uma perda de atividade catalítica, e naturalmente da velocidade da reação. Quando isto acontece o processo tem que ser interrompido para se proceder à lavagem da enzima imobilizada, também designado por vários autores como a etapa de “regeneração da enzima”.

Neste processo de regeneração Ognjanovic *et al.* (2009) lavaram a enzima com álcoois de 3 a 5 cadeias de carbono.

Este procedimento foi também adotado por outros autores (Chen & Wu 2003; Christopher & Zambare 2014; Gog *et al.* 2012), tendo sido dada preferência ao 2-butanol e ao tert-butanol, na regeneração a lipase “desativada”.

Na Figura 2.6 é possível observar, os resultados obtidos por Azócar *et al.* (2011), relativos ao desempenho da Novozyme<sup>®</sup> 435 quando lavada com diferentes compostos nas etapas de pré-tratamento (para 1<sup>a</sup> utilização) e de regeneração/lavagem da referida enzima. O processo decorreu de forma semicontínua, com uma razão molar de metanol/ OAU 3,8:1, 15% (m/m) de Novozyme<sup>®</sup> 435 relativamente à massa de OAU, na presença de peneiros moleculares de 3Å de diâmetro, e com agitação de 200 rpm. A duração de cada ciclo foi de 12h, tendo sido efetuadas amostragens da mistura reacional nos tempos: 3, 6, 9 e 12h. Entre cada ciclo foi efetuada a lavagem da enzima.



**Figura 2.6** Efeito do tipo método usado na lavagem na enzima (*Novozyme*<sup>®</sup>435) no rendimento em *FAME*, ao longo de 4 ciclos de utilização: (A) controlo, i.e., sem lavagem; (B) lavagem com acetona; (C) lavagem com OAU; (D) lavagem com *tert*-butanol e incubação com OAU (Azócar *et al.* 2011).

Na Figura 2.6 B pode-se observar-se o efeito na lavagem da enzima com acetona ao longo dos 4 ciclos. Verifica-se que, comparativamente ao controlo, no 2º ciclo os rendimentos conseguidos são superiores quando se usa acetona. Este resultado pode dever-se ao facto de se tratar de um solvente hidrofílico, e como tal mais eficaz na remoção do glicerol e do metanol do suporte enzimático. No entanto, no terceiro ciclo o rendimento em ésteres diminui drasticamente, o que pode ser devido à remoção de água da superfície da *Novozyme*<sup>®</sup> 435 (efeito semelhante ao que tem o metanol na Figura 2.5), essencial para manter sua atividade catalítica. O rendimento em *FAME* foi sempre decrescendo à medida que a enzima foi sendo lavada, com acetona, de ciclo para ciclo, atingindo valores quase nulos no 4º ciclo.

---

Na Figura 2.6 C observa-se que a regeneração da lipase em OAU no terceiro ciclo tem efeito benéfico, quando comparado com o controlo ou a lavagem com acetona, pois apresenta rendimento em ésteres superiores. Este tratamento é muito vantajoso em comparação com o processo de lavagem acetona, pois é mais “amigo do ambiente” e mais barato. Embora existam vantagens na utilização do OAU na regeneração da enzima, o rendimento *FAME* também diminui ao longo das sucessivas reutilizações; o mesmo foi observado pelos investigadores (Chen & Wu 2003).

O terceiro método testado por Azócar *et al.*(2011) consistiu na lavagem da enzima com um álcool terciário, o tert-butanol e posterior incubação com OAU. Os resultados (vide Figura 2.6 D) mostraram que este álcool promove a remoção do glicerol e do metanol do suporte enzimático, sendo uma alternativa promissora para a regeneração da enzima.

Chen *et al.*(2003) investigaram a utilização de tert-butanol e 2-butanol na regeneração da atividade de enzimas inativas. Estes autores verificaram que atividade das enzimas aumentou cerca de 10 vezes em comparação com a de enzimas não tratadas, e também registaram que a atividade da enzima, completamente desativada, foi restaurada 56% e 75% do seu valor original, quando lavado com 2-butanol e tert-butanol, respetivamente.

Alguns autores adotaram o método de pré-tratamento de enzima descrito por Lai *et al.*(2005). O procedimento consistia em suspender 0.5g de enzima em 5 cm<sup>3</sup> de tert-butanol durante 1h à temperatura ambiente. Após 1h o solvente era removido e a lipase incubada em 10g de óleo num frasco roscado, por mais 1h a 50°C e 150rpm. Oliveira B. (2010) que verificou que este procedimento tinha um efeito positivo na separação de dois produtos da reação, bem como um maior rendimento em ésteres. Por sua vez, Melo S. (2012) testou o efeito da temperatura (ambiente e 50°C) do pré-tratamento em três lipases imobilizadas (Novozyme<sup>®</sup> 435, Lipozyme<sup>®</sup> TL IM e Lipozyme<sup>®</sup> RM IM), tendo concluído que com temperatura mais elevada o desempenho das enzimas era superior, e no caso específico da Novozyme<sup>®</sup> 435 o solvente provocou o aumento do tamanho de partícula (efeito *swelling*), tornando a superfície de contato entre enzima e substrato maior. Nas outras enzimas este efeito não se verificou, e tal deveu-se à natureza do seu suporte.

Da pesquisa realizada constatou-se que existem poucos estudos sobre os métodos conducentes à regeneração/ reutilização das enzimas imobilizadas, pelo que é um assunto que merece ser investigado.

---

#### 2.3.2.4 Incremento da atividade enzimática

Na última década, alguns investigadores tem apostado no uso de líquidos iônicos como substitutos de solventes orgânicos em reação. Em comparação com os solventes orgânicos, os líquidos iônicos apresentam várias vantagens, incluindo: maior variedade de líquidos, baixa inflamabilidade, condutividade iônica e térmica elevada, boa dissolução, alta estabilidade térmica e química e um elevado potencial eletroquímico (Melo S. (2012)).

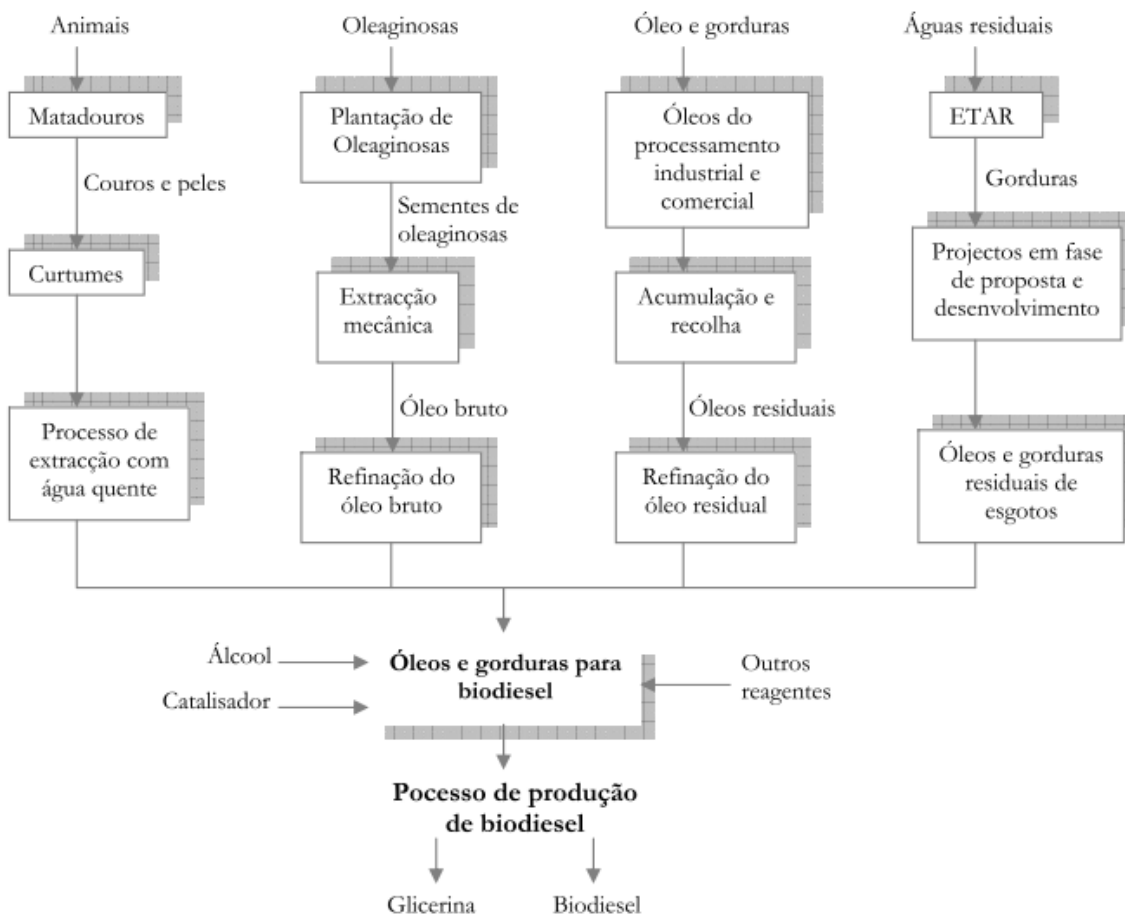
Ventura *et al.*(2012) verificaram que o líquido iônico cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio consegue induzir superatividade em enzimas aumentando até seis vezes a atividade da *Candida antarctica* (Novozyme®435 líquida). (Nota: esta é uma das enzimas mais utilizadas a nível industrial para melhorar a qualidade de certas gorduras e óleos vegetais em processos industriais.) Os resultados demonstraram que aquele líquido iônico é capaz de induzir superatividade da enzima, que o aumento da atividade enzimática observado não resultou de modificações do mecanismo de reação ou alterações estruturais da enzima devido à interação entre o líquido iônico e a superfície da enzima, mas pode ser explicado pela formação de microemulsões devido ao líquido iônico (Ventura *et al.* 2012).

## 2.4 Reagentes

### 2.4.1 Triglicerídeos e ácidos gordos livres

O biodiesel pode ser produzido a partir de matérias-primas naturais e renováveis, como o caso dos óleos vegetais (virgens ou residuais), das gorduras animais e residuais (vide Figura 2.7). Na categoria de óleos vegetais, podem ser transformados em biodiesel os óleos obtidos de semente de soja, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, bagaço de mamona, semente de colza, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas.

O ponto em comum entre todas estas fontes do biodiesel é que todas contêm gordura de alguma forma. Toda a substância que contém triglicerídeos na sua composição pode, por princípio, ser usada na produção de biodiesel.



**Figura 2.7 Fluxograma das cadeias produtivas de biodiesel (Maurício S. 2008).**

Estas matérias-primas, após a respetiva recolha, e antes de entrarem no processo produtivo, são sujeitas a um conjunto de análises. A composição química dos óleos influencia naturalmente as suas propriedades tais como a viscosidade, ponto de fusão, a estabilidade térmica e o índice de cetano<sup>3</sup>. Conhecendo-se a composição química de um óleo vegetal é possível prever o seu comportamento (em termos das propriedades anteriormente referidas) e o futuro potencial para os diferentes processos de valorização (Felizardo *et al.* 2006; Pratas *et al.* 2011; Freitas *et al.* 2011).

<sup>3</sup> Este índice é uma medida da qualidade de ignição de um combustível. Ele representa tempo (atraso) entre o início do processo de injeção e o momento em que o combustível inflama [URL1]



Os óleos e as gorduras são essencialmente constituídos por triglicerídeos resultantes da esterificação de vários ácidos gordos pelo glicerol, que é um tri-álcool. Os glicerídeos são o resultado de uma união entre uma molécula de glicerol e uma, duas ou três cadeias de ácidos gordos, sendo no fundo ésteres de glicerol.

Os ácidos gordos podem ser classificados como saturados e insaturados, os primeiros não têm qualquer ligação dupla enquanto os segundos podem ter uma, duas ou três ligações duplas. Assim, os ácidos gordos insaturados variam no número de ligações duplas, na sua posição e na configuração dos ácidos gordos (Felizardo 2003). Na Tabela 2.8, apresenta-se a composição em ácidos gordos de alguns óleos e gorduras.

**Tabela 2.8. Composição típica de alguns óleos e gorduras, em ácidos gordos (Felizardo 2003).**

Óleo ou gordura	Composição em ácidos gordos (% m/m)									
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0	C24:0
Amendoim	-	-	7-12	1.5-5	64-86	4-15	0.5-1	<1.5	2-4	1-2
Banha	<0.5	<1.5	24-30	12-18	36-52	10-12	<1	<0.5	-	-
Coco	41-46	18-21	9-12	2-4	5-9	0.5-3	vest.	vest.	vest.	-
Colza	vest.	vest.	2-4	1-2	52-66	17-25	8-11	0.5-1	0.5-2.0	0.5
Girassol	vest.	vest.	5.5-8	2.5-6.5	14-34	55-73	<0.4	<0.5	0.5-1.0	<0.5
Milho	vest.	vest.	9-12	1-3	25-35	40-60	<1	<0.5	<0.5	<0.5
Palma	vest.	1-2	41-46	4-6.5	37-42	8-12	<0.5	<0.5	-	-
Sebo	vest.	2-4	23-29	20-35	26-45	2-6	<1	<0.5	vest.	-
Semente de algodão	vest.	0.5-2.0	21-27	2-3	14-21	45-58	<0.2	<0.5	vest.	vest.
Soja	-	<0.5	8-12	3-5	18-25	49-57	6-11	<0.5	vest.	-

Cada composição de óleo origina um tipo de biodiesel com características próprias e diferentes. O ideal seria utilizar uma combinação de óleos que permitisse obter um biodiesel com as melhores características possíveis.

No caso dos óleos e gorduras que são submetidos a um processo de fritura, estão expostos à ação de vários agentes, os quais causam mudanças em sua estrutura provocadas por três reações: hidrolíticas, oxidativas e de polimerização.

A hidrólise de triglicerídeos ocorre quando é produzido vapor de água durante a preparação dos alimentos. Parte da água é rapidamente evaporada, mas outra parte dissolve-se no óleo e induz a sua clivagem para originar ácidos gordos, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos (Lam *et al.* 2010). Assim, a oxidação do óleo é acelerada pela alta temperatura do processo, e é a principal responsável pela modificação das suas características físico-químicas. Quando o óleo é constituído por moléculas insaturadas, é mais propício à

---

ocorrência de oxidação, bem como a produtos degradados (e. g. hidroperóxidos, aldeídos e cetonas). O óleo torna-se escuro, viscoso, acidez mais elevada e desenvolve odor desagradável (Oliveira B.(2010); Neto P. (2002)).

A polimerização é uma reação química onde os ácidos gordos insaturados – devido à influência do calor e por meio da quebra de ligações duplas – reagem para formar dímeros (molécula composta por duas subunidades idênticas ou monómeros ligados entre si) e polímeros de triglicerídeos. Esta reação promove o aumento do peso molecular do óleo e da sua viscosidade (Oliveira B. (2010)).

#### 2.4.1.1 Índice de acidez

O índice de acidez de um óleo vegetal corresponde a percentagem de ácidos gordos livres (AGL), o que por sua vez representa o seu grau de deterioração e consequentemente produção de AGL, quer por hidrólise e oxidação.

O elevado índice acidez poderá indicar que o óleo ou gordura sofreu quebras na sua cadeia lipídica. Este índice é expresso em massa de hidróxido de potássio (KOH) necessária para neutralizar os AGL, contidos em uma grama de amostra, sendo determinado através de um método titrimétrico (Oliveira B. (2010)).

Os ácidos gordos livres podem representar entre 0,3 a 2,0% da composição dos óleos virgens. Porém, este intervalo de percentagem pode ser maior quando se trata de óleos usados (Felizardo 2003). Na Tabela 2.9 é possível observar-se algumas matérias-primas usadas na produção de biodiesel e o respetivo índice de acidez.

**Tabela 2.9 Matérias-primas usadas na produção de biodiesel e respetivo índice de acidez (Teixeira J. 2011; Azócar *et al.* 2011).**

<b>Espécie de oleaginosa</b>	<b>Índice de acidez</b> [mg <sub>KOH</sub> /g]
Soja	0,2
Colza	2,92
Palma	0,1
Amendoim	3,0
Abóbora	0,55
Palanga	44
OAU*	~2,5

\*depende da natureza do óleo virgem e da utilização a que foi sujeito.

Por vezes, na reação de transesterificação e esterificação, é necessário adequar o tipo de catalisador a usar em função do teor de AGL. Felizardo *et al.*(2006) referem que os óleos com elevada concentração de AGL não podem ser usados diretamente para produzir biodiesel, via catálise homogénea alcalina, sendo aconselhável realizar-se um pré-tratamento. Na Tabela 2.10 está representado o teor de AGL máximo que alguns autores (Yaakob *et al.* 2013; Azócar *et al.* 2011) recomendam para a sua utilização na produção de biodiesel pela via convencional.

**Tabela 2.10 Teor de AGL máximo recomendado para a transesterificação quando é usado um catalisador básico homogéneo (Lam *et al.* 2010).**

Referência	AGL recomendado (m/m%)
Ma e Hanna (1999)	<1
Ramadhas <i>et al.</i> (2005)	≤2
Zhang <i>et al.</i> (2003a)	<0,5
Freedman <i>et al.</i> (1984)	<1
Kumar Tiwari <i>et al.</i> (2007)	<1
Sahoo <i>et al.</i> (2007)	≤2

Se um óleo contiver um significativo teor de AGL, e a catálise do processo de produção de biodiesel for a homogénea alcalina, então existem duas vias de pré-tratamento para esse óleo (Lam *et al.* 2010; Yaakob *et al.* 2013; Azócar *et al.* 2011):

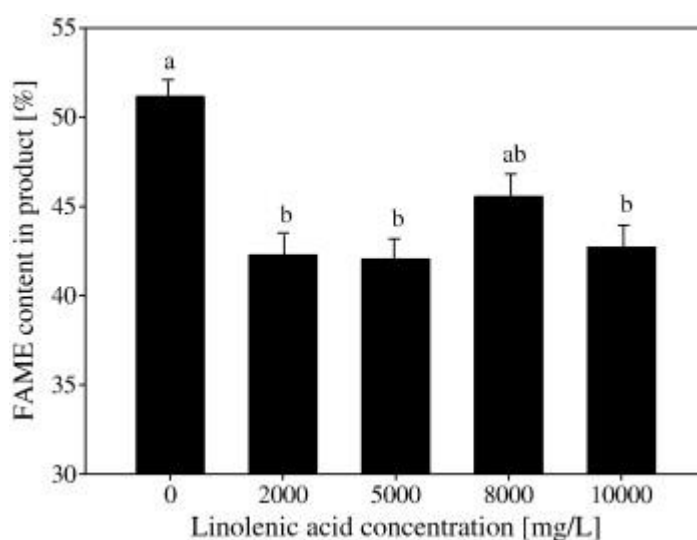
- neutralização dos AGL, através da reação de saponificação. Para tal usa-se por exemplo NaOH ou KOH;
- esterificação dos AGL, usando um catalisador ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e um álcool (e.g. metanol), com a formação de ésteres de ácidos gordos. Estes são posteriormente separados dos triglicerídeos, podendo ainda ser purificados dando origem ao biodiesel. Esta é a via mais adotada pelos grandes produtores de biodiesel.

Os óleos depois de pré-tratados prosseguem para na reação de transesterificação. Porém, quando a catálise é a alcalina, o seu teor em água deve ser reduzido, para que não ocorra a reação de saponificação (competitiva com a de transesterificação) dos triglicéridos (Lam *et al.* 2010).

De acordo com alguns autores, (Yaakob *et al.*2013; Azócar *et al.*2011; Lam *et al.*2010), a presença de AGL e de água no meio reacional quando se trata da catálise enzimática não constitui um obstáculo, porque para algumas enzimas a presença de água chega mesmo a ser benéfica (vide secção 2.2.1.3) e há enzimas catalisam ambas as reações, a de transesterificação e a de esterificação ).

---

Azócar *et al.*(2011) verificaram uma redução significativa no rendimento em ésteres, na presença de grandes quantidades de ácido linolénico no meio reacional anidro (presença de peneiras moleculares de 3Å). Estes resultados deve-se provavelmente pela esterificação dos ácidos gordos livres e conseqüentemente a hidrólise dos triglicérides (vide Figura 2.8). Esta reação é indesejada porque retarda a reação de transesterificação, i.e., a reação de esterificação dos ácidos produz *FAME* e água, este último reage com os triglicérides formando AGL e glicerol. Portanto, a enzima realiza as três reações em paralelo: hidrólise, esterificação e transesterificação, o que poderia gerar um processo menos eficiente e mais lento.



**Figura 2.8** Rendimento em *FAME* para diferentes concentrações de ácido linolénico na matéria-prima. As condições operacionais: razão metanol/ óleo de 3:1, 15% *Novozyme*<sup>®</sup> 435, 200 rpm, a 35°C e 12h de tempo de reação. As letras “a” e “b” mostram diferenças significativas ( $P<0.05$ ) (Azócar *et al.* 2011).

#### 2.4.1.2 Pré-tratamento do OAU

Como já foi mencionado anteriormente, as matérias-primas utilizadas no processo de produção de biodiesel podem ter diversas origens. Qualquer que seja a matéria-prima, esta deve encontrar-se em condições adequadas para ser possível atingir a maior taxa de conversão, o que muitas vezes significa um pré-tratamento de acordo com o catalisador selecionado. Assim, dependendo do composto a eliminar, os óleos vegetais e gorduras animais podem sofrer diversos tipos de tratamento, como são exemplos os apresentados na Tabela 2.11.

**Tabela 2.11 Pré-tratamentos aplicáveis a óleos vegetais usados na produção de biodiesel.**

<b>Tratamento</b>	<b>Modo operacional</b>
Redução de ácidos gordos livres	Executada por neutralização, extração por solvente e destilação a pressão reduzida. A neutralização consiste em adicionar uma base (NaOH, KOH) induzindo a formação de sabão, que deve ser removido antes de qualquer tratamento posterior. A extração por solvente permite remover os ácidos gordos livres utilizando um solvente como, por exemplo o etanol. A destilação a pressão reduzida consiste na destilação de AGL por arraste de vapor, sob pressão reduzida.
Remoção de resíduos sólidos	Consiste na precipitação das gomas após adição de ácido fosfórico e injeção de vapor de água. Comum para óleos e gorduras em bruto que contêm, normalmente, grandes quantidades de fosfatídeos (e.g. soja, milho).
Filtração	Elimina pequenas proporções de sólidos existentes em suspensão. Pode realizar-se por gravidade ou por vácuo.
Secagem	Utilização de um agente secante, como o sulfato de magnésio anidro ou o sulfato de sódio anidro, para remover a água residual que possa existir no óleo.
Descoloração	Consiste na adição de carvão ativado ao óleo, conseguindo-se a remoção de metais, água, insolúveis e pigmentos, reduzindo a cor e a possível turvação dos óleos e gorduras.

Após o pré-tratamento, o óleo vegetal deverá possuir uma composição que permita a sua utilização no processo de produção de biodiesel, sem comprometer o seu rendimento e qualidade do produto final.

### **2.4.2 Álcoois**

Como referido anteriormente, um dos reagentes envolvidos, quer a reação de transesterificação quer a de esterificação é um álcool, e vários autores identificam-no como um dos fatores mais importantes que afeta o rendimento.

Um dos fatores importantes que influencia a reatividade de um álcool é o comprimento da cadeia de átomos de carbono. Saliencia-se que, apenas os álcoois simples tais como metanol, etanol, propanol, butanol e o álcool amílico, podem ser utilizados na transesterificação (Ranganathan *et al.* 2008). De entre estes, o metanol e o etanol são os mais utilizados pelas razões expostas seguidamente.

---

O etanol é mais atrativo do ponto de vista ambiental, uma vez que se trata de um composto orgânico que pode ser produzido a partir de uma fonte renovável e, ao contrário do metanol, não levanta tantas preocupações relacionadas com a toxicidade (Christopher & Zambare 2014). No entanto, a utilização de etanol implica que este esteja isento de água, pois caso contrário a separação da glicerina será difícil (Felizardo 2003). Para além disso, o etanol, como possui uma cadeia carbónica mais longa do que a do metanol, torna os ésteres etílicos produzidos mais miscíveis na glicerina, o que dificulta a separação de fases.

O metanol é o álcool mais utilizado na reação de transesterificação, por ser o mais reativo, uma vez que possui uma cadeia curta e um elevado grau de polaridade (Felizardo 2003). Esta última propriedade também permite maior facilidade na separação entre os ésteres e a glicerina. A transesterificação metílica é considerada muito eficaz, proporcionando uma transformação praticamente completa, na ordem dos 95-98%, dos triglicédeos em ésteres de ácidos gordos, num período de tempo relativamente pequeno (Soares N. 2010).

O metanol apresenta inúmeras vantagens relativamente ao etanol, no entanto possui a desvantagem de se tratar de um álcool pouco solúvel no óleo, o que acaba por diminuir a produção em ésteres (Shimada *et al.* 1999).

A reação de transesterificação é reversível, e portanto o uso de um reagente em excesso permite deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos produtos (Hama *et al.* 2011a). Antczak *et al.*(2009) referem que um pequeno excesso de álcool conduz a um elevado rendimento na síntese de biodiesel, contudo, o aumento da quantidade de álcool para além do valor ótimo não vai aumentar o rendimento.

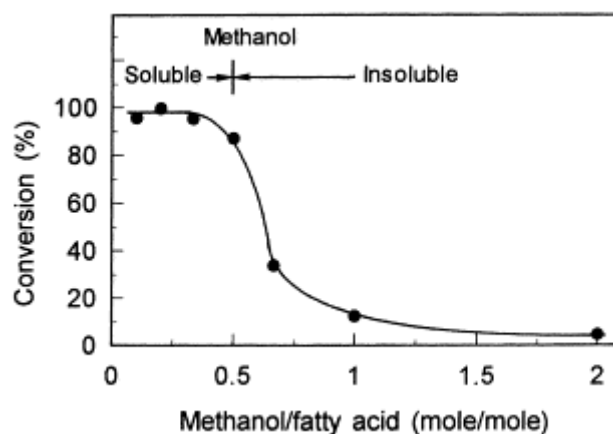
Shimada *et al.*(2002) afirmaram que o metanol é consumido completamente na metanólise<sup>4</sup> quando é usado numa quantidade correspondente a menos de um terço da estequiométrica. Aqueles autores verificaram que quando o álcool foi adicionado em quantidade superior a metade da estequiométrica, a atividade da lipase de *Candida antarctica* (Novozyme® 435) diminuiu substancialmente. A atividade da enzima não foi recuperada mesmo em reações subsequentes com um terço da quantidade (molar) estequiométrica de metanol. Portanto, foi constatado que a inativação enzimática é irreversível quando são utilizadas quantidades elevadas de metanol.

---

<sup>4</sup> Metanólise – reação de transesterificação ocorrida na presença de metanol.

---

No mesmo trabalho, foi observado que elevadas razões molares metanol: óleo também conduzem à desativação de lípases devido ao contato da enzima com a fase orgânica polar imiscível, que é formada pelo álcool e a glicerina. A Figura 2.9 ilustra um dos resultados deste estudo, conduzido com nas seguintes condições operatórias: mistura de 10 g de óleo vegetal/ MeOH, 0,4 g de lípase imobilizada, sob agitação, 30°C, durante 24 h .



**Figura 2.9. Metanólise de óleo vegetal com diferentes quantidades de MeOH, catalisada pela lípase *Candida antarctica* (Novozyme® 435) (Shimada *et al.* 2002).**

De acordo com o referido na secção 2.3.2.2, existem métodos para mitigar/evitar a inibição da atividade enzimática, provocada pelo metanol, tais como o uso de solventes orgânicos, adição gradual do álcool e utilização de álcoois de cadeia mais longa. Vários autores, (Shimada *et al.*2002; Li *et al.*2006; Wang & Zhang 2010; Antczak *et al.*2009; Jegannathan *et al.*2010; Li *et al.*2012), têm centrado a investigação na adição gradual do metanol, tendo verificado que acima de três adições graduais a conversão em *FAME* mantém-se constante.

A razão molar metanol:óleo é de 3:1 (ver Figura 2.1), e vários estudos (Chen *et al.*2010; Issariyakul & Dalai 2014; Royon *et al.*2007; Azócar *et al.*2011) têm sido realizados com essa razão, num esquema de adição de metanol por estágios em razões de 1:1 (em cada adição), de modo a evitar a desnaturação da lípase. Contudo, outros autores (Li *et al.* 2006; Melo S. 2012; Ognjanovic *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010; Halim & Kamaruddin 2008; Oliveira B. 2010; Alcantara *et al.* 2000) apontam que a razão molar metanol: óleo ótima é de 4:1.

---

## 2.5 Outros parâmetros operacionais

A velocidade das reações de produção de biodiesel por biocatálise é influenciada pela concentração do substrato (triglicérides e AGL), pH, concentração da enzima, temperatura, teor em água e presença de ativadores ou inibidores. Esses fatores afetam a atividade enzimática e, conseqüentemente, podem dificultar a conversão dos reagentes em produtos.

### 2.5.1 Teor em água

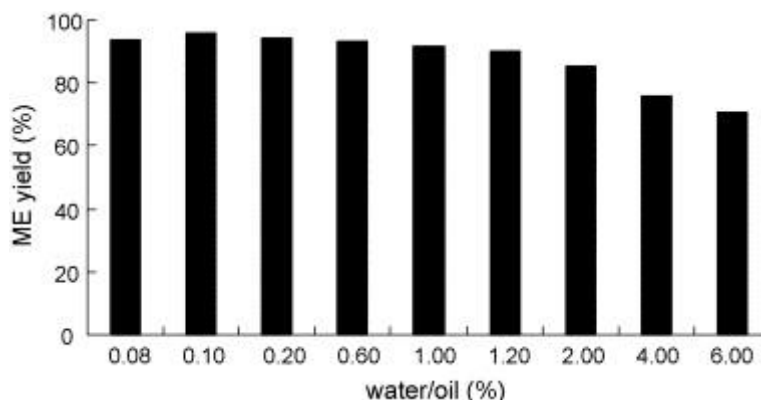
É indesejável a presença de água no meio reacional de transesterificação por catálise alcalina homogênea, tal como foi referido na subsecção 2.3.2.3. Contudo, na catálise enzimática o conteúdo de água na mistura reacional é um fator crucial que determina o rendimento da síntese do biodiesel, visto que desempenha várias funções, mantendo a estrutura tridimensional da enzima (Christopher & Zambare 2014), apresentando forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da lipase (Gog *et al.* 2012; Lu *et al.* 2009).

Todavia, a lipase *Candida antarctica* exibe a atividade mais elevada, com baixa disponibilidade de água, e conteúdo muito elevado de água pode diminuir o tempo de vida da enzima. O teor ótimo de água no meio reacional é um compromisso entre a maximização da atividade da enzima, aumentando a área interfacial, e a minimização da reação de hidrólise. Este teor ótimo deve ser determinado para cada tipo de lipase (Gog *et al.* 2012).

Azócar *et al.*(2011) e Nie *et al.*(2006) referem que água em excesso reduz o rendimento em ésteres, pois retarda a reação de transesterificação através da reação de hidrólise. Contudo, Yaakob *et al.*(2013) afirmaram que a Novozyme<sup>®</sup> 435 tem provado ser um catalisador eficaz na produção de biodiesel, em meio anidro (Azócar *et al.* 2011; Nie *et al.* 2006; Yaakob *et al.* 2013).

Li *et al.* (2006) afirmaram que se deve evitar um teor de água, presente no óleo, superior a 2%, pois provoca uma diminuição do rendimento em *FAM*, como se pode observar na Figura 2.10. Contudo, Shimada *et al.*(2002) concluíram que água gerada na síntese dos ésteres dos ácidos gordos livres, contidos nesses óleos, estava rodeado pelo glicerol, não prejudicando a transesterificação. Dado que, a concentração de ésteres metílicos aumentou gradualmente durante o processo.





**Figura 2.10** Efeito da água sobre a metanólise de óleo. As condições de reação: 3% Lipozyme TL IM e 1% Novozyme® 435; razão molar metanol / óleo de 4:1; razão tert-butanol/ óleo 1:1 (Li *et al.* 2006).

### 2.5.2 Temperatura

A estabilidade térmica das lípases imobilizadas depende fortemente da natureza do catalisador, dos compostos presentes no meio reacional (exemplo do seu ponto de ebulição), assim como do método de imobilização utilizado. Em geral, as temperaturas de reação mais elevadas reduzem a viscosidade do óleo, aumentam as velocidades de reação e conseqüentemente diminuem o tempo de reação (Xu *et al.* 2003).

A temperaturas elevadas são favoráveis à reação de transesterificação, contudo a estrutura da enzima não permite temperaturas muito elevadas, pois podem causar a sua desnaturação. Como a maioria das lípases têm a sua temperatura ótima entre os 30-60°C, a transesterificação enzimática é geralmente conduzida nesse intervalo de temperatura (Gog *et al.* 2012).

Existe uma ampla gama de temperaturas de operação da reação de produção de biodiesel, dependendo da origem da enzima: 25-55°C para lípases *Candida antarctica* IM (temperatura ótima de 50°C) (Li *et al.* 2006; Maceiras *et al.* 2011); 20-70°C durante lípases *P. cepacia* (temperatura ótima 50°C); 20-60°C para lípases *R. chinensis* de célula inteira IM (30°C). A temperatura ideal para transesterificação de mistura de lípases *R. oryzae* e *C. rugosa* IM de 45°C. Na maioria das vezes, a temperatura média de 40°C tem sido indicada como a ideal para lípases.

Em suma, a temperatura ótima para o processo de transesterificação enzimática resulta de um compromisso entre a estabilidade operacional da lípase, o tipo de solvente orgânico e o ponto de ebulição do álcool (Gog *et al.* 2012). No caso do metanol e etanol, as temperaturas do ponto de ebulição são 65°C e 78°C, respectivamente.

---

### 2.5.3 Agitação

Agitação é um fator de particular importância no processo de transesterificação para facilitar a interação entre as fases de álcool e de triglicéridos. Estas fases não são miscíveis e formam no início da reação duas camadas líquidas no interior do reator, pelo que agitação é crucial para a ocorrência da reação (Li & Fan 2011).

Na catalise homogênea a agitação tem de ser mais intensa, de forma a reduzir o tempo de reação e alcançar uma conversão superior. Contudo, a eficiência de mistura que se consegue com uma determinada velocidade de agitação, depende do volume de solução.

Enquanto, na catálise enzimática é conveniente operar com velocidade de agitação baixas de forma a evitar a inativação das lípases e/ou a desintegração do seu suporte (no caso das imobilizadas). Os autores, Halim *et al.* (2008) verificaram que o aumento da velocidade de 140 para 200 rpm, o rendimento de *FAME* aumenta, sendo maior rendimento obtido às 200 rpm (Halim & Kamaruddin 2008). Contudo, quando a velocidade reacional aumentou para 220rpm, o rendimento em ésteres diminuiu, possivelmente devido a inativação da enzima. Para além disso, na catálise enzimática é preferível substituir a agitação magnética pela orbital. Porém, também existem sistemas em que a solução reacional é previamente agitada, antes de entrar em contacto com o catalisador, como é o caso dos sistemas contínuos de leito fixo (com enzimas suportadas).

### 2.5.4 pH

O pH é um parâmetro que pode afetar a atividade da enzima. Porém, é necessário realçar que o pH ótimo depende da técnica de imobilização, no caso das lípases imobilizadas por adsorção, as reações não devem ser conduzidas em pH superior a 8,5. A estrutura terciária da proteína depende de interações, tais como ligações de hidrogénio entre os grupos R (Figura 2.1). A mudança no pH pode alterar a ionização de grupos funcionais presentes na cadeia lateral e destruir a configuração normal, em alguns casos desnaturando a enzima.

### 2.5.5 Concentração de enzima

As baixas concentrações em reações enzimáticas traduzem-se em baixas velocidades de reação. Por outro lado, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade aumenta proporcionalmente em função da frequência de colisões entre a enzima e as moléculas dos reagentes. Quando a “proporção” da enzima se aproxima da velocidade máxima em que ela pode combinar com os reagentes e formar produtos, o efeito do

---

---

aumento da concentração do substrato diminui. Nesse ponto, a enzima estabelece uma interação com o substrato que, mesmo aumentando a concentração deste, ela não terá efeito na velocidade da reação e, portanto estará saturada (Rosset I. 2011). Contudo, alguns inibidores combinam-se com as enzimas através de grupos funcionais fora do centro ativo, dificultando o acesso do substrato, causando mudanças na estrutura da proteína e reduzindo a energia de ativação.

Algumas enzimas catalisam as reações de transesterificação e esterificação, sendo inibidas por substâncias que interagem com o centro ativo da enzima reduzindo o seu potencial biocatalítico. O inibidor competitivo compete com o sítio ativo da enzima, impedindo a ligação entre enzima e substrato. Assim, neste tipo de inibição, as substâncias afetam a primeira etapa da catálise, prejudicando a interação do substrato com o sítio ativo da enzima, mas sem interferir na transformação do produto. Por ser uma inibição reversível, a adição de mais substrato minimiza a probabilidade de formação do complexo enzima inibidor.

Alguns dos estudos encontrados na literatura consultada, que confirmam esta teoria na prática e dois deles são descritos de seguir.

Wang *et al.*(2010) observaram que a Novozyme<sup>®</sup> 435 tinha uma elevada atividade catalítica na metanólise. O estudo decorreu sob as seguintes condições operatórias: 4,76g de óleo de algodão, 0,24g de metanol (adição por estágios), 3,5% a 5% (m/m) de Novozyme<sup>®</sup> 435/óleo, 150 rpm, a 40°C e tempo de duração de 36h. Os resultados obtidos mostraram que se obtêm rendimentos superiores, quando a catálise se dá na presença de uma maior quantidade de lipase (na gama estudada), tal como se pode observar na figura seguinte.

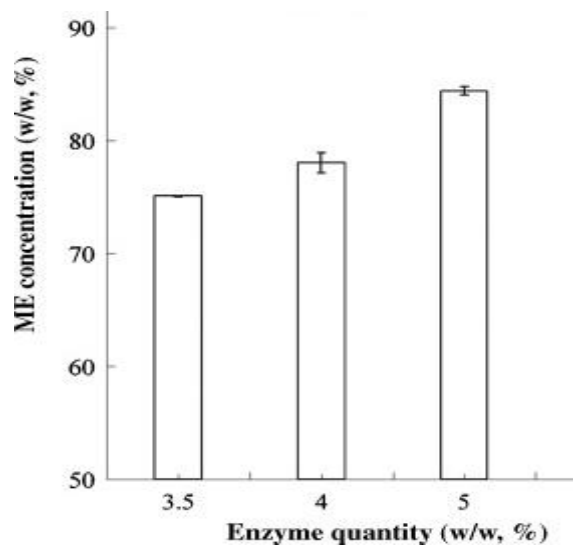


Figura 2.11. Efeito de diferentes razões mássicas enzima/ óleo de semente de algodão na concentração de *FAME*(Wang & Zhang 2010).

Li *et al.* (2006) investigaram a metanólise de óleo de colza catalisada por diferentes concentrações da lípase Novozyme<sup>®</sup> 435, de acordo com o ilustrado na Figura 2.12. Condições operacionais do estudo foram: tert-butanol/ óleo de 1:1 e razão metanol/ óleo de 4:1. Analisando a Figura 2.12 nota-se que à medida que aumenta a concentração de lípases também aumentou o rendimento em ésteres. Sendo, aos 2% (m/m), a maior razão testada, que se atinge o máximo de conversão em ésteres, 90%, ao fim de 12h de reação.

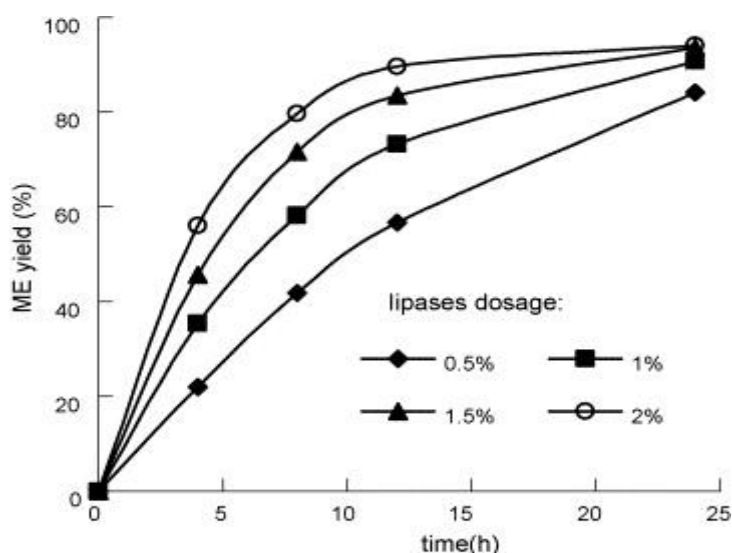


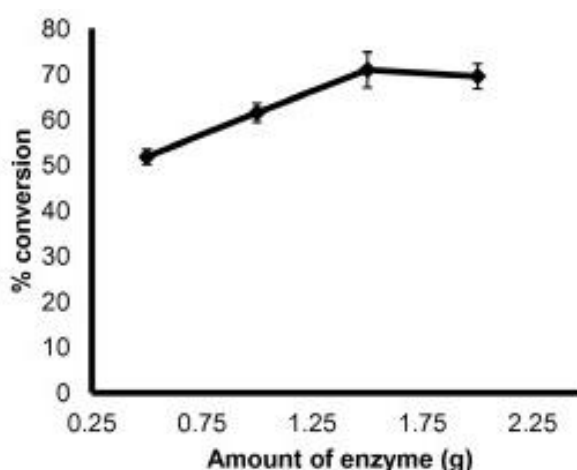
Figura 2.12 Efeito da razão mássica de Novozyme<sup>®</sup> 435/óleo no rendimento em *FAME*, na metanólise de óleo de colza(Li *et al.* 2006).

---

Nos reatores de leito fixo contínuo, a quantidade de enzima é um parâmetro operacional importante no rendimento do processo de produção de biodiesel por biocatálise.

Chattopadhyay *et al.* (2013), investigaram a metanólise do OAU catalisada por diferentes concentrações da lipase IIT-SARKYME, num sistema contínuo (duas colunas de 20x45 mm). Condições operacionais do estudo foram: adição de metanol em duas etapas (razão molar metanol: óleo de 1:1), temperatura de 37°C, o caudal do substrato variou entre 0,12-1,78 mL/ min, a quantidade de enzima variou entre 0,15 a 2g.

Observaram que, com o aumento da quantidade de lipase a conversão aumenta até atingir um patamar. Após este nível de saturação o sistema não incrementa a conversão dos triglicerídeos, como ilustra a Figura 2.13, onde 1,5 g de lipase é a quantidade suficiente para a produção enzimática.



**Figura 2.13** O efeito da quantidade de enzima IIT-SARKYME usada na metanólise do OAU, num reator de leito fixo (Chattopadhyay & Sen 2013).

Na Tabela 2.12 estão representados vários estudos em reatores contínuos, em particular, de leito fixo com diferentes volumes e quantidades de enzimas imobilizadas, que obtiveram rendimentos elevados.

**Tabela 2.12** Exemplos de estudos de produção de biodiesel por biocatálise em reatores contínuos: volume do reator versus massa de enzima imobilizada (Chattopadhyay & Sen 2013).

Volume do reator (mL)	Enzima imobilizada (g)	Referências
-----------------------	------------------------	-------------

---

---

40,2	10,0	Wang <i>et al.</i> (2011)
22,7	3,0	Salum <i>et al.</i> (2010)
17,7	2,0	Hajar <i>et al.</i> (2009)
21,0	22,5	Rosa <i>et al.</i> (2009)
8,3	2,8	Halim <i>et al.</i> (2009)
1,2	1,0	Shaw <i>et al.</i> (2008)
5,1	1,0	Royon <i>et al.</i> (2007)

Na tabela anterior verifica-se que existe uma grande disparidade de valores de massa de enzima imobilizada por volume de reator contínuo.

### 2.5.6 O subproduto glicerol

Sendo o glicerol um subproduto de uma reação reversível, como é o caso da reação de transesterificação, se ele for removido à medida que vai sendo produzido, aumenta-se o rendimento da referida reação. Além disso, este subproduto, além de ser hidrofílico, possui uma viscosidade e densidade mais elevadas do que os restantes componentes da mistura reacional em processos de produção de biodiesel. Quando se usam enzimas imobilizadas nestes sistemas, o glicerol deposita-se na superfície das mesmas, criando limitações à transferência de massa, e conseqüentemente reduzindo o rendimento da reação (Shimada *et al.* 2002). A inativação das enzimas por parte do glicerol já foi abordada na secção 2.3.1.2.

Na literatura encontram-se várias sugestões para a remoção do glicerol da mistura reacional, tais como:

- Num sistema de reatores (de leito fixo, com enzimas imobilizadas) em série, entre reatores existe uma etapa de separação (por sedimentação) do glicerol (Shimada *et al.* 2002; Hama *et al.* 2011b);
- Presença de sílica no meio reacional. Segundo os autores Li *et al.* (2006), a sílica adsorve o glicerol. Porém, a Melo S. (2012) verificou que este método não era eficaz, porque o metanol também é adsorvido pelo sílica, ficando assim indisponível para a reação de transesterificação;
- Uso de resina adsorvente com seletividade para o glicerol e não para o metanol, como é o caso da comercial Lewatit GF 202 utilizada por Silva W. (2013).

Do ponto de vista industrial a remoção eficiente do glicerol pode ser um obstáculo na implementação dos catalisadores enzimáticos em reatores de leito fixo (Hama *et al.* 2011a).

---

---

## 2.6 Biorreatores

No caso específico de produção de biodiesel por biocatálise, a configuração do processo é muito importante e devem ser levados em conta os problemas técnicos como a homogeneidade da mistura reacional, solubilidade do álcool, estabilidade do catalisador, recuperação da catalisador, entre outros (Al-Zuhair *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010).

A aplicação de biocatalisadores em processos industriais tem sido realizado em diferentes configurações de reatores. Neste contexto, o biorreator pode ser definido como o equipamento no qual as enzimas são colocadas em contato com a solução de substrato.

Os biorreatores podem ser operados em modo descontínuo (reator agitado descontínuo ou *batch*) ou contínuo (tanque agitado contínuo, *CSTR*), leito fixo e leito fluidizado). No reator de tanque agitado as lípases são dispersas na solução de substrato, sendo agitação promovida por agitadores mecânicos ou por agitadores orbitais. Nos reatores de leito fixo e fluidizado, as lípases são mantidas no interior do reator enquanto o fluido passa pelo leito. Estes são o tipo de reatores adotados para aplicações em larga escala. Uma comparação/resumo dos reatores mais utilizados para as lípases é apresentado na Tabela 2.13.

**Tabela 2.13 Comparação/resumo dos reatores mais utilizados na produção de biodiesel por biocatálise (Simões A. 2011; Gog *et al.* 2012).**

<b>Parâmetros</b>	<b>Descontínuo agitado</b>	<b>Contínuo agitado</b>	<b>Contínuo Leito fixo</b>	<b>Contínuo Leito fluidizado</b>
Alimentação do sistema com catalisador	Fácil	Fácil	Difícil	Fácil
Concentração de catalisador por volume de reator	Baixa	Baixa	Alta	Relativamente alta
Controlo da temperatura do sistema	Controlo razoável	Distribuição e controlo razoável	Controlo difícil; gradiente de temperatura	Constante uniforme; fácil controlo
Obstrução do reator	Raramente	Ocorre em alguns casos	Ocorre facilmente	Muito difícil
Tempo de residência	Grande	Grande	Pequeno	Intermédio
Tensões de cisalhamento	Elevadas	Elevadas	Pequenas	Poucas
Problemas com inibição pelo substrato	Não causa problemas sérios	Grande devido a alta concentração	Maiores que no leito fluidizado	Não causa problemas sérios

A seleção do reator mais apropriado para um determinado processo com lípases imobilizadas depende de vários fatores, tais como (Gog *et al.* 2012): (a) a forma como a enzima está imobilizada – partícula, membranas e fibras; (b) a natureza do substrato – solução, sólidos em suspensão; (c) requisitos operacionais da reação – controle de pH, temperatura; (d) cinética da reação – inibição por substrato, produto, ou ambos; (e) a superfície catalítica por unidade de volume de reator; (f) características de transferência de massa externa e interna; (g) facilidade de substituição e regeneração do catalisador; (h) dificuldade de montagem do reator; e (i) custos (conceção e operacionais) do reator. Dos fatores apresentados, são considerados como os pontos fundamentais a natureza da solução de substrato e a cinética da reação enzimática.



---

### 2.6.1 Descontínuos

A maioria das experiências são realizadas em laboratório com (bior)reatores descontínuos agitados nos quais as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato, com agitação promovida por agitadores mecânicos (orbitais).

Os reatores descontínuos são os mais reportados na literatura em estudos com lípases. No entanto, apresentam algumas desvantagens na aplicação à escala industrial, dado que as lípases imobilizadas estão suscetíveis à rutura do seu suporte causada pelas altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica. Assim, a lípase imobilizada não pode ser reutilizada por um longo período de tempo (Tan *et al.* 2010).

Outros fatores negativos deste tipo de processo à grande escala são: a necessidade de reatores de volumes grandes, dificuldade de separação dos produtos e longos períodos de reação, para alcançar boa produtividade e a rutura do suporte de enzimas imobilizadas.

O processo de transesterificação convencional utilizado na operação descontínua é considerado lenta e não é adequado para um sistema de automatização. Em comparação, com um processo de transesterificação de fluxo contínuo, este têm a vantagem, a capacidade de obter melhores *design* de equipamento, de forma a otimizar a qualidade de biodiesel.

Royon *et al.* (2007) testaram a produção, em descontínuo, de biodiesel por metanólise do óleo de semente de algodão, catalisada pela *Novozyme*<sup>®</sup> 435 na presença de tert-butanol. Neste estudo foi possível observar a inibição da enzima causada pelo metanol. Este problema foi eliminado pela adição de tert-butanol ao meio reacional, que proporcionou um aumento do rendimento em ésteres. Ao fim de 24 h de reação obteve-se um rendimento de 97%, com um meio reacional contendo 32,5% de tert-butanol, 13,5% metanol e 54% óleo e carregamento catalítico de 0,017g de enzima.g<sup>-1</sup>de óleo.

Na Tabela 2.14 apresenta síntese de estudos realizados em reatores descontínuos, com a lípase *Candida antarctica* (*Novozyme*<sup>®</sup> 435).

**Tabela 2.14. Síntese de alguns estudos realizados em reatores descontínuos (escala laboratorial) na produção de biodiesel.**

Matéria-prima	Nov. 435	Álcool	Outras condições operatórias	Rendimento	Referência
Óleo de canola	42,3%	Metanol (razão álcool: óleo=3,5:1)	T=38°C;t=12,4h; 7,2% água	98%	(Chang <i>et al.</i> 2005)

Óleo de sementes algodão	1,7%	Metanol (adição em três etapas numa razão álcool: óleo=0,33:1)	T=30°C; t=12h ;150 rpm	97%	(Samukawa <i>et al.</i> 2000)
Óleo de girassol	3%	Metanol (razão álcool: óleo=3:1)	T=45°C; t=50h 150rpm; Adição do álcool em três etapas: 0h, 10h e 24h	>99%	(Iso <i>et al.</i> 2001)
Óleo de pinhão	10%	Acetato Etilo (razão molar acetato :óleo= 11:1)	T=50°C; t=12h; 150rpm	91%	(Modi <i>et al.</i> 2007)
Óleo de Karanja	10%	Acetato Etilo (razão molar acetato: óleo= 11:1)	T=50°C; t=12h; 150rpm	90%	(Modi <i>et al.</i> 2007)
Óleo de girassol	10%	Acetato Etilo (razão molar acetato: óleo = 11:1)	T=50°C; t=12h; 150rpm	92%	(Modi <i>et al.</i> 2007)
Óleo de sementes algodão	1,7%	Metanol (razão álcool: óleo = 6:1)	t= 24 h; T= 50°C; Solvente tert-butanol	97%	(Royon <i>et al.</i> 2007)
Óleo de soja	4%	Metanol (razão molar metanol: óleo= 6:1)	T=40°C; 150rpm; solvente tert-butanol	94%	(Wang <i>et al.</i> 2006)
Óleo de soja	1,3%	Metanol (razão molar metanol: óleo =6:1)	T=40°C;t= 12h; Solvente orgânico: óleo=1:1 (v/v)	94%	(Chen <i>et al.</i> 2010)
Óleo de soja	6%	Metanol (razão molar metanol: óleo =6:1)	T=40°C;t= 4h; Solvente orgânico: óleo=1:1 (v/v)	96%	(Chen <i>et al.</i> 2010)

**Tabela 2.14 - Síntese de alguns estudos realizados em reatores descontínuos (escala laboratorial) na produção de biodiesel. (cont.)**

Matéria-prima	Nov. 435	Álcool	Outras condições operatórias	Rendimento	Referência
OAU	15 %	Metanol (razão molar metanol: óleo= 8:1)	T=44,5°C; t=12h; 200 rpm; solvente tert-butanol	~80% (17 ciclos)	(Azócar <i>et al.</i> 2011)
OAU	10%	Metanol (razão molar metanol: óleo= 4:1)	T=50°C;t= 8h; 200 rpm	90%	(Melo S. 2012)
OAU	10%	Metanol (razão molar metanol: óleo= 4:1)	T=40°C;t= 48h; 200 rpm	96%	(Oliveira B. 2010)
OAU	10%	Metanol (razão molar metanol: óleo= 4:1)	T=40°C;t= 48h; 200 rpm	83%	(Amorim A. 2009)

Os reatores descontínuos são particularmente indicados para o estudo de cinéticas de reações, à escala laboratorial.

## 2.6.2 Contínuos

Os biorreatores contínuos mais utilizados na produção de biodiesel são os tanques agitados e os de leito fixo, do tipo tubular. Segundo Gog *et al.*(2012), devem ser utilizados reatores contínuos, em particular, de leito fixo, na produção de biodiesel, de forma a reduzir os custos operacionais.

### 2.6.2.1 Biorreatores agitados

Na indústria do biodiesel, a reação transesterificação tanto é processada em biorreatores agitados simples como em série, com ou sem a remoção do glicerol. Uma vez que os parâmetros operacionais são frequentemente selecionados com base em experiências realizadas em sistemas descontínuos, é necessário ajustá-los para os processos contínuos. Por esta razão ainda não são conhecidas as condições de operação ótimas à escala industrial em reatores contínuos (Silva W. 2013).

---

A operação em série de reatores contínuos permite inserir etapas de separação (entre os reatores) de produtos e/ou subprodutos com potencialidade de inibição na reação, nomeadamente o glicerol (Gog *et al.* 2012).

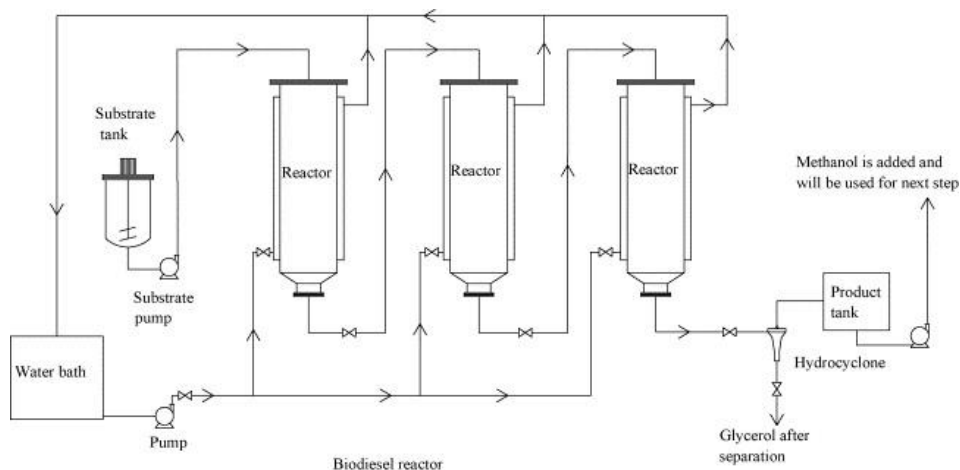
#### 2.6.2.2 Biorreatores de leito fixo

Os reatores de leito fixo estão em crescente aplicação na produção de biodiesel, dada a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de operação, controlo automático e força de cisalhamento sobre a lípase inferiores (Halim *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010; Tan *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011). Porém, existem alguns inconvenientes com os biorreatores de leito fixo, tais como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e acumulação de glicerol. Além disso, este sistema exige particular atenção ao controlo do tempo de residência e na razão mássica enzima/óleo.

Diversa literatura comprova casos de estudo de sucesso na implementação de reatores de leito fixo na produção enzimática de biodiesel, usando diferentes configurações de biorreatores: leito fixo simples estágio com adição gradual de metanol (Royon *et al.* 2007; Shimada *et al.* 2002); leito fixo de simples estágio com recirculação (Lai *et al.* 2005); leito fixo de vários estágios conectados em série, com extração de glicerol (Chen *et al.* 2010; Halim *et al.* 2009; Nie *et al.* 2006; Hama *et al.* 2011b).

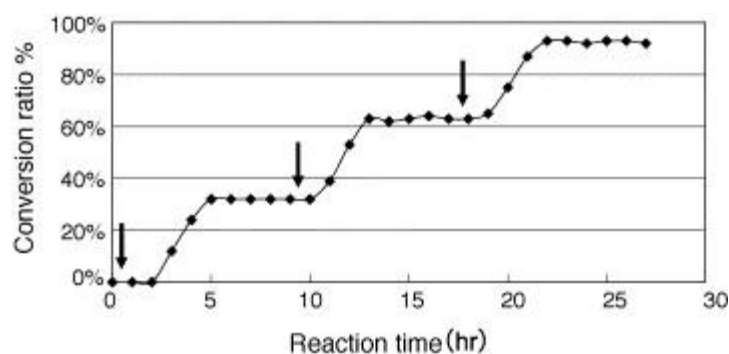
Na literatura encontram-se diversos estudos de produção de biodiesel por catálise enzimática, realizados à escala laboratorial. Nos próximos parágrafos resumem-se aqueles que se consideraram de maior relevância nesta temática.

Nie *et al.* (2006) investigaram a metanólise do OAU, num sistema contínuo, com reatores de 50 mL (180×1000 mm) de capacidade, com 500g da lípase *Candida sp.* 99-125. Outras condições de operação foram: razão molar éter de petróleo / óleo é de 1:1 e 10% de água no sistema reacional. O esquema da montagem experimental pode ser visto na Figura 2.14. O reator foi aquecido por um banho de água a 40°C e o glicerol foi separado na saída de cada reator.



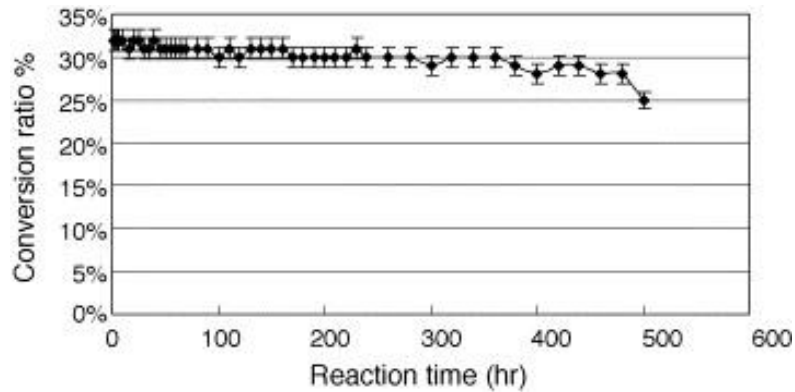
**Figura 2.14. Representação esquemática do reator de leito fixo, em cada etapa de reação usado por (Nie *et al.* 2006).**

Na Figura 2.15 está representada a evolução temporal do rendimento da reação. O sistema arrancou com os reatores vazios (sem mistura reacional) e por isso durante as três primeiras horas a conversão registada à saída do terceiro reator é nula. Após este tempo a taxa de conversão de triglicerídeos começou a aumentar rapidamente. Após as três adições de metanol (indicado por setas na Figura 2.15), a percentagem de ésteres atingiu 92%.



**Figura 2.15. Metanólise do OAU com adição gradual de metanol (indicado por setas) (Nie *et al.* 2006).**

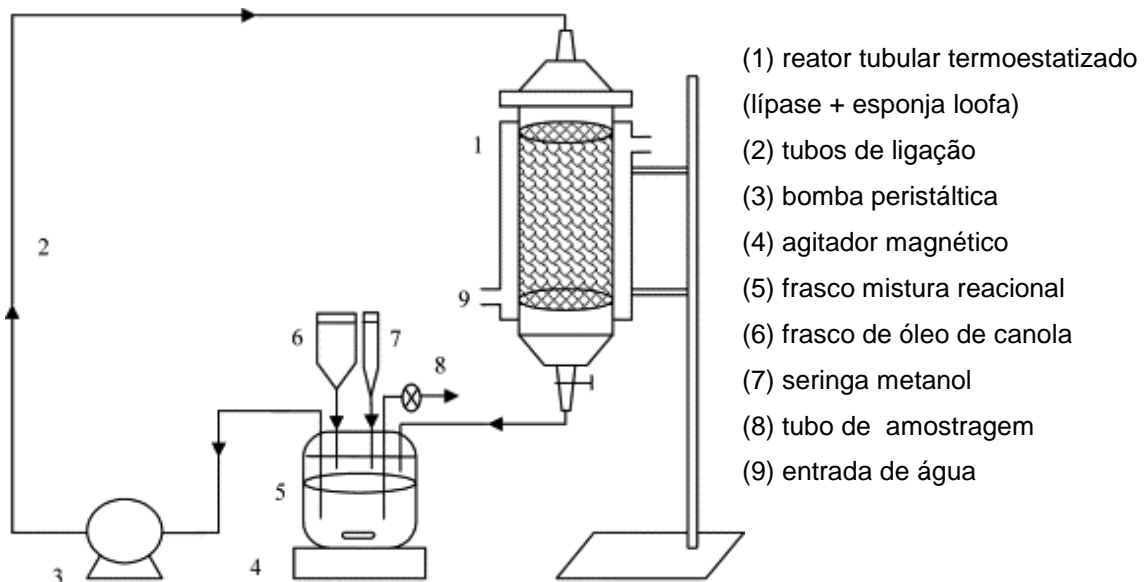
No restante tempo reacional, a lipase imobilizada atinge a estabilidade operacional sendo este o parâmetro importante num processo industrial, uma vez que afeta diretamente a viabilidade económica do processo. A Figura 2.16 mostra que a estabilidade operacional da lipase imobilizada durante cerca de 500 h.



**Figura 2.16. Estabilidade operacional da lipase imobilizada num reator de leito fixo (Nie et al. 2006).**

Royon *et al* (2007) investigaram a produção de biodiesel por metanólise do óleo de semente de algodão utilizando Novozyme® 435 como catalisador, na presença de solvente tert-butanol. No processo contínuo obtiveram um rendimento em ésteres de 95% utilizando um reator de leito fixo (180 x 6 mm) com um caudal de 9,6 mL/h. O sistema contínuo operou mais de 500 h sem apresentar expressiva redução no rendimento em ésteres.

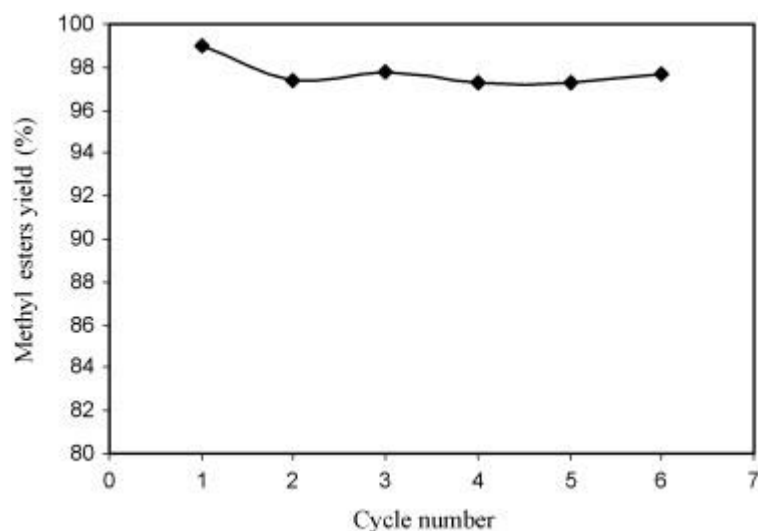
Hajar *et al.* (2009) estudaram a metanólise enzimática do óleo de canola, num reator de leito fixo (100 mm x 15mm), contendo 2 g de Novozyme® 435 misturada com pequenos pedaços de esponja natural em meio isento de solventes (vide Figura 2.17).



**Figura 2.17 Esquema do reator de leito fixo usado por (Hajar et al. 2009).**

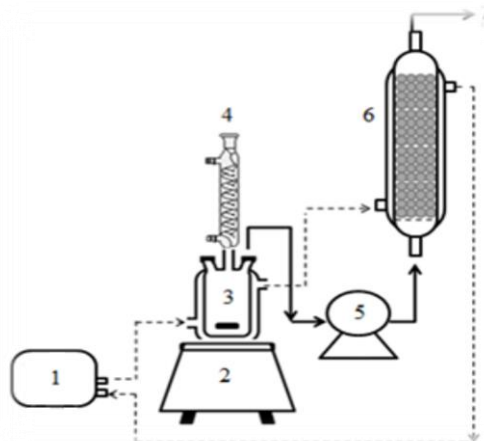
---

O sistema operou durante 72 h e o metanol foi adicionado em 3 etapas, a primeira adição no arranque do ensaio (0 h), a segunda às 24 h e a terceira às 48 h de operação. As condições ótimas obtidas foram: caudal de 378 mL/h, temperatura de 38 °C e razão molar metanol: óleo de canola de 4,3:1. Estas condições foram repetidas por 6 ciclos (432 h) no reator de leito fixo, mantendo a conversão de ésteres metílicos superior a 97% (retiradas a cada 72 h) (vide Figura 2.18).



**Figura 2.18** Reutilização de lipase imobilizada Novozyme® 435 do reator de leito fixo contínuo (Hajar *et al.* 2009).

Silva W. (2013) trabalhou com um sistema constituído por reatores de leito fixo com a capacidade de 10 mL (15 x55 mm), o substrato (vários tipos de óleo e etanol) foi alimentado por meio de uma bomba, com fluxo ascendente. Para evitar a perda de etanol no sistema, recorreram a um condensador sobre o frasco de alimentação. A Figura 2.19 ilustra o esquema da montagem experimental.

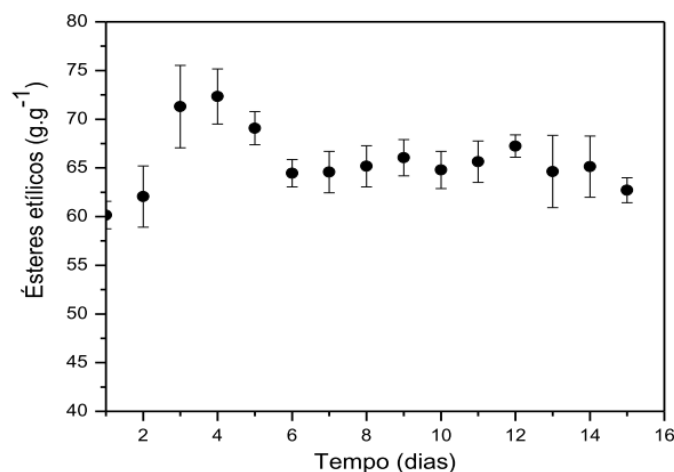


Legenda:

- 1- Banho termostático
- 2- Agitador magnético
- 3- Frasco de alimentação
- 4- Condensador de refluxo
- 5- Bomba
- 6- Reator contínuo de leito fixo

**Figura 2.19. Esquema experimental do reator de leito fixo simples estágio usado por (Silva W. 2013).**

Neste estudo, Silva W. (2013) testaram diferentes tipos de óleo (babaçu, macaúba e coco), dando destaque ao óleo de macaúba que obteve rendimentos superiores. Outras condições operatórias do estudo: 50°C, razão molar óleo vegetal/ etanol de 1:7, tempo de residência 7 h, enzima lípase *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA. Como se pode observar na Figura 2.20, o estado estacionário foi alcançado ao fim de 24h, com uma concentração em ésteres foi de 65,4± 4,8 %(m/m), correspondendo ao rendimento em FAME de 86,3 ± 6,5% e produtividade de 93,4±6,9 mg éster.g<sup>-1</sup> meio.h<sup>-1</sup>.



**Figura 2.20. Rendimento em ésteres na etanólise do óleo de macaúba em reator de leito fixo (lípase *B. cepacia*) operando de modo contínuo (Silva W. (2013)).**

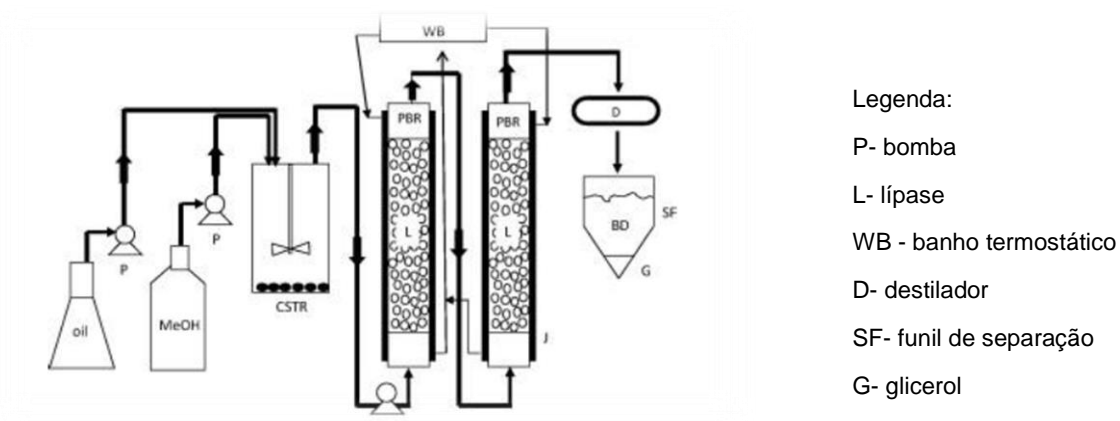
Ao final de 15 dias de operação contínua de etanólise do óleo de macaúba, a lípase imobilizada foi recuperada e tratada com tert-butanol, apresentando uma atividade



---

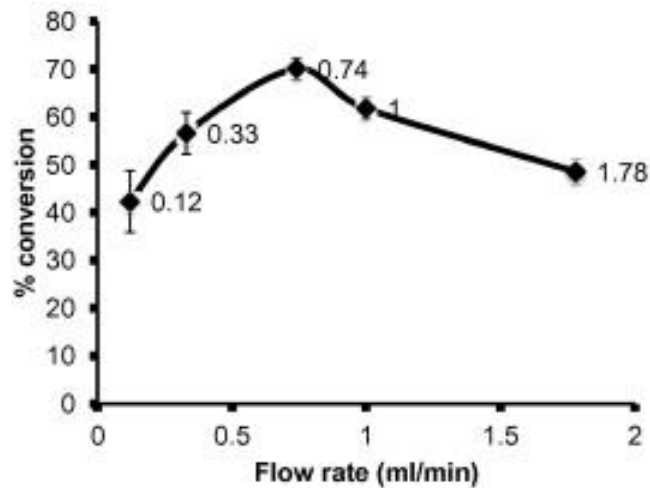
hidrolítica de  $1580 \pm 107 \text{ U.g}^{-1}$ , o que corresponde a uma perda de atividade da ordem 41% em relação à atividade inicial.

Chattopadhyay *et al.* (2013) estudaram a metanólise do OAU catalisada pela lipase Novozyme® 435. Nesse estudo usaram a associação de dois tipos de reatores, o *CSTR* e *PFR*, tendo os reatores contínuos a capacidade total de 100 mL (20x450 mm). O sistema operava com um caudal de 1 mL/ min, a temperatura dos reatores foi mantida à 37°C (vide Figura 2.21). O objetivo do estudo consistiu na avaliação do efeito de da massa de enzima utilizada e do caudal de operação, no rendimento em *FAME*.



**Figura 2.21. Esquema experimental do processo de produção de biodiesel contínua numa associação CSTR-PFR usado por (Chattopadhyay & Sen 2013).**

Na Figura 2.22 pode observar-se o efeito do caudal na conversão em *FAME*, onde se identifica um valor ótimo de caudal. Até este valor ótimo, o aumento da conversão com o incremento de caudal registado, pode ser uma consequência dum efeito favorável na velocidade de transferência de massa. Os autores concluíram que o valor do caudal ótimo, a taxa de transferência de massa atinge o seu máximo e a percentagem de conversão diminui, que poderá estar relacionado com o decréscimo do tempo de residência.



**Figura 2.22. O efeito do caudal da mistura de alimentação usada na transesterificação (Chattopadhyay & Sen 2013).**

Neste estudo observou-se ainda que o óleo foi parcialmente convertido no *CSTR*, após 4h de reação, e que o rendimento da reação permaneceu estável durante 45 ciclos.

Na Tabela 2.15 são listados alguns trabalhos publicados referentes à produção de biodiesel em reatores contínuos, em particular, de leito fixo.

**Tabela 2.15. Síntese dos estudos realizados com reatores tubulares na produção de biodiesel.**

Matéria-prima	Catalisador	Álcool	Outras condições operatórias	V reator [mL]	Caudal [mL/min]	Rend.	Ref.
Óleo de semente algodão	1,7% <i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	Metanol (razão álcool: óleo = 6:1)	t= 24 h; T= 50°C; Solvente t- butanol	5,1	0,16	95%	(Royon <i>et al.</i> 2007)
Óleo de girassol	3% <i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	Metanol (razão molar metanol: óleo= 4:1)	T=45°C; t=50h; 150 rpm; solvente t-butanol	100	ND	94%	(Ognjano vic <i>et al.</i> 2009)
Óleo de canola	2 g <i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	ND	t= 432 h; T=50°C;	17,7	6,00	97%	(Hajar <i>et al.</i> , 2009)
Óleo de cana açúcar	3 g lípase de <i>Burkhold</i> <i>eria cepacia</i>	Etanol (razão metanol: óleo = 3:1)	t= 46 h; T=50°C;	22,7	1,50	96%	(Salum <i>et al.</i> 2010)
Óleo de babaçu	2 g <i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	Etanol (razão álcool: óleo = 7:1)	T=45° - 50°C;	10	0,03	69%	(Simões A., 2011)
Óleo de soja	40g <i>Pseudomon</i> <i>as cepacia</i> lípase	Metanol (razão metanol: óleo=6:1)	t= 240 h; T=40°C;	160	0,25	~75%	(Wang <i>et al.</i> 2011)
OAU	2,8 g <i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	Metanol (razão metanol: óleo = 4:1)	t= 432 h; T=40°C;	8,3	0,57	79 %	(Halim <i>et al.</i> 2009)
OAU	1% <i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	Metanol (razão álcool:óleo = 15:1)	ND	140	1,00	~70%	(Chattopa dhyay & Sen 2013)

## 2.7 Monitorização do rendimento da reação

Durante as reações de transesterificação e esterificação várias substâncias são formadas, geralmente em menores quantidades, como são exemplos o glicerol, mono- e diglicerídeos. Estes produtos intermédios ou subproduto permanecem misturados com os ésteres de

---

ácidos gordos. Além disso, os triglicerídeos que não sofreram o processo de transesterificação podem estar presentes, bem como ácidos gordos livres, o álcool não convertido e o catalisador.

A cromatografia é uma técnica versátil e poderosa que permite a separação, identificação e quantificação do teor de ésteres presentes numa amostra. Diversas técnicas têm sido utilizadas na determinação do teor de ésteres em biodiesel, tais como (Amais *et al.* 2010; Knothe 2006; Meher *et al.* 2006): cromatografia gasosa com detetor por ionização em chama (CG-FID), cromatografia gasosa com detetor seletivo de massas (CG-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida com detetor seletivo de massas (CL-MS), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN-H e C) e infravermelho próximo (IV) .

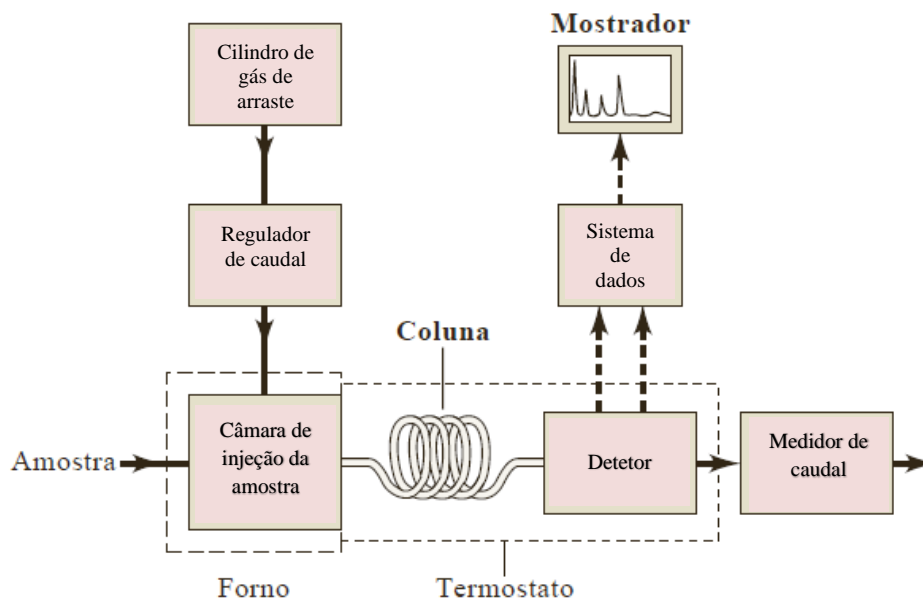
A norma europeia EN14103 indica a cromatografia gasosa com detetor por ionização em chama (CG-FID) com padronização interna (metil heptadecanoato) e quantificação com calibração por um ponto para a avaliação do teor em ésteres de qualquer biodiesel candidato a comercialização (Chattopadhyay *et al.* 2011).

Atendendo a que, neste trabalho apenas se utilizou a cromatografia gasosa (GC) na monitorização do rendimento da reação de produção de *FAME*, entendeu-se, nesta secção, dar um maior enfoque a esta técnica e a sua aplicação à análise do tipo de amostras que normalmente se pretendem caracterizar neste tipo de investigação.

A cromatografia gasosa é definida como um método físico-químico de separação, em que a amostra é vaporizada, entrando em contacto com duas fases: móvel e estacionária. A fase móvel, o gás de arraste, não interage com a amostra, apenas serve para eluir os componentes pela fase estacionária. A fase estacionária em cromatografia é imobilizada em uma coluna ou sobre uma superfície plana. O gás de arraste mais utilizado em cromatografia é o hélio, sendo compatível com a maioria dos detetores.

---

O cromatógrafo é constituído essencialmente por um injetor, coluna, detetor e medidor de caudal como ilustra a Figura 2.23.



**Figura 2.23 Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico (Douglas *et al.* 2009).**

As colunas cromatográficas, devido sua alta eficiência, são normalmente utilizadas como fases estacionárias e são responsáveis pela retenção dos compostos da amostra. Para separar diversos componentes da amostra, os seus tempos de retenção devem ser suficientemente diferentes para uma separação bem definida. Para evitar condensação dos componentes e corridas muito longas, a temperatura da coluna deve ser ajustada para que permaneça constante ou que aumente progressivamente ao longo da corrida cromatográfica. A escolha da coluna cromatográfica deve ser de acordo com as características dos componentes analisados para que se obtenha uma boa resolução.

Outro fator, para obter boa resolução é aumentar a pressão de entrada, de modo a aumentar o caudal da fase móvel e diminuir os tempos de retenção. Os tempos de retenção dependem das forças de interação do composto com a fase estacionária. Quanto menor a afinidade dos componentes pela fase estacionária, mais rapidamente estes são eluídos na coluna. Isso implica que os compostos da amostra devem apresentar algum grau de compatibilidade com a fase estacionária. Portanto, colunas polares são compatíveis com compostos polares e colunas apolares, com compostos apolares.

---

Sobre o sistema de injeção de amostra em colunas capilares, o injetor mais utilizado é o *split/ splitless*. No modo *split*, ocorre uma diluição da amostra pelo gás de arraste, sendo esse modo de injeção interessante quando os compostos de interesse estão em alta concentração. Já no modo *splitless*, não ocorre esta diluição, o que é desejado para a análise de níveis de concentração muito baixos, nesse caso, uma maior quantidade de amostra precisa ser injetada na coluna.

O sucesso da cromatografia gasosa depende da eficiência do processo de detecção. O detetor deve ser mantido a uma temperatura superior à do injetor, de modo que todos os compostos permaneçam na forma gasosa. Para um determinado processo cromatográfico, a escolha do detetor a instalar depende do tipo de compostos que se pretendem analisar e da sensibilidade do método. Destacam-se dois tipos de detetores: o de ionização de chama (FID) e o espectrometria de massa (GC-MS). O GC-FID, apresenta algumas vantagens relativamente aos detetores mais específicos, nomeadamente: igual sensibilidade para a maioria dos compostos orgânicos, não sofre grandes alterações com variações de fluxo, pressão ou temperatura, não é sensível a impurezas comuns do gás arraste, como por exemplo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, apresenta uma linha de base estável e boa linearidade de resposta, não necessita de muita manutenção.

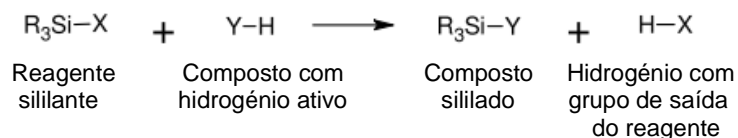
Um dos detetores mais poderosos para a cromatografia gasosa é o espectrómetro de massa. A combinação da cromatografia a gás e a espectrometria de massas é conhecida como CG. Os espectrómetros de massa, como detetores em cromatografia gasosa, têm sido amplamente utilizados por serem extremamente sensíveis.

A anteceder uma análise de CG, para amostras que se suspeita que contenham outros compostos da mistura reacional para além dos ésteres de ácidos gordos, é necessário submetê-las a um pré-tratamento de derivatização, de forma a obter as substâncias voláteis, termicamente estáveis e a proteger a coluna de CG.

Dos tipos de reações de derivatização que podem ser utilizados em análise por CG, as mais usadas são alquilação, a acilação e a sililação. Destaca-se a sililação por ser a reação mais simples, rápida e versátil, que ocorre numa única etapa e por apresentar alto rendimento. Na sililação ocorre o bloqueio das ligações de hidrogénio, havendo uma redução de interação do tipo dipolo-dipolo, elevando a volatilidade dos compostos, resultando em picos mais estreitos e simétricos. Esta técnica consiste em substituir, por um grupo silano, os grupos funcionais com -COOH, -OH, -NH, -SH, que são sensíveis devido a capacidade de formar pontes de hidrogénio entre as moléculas.

---

A reação geral para formação do derivado é apresentada na Figura 2.24.



**Figura 2.24. Representação genérica da reação de sililação (Douglas *et al.* 2009).**

Todos os reagentes sililantes e seus respectivos derivados são sensíveis ao efeito hidrolítico. Consequentemente as reações devem ser realizadas em frascos selados e com derivatizantes em excesso. A escolha do solvente é importante, como a sililação ocorre em hidrogénios mais ativos, devem-se evitar solventes próticos<sup>5</sup>. Em alguns casos, o próprio agente sililante pode ser usado como solvente. Entre os solventes utilizados, destacam-se: piridina, hexano, isoctano, dimetilformamida, entre outros. Foram desenvolvidos vários agentes sililantes com vista à sua aplicação na sililação de diversos compostos polares de diferentes reatividades. Geralmente, para análises via CG, adiciona-se, em compostos polares, grupos trimetilsilila (TMS) ou tert-butil(dimetil)sílica (TBDMS). Quando se deseja obter derivados-TMS, os agentes sililantes mais utilizados são trimetilclorosilano (TMCS), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), hexametilsililazano (HMDS), entre outros. Destes o BSTFA é o mais volátil.

A derivatização pode também servir para interromper as reações, quando as amostras correspondem a alíquotas de mistura reacional recolhidas ao longo de um determinado tempo de operação.

---

<sup>5</sup> solvente prótico - qualquer solvente molecular o qual contenha H<sup>+</sup> dissociável.

---

## 2.8 Conclusão

Do exposto ao longo deste capítulo é possível apurar que o processo de produção de biodiesel já remonta a algumas décadas.

O biodiesel tem atraído muita atenção por parte dos pesquisadores e indústrias como combustível renovável, biodegradável e não tóxico. No entanto, várias matérias-primas foram testadas, sendo considerado o OAU a matéria-prima alternativa aos óleos virgens, apesar das suas desvantagens, tais como a elevada concentração dos ácidos gordos livres (AGL) e o teor de água.

Esta revisão bibliográfica fornece uma visão abrangente dos processos de produção de biodiesel recorrendo vários métodos, diferentes tipos de operações de processo, várias quantidades de catalisador e diferentes composições físico-químicas do OAU e de óleos vegetais virgens.

De acordo com a revisão bibliográfica efetuada, verifica-se que as enzimas têm potencial para catalisar as reações de esterificação e transesterificação. Com especial destaque a lipase Novozyme<sup>®</sup> 435, que tem provado ser um catalisador eficaz na produção de *FAME* e têm sido demonstrado que preserva a sua atividade catalítica em meio anidro. No entanto, ainda existem poucos estudos acerca da sua reutilização/regeneração. Assim, dentro da biocatálise aplicada a produção de biodiesel, este constitui um campo pouco explorado, sendo por isso objeto de estudo do presente trabalho.

A aplicação industrial da lipase Novozyme<sup>®</sup> 435 depende da otimização de diversos parâmetros operacionais, nomeadamente a razão mássica Novozyme<sup>®</sup> 435:óleo e razão molar óleo: álcool. Sendo, o álcool um dos fatores mais importantes que afeta o rendimento, verifica-se que na maioria dos estudos foi usado o mais reativo: o metanol. Todavia, este álcool é tóxico para lípases, havendo por isso soluções para contornar esta limitação, que passam por manter baixas as suas concentrações no meio reacional, quer através da sua adição por estágios, quer através do uso de um solvente. Esta última via permite simultaneamente dissolver o óleo e álcool. Li *et al.* (2006) observaram uma variação significativa na estabilidade da enzima quando diferentes solventes foram testados; os resultados elegeram o tert-butanol como o melhor solvente.



---

Para a produção de biodiesel à escala industrial, deve ser levado em conta que, mesmo tendo benefícios os solventes introduzem outros problemas operacionais, como redução da capacidade volumétrica, problemas ambientais (toxicidade, emissões) e custos (recuperação e perdas). Desta forma, os efeitos negativos têm que ser cuidadosamente avaliados com os positivos.

Já se conhecem algumas condições operatórias testadas com sucesso (com OAU, metanol e Novozyme® 435) em trabalhos desenvolvidos por estudantes de mestrado em Engenharia do Ambiente, do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, nomeadamente:

- Razão volumétrica do tert-butanol de 0,75 v/v (em relação ao volume de OAU), visto ter sido obtida por Amorim A. (2009);
- Razão molar metanol: OAU selecionado foi 4:1, sendo a razão com melhores resultados obtidos Oliveira B. (2010) e Melo S. (2012), mas também por outros investigadores, como por exemplo Halim *et al.*(2008) e Chen *et al.*(2006);
- Temperatura de reação de 50°C (Melo S., 2012). Verifica-se que a esta temperatura a enzima mantém não desnatura, e o rendimento em *FAME* é superior.

Relativamente ao tipo de reatores empregues na produção de biodiesel por biocatálise, descontínuos são, sem dúvida, os mais indicados para o estudo cinético de reações à escala laboratorial. Todavia, para a produção em contínuo, tendo em vista uma futura aplicação industrial, o tipo de reator mais usado é de leito fixo (com enzima imobilizada), não havendo contudo um consenso quanto à massa de enzima a utilizar por volume de reator, bem como os caudais mais adequados. O rendimento em *FAME* está dependente de vários parâmetros processuais, tais como natureza/composição da matéria-prima, natureza do álcool, do catalisador, teor em água, a temperatura, pH, etc. São inúmeras as combinações possíveis destes fatores que poderão conduzir com sucesso ao objetivo último de qualquer estudo nesta temática: produzir biodiesel de forma eficiente e com impactes mínimos para o ambiente.



---

## 3 Procedimento e planeamento experimental

### 3.1 Introdução

Existe uma vasta informação publicada na área da produção de biodiesel por catálise enzimática em reatores descontínuos agitados, contudo ainda não há um consenso quanto às condições operacionais ideais. No que concerne à reutilização do biocatalisador a escassez de informação é mais notória.

O presente trabalho vem na continuidade de outros (Amorim A. (2009), Oliveira B. (2010) e Melo S. (2012)) desenvolvidos no âmbito de dissertações de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Assim, a seleção do catalisador, do solvente e do álcool tiveram por base os resultados obtidos nos referidos trabalhos. No presente trabalho pretende-se investigar/testar algumas condições operatórias pouco exploradas na bibliografia consultada e apresentada no Capítulo 2.

Neste capítulo são apresentados os materiais bem como os procedimentos adotados, com a finalidade de converter o OAU em ésteres metílicos de ácidos gordos (*FAME*), por catálise enzimática. Numa primeira fase, realizaram-se ensaios em reator agitado descontínuo com o objetivo de avaliar a influência da razão mássica da enzima (Novozyme<sup>®</sup> 435)/ OAU e do índice de acidez da “matéria-prima” no rendimento da(s) reação(ões) de produção de *FAME*. Ainda em reator descontínuo testou-se o efeito do método regeneração na reutilização da Novozyme<sup>®</sup> 435, no rendimento da produção de *FAME*. E por fim, procedeu-se à produção de *FAME* num sistema contínuo de leito fixo, testando o desempenho de uma resina na adsorção do glicerol.

## 3.2 Plano experimental

Com vista a atingir os objetivos definidos na secção 1.2, estabeleceu-se o plano experimental constante na Tabela 3.1

**Tabela 3.1 – Resumo do plano experimental do presente trabalho.**

Objetivo	Reator	Condições operatórias	Variáveis testadas
Avaliar a influência da razão mássica de enzima/OAU no rendimento em <i>FAME</i>	Descontínuo	<ul style="list-style-type: none"><li>• T=50°C</li><li>• Metanol: OAU=4:1 (mol/mol)</li><li>• tert-butanol: OAU de 0,75 (v/v)</li><li>• Catalisador: Novozyme® 435</li><li>• Tempo de reação de 8h</li><li>• Agitação orbital 260 rpm</li></ul>	Razão mássica de enzima/ óleo: <ul style="list-style-type: none"><li>• 5%</li><li>• 10%</li><li>• 15%</li></ul>
Avaliar o efeito do índice de acidez do óleo no rendimento em <i>FAME</i>	Descontínuo	<ul style="list-style-type: none"><li>• T=50°C</li><li>• Metanol: OAU=4:1 (mol/mol)</li><li>• tert-butanol: OAU de 0,75 (v/v)</li><li>• Novozyme® 435: óleo=10% (m/m)</li><li>• Tempo de reação de 8h</li><li>• Agitação orbital 260 rpm</li></ul>	Índice de acidez do óleo: <ul style="list-style-type: none"><li>• 2,302 mg KOH/g OAU</li><li>• 16,785 mg KOH/g OAU</li><li>• 68,342 mg KOH/g OAU</li><li>• 104,009 mg KOH/g OAU</li></ul>
Selecionar o solvente mais adequado na regeneração da enzima com vista à sua reutilização	Descontínuo	<ul style="list-style-type: none"><li>• T=50°C</li><li>• Metanol: OAU=4:1 (mol/mol)</li><li>• tert-butanol: OAU de 0,75 (v/v)</li><li>• Novozyme® 435/óleo=10% (m/m)</li><li>• Tempo de reação de cada ciclo: 8h; 6 ciclos.</li><li>• Agitação orbital 260 rpm</li></ul>	Solventes orgânicos: <ul style="list-style-type: none"><li>• tert-butanol</li><li>• 1-butanol</li></ul>
Avaliação do rendimento em <i>FAME</i> numa produção em contínuo	Contínuo de leito fixo	<ul style="list-style-type: none"><li>• T=50°C</li><li>• Metanol: OAU=4:1 (mol/mol)</li><li>• tert-butanol: OAU de 0,75 (v/v)</li><li>• Catalisador: Novozyme® 435</li><li>• Tempo de operação de 715 h (~30 dias)</li><li>• Caudal de 0,9 mL/min</li></ul>	

---

### 3.3 Materiais e equipamentos

O OAU utilizado neste trabalho, proveio de uma das cantinas da Universidade de Aveiro, e o óleo vegetal virgem original era maioritariamente de amendoim. A componente experimental inicialmente centrou-se na caracterização de amostras de OAU e das respetivas misturas de OAU com ácido oleico, usado para “simular” óleos com diferentes índices de acidez.

Os respetivos procedimentos experimentais encontram-se descritos na subsecção 3.4.4.1. Neste trabalho, o rendimento da reação foi monitorizado em termos da conversão em ésteres metílicos, por cromatografia gasosa.

Tendo como base estudos já desenvolvidos acerca da catalise enzimática optou-se pelos produtos químicos da Tabela 3.2, necessários para execução deste trabalho. Os principais equipamentos utilizados no decorrer deste trabalho encontram-se resumidos na Tabela 3.3.

**Tabela 3.2. Produtos químicos utilizados na componente experimental deste trabalho.**

Produto químico	CAS	Origem
OAU	-	Óleo alimentar usado proveniente das cantinas da UA
Hidróxido de sódio	1.06462.1000	Merck, PA
Ácido oleico	27728	Riedel-de Haën, PA
Novozyme® 435 ( <i>Candida antarctica</i> )	200233 200229	(cedida por) Novozymes A/S
tert-butanol	1078371	Panreac, PA
Metanol	1289045	Fisher Chemical, PA
Metil heptadecanoato	51633	Fluka, PA
Piridina	131457.1611	Panreac, PA
Clotrimetilsilano	426431000	Acros Organics, PA
N,O-Bis(trimetilsilano)	355588.1905	Panreac, PA
Álcool isopropílico	10904	José M. Vaz Pereira, S. A., PA
Hexano	1341812	Fisher Scientific, PA
Heptano	27101125	José Manuel Gomes dos Santos, PA
Resina Lewatit GF 202	03377621	(cedida por) Lanxess, 03377621
1-Butanol	19.3081702.200	Chem-Lab NV, PA

---

**Tabela 3.3. Equipamentos usados na componente experimental do presente trabalho.**

<b>Equipamentos</b>	<b>Origem</b>
Agitador orbital	Scansci, SK-330-Pro
Placa de aquecimento	SBS
Titulador automático	Metrohm, 904
Estufa	Labmorma
Bomba peristáltica	Watson Marlow 505 S
Seringa 0.5 µL	Hamilton®
Cromatógrafo CG-FID	Thermo Scientific, TRACE GC ULTRA
Cromatógrafo CG-FID	Thermo Scientific, TRACE GC ULTRA
Cromatógrafo CG-MS	Thermo Scientific, TRACE GC ULTRA, DSQ II

### **3.4 Metodologia experimental**

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada no capítulo anterior, verifica-se que já foram testadas, por diversos autores, inúmeras condições experimentais, sempre com o objetivo de maximizar a conversão de triglicerídeos e ácidos gordos livres em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos. Como objetivo de aumentar o rendimento do processo, usando uma enzima suportada, e tendo como referência os estudos já realizados, considerou-se importante estudar a influência do índice de acidez, da razão mássica enzima/ OAU e dos solventes usados na regeneração da enzima quando usada em ciclos consecutivos. Posteriormente, testou-se a produção de *FAME* em contínuo em reatores tubulares de leito fixo (com a referida enzima), fazendo uso de uma resina para remoção do glicerol durante a etapa de reação.

A matéria-prima, OAU, teve como proveniência o óleo de amendoim, usado numa das cantinas da Universidade de Aveiro.

A enzima utilizada neste trabalho foi a enzima *Novozyme*® 435 por ser umas das enzimas mais eficiente, i.e., por apresentar rendimentos mais elevados, segundo a literatura. Selecionou-se o metanol, por ser mais reativo, apesar de apresentar elevado grau de toxicidade para a enzima. Para ultrapassar este problema adicionou-se ao meio reacional um solvente orgânico, que pudesse solubilizar o óleo e o metanol (vide secção 2.3.2.3). Vários estudos apontam que o tert-butanol é o mais eficiente, possuindo a capacidade de proteger a enzima da inativação e assegurando a reação de transesterificação.

---

Para garantir que todo o sistema opera numa temperatura controlada operou-se dentro da estufa a 50°C. Este valor de temperatura foi selecionado tendo em consideração o ponto de ebulição do álcool e a gama ótima recomendada para a *Novozyme*<sup>®</sup>435.

O rendimento das reações de transesterificação e esterificação é afetado pela razão mássica de catalisador/óleo. Este foi outros dos parâmetros estudados no presente trabalho.

Neste trabalho, como não se realizou a purificação do biodiesel, tendo sido caracterizadas as amostras recolhidas ao longo dos ensaios experimentais, em termos do teor em *FAME*, de acordo com o EN 14103. Com este valor calculou-se o rendimento em ésteres.

### 3.4.1 Caracterização e pré-tratamento da enzima

A composição da enzima *Novozyme*<sup>®</sup>435 usada neste trabalho foi fornecida pela *Novozyme A/S Denmark*. Esta empresa facultou os valores de atividade dos lotes a que pertenciam as enzimas usadas no presente trabalho. Esta informação encontra-se compilada na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4 Composição média e atividade das enzimas *Novozyme*<sup>®</sup> 435.**

Lípase	Ingrediente	Aprox. %(m/m)	Atividade inicial
<i>Novozyme</i> <sup>®</sup> 435	Resina acrílica	78,8	9.080,0 PLU <sup>6</sup> /g ou 11.075,0 PLU/g
	Lípase	21	
	Sorbato de potássio	0,20	

Nos ensaios em reator descontínuo foi usada a *Novozyme*<sup>®</sup> 435 pertencente ao lote com uma atividade inicial de 9.080,0 PLU/g, e nos ensaios em reator contínuo a do lote com 11.075,0 PLU/g. O motivo que levou a terem sido usadas enzimas de lotes distintos foi o facto de ter terminado a amostra de um dos lotes.

---

<sup>6</sup> PLU= 1 µmol de propilaurato formado por minuto / g enzima. É uma atividade baseada na síntese de éster.

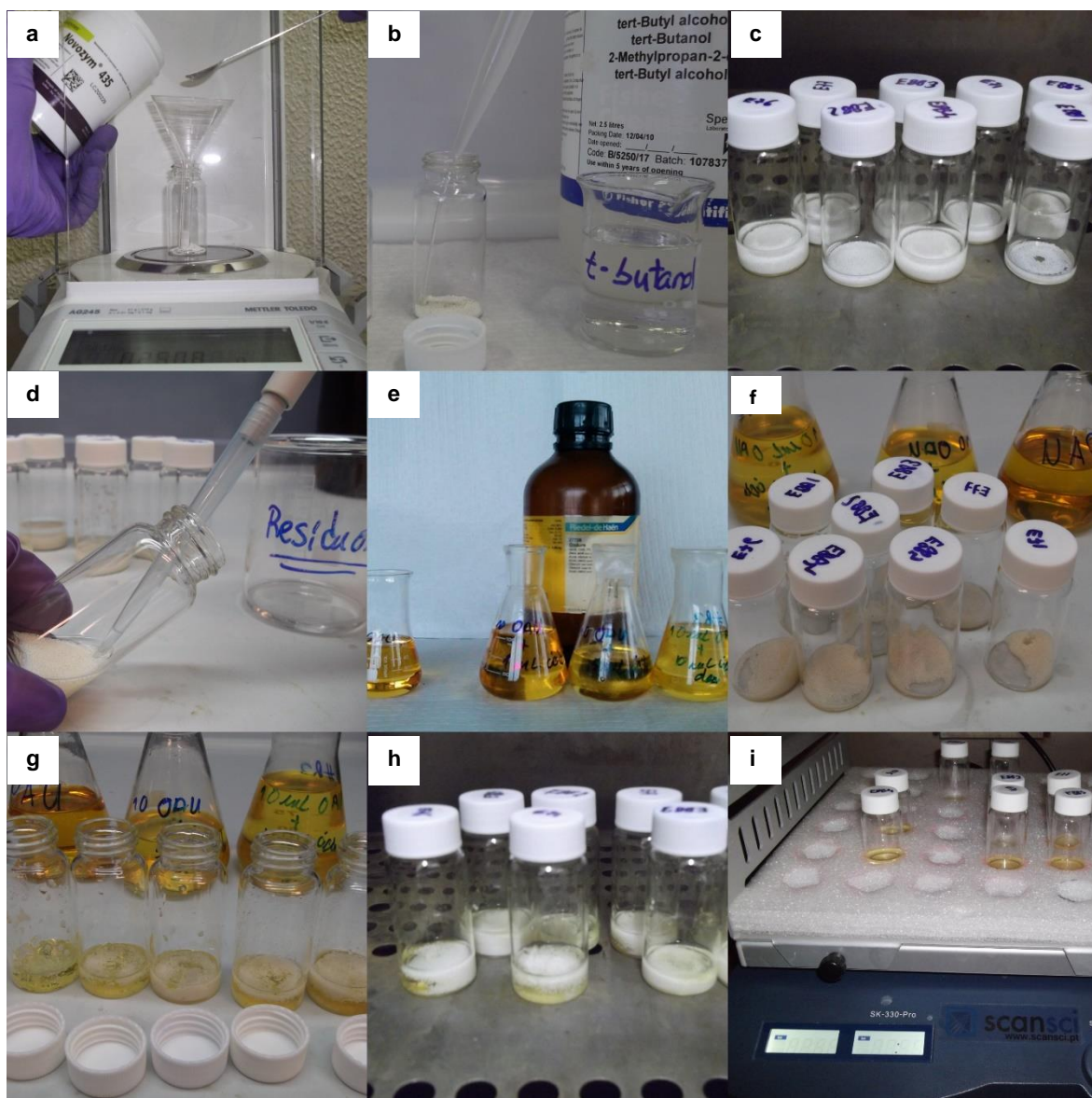
---

### Pré-tratamento da enzima

Numa primeira etapa de síntese enzimática do biodiesel, as enzimas foram pré-tratadas seguindo o procedimento descrito por Melo S. (2012), que, por sua vez, foi adaptado de Lai *et al.*(2005). Na Figura 3.1 encontra-se ilustrados todo o procedimento de pré-tratamento da enzima que compreendeu os seguintes passos:

- a) Pesagem da enzima (1g, neste caso);
- b) Adição de 10 mL tert-butanol à enzima;
- c) Incubação da enzima em tert-butanol durante 1h, a 50°C;
- d) Separação do tert-butanol, com ajuda da micropipeta;
- e) Preparação da matéria-prima (e.g., OAU ou misturas de OAU com ácido oleico) a usar na (posterior) etapa de reação, para a qual a enzima está a ser pré-preparada;
- f) *Vials* com enzima e a matéria-prima pronta a ser adicionada;
- g) Adição da matéria-prima à enzima;
- h) e i) Colocar a enzima com a matéria-prima na estufa a 50°C e deixar incubar durante a noite.





**Figura 3.1** Fotografias ilustrativas das várias etapas que compreendem o processo de pré-tratamento da enzima.

Concluído o pré-tratamento da enzima dá-se início à etapa da reação de transesterificação e esterificação, procedendo-se à adição do álcool e do solvente aos *vials*/reatores que contêm a enzima e a matéria-prima (OAU ou misturas deste com ácido oleico).

---

### 3.4.2 Características da resina Lewatit GF 202

A resina foi gentilmente cedida pela empresa Lenntech, sendo um composto hidrofílico, com a capacidade de adsorver o glicerol e o sabão do meio reacional em leitos fixos. É uma resina de troca iônica macroporosa que possui uma porosidade  $0.65 \pm 0,05$  mm (vide anexo A.4).

### 3.4.3 Caracterização e pré-tratamento do OAU

A caracterização do OAU foi efetuada previamente aos ensaios experimentais previstos no plano experimental. O conhecimento de parâmetros como: densidade, índice de acidez, teor em água, fórmula empírica, etc., de um óleo, são importantes quando se pretende investigar a influência de determinadas condições operatórias na produção de *FAME*. A relevância do conhecimento dos parâmetros anteriores depende do tipo de catálise adotada.

#### 3.4.3.1 Densidade OAU e misturas de OAU com ácido oleico

A densidade OAU é importante ser conhecida antes de se iniciarem os ensaios à escala laboratorial. O seu conhecimento permite medir volumes tendo por base valores pré-estipulados de massa, agilizando assim o procedimento experimental.

Nos ensaios levados a cabo, com vista à avaliação do desempenho da enzima em misturas reacionais com diferentes índices de acidez, preparam-se misturas de OAU com ácido oleico (para mais informação consultar a secção 3.4.4.1), cuja densidade foi necessário conhecer.



**Figura 3.2.**

**Picnómetro com  
OAU.**

A densidade do OAU foi determinada por picnometria, a uma temperatura constante ( $20^{\circ}\text{C}$ ), tendo sido usado um picnómetro de 50 mL. O procedimento adotado foi:

- i. Pesar o picnómetro e registar a massa ( $\pm 0,0001$  g);
- ii. Encher o picnómetro com OAU até ao traço de referência;
- iii. Registrar a massa e a temperatura do óleo.

---

Posteriormente, calculou-se o valor da densidade do OAU de acordo com a seguinte equação:

$$\rho_{\text{OAU}} = \frac{m_{\text{OAU}} [\text{g}]}{V_{\text{picnómetro}} [\text{L}]} (@20^{\circ}\text{C}) \quad (1)$$

O mesmo procedimento experimental e de cálculo foi efetuado para a determinação da densidade de misturas de OAU com ácido oleico.

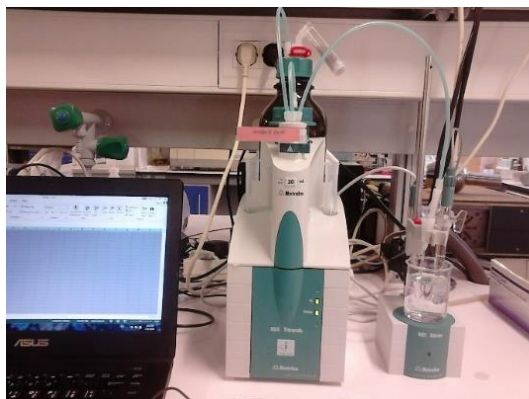
#### 3.4.3.2 *Índice de acidez do OAU e misturas de OAU com ácido oleico*

O índice de acidez traduz-se na quantidade de hidróxido de potássio, mg KOH, necessária para neutralizar uma grama de amostra, sendo um importante parâmetro na caracterização do óleo.

Este parâmetro permite quantificar o teor de ácidos gordos livres, que é importante conhecer antes de se processar a reação de transesterificação quando a catálise homogénea alcalina é utilizada. A acidez de um óleo não pode ser entendida como uma constante, uma vez que resulta da hidrólise dos triglicerídeos e, por isso, é associada ao grau de degradação do óleo.

O índice de acidez foi determinado por titulação automática (Figura 3.3), o método consiste na neutralização, por reação ácido-base, dos ácidos gordos livres contidos na amostra de óleo. O procedimento para a determinação foi:

- i. Dissolver 2 mL de OAU em 20 mL de álcool isopropílico;
- ii. Titular com solução aquosa de NaOH 0.095M, recorrendo ao titulador automático;
- iii. Registar o EP (*End Points*) real do EP que são variações de pH representadas no volume de KOH gasto na titulação.



**Figura 3.3. Titulador automático.**

O índice de acidez do OAU determina-se através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice acidez} \left[ \frac{\text{mg KOH}}{\text{g OAU}} \right] = \frac{C_{\text{NaOH}} [M] \times V_I [\text{mL}]}{\rho_{\text{OAU}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \times V_{\text{OAU}} [\text{mL}]} \times 1.4 \times 10^6 \left[ \frac{\text{mg KOH}}{\text{mg NaOH}} \right] \quad (2)$$

#### 3.4.3.3 *Pré-tratamento do OAU*

A anteceder a etapa de reação num processo de produção de biodiesel, é comum que a matéria-prima (os óleos) necessitem de um pré-tratamento que visa melhorar a composição química dos mesmos. Este pré-tratamento poderá incluir a desidratação (total ou parcial), a neutralização de ácidos gordos livres e remoção de sólidos em suspensão.

Esta etapa de pré-tratamento é fundamental sobretudo nos OAU, pois após a utilização dos óleos para a confeção de alimentos por fritura, as suas características apresentam-se quimicamente alteradas, assim como acrescentadas de elementos relacionados com a confeção alimentar.

Neste trabalho as partículas foram removidas por sedimentação/decantação. Não se procedeu à desidratação do OAU, visto que se conhecia de trabalhos anteriores o seu valor e se mostrou adequado à aplicação em processos biocatalisados. Também não se neutralizaram os ácidos gordos livres pelo mesmo motivo apresentado anteriormente.

---

#### 3.4.3.4 Massa molar do OAU

A massa molar média dos triglicéridos que constituem o OAU foi determinada de uma forma indireta, ou seja, converteu-se os triglicéridos em *FAME* numa reação com o metanol (em largo excesso relativamente à estequiometria da reação), catalisada pelo NaOH (1% m/m). De seguida procedeu-se à separação de fases, extraindo-se o glicerol e ficando-se com a mistura de *FAME* “bruta”. Esta mistura foi posteriormente lavada sucessivamente com água fervente. Finalmente desidratou-se os *FAME* (ou biodiesel) numa estufa.

Uma amostra deste biodiesel foi analisada por GC de modo a obter o “mapa” dos ésteres metílicos, bem como as respetivas concentrações.

O cálculo da fórmula empírica média dos *FAME*, bem como da fórmula empírica dos triglicéridos encontra-se descrito com mais detalhes no Anexo A1.

#### 3.4.4 Ensaios em reator descontínuo

Em reator descontínuo realizaram-se três séries de ensaios com vista a avaliar:

- o desempenho da Novozyme® 435 em misturas reacionais com diferentes índices de acidez (secção 3.4.4.1)
- a influência da razão mássica de enzima/OAU no rendimento em *FAME* (secção 3.4.4.2)
- efeito do solvente no desempenho da enzima reutilizada (secção 3.4.4.3)

##### 3.4.4.1 Influência do índices de acidez da matéria-prima no desempenho da Novozyme®435

O sucesso da síntese enzimática de biodiesel depende de diversos fatores, entre os quais, as características químicas da matéria-prima. Parte da componente experimental do presente trabalho focou-se na caracterização de amostras de OAU e das respetivas misturas de OAU com ácido oleico, usado para “simular” óleos com diferentes índices de acidez.

Os ensaios foram realizados em reator fechado, descontínuo, evitando o contacto com o ar, de forma a minimizar perdas dos componentes voláteis da mistura reacional.

A Figura 3.4 ilustra algumas das etapas que compreenderam o ensaio com diferentes valores de índice de acidez da matéria-prima (OAU + ácido oleico). Na Tabela 3.6 estão

---

resumidas as condições operatórias do referido ensaio, no qual foram realizadas duas réplicas. As condições operatórias gerais do ensaio foram: razão mássica Novozyme® 435/OAU de 10%, correspondente a 0.30g de Novozyme® 435 em cada reator(vide Anexo A.3), 50°C, 0,75 v/v de tert-butanol/óleo, razão molar metanol/óleo 4:1, agitação orbital de 260rpm e 8h de tempo de reação.

**Tabela 3.5. Condições experimentais para os ensaios de avaliação do efeito do índice de acidez e da razão mássica de enzima no rendimento em FAME.**

<b>Concentração de ácido oleico [v/v]</b>	<b>V<sub>OAU + ácido oleico</sub> [mL]</b>	<b>Índice de acidez [mg KOH/g amostra]</b>	<b>V<sub>MeOH</sub> [mL]</b>	<b>V<sub>tert-butanol</sub> [mL]</b>
100%	3,58	104,009	0,60	2,69
50%	3,15	16,785	0,57	2,36
10%	3,43	68,342	0,59	2,58
0%	3,06	2,302	0,55	2,30

Na Figura 3.4 encontra-se ilustrados todo o procedimento de produção de biodiesel por catalise enzimática, que compreendeu os seguintes passos:

- Incubação da enzima;
- Adição de metanol ao tert-butanol com os volumes mencionados na Tabela 3.6;
- Vials com à mistura do álcool e do tert-butanol;
- Início da reação de transesterificação após adição da mistura, recorreu-se a uma placa de agitação orbital colocada dentro da estufa, a 50°C;
- As amostragens foram realizadas as 8 horas;
- Guardadas no congelador.





Figura 3.4. Fotografias ilustrativas das várias etapas que compreendem o processo de produção de *FAME* que testam a influência do índice de acidez.

#### 3.4.4.2 Influência da razão mássica *Novozyme*<sup>®</sup> 435/ OAU no rendimento em *FAME*

A quantidade de enzima necessária na síntese enzimática de biodiesel é um fator crucial para o sucesso a nível industrial. Na Tabela 3.6 estão resumidas as condições operatórias usadas no ensaio onde foi testada a razão mássica *Novozyme*<sup>®</sup> 435/OAU (vide Anexo A.3), e a sua influência no rendimento em *FAME*. As condições operatórias comuns neste ensaio foram: 50°C, 0,75 v/v de tert-butanol/óleo, razão molar metanol/OAU de 4:1, agitação orbital de 260rpm e 8h de tempo de reação.

**Tabela 3.6. Condições experimentais do ensaio para a avaliação do efeito da razão mássica de enzima no rendimento em FAME.**

Razão mássica enzima /OAU [m/m %]	m enzima [g]	V <sub>OAU +</sub> ácido oleico [mL]	V <sub>MeOH</sub> [mL]	V <sub>tert-</sub> butanol [mL]
10	0,30	3,06	0,55	2,30
5	0,15	3,06	0,55	2,30
15	0,45	3,06	0,55	2,30

O procedimento adotado neste ensaio foi o mesmo que se encontra ilustrado na secção 3.4.4.1 (vide Figura 3.4).

#### 3.4.4.3 Efeito do método regeneração na reutilização da Novozyme® 435

Para o ensaio que visava testar método de regeneração na reutilização da *Novozyme*® 435, selecionaram-se solventes orgânicos hidrofílicos que apresentavam afinidade com a enzima, e capacidade de solubilizar o óleo e o metanol. Com base no exposto na secção 2.3.2.3 selecionou-se o tert-butanol por conduzir a conversões em *FAME* elevadas, quando a enzima é regenerada com esse solvente. Para além deste testou-se também 1-butanol, apesar de não existir nenhuma literatura acerca da aplicação deste solvente na reutilização/ regeneração de enzimas.

O método de regeneração compreendeu uma ou as duas das seguintes etapas: a lavagem e a incubação da enzima imediatamente antes da sua reutilização.

Após o pré-tratamento da enzima (vide subsecção 3.4.1 ) iniciou-se a etapa de reação de produção de *FAME*, num reator descontínuo agitado, nas seguintes condições operatórias: 50°C, razão molar metanol/ álcool de 4:1, razão volumétrica do tert butanol/ OAU de 0,75v/v e tempo de operação de 8 horas por ciclo. Entre as reutilizações (ciclos), a mistura reacional foi pipetada, sendo realizadas sempre no mesmo reator (*via/s*), evitando assim as perdas de massa de enzima. Foram realizados no total de 6 ciclos, sendo que entre o 5º e o 6º ciclo a enzima foi regenerada de acordo com as condições estabelecidas na Tabela 3.7. As etapas do procedimento experimental foram idênticas às apresentadas na secção 3.4.1. “*Pré-tratamento da enzima*”, i.e., incubação engloba, suspender a enzima em tert-butanol durante 1h e deixar durante a noite em OAU a 50°C. Todos o reatores operaram nas seguintes condições: índice de acidez de 0% v/v a concentração de ácido oleico, volume de OAU de 3,06 mL, volume de MeOH de 0,55 mL, volume de tert-butanol de 2,30 mL e 0,30g de enzima.



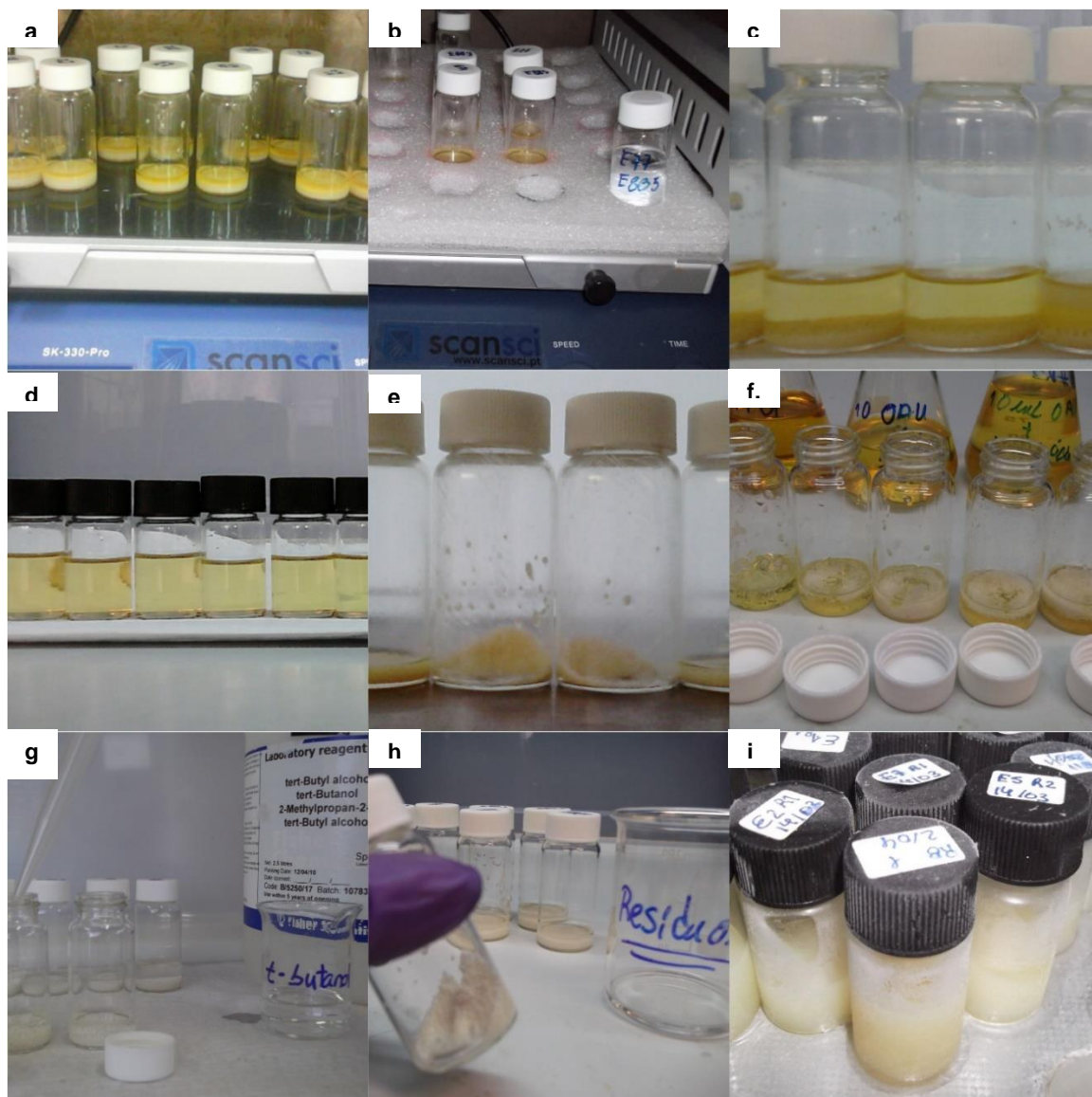
**Tabela 3.7 . Condições dos ensaios que testam o efeito do método regeneração na reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup>435.**

Ensaio	Solventes orgânicos utilizados na regeneração da enzima
<b>Reutilização da <i>Novozyme</i><sup>®</sup>435</b>	Controlo (sem lavar nem incubar)
	Lavar com tert-butanol e incubação
	Lavar com tert-butanol
	Lavar com tert-butanol + H <sub>2</sub> O e incubação
	Lavar com 1-butanol e incubação
	Lavar com 1-butanol
	Lavar com 1-butanol + H <sub>2</sub> O e incubação

Na Figura 3.5 encontra-se ilustrado todo o procedimento adotado nesta série de ensaios que testam o efeito do método regeneração na reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup>435:

- a) após o pré-tratamento da enzima (vide 3.4.3.3);
- b) a adição da mistura do álcool e do tert-butanol ao *vials* que contém a enzima pré-tratada e incubada;
- c) as amostragens foram realizadas as 8 horas de reação;
- d) *FAME* recolhido durante cinco ciclos;
- e) guardar enzimas no frigorífico durante a noite (sem incubação);
- f) adicionar óleo a enzima;
- g) após 5<sup>o</sup> ciclos sucessivos de reação a enzima é submetida ao método de regeneração (vide Tabela 3.7);
- h) após sucessivas lavagens até se obter a enzima com a coloração inicial, iniciou-se o último ciclo;
- i) a amostragem foram sempre realizadas ao fim de 8h e devidamente congeladas.

Por questões logísticas, amostras de mistura reacional não foram analisadas por GC à medida que foram sendo recolhidas, mas sim apenas depois de concluído o ensaio.



**Figura 3.5. Fotografias ilustrativas das várias etapas que compreendem o processo de produção de FAME que testam o efeito do método de regeneração na reutilização Novozyme® 435.**

### 3.4.5 Ensaios em reator contínuo

No sistema de leito fixo contínuo, a lipase Novozyme® 435 poderá estar mais exposta a inibição do glicerol, promovendo a redução do rendimento em ésteres. O glicerol pode depositar-se na superfície da enzima suportada, impedindo consequentemente o fluxo uniforme do meio reacional pelo suporte sólido. De forma a minimizar este problema construíram-se dois reatores tubulares de leito fixo em série, e entre eles colocou-se uma coluna com a resina Lewatit® GF 202.

---

Assim, o sistema contínuo era constituído por dois reatores em série, com o volume (sem leite/enzima) de 17,7 mL (cada um) com leite de enzima *Novozyme*<sup>®</sup>435, e entre eles encontrava-se uma coluna com resina. Este sistema era alimentado, através de uma bomba peristáltica, com uma mistura de OAU, tert-butanol e metanol, preparada todos os dias. O fluxo nos reatores era ascendente e na coluna da resina era descendente. O caudal de operação foi mantido aproximadamente constante e igual a 0,9 mL/min. O sistema foi operado continuamente durante 200h; ao final deste tempo interrompeu-se a alimentação para proceder à limpeza do mesmo, visto que se assistiu à diminuição do rendimento em *FAME* do efluente à saída do sistema.

Durante esta primeira fase de operação do sistema contínuo, foram recolhidas amostras, com diferentes frequências, a montante e jusante da coluna com resina e à saída do último reator da série.

A regeneração da enzima foi levada a cabo aplicando o método que melhor desempenho teve ao nível da reutilização deste catalisador, i.e., o tert-butanol sucedido de incubação com OAU, como oportunamente será apresentado posteriormente na secção 4.5.

A operação do sistema foi reiniciada, nas mesmas condições operatórias descritas anteriormente, desta vez com a enzima e resina regeneradas, até às 715h (tempo de operação total).

Note-se que a anteceder a primeira utilização quer da enzima quer da resina (i.e., antes do arranque do sistema contínuo), estas foram pré-tratadas de acordo com a metodologia descrita na secção 3.4.1. Todavia, numa fase avançada do ensaio houve a perceção de que a resina deveria ter sido ativada previamente com metanol. Assim, o objetivo de avaliar o efeito da remoção do glicerol numa etapa intermédia da reação, ou seja, entre os dois reatores em série não foi atingido. Contudo, após cessar a operação do sistema (715h), devido a problemas obstrução dos reatores e tubagens, ativou-se a resina com metanol e arrancou-se a alimentação do sistema, desta vez recolhendo amostras exclusivamente à entrada e saída da coluna da resina.

Uma ilustração da instalação acima descrita pode ser vista na Figura 3.6.



**Legenda:** A. Placa de agitação; B. Frasco da mistura reacional de alimentação do sistema; C. Bomba peristáltica; D. 1º biorreator de leito fixo; E. Coluna com a resina; F. 2º biorreator de leito fixo; G. Pontos de amostragem.

**Figura 3.6** Fotografia ilustrativa sistema contínuo de leito fixo.

As condições operatórias utilizadas no sistema contínuo de leito fixo foram à temperatura de 50°C, com uma razão molar metanol/ álcool de 4:1, razão volumétrica do tert-butanol/ OAU de 0.75v/v. Na Tabela 3.8 resume-se as massas dos reatores de leito fixo contínuo usadas síntese da catálise enzimática.

**Tabela 3.8.** Descrição dos volumes dos reatores contínuos de leito fixo.

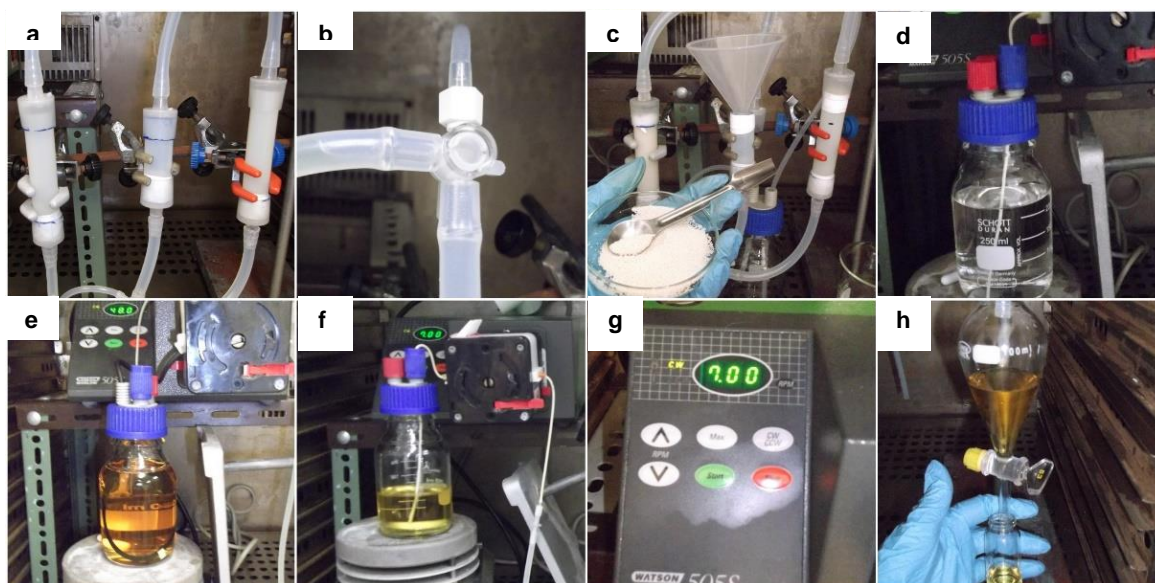
Parâmetros	massa [g]
1º reator de Novozme®435	1,68
2º reator de Novozme®435	1,55
coluna de resina Lewatit® GF 202	10,10



---

O procedimento adotado está ilustrado na Figura 3.7:

- a) Montagem dos três reatores;
- b) Válvula de três vias, que permite recolher amostra a montante e jusante da coluna de resina;
- c) Colocar a resina dentro do reator, previamente pesado;
- d) Pré-tratar a enzima e ativar a resina, com t-butanol durante 1h;
- e) Incubar durante a noite com OAU;
- f) Frasco de alimentação do sistema, com a mistura (álcool, solvente e OAU), submetida agitação;
- g) Bomba peristáltica com rotação de 7rpm, correspondente a um caudal de 0,09 mL/min (vide Anexo A.5);
- h) Ponto de amostragem.



**Figura 3.7. Fotografia ilustrativa do processo de produção de FAME por catálise enzimática num sistema contínuo de leito fixo.**

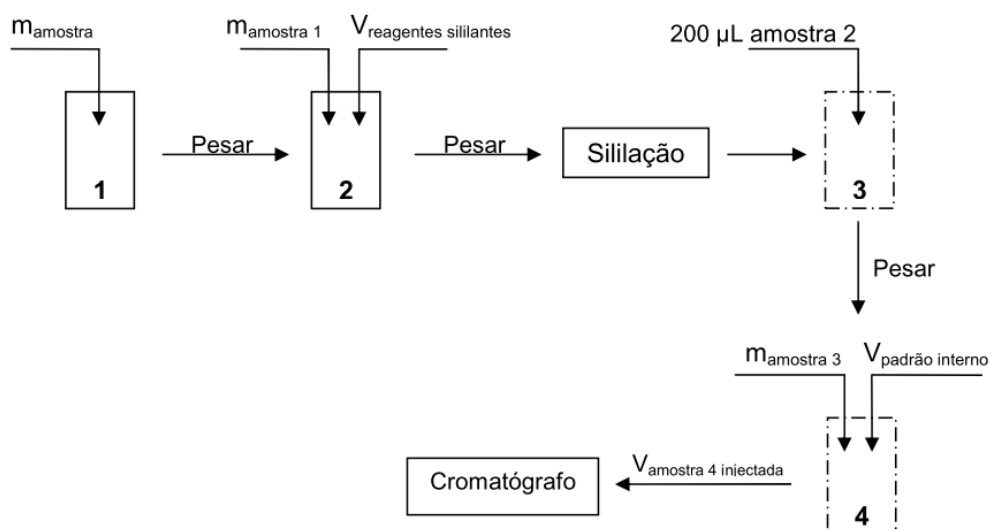
### 3.4.6 Determinação do teor de ésteres metílicos

A técnica adotada para a quantificação do teor de ésteres metílicos presentes nas amostras foi a cromatografia gasosa (GC), de acordo com a EN 14103. Todas as amostras foram sempre derivatizadas, uma vez que nunca se procedeu à separação dos *FAME*. O procedimento adotado na preparação das amostras para caracterização em GC compreendeu as seguintes etapas:

- i) Sililação de 30  $\mu\text{L}$  de amostra, previamente pesada, por adição de 100  $\mu\text{L}$  de piridina, 100  $\mu\text{L}$  de N,O-Bis(trimetilsilano)trifluor acetamida e por fim 50  $\mu\text{L}$  de clorotrimetilsilano. Pesam a amostra com os três reagentes sililantes adicionados;
- j) Digestão em banho de óleo a 70-80°C durante 30 minutos;
- k) Preparação da solução de metil heptadecanoato (padrão interno), em n-heptano, com uma concentração de 10 mg/mL;
- l) Adição de 100  $\mu\text{L}$  do padrão interno preparado no passo anterior, a 50  $\mu\text{L}$  de amostra sililada (previamente pesada);
- m) Injeção no cromatógrafo de 0,5  $\mu\text{L}$  da solução preparada no passo anterior.

Note-se que as amostras recolhidas nos diversos ensaios foram sempre congeladas e só depois derivatizadas nas alturas em que foram analisadas por GC.

A Figura 3.8 ilustra a preparação das referidas amostras, bem como a nomenclatura utilizada.



**Figura 3.8** Procedimento adotado na sililação e preparação das amostras para análise por GC.

---

Devido a problemas logísticos e/ou técnicos, neste trabalho foram usados três equipamentos de GC, sendo um deles um GC-MS (Figura 3.9) e os outros dois GC (por exemplo, vide Figura 3.10).



**Figura 3.9. TRACE GC ULTRA acoplado a um espectrômetro de massa DSQ II, da Thermo Scientific.**

A análise cromatográfica das amostras recolhidas nos ensaios que visavam avaliar a influência de diferentes índices de acidez da matéria-prima e razões mássicas *Novozyme*<sup>®</sup> 435/ OAU, foi realizada num TRACE GC ULTRA acoplado a um espectrômetro de massa DSQ II, quadrupolo simples, da Thermo. A análise dos iões positivos foi realizada em modo de varrimento total (*fullscan*) com um intervalo de fragmentos massa/carga de iões ( $m/z$ ) entre 50 e 850, com uma ionização por impacto eletrónico de 70 eV. A amostra foi injetada de forma manual (0,5  $\mu\text{L}$ ) no modo *splitless* a uma temperatura de 250°C. Os analitos foram separados por uma coluna TRB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), lote NF-17417, da Teknokroma. Utilizou-se como gás de arraste o hélio ( $\geq 99,999\%$ ) com um fluxo constante de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a uma pressão inicial de 147 kPa. A temperatura da fonte foi de 290°C e na interface do GC/MS a temperatura foi de 290°C. A aquisição iniciou-se aos 9 minutos (*solvent delay*) e o programa de temperaturas aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 60°C mantida por 1 minuto, aumentou-se até atingir os 150°C a uma rampa de aquecimento de 10°C $\cdot\text{min}^{-1}$ , e por fim elevou-se a temperatura com uma rampa de aquecimento de 5°C $\cdot\text{min}^{-1}$  até aos 290°C que foram mantidos por 30 minutos. A identificação e quantificação dos picos verificados nas amostras foi efetuada através da comparação entre os espectros das amostras e os espectros dos padrões e com o auxílio da biblioteca NIST. Os dados obtidos no GC/MS foram tratados através do software *Xcalibur* (versão 2.0).



**Figura 3.10. TRACE GC ULTRA da Thermo Scientific.**

A análise cromatográfica das amostras do ensaio de produção de *FAME* em reator de leito fixo contínuo, foi realizada num TRACE GC ULTRA, da Thermo. A amostra foi injetada de forma manual (0,5  $\mu\text{L}$ ) no modo split a uma temperatura de 250°C. Os analitos foram separados por uma coluna capilar CP *Select<sup>TM</sup> biodiesel for FAME* (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), lote MH-31-11-2, da *Varian*, com detetor FID. Utilizou-se como gás de arraste o hélio ( $\geq 99,999\%$ ) com um fluxo constante de 2,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , o ar e o hidrogénio com um fluxo constante de 400 e 40 ( $\text{mL}/\text{min}$ ), respetivamente. O programa de temperaturas aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 40°C mantida por 1 minuto, aumentou-se até atingir os 200°C a uma rampa de aquecimento de 5,5°C $\cdot\text{min}^{-1}$ , e por fim elevou-se a temperatura com uma rampa de aquecimento de 20°C $\cdot\text{min}^{-1}$  até aos 215°C que foram mantidos por 35 minutos. A identificação e quantificação dos picos verificados nas amostras foi efetuada através da comparação entre os espectros das amostras e os espectros dos padrões. Os dados obtidos no GC-FID foram tratados através do software *Xcalibur* (versão 2.0).

A análise cromatográfica dos ensaios do efeito do método regeneração na reutilização da *Novozyme<sup>®</sup> 435* foi realizada num TRACE GC ULTRA, da Thermo. A amostra foi injetada de forma manual (0,5  $\mu\text{L}$ ) no modo *splitless* a uma temperatura de 250°C. Os analitos foram separados por uma coluna TRB-1MS (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), lote NF-16669, da *Teknokroma*, com detetor FID. Utilizou-se como gás de arraste o hélio ( $\geq 99,999\%$ ) com um fluxo constante de 1,1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , o ar e o hidrogénio com um fluxo constante de 300 e 30 ( $\text{mL}/\text{min}$ ), respetivamente. O programa de temperaturas aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 40°C mantida por 1 minuto, aumentou-se até atingir os 225°C a uma rampa de aquecimento de 5,5°C $\cdot\text{min}^{-1}$ , e por fim elevou-se a temperatura com uma rampa



---

de aquecimento de 20°C.min<sup>-1</sup> até aos 270°C que foram mantidos por 35 minutos. A identificação e quantificação dos picos verificados nas amostras foi efetuada através da comparação entre os espectros das amostras e os espectros dos padrões. Os dados obtidos no GC-FID foram tratados através do software *Xcalibur* (versão 2.0).

Na análise dos cromatogramas teve-se em atenção os tempos de retenção e a área dos vários ésteres metílicos, de modo a se avaliar qualitativa e quantitativamente os vários ésteres obtidos. Procedeu-se ao cálculo da percentagem de cada éster de ácido gordo de acordo com a equação 4:

O cálculo da concentração em ésteres teve em conta a seguinte expressão (EN 14103):

$$C_{\text{ésteres}}[\%] = \frac{(\sum A_E) - A_{MH}}{A_{MH}} \times \frac{C_{MH} \left[ \frac{mg}{mL} \right] \times V_{MH}[mL]}{m_{\text{amostra}}[mg]} \quad (3)$$

Em que  $\sum A_E$  corresponde ao somatório das áreas correspondentes a cada éster;  $A_{MH}$ ,  $C_{MH}$  e  $V_{MH}$  correspondem respetivamente à área do pico, à concentração e ao volume do padrão interno.

### 3.5 Conclusão

Ao longo deste capítulo foram apresentados a metodologia dos vários ensaios que são realizados neste estudo, bem como diversos ensaios realizados com a pretensão de avaliar:

- o desempenho da Novozyme<sup>®</sup> 435 na conversão a *FAME* de óleos com diferentes índices de acidez;
- a influência da razão mássica Novozyme<sup>®</sup> 435/OAU;
- o efeito do método regeneração na reutilização da Novozyme<sup>®</sup> 435;
- a produção contínua de biodiesel em reator tubular de leito fixo.

Para tal, foi indispensável a caracterização do OAU, pois só assim possibilitou a determinação de algumas variáveis necessárias à concretização da síntese enzimática de biodiesel. Consoante o processo de produção de biodiesel, contínuo e descontínuo, realizaram-se diferentes condições operatórias, tendo em comum à T de 50°C, a razão molar metanol/ OAU de 4:1 e a razão volumétrica tert-butanol/ OAU de 0,75 v/v. Em todos os ensaios foram retiradas amostragens que foram analisadas por cromatografia.



---

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Introdução

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na componente experimental deste trabalho.

### 4.2 Caracterização do OAU e de misturas de OAU com ácido oleico

O OAU utilizado no presente trabalho foi caracterizado, nos seguintes parâmetros: densidade, índice de acidez e massa molar média.

#### 4.2.1 Densidade

Na determinação da densidade foi usado um picnómetro, de acordo com o previamente referido na secção 3.4.3.1. Os resultados obtidos encontram-se resumidos Tabela 4.1. Nesta tabela também se encontram as densidades das misturas de OAU e ácido oleico preparadas para os ensaios com diferentes índices de acidez da matéria-prima.

**Tabela 4.1 Densidade do OAU e das misturas de OAU com ácido oleico.**

Amostra	$\rho$ (@20°C) [g/L] $\pm \sigma$
OAU	979,3 ( $\pm$ 2,90)
OAU + 10% (v/v) Ácido oleico	951,7 ( $\pm$ 16,45)
OAU + 25% (v/v) Ácido oleico	873,6 ( $\pm$ 64,00)
OAU + 50% (v/v) Ácido oleico	837,2 ( $\pm$ 3,96)

A densidade relativa do óleo de amendoim é de 914,0 – 917,0 [g/L] (@20°C). O valor da densidade média do OAU é de 979,4 g/mL, sendo superior ao do respetivo óleo virgem. Este resultado era expectável, uma vez que um dos parâmetros que se altera com o uso de um óleo vegetal é a sua densidade. O valor da densidade do OAU utilizado no presente trabalho encontra-se dentro da gama de valores definido para a densidade do OAU (Azócar *et al.* 2010).

#### 4.2.2 Índice de acidez

O índice de acidez contabiliza a quantidade de ácidos gordos existentes numa amostra. Este parâmetro foi determinado pelo método titrimétrico automático descrito na secção 3.4.3.2. Os resultados obtidos encontram-se na tabela que se segue:

---

**Tabela 4.2 Índice de acidez do OAU e das misturas de OAU com ácido oleico.**

	<b>Índice de acidez</b> [mg KOH/ g amostra]
OAU	2,302
OAU + 10% (v/v) Ácido oleico	16,785
OAU + 25% (v/v) Ácido oleico	68,342
OAU + 50% (v/v) Ácido oleico	104,009

Como se pode constatar da análise dos resultados do Tabela 4.2, o índice de acidez aumenta percentagem volumétrica de ácido oleico na mistura com OAU.

O índice de acidez do OAU utilizado neste trabalho é de 2,302 mg KOH/g OAU. A mesma “remessa” de OAU foi caracterizada por Melo S. (2012), tendo sido obtido nessa altura (2012) um índice de acidez de 1,277 mg KOH/g OAU. Esta diferença entre os valores de índices de acidez são uma consequência do grau de degradação que o OAU sofreu durante estes dois anos. Na degradação estão incluídas quebras de ligações nas cadeias lipídicas dos seus constituintes e oxidação.

Note-se que, a matéria-prima (óleos) com elevados índices de acidez são desaconselháveis serem usados, sem pré-tratamento, na produção de biodiesel quando é adotada a catálise homogénea alcalina (com NaOH ou KOH), devido à ocorrência de reações paralelas. Óleos com índices de acidez inferiores a 2 mg KOH/g óleo podem ser utilizados no processo anterior em necessidade de um pré-tratamento. Todavia, no presente trabalho optou-se pela biocatálise, um índice de acidez mais elevado não constituirá problema, uma vez que as lípases são menos sensíveis à presença de ácidos gordos livres (Bajaj *et al.* 2010), e algumas conseguem mesmo catalisar a reação de esterificação.

#### **4.2.3 Massa molar**

A massa molar do OAU foi determinado de acordo com o exposto no anexo A.1, sendo esta considerada aproximadamente igual à massa molar da mistura de triglicerídeos. Tendo por base os dados que constam na bibliografia para o caso do óleo de amendoim,

---

---

procedeu-se à determinação do perfil em ésteres do OAU. Os resultados obtidos com o auxílio da cromatografia gasosa e tendo por base o peso molecular dos respetivos ésteres obteve-se a uma fórmula empírica média dos ésteres metílicos da amostra:  $C_{19}H_{36}O_2$ . Conhecendo-se esta dos *FAME*, inferiu-se a fórmula empírica média dos triglicerídeos do OAU,  $C_{57}H_{104}O_6$ , a qual corresponde a uma massa molar de 884 g/mol.

### 4.3 Avaliação do desempenho da Novozyme® 435 na conversão a *FAME* de OAU com diferentes índices de acidez

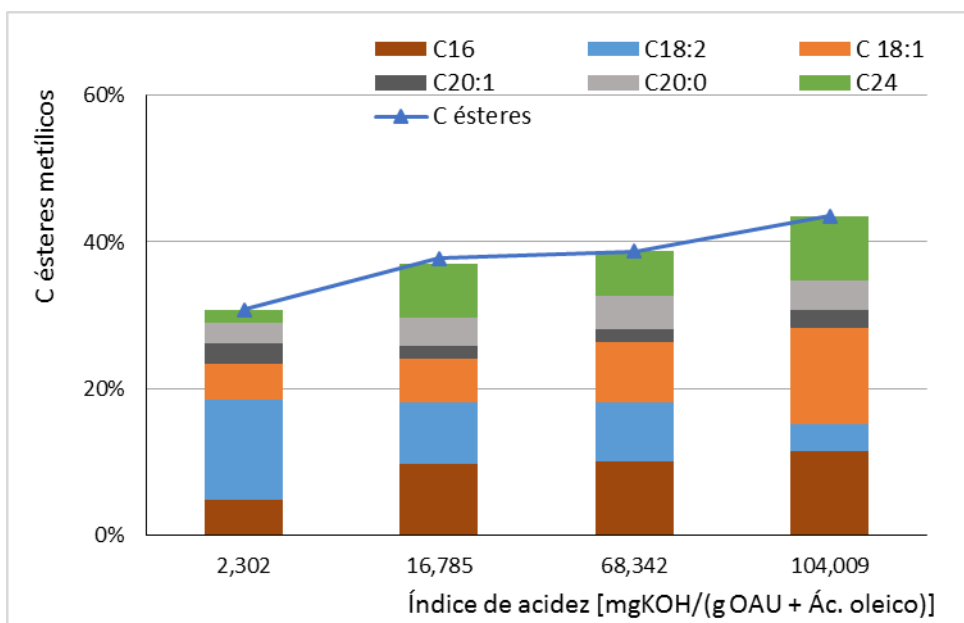
No presente trabalho pretendeu-se avaliar o desempenho da enzima Novozyme® 435 na produção de *FAME*, a partir do óleo com diferentes índices de acidez. Para simular diferentes índices de acidez, adicionou-se a amostras de OAU diferentes volumes de ácido oleico (vide secção 3.4.4.1). Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições operatórias: razão mássica Novozyme® 435/ OAU de 10%, razão volumétrica de tert-butanol/OAU de 0,75 v/v, razão molar metanol/ OAU de 4:1, agitação orbital de 200 rpm, temperatura de 50°C e tempo de reação de 8h.

As propriedades físico-químicas dos óleos, gorduras e seus respetivos ésteres, variam de acordo com a composição dos ácidos gordos presentes em cada matéria-prima. Na Tabela 4.3 estão apresentados os parâmetros de operação dos ensaio realizados utilizando diferentes índices de acidez.

**Tabela 4.3 Índice de acidez das misturas preparadas para os ensaios de avaliação da influência deste parâmetro no desempenho a Novozyme® 435.**

Razão volumétrica ácido oleico/OAU	$V_{OAU}$ [mL]	$V_{Ácido\ oleico}$ [mL]	Índice de acidez [mg KOH/(g OAU+ ác. oleico )]
0%	10	0	2,302
10%	10	1	16,785
25%	10	5	68,342
50%	10	10	104,009

Os resultados deste ensaio encontram-se na figura seguinte.



**Figura 4.1** Influência do índice de acidez do óleo na concentração em *FAME*, obtidos por catálise da *Novozyme*<sup>®</sup> 435.

Pela Figura 4.1 é notável o aumento do éster metil oleato (C18:1) com o índice de acidez, ou seja, com a percentagem de ácido oleico na mistura reacional inicial. Isto significa que a *Novozyme*<sup>®</sup> 435 catalisa a reação de esterificação. Resumindo a enzima catalisa não só a reação de transesterificação (porque é uma lipase), mas também a de esterificação. Esta capacidade da enzima catalisar as duas reações também foi observado por Cidade *et al.*(2011), e faz dela uma séria candidata a catalisar reações com matérias-primas com elevados índices de acidez. Este resultado mostra uma vantagem que esta enzima apresenta relativamente aos catalisadores químicos alcalinos.

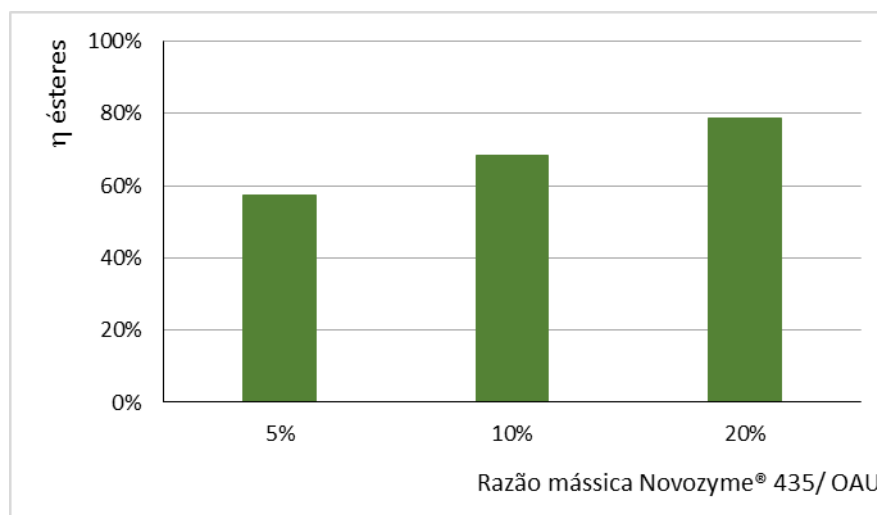
Azócar *et al.*(2011) verificaram que o OAU, depois de convertido a *FAME*, apresenta uma predominância de ácido linoleico (C18:2). Neste trabalho observa-se essa mesma predominância, quando se analisa a amostra de OAU sem ácido oleico, i.e. com um índice de acidez de (2,302 mgKOH/g OAU) (vide Figura 4.1).

---

#### 4.4 Influência da razão mássica Novozyme® 435/ OAU no rendimento em FAME

A quantidade de catalisador utilizado é um parâmetro a ser otimizado influenciando não só a velocidade das reações de transesterificação e esterificação, mas também a ocorrência de reações secundárias. Assim, o objetivo desta parte do trabalho prático é avaliar a influência da razão mássica de biocatalisador/OAU no rendimento em FAME.

Para atingir o objetivo acima referido, fez-se variar a razão mássica Novozyme® 435/ OAU (5%, 10% e 20%), mantendo as restantes condições de operação (vide secção 3.4.4.2). Na Figura 4.2 pode ver-se rendimento em ésteres para as várias razões mássica Novozyme® 435/ OAU testadas.



**Figura 4.2. Comparação do rendimento de ésteres para diferentes razões mássicas Novozyme®435/ OAU.**

Da análise da Figura 4.2 é possível observar que o rendimento em ésteres metílicos aumenta com a quantidade de enzima Novozyme® 435 presente no meio reacional, i.e., com razões mássicas superiores. Tal como já tinha sido comprovado pelos autores, Souza L. (2011) e Wang *et al.*(2006) relataram que quanto maior for a quantidade de enzima maior era a quantidade de ésteres metílicos sintetizados. Tendo os referidos autores testado razões mássicas no intervalo de [0,5-5 m/m, %].

Na gama de razões mássicas estudada não se encontrou um valor ótimo para este parâmetro, ou seja o valor a partir do qual não se regista incremento do rendimento em ésteres.

---

#### 4.5 Efeito do método regeneração na reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup>435

Com o intuito de aumentar o desempenho e o tempo de vida útil da *Novozyme*<sup>®</sup> 435, testou-se sua reutilização ao longo de 6<sup>o</sup> ciclos consecutivos (de 8h cada um), realizando apenas uma lavagem da enzima entre o 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> ciclo. De acordo com Ognjanovic *et al.*(2009), para melhorar o desempenho da lipase imobilizada, em meios com elevada polaridade (como é o caso do metanol), procede-se à regeneração do biocatalisador lavando as suas partículas sólidas com álcoois que possuem 3 a 5 cadeias de carbono. Os métodos de regeneração na reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup>435 selecionados para testar neste trabalho, basearam-se em vários estudos, com principal destaque nos realizados por Azócar *et al.*(2011) e Chen *et al.*(2003).

A Tabela 4.4 listam-se os solventes usados na regeneração da *Novozyme*<sup>®</sup>435 entre o 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> ciclo, sendo a incubação de acordo com a mesma metodologia apresentada no “pré-tratamento da enzima” (subsecção 3.4.1), e realizada após a lavagem com o solvente.

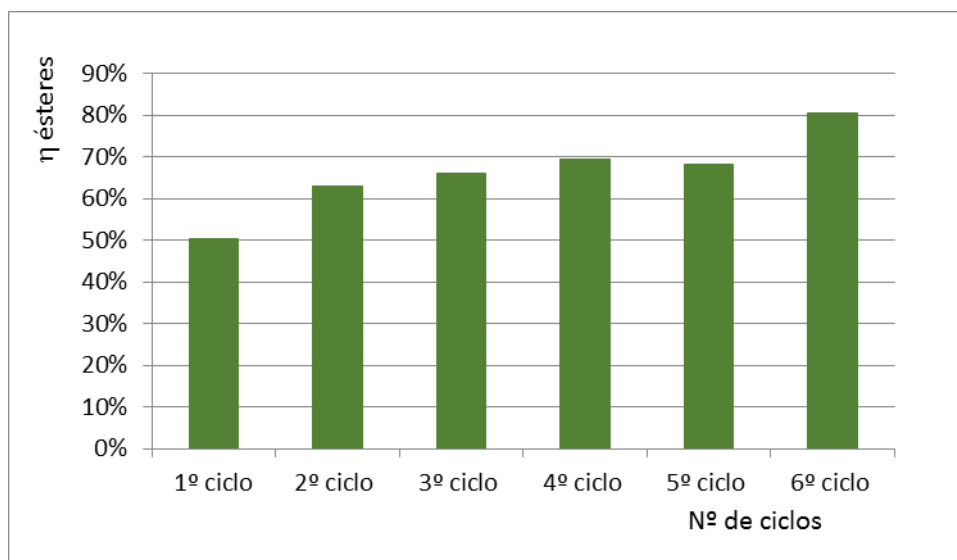
Note-se que antes do primeiro ciclo a enzima foi pré-tratada de acordo com o descrito na secção 3.4.1.

**Tabela 4.4 Condições dos ensaios que avaliam o efeito do método regeneração (lavagem e/ou a incubação da enzima) na reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup>435**

<b>Solvente de regeneração</b>	<b>Incubação</b>
sem aplicação (controlo)	
tert-butanol	X
tert-butanol	
tert-butanol + água destilada	X
1 -butanol	X
1-butanol	
1-butanol + água destilada	X

A figura seguinte representa o rendimento em ésteres durante 6<sup>o</sup> ciclos consecutivos, sem efetuar qualquer método de regeneração da enzima.





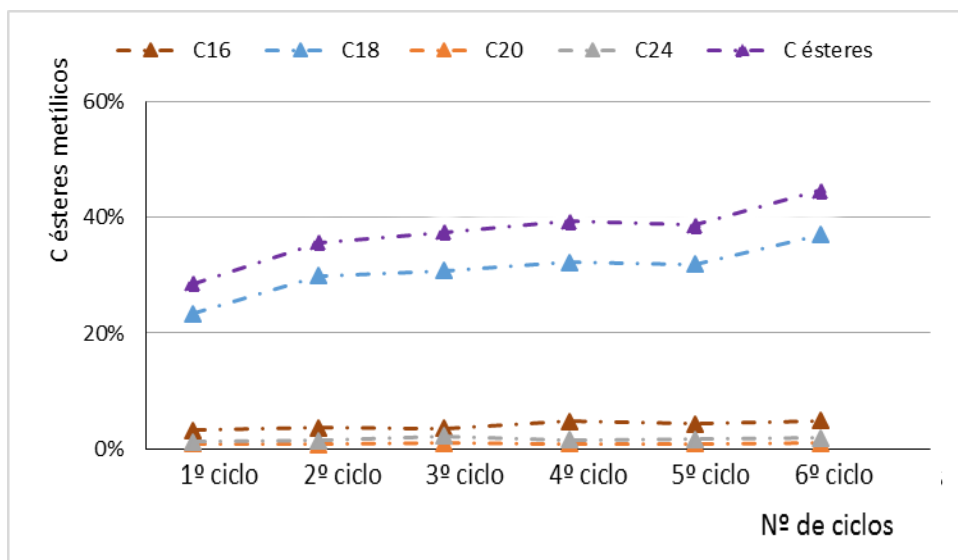
**Figura 4.3** Evolução do rendimento em ésteres dos ciclos realizados sem efetuar qualquer método de regeneração da *Novozyme*<sup>®</sup> 435.

No primeiro ciclo (8 horas de reação), atingiu-se um rendimento da conversão em ésteres de 50%, apresentando um valor semelhante nas várias réplicas realizadas. Este resultado pode dever-se pela agitação não ser vigorosa, i.e., a mistura reacional não foi suficientemente agitada, de forma a misturar o óleo e álcool nas concentrações e temperaturas que se operou, dado que o agitador orbital não esteve sempre operacional durante as 8h de reação. Comparando este valor de 50% com o observado, para a razão mássica de 10% (a usada neste ensaio também) na Figura 4.2, conclui-se que de facto neste ensaio o valor ficou aquém do esperado.

Nos ciclos seguintes (com duração de 8h) verifica-se que os rendimentos da reação vão aumentando gradualmente até atingir 80%, ao fim do 6º ciclo (correspondendo a 48h de utilização da enzima). Note-se que estão a ser analisados os resultados do reator “controlo”, ou seja, não se aplicou nenhum método regeneração na reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup> 435. Estes resultados não eram conhecidos no momento em que se decidiu regenerar a enzima.

Em suma, não se regista perda de atividade da enzima ao fim do 6º ciclo sucessivo de reutilização da *Novozyme*<sup>®</sup> 435, sem aplicar qualquer método regeneração. A nível industrial este resultado é um fator importante, uma vez que para a catálise enzimática pode ser monetariamente competitiva, as enzimas têm de ser reutilizadas várias vezes.

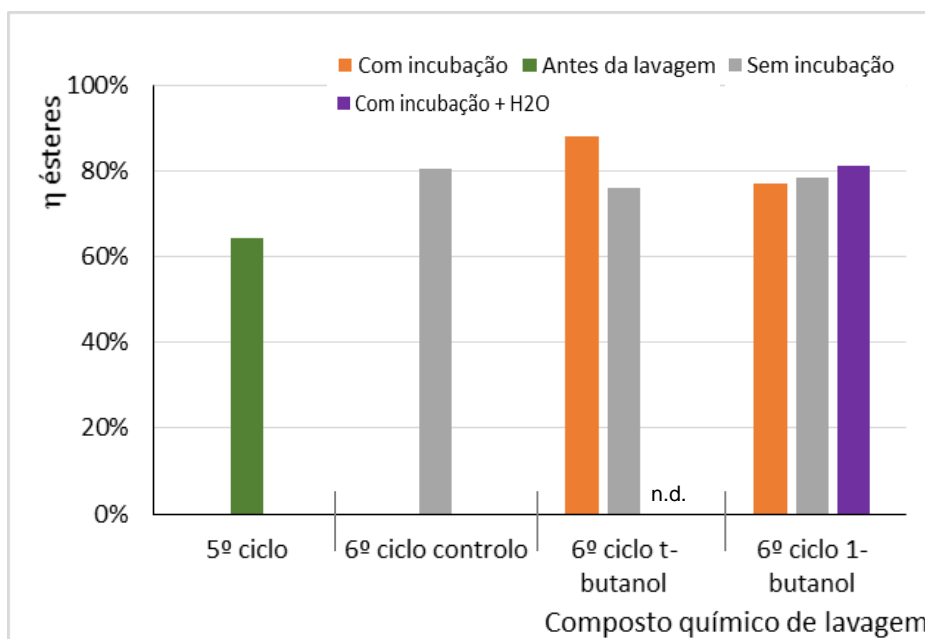
Na Figura 4.4 estão representados graficamente as concentrações de cada éster presentes ao final de cada ciclo. Note-se que as linhas traçadas a unir os pontos pretendem apenas auxiliar a leitura da informação, não tendo um significado físico, i.e., não foram determinados pontos experimentais além dos assinalados,



**Figura 4.4 Concentração de ésteres nos ciclos realizados sem efetuar qualquer método de regeneração da *Novozyme*<sup>®</sup>435.**

Pela Figura 4.4 pode observar-se que os ésteres predominantes são C18:0 (vide Anexo A.7). No cromatógrafo onde foram analisadas as amostras não foi possível separar os ésteres desta família, representado o C18:0 a soma dos C18:1 e C18:2. A coluna utilizada para analisar esta amostra, não separava os ésteres saturados dos insaturados, pois a fase estacionária tinha menor afinidade para a separação destes ésteres.

Testou-se a influência da lavagem da enzima *Novozyme*<sup>®</sup>435 com dois solventes, tert-butanol e 1-butanol, na presença de água e incubada durante à noite. A Figura 4.5 representa os rendimentos de conversão em ésteres, aplicando diferentes compostos químicos na lavagem da *Novozyme*<sup>®</sup>435 (vide Tabela 4.4).



**Figura 4.5 Comparação do rendimento em FAME aplicando diferentes métodos de regeneração (entre o 5º e 6º ciclo) da enzima.**

Na Figura 4.5 está representado no 5º ciclo um valor médio de todos (compilação) as réplicas realizadas antes da regeneração da enzima *Novozyme*<sup>®</sup>435, tendo-se registado um rendimento médio de  $64 \pm 3\%$

Pela observação da referida figura pode-se constatar que o método de regeneração mais eficaz foi quando se lavou com tert-butanol e posteriormente incubou (segundo a metodologia aplicada no pré-tratamento da enzima para 1ª utilização) antes de iniciar a reação do 6º ciclo. Posto isto, conclui-se que este é o método mais adequado de regeneração da enzima, que vem corroborar os resultados obtidos por:

- Chen *et al.*(2003), Ognjanovic *et al.*(2009) e Azócar *et al.*(2010) concluíram que o tert-butanol, é o solvente com a capacidade de regenerar a lipase desativada;
- Royon *et al.*(2007) afirmam que o tert-butanol é o solvente que solubiliza o glicerol no meio reacional;
- Samukawa *et al.*(2000) afirmam que o pré-tratamento da enzima aumenta a velocidade de reação.

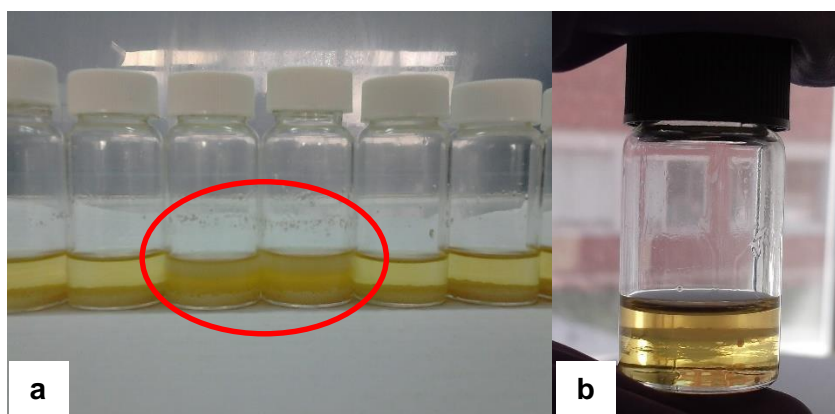
Portanto, o tert-butanol poderá ser um solvente promissor para regenerar a enzima, pois as suas propriedades hidrofílicas permitem a remoção do glicerol e do metanol. Impedindo assim a redução significativa do rendimento possivelmente promovida pela presença de glicerol no meio reacional. Uma vez que este subproduto formado durante o processo

---

reveste o catalisador imobilizado e facilmente é adsorvido pelo suporte enzimático, o que provoca efeitos inibitórios na atividade e estabilidade da enzima.

Recordando, o tert-butanol foi sempre usado no meio reacional para proteger a enzima do metanol. A sua presença no meio reacional terá um duplo efeito benéfico, pois para além desta proteção, também promove a solubilização do glicerol no meio reacional, impedindo ou minimizando a sua deposição à superfície da enzima. Em suma, o tert-butanol em meio reacional protege a enzima do metanol e da deposição do glicerol, mas também tem um papel muito importante na etapa de regeneração da enzima com vista à sua reutilização.

Note-se que não foi possível analisar as amostras referentes ao método de regeneração da enzima com tert-butanol + água e incubada, dado que ocorreu algum problema com as duas réplicas, nas quais se assistiu à formação de duas fases imiscíveis, não sendo possível obter uma mistura homogênea (vide Figura 4.6).



**Figura 4.6** Fotografias elucidativas do problema que surgiu nas réplicas em que se testava a regeneração da enzima com tert-butanol + H<sub>2</sub>O: (a) separação de fases no reator; (b) separação de fases na amostra recolhida.

Quanto ao solvente 1-butanol não foi encontrado nenhuma literatura acerca da aplicação deste solvente na reutilização/ regeneração da enzima. Todavia, alguns autores, (Chen *et al.*(2003), Christopher *et al.*(2014) e Gog *et al.*(2014)), fizeram referência ao 2-butanol sendo um solvente competitivo, na função de regeneração, com tert-butanol, pelas suas características químicas.

Comparando os três métodos de regeneração com 1-butanol, verifica-se que o máximo em conversão é conseguido quando se adicionou água à lavagem. Este resultado vem apontar para a importância da presença de água na catálise enzimática, sendo um elemento fundamental para manter a atividade da enzimas, bem como produzir interfaces entre a água formada da esterificação e o óleo, de forma a promover a reação de

---

---

transesterificação. Contudo, o teor de água necessário para maximização da atividade enzimática depende do tipo de matéria-prima, do meio de imobilização da lipase e do solvente orgânico (Lu *et al.* 2010).

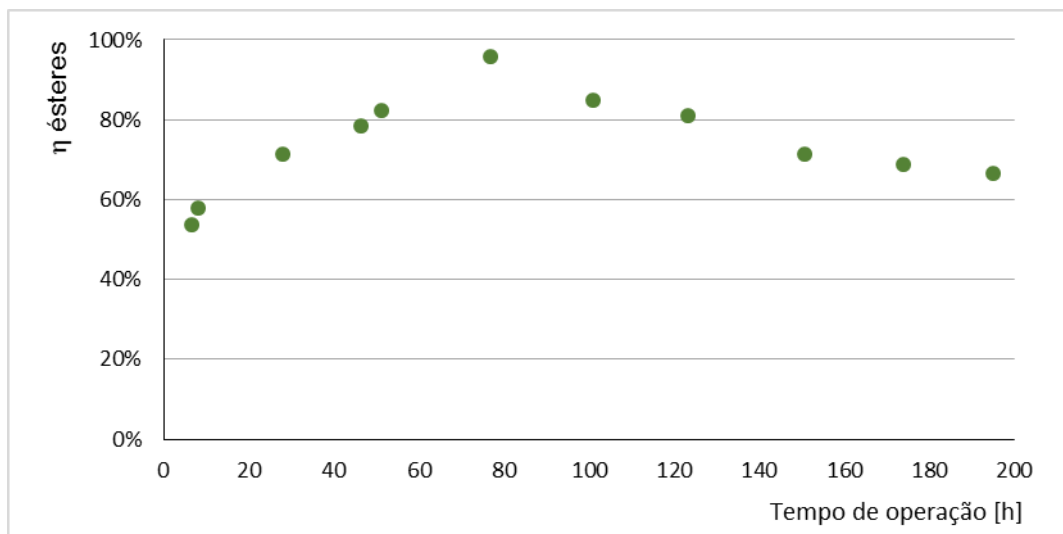
Nos ensaios em que não se adicionou água à enzima durante o processo de lavagem, o rendimento em *FAME* é inferior. Segundo Souza L. (2010), quando a quantidade de água aumenta, a flexibilidade da enzima e a sua atividade é superior. Porém, depois de uma quantidade ótima de água as reações hidrolíticas tornam-se significativas, sendo esperada uma redução no rendimento da reação de transesterificação.

#### **4.6 Produção de *FAME* em reator contínuo de leito fixo**

Atendendo às diversas vantagens apontadas na literatura (vide secção 2.6.2.2) acerca da implementação do reator contínuo de leito fixo na produção biodiesel, definiu-se como último objetivo deste trabalho, testar esse sistema.

A instalação experimental compreendia dois reatores tubulares de leito fixo em série. Entre eles foi colocada uma coluna com resina Lewatit® GF 202 para remover o glicerol da mistura reacional proveniente do 1º reator da série. A remoção do glicerol do meio visa reduzir os problemas de transferência de massa, no leito do 2º reator, que influenciam a eficiência global do processo.

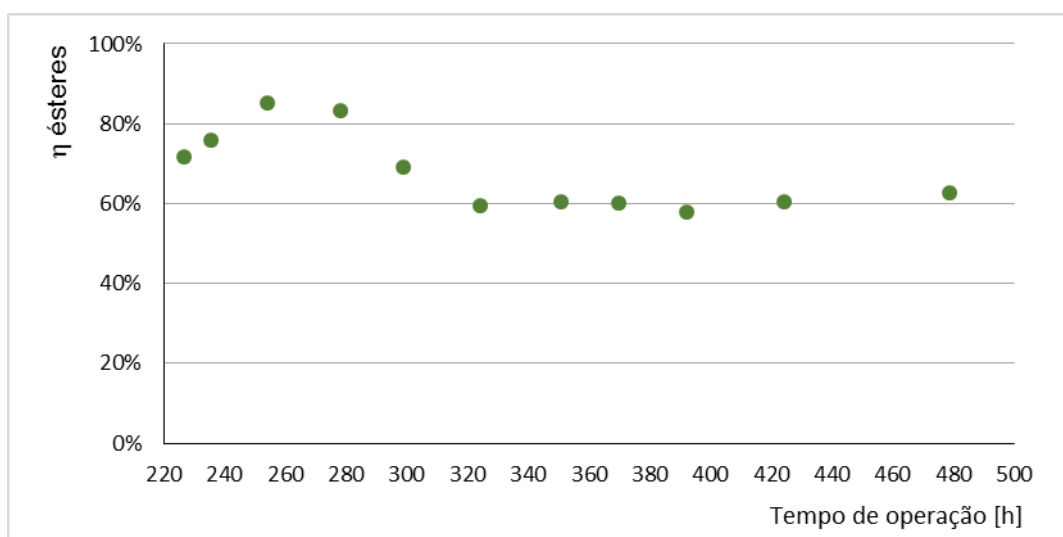
O reator foi operado durante 715h, sofrendo uma interrupção às 200h, para proceder a regeneração da lipase *Novozyme*®435 (vide secção Figura 4.7). Optou-se por apresentar graficamente apenas até às 478h de reação, dado que a partir deste momento o sistema teve algumas interrupções de operação, desde bolhas de ar no leito, obstrução do tubo de alimentação e deterioração dos tubos de silicone, pelo que o sistema deixou de operar de uma forma contínua. Na Figura 4.7 ilustra-se a evolução temporal do rendimento em ésteres antes de aplicar o método regeneração na reutilização da enzima.



**Figura 4.7 Evolução temporal do rendimento em ésteres na produção contínua de biodiesel num reator de leito fixo (sem aplicar nenhum método de regeneração da enzima).**

Observando a Figura 4.7, verifica-se que às 8 horas o rendimento em *FAME* era de 58%, e ao fim de 76 horas de operação atingiu-se o máximo de conversão de 96%. A partir deste ponto o rendimento diminuiu, para valores próximos do registado inicialmente, até à interrupção da alimentação, i.e. até às 200 horas. Nesta altura todo o sistema foi limpo e a enzima e a resina lavada com tert-butanol, com posterior incubação.

A Figura 4.8 ilustra a evolução temporal do rendimento em ésteres monitorizado após a intervenção anterior.



**Figura 4.8 Evolução temporal do rendimento em ésteres na produção contínua de biodiesel num reator tubular de leito fixo (depois da regeneração da enzima).**

---

Ao fim das 254 horas de operação, correspondente a 43 horas de operação após a regeneração da enzima, obteve-se a conversão máxima de 85%, inferior ao valor registado na “primeira” utilização (Figura 4.7). A partir deste ponto, o rendimento decresce até atingir um estado estacionário, com um rendimento em *FAME* médio de 60%. Esta redução do rendimento do sistema contínuo pode ser uma consequência de uma acumulação/deposição glicerol nos espaços vazios do leito e/ou na superfície da enzima. Uma possível forma de contornar este problema será remover o glicerol com um sorvente colocado dentro do próprio leito fixo, ou entre os reatores da série. Esta última opção foi “aparentemente” testada neste trabalho, contudo, sem sucesso por inadequada preparação da resina. De acordo com o exposto na secção 3.4.5, a resina deveria ter sido ativada com metanol antes da sua utilização e não foi. Assim, a presença da coluna de resina no sistema contínuo não teve qualquer efeito ao nível da melhoria do rendimento em *FAME* atingido. Isto veio a confirmar-se com as análises efetuadas às amostras recolhidas a montante e jusante da coluna de resina, cujos valores da concentração em ésteres foram muito semelhantes.

Após o término da operação do sistema contínuo (num total de 478h), devido aos problemas anteriormente referidos, procedeu-se manutenção da instalação, incluindo à limpeza da resina e à sua ativação com metanol. De seguida, reiniciou-se a operação, com amostragens exclusivamente nos pontos a montante e jusante da coluna de resina. Esta nova etapa de operação do sistema teve como objetivo exclusivo averiguar a capacidade da resina de remover o glicerol. Nos dois tempos (7 e 8h de operação) de amostragem a concentração de ésteres diferiu em 5%, sendo superior no ponto a jusante. Este resultado indica que, de facto, a resina depois de ativada tem potencial para remover glicerol.

#### **4.7 Conclusão**

O principal objetivo do presente trabalho consistiu na avaliação do efeito de alguns parâmetros operacionais no desempenho de uma lípase imobilizada (Novozyme<sup>®</sup> 435). Para atingir este objetivo produziu-se *FAME*, com recurso à biocatálise, que se baseou exclusivamente na etapa da reação, não se tendo realizado nenhuma etapa de separação e purificação de produtos.

Numa primeira fase fez-se a caracterização do óleo alimentar usado, tendo em conta os resultados apresentados na secção 4.3, constata-se que ele apresenta um índice de acidez mais elevado comparativamente ao obtido noutra estudo realizado anteriormente com mesmo óleo, sendo este facto um sinal de degradação/oxidação do mesmo.

---

O suporte da enzima selecionada para este trabalho (*Candida antarctica*) é uma resina acrílica. Tendo por base trabalhos de outros autores (por exemplo Oliveira B. (2010)), constatou-se ser fundamental pré-tratar a referida enzima, com vista a potenciar a sua atividade catalítica. Deste modo, em qualquer ensaio realizado no decorrer da componente prática do presente trabalho, aquele biocatalisador foi sempre previamente tratado com tert-butanol e incubado com o OAU a 50°C.

Um dos objetivos do presente trabalho consistiu na avaliação do desempenho da Novozyme® 435 na produção de *FAME*, a partir de óleos com diferentes índices de acidez. Constatou-se que se obtêm rendimentos em ésteres superiores quando o índice de acidez é elevado. Assim, conclui-se que a enzima catalisa a reação de esterificação, para além da reação de transesterificação.

Da experiência efetuada conducente à avaliação do efeito da razão mássica de enzima/OAU (secção 4.4), verificou-se que até 20% (valor máximo testado) o rendimento em *FAME* aumenta com a percentagem de enzima no meio reacional. Outros autores (por exemplo Wang *et al.* 2010) testaram razões mássicas até 5%, com resultados qualitativamente semelhantes ao obtido no presente trabalho. Uma vez que as lípases são catalisadores que aceleram a velocidade de reação, i.e., as baixas concentrações em reações enzimáticas traduzem-se em baixas velocidades de reação. Porém, será de esperar que a partir de um “certo” valor a razão mássica deixe de influenciar o rendimento da(s) reação(ões). Este valor não foi encontrado neste trabalho.

Um fator importante para tornar a catálise enzimática competitiva à escala industrial é a possibilidade de reutilização das enzimas. Nas experiências realizadas neste trabalho, cujos resultados foram apresentados na secção 4.5, verificou-se que a enzima aumentou a sua atividade ao longo dos 6 ciclos de utilização. O método que foi mais eficaz na regeneração da enzima foi a lavagem com tert-butanol e posteriormente incubação com OAU a 50°C. Desta série de ensaios reconhece-se que o momento escolhido (entre o 5º e o 6º ciclo, correspondendo a 48h de operação da enzima) para a regeneração da enzima não foi o mais indicado. Esta conclusão advém do facto do controlo apresentar um rendimento em *FAME* superior (comparativamente aos ciclos anteriores) no 6º, sendo este muito semelhante aos rendimentos observados nos restantes reatores onde a enzima foi regenerada. A exceção verifica-se apenas no reator com enzima lavada com tert-butanol (eleito como o melhor), onde o rendimento foi superior ao do “controlo”.

Reiterando o motivo da decisão de regenerar a enzima entre o 5º e o 6º ciclo: a visível acumulação de glicerol no leito (enzimas). Mais, nessa altura, por razões logísticas, a

---



---

informação acerca do teor em ésteres, das amostras recolhidas ao final de cada ciclo, não era conhecida.

Desta série de ensaios importa ainda salientar um dado relevante para a implementação da síntese de *FAME*, com a *Novozyme*<sup>®</sup> 435, num modo de operação contínua: ao final do 6º ciclo de operação o rendimento em ésteres encontra-se ainda numa fase crescente, o que leva a crer que enzima poderá não exigir interrupção frequente da operação para regeneração.

A ilação anterior veio a confirmar-se na última série de experiências realizadas num sistema de reatores tubulares de leito fixo (com a *Novozyme*<sup>®</sup> 435), como se pode ver na Figura 4.7). Neste modo de operação obteve-se conversões superiores às do sistema descontínuo agitado, pois ao fim de 76 horas de operação obteve-se a conversão máxima de 96%, a partir deste ponto o rendimento decresce. Momento em que se interrompe alimentação do sistema, para aplicar o método de regeneração da enzima, i.e., lavar a enzima com tert-butanol com posterior incubação. Após a regeneração da enzima, obteve-se conversão máxima ao fim de 43 horas de operação, valor inferior ao registado na “primeira” utilização. A partir deste ponto, o rendimento decresce até atingir um estado estacionário, com um rendimento em *FAME* médio de 60%. Esta redução do rendimento do sistema contínuo pode ser uma consequência de uma acumulação/deposição glicerol nos espaços vazios do leito e/ou na superfície da enzima. Dos resultados obtidos no sistema contínuo de leito fixo pode-se concluir que os resultados são motivadores para uma eventual aplicação industrial. Todavia, mais ensaios à escala laboratorial deverão ser realizados com vista a testar outras condições operatórias.

---

---

## 5 Considerações finais

### 5.1 Introdução

Ao longo deste trabalho constata-se que existem inúmeras variáveis que afetam a produção de biodiesel, principalmente a natureza da matéria-prima e do catalisador.

No presente trabalho de estudo de produção de biodiesel recorreu-se ao OAU como matéria-prima, na presença de um biocatalisador imobilizado sob processos de operação descontínuo e contínuo. Nas próximas subsecções apresentam-se as considerações finais e algumas sugestões para estudos futuros.

### 5.2 Conclusões gerais

Da realização deste estudo, com vista à avaliação do efeito de alguns parâmetros operacionais no desempenho de uma lipase imobilizada (Novozyme® 435), nomeadamente: (i) índice de acidez do óleo, (ii) razão mássica de enzima/óleo e (iii) método regeneração da enzima com vista à sua reutilização. Também foi objeto de estudo do presente trabalho a produção em contínuo, num (bior)reator tubular de leito fixo, de ésteres metílicos de ácidos gordos (*FAME*) usando a enzima anteriormente referida.

Dos ensaios realizados conclui-se que a Novozyme® 435 apresenta um bom desempenho com misturas reacionais de elevado índice de acidez. Assim, verifica-se que a enzima catalisa ambas as reações de esterificação e de transesterificação. Esta facto foi também observado por outros autores (por exemplo Cidade *et al.* (2011)), e faz da enzima uma séria candidata a catalisar reações com matérias-primas com elevados índices de acidez. Este resultado mostra uma vantagem que esta enzima apresenta relativamente aos catalisadores químicos alcalinos.

Da experiência efetuada com vista à avaliação do efeito da razão mássica de enzima/OAU verificou-se que quanto maior essa razão (até ao valor máximo testado neste trabalho: 20%) maior é o rendimento em *FAME* conseguido num tempo de reação de 8h. Outros autores (por exemplo Wang *et al.* (2010)) testaram razões mássicas até 5%, com resultados qualitativamente semelhantes ao obtido no presente trabalho. Como futuros trabalhos será conveniente testar razões mássicas mais elevadas de modo a averiguar qual é o valor máximo (da razão mássica) a partir do qual não se observa incremento do rendimento em *FAME*.

---

Um fator importante para tornar a catálise enzimática competitiva à escala industrial é a possibilidade de reutilização das enzimas. Nas experiências realizadas neste trabalho verificou-se que o rendimento em *FAME* aumentou ao longo dos 6 ciclos de utilização, onde a enzima foi sendo reutilizada sem aplicar qualquer método de regeneração. Nas enzimas que foram sujeitas a essa etapa entre o 5º e o 6º ciclo, conclui-se que o método que foi mais eficaz regeneração foi a lavagem com tert-butanol e posteriormente incubação com OAU a 50°C. Esta conclusão vem de encontro aos resultados obtidos por outros autores (por exemplo Chen *et al.* (2003), Ognjanovic *et al.* (2009) e Azócar *et al.* (2010)). Assim, o tert-butanol poderá ser um solvente promissor para regenerar a enzima, pois as suas propriedades hidrofílicas permitem a remoção do glicerol e do metanol.

Na experiência, à escala laboratorial, de produção em contínuo de *FAME* em reatores tubulares de leito fixo (com a Novozyme® 435) verificou-se que se pode garantir um rendimento de cerca de pelo menos 60% (com a matéria-prima usada) durante 200h, tendo obtido um valor máximo de 96%. A interrupção feita no sistema para manutenção, que incluiu a regeneração do biocatalisador, permitiu uma recuperação do rendimento da reação em cerca de 15%. Garante-se uma operação até às 480h (tempo cumulativo) com um rendimento garantido de pelo menos 60%. Estes resultados são motivadores quando se perspetiva uma eventual aplicação industrial da biocatálise aplicada à produção de biodiesel.

### 5.3 Sugestões para trabalho futuro

Após a conclusão deste trabalho e tendo em conta os resultados obtidos e conhecimentos adquiridos, verifica-se ser necessário a clarificação/ exploração de alguns aspetos, dos quais realçam:

- Testar razões mássicas enzima/ OAU superiores a 20% e com óleos (vegetais) de outras espécies;
- Testar diferentes concentrações do catalisador no sistema de leito fixo contínuo;
- Testar diferentes tempos de residência no sistema de leito fixo contínuo;
- Investigação de métodos de remoção do glicerol do meio reacional, inclusive a resina Lewatit GF 202 devidamente ativada desde início da operação;
- Testar diferentes teores de água no meio reacional;
- Desenvolvimento de processos de separação e purificação dos produtos da reação biocatalisada;
- Análise económica do processo contínuo e descontínuo.

---

Em suma, como em qualquer processo que se perspectiva aplicar ao nível industrial, é fundamental a otimização do mesmo, e a biocatálise aplicada à produção de biodiesel não é exceção. Este trabalho pretende dar um contributo nesta temática, mas há consciência de que existe muito para explorar dentro desta temática.



---

## Bibliografia

### I. Referências bibliográficas

- Alcantara, R. Amores, J. Canoira, L. Fidalgo, E. Franco, M.J., 2000. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. *Biomass and Bioenergy*, 18(6), pp.515–527.
- Al-Zuhair, S., Dowaidar, A. & Kamal, H., 2009. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), pp.256–262.
- Amais, R.S. Garcia, Edivaldo E. Monteiro, Marcos R. Nogueira, Ana Rita a., 2010. Direct analysis of biodiesel microemulsions using an inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96(1), pp.146–150.
- Antczak, M., Bielecki, S., Antczak K., Aneta, T., 2009. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, 34(5), pp.1185–1194.
- Atkins, P. & Jones, L., 2006. *Princípios de Química Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente 3o Edição.*, Canadá.
- Azócar, L., Kubiak, A., 2010. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(3), pp.621–36.
- Azócar, L., Ciudad, G., Heipieper, H., Muñoz, R., Navia, R., 2011. Lipase-catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(6), pp.583–9.
- Bajaj, A., Lohan, P., Mehrotra, R., 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), pp.9–14.
- Bisatto, R., 2012. *Poliésteres via catálise enzimática heterogênea.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Chang, H.-M., Liao, H., Shieh, C., 2005. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(3), pp.307–312.
- Chang, R. & Goldsby, K.A., 2013. *Química 11a edição.*,
- Chattopadhyay, S., Das, S., Sen, R., 2011. Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: Standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. *Applied Energy*, 88(4), pp.1251–1256.

- 
- Chattopadhyay, S. & Sen, R., 2013. Development of a novel integrated continuous reactor system for biocatalytic production of biodiesel. *Bioresource technology*, 147, pp.395–400.
- Chen, J.-W. & Wu, W.-T., 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95(5), pp.466–9.
- Chen, Y.-H. Lin, R. Shang, N., 2010. A continuous-flow biodiesel production process using a rotating packed bed. *Bioresource technology*, 101(2), pp.668–73.
- Christopher, L.P. & Zambare, V.P., 2014. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 119, pp.497–520.
- Dossat, V., Combes, D. & Marty, A., 1999. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5), pp.194–200.
- Douglas, S., Donald, W. & Holler, J., 2009. *Fundamentos de Química Analítica 8a edição.*, Norte-Americana.
- Felizardo, P., 2003. *Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Frituras*, Instituto Superior Técnico.
- Felizardo, P., Raposo, I., Berkemeier, R., Mendes, J.F., 2006. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste management (New York, N.Y.)*, 26(5), pp.487–94.
- Freitas, S.V.D., Pratas, M.J., Ceriani, R., Lima, A.S., 2011. Evaluation of Predictive Models for the Viscosity of Biodiesel. *Energy & Fuels*, 25(1), pp.352–358.
- Fu, B. & Vasudevan, P.T., 2009. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. , (13), pp.4105–4111.
- Gog, A., Roman, M., Paizs, C., Irimie, F.D., 2012. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *these*, 39(1), pp.10–16.
- Hajar, M., Shokrollahzadeh, S., Vahabzadeh, F., Monazzami, A., 2009. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), pp.188–194.
- Halim, S. & Kamaruddin, A., 2008. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. *Process Biochemistry*, 43(12), pp.1436–1439.
- Halim, S.F.A., Kamaruddin, A.H. & Fernando, W.J.N., 2009. 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*, 100(2), pp.710–6.
- Hama, S., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Fukuda, H., Kondo, A., 2011a. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. *Biochemical Engineering Journal*, 55(1), pp.66–71.
-



- 
- Hama, S., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Tamadani, N., Kuratani, N., Noda, H., Fukuda, H., Kondo, A., 2011b. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. *Bioresource technology*, 102(22), pp.10419–24.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), pp.53–58.
- Issariyakul, T. & Dalai, A.K., 2014. Biodiesel from vegetable oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, pp.446–471.
- Knothe, G., 2006. Analyzing biodiesel: standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), pp.823–833.
- Lai, C.-C., Zullaikah, S., Vali, S. R., 2005. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(3), pp.331–337.
- Lam, M.K., Lee, K.T. & Mohamed, A.R., 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnology advances*, 28(4), pp.500–18.
- Li, J., Li, J., Li, L., Tong, J., Wang, Y., 2012. Research Development on Lipase-catalyzed Biodiesel. *Energy Procedia*, 16, pp.1014–1021.
- Li, S. & Fan, Y., 2011. Pseudomonas cepacia lipase imobilizada sobre os electrospun membranas PAN nanofibras para a produção de biodiesel a partir de óleo de soja Palavras-chave.
- Liu, Y., Xin, H. & Yan, Y., 2009. Physicochemical properties of stillingia oil: Feasibility for biodiesel production by enzyme transesterification. *Industrial Crops and Products*, 30(3), pp.431–436.
- Lu, J. et al., 2010. Pretreatment of immobilized Candida sp. 99-125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), pp.15–18.
- Lu, J., Zhang, R. & Wang, F., 2009. O pré-tratamento das imobilizada Candida sp . 99-125 lipase para melhorar a sua tolerância metanol para produção de biodiesel Palavras-chave. , (3).
- Maceiras, R. et al., 2011. Enzyme deactivation during biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 166(1), pp.358–361.
- Maurício, S., 2008. A Produção de Biodiesel Alimentares Usados a partir de Óleos - The production of Biodiesel from waste cooking oil. Universidade de Aveiro.
-

- 
- Meher, L., Vidyasagar, D. & Naik, S., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), pp.248–268.
- Melo, S., 2012. Aplicação de biocatalisadores imobilizados na produção de biodiesel. Universidade de Aveiro.
- Mendes, A. a. et al., 2011. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), pp.109–115.
- Modi, M.K. et al., 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource technology*, 98(6), pp.1260–4.
- Moreira, A., 2009. Produção de biodiesel a partir de gordura de frango. Faculdade de Engenharia Universidade do Porto.
- Neto, P., 2002. Obtenção de Ésteres Alquílicos (Biodiesel) por Via Enzimática a partir de Óleo de Soja. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Nie, K. et al., 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), pp.142–147.
- Ognjanovic, N., Bezbradica, D. & Knezevic-Jugovic, Z., 2009. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource technology*, 100(21), pp.5146–54.
- Oliveira, B., 2010. Eficiência de uma lipase na transesterificação de óleo alimentar usado. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Pratas, M.J., Pratas, M.J., Freitas, S.V.D., Oliveira, M.B., Monteiro, S.C., Lima, A.S., Coutinho, J.P., 2011. Biodiesel Density: Experimental Measurements and Prediction Models. *Energy & Fuels*, 25(5), pp.2333–2340. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef2002124>.
- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L. & Muthukumar, K., 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource technology*, 99(10), pp.3975–81.
- Da Rós, P.C.M., 2010. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource technology*, 101(14), pp.5508–16.
- Rosset, I., 2011. Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação. Universidade de São Paulo.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S., 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource technology*, 98(3), pp.648–53.
-

- 
- Salum, T.F.C., 2010. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*, 45(8), pp.1348–1354.
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(2), pp.180–3.
- Sharma, R., Chisti, Y. & Chand, U., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19, pp.627–662.
- Shimada, Y. Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), pp.789–793.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. , 17, pp.133–142.
- Silva, R., 2011. Produção de biodiesel por Catálise Enzimática a Partir de óleo de Cardo. Universidade Técnica de Lisboa.
- Silva, T.A.R. & Neto, W.B., 2013. Estudo da Redução da Acidez do Óleo Residual para a Produção de Biodiesel Utilizando Planejamento Fatorial Fracionado Estudo da Redução da Acidez do Óleo Residual para a Produção de Biodiesel Utilizando Planejamento Fatorial Fracionado. , 5(5), pp.828–839.
- Silva, W., 2013. Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto. Universidade de São Paulo.
- Simões, A., 2011. Síntese enzimática de biodiesel a partir do óleo de babaçu pela rota etílica em reator de leito fixo: estabelecimento das condições operacionais em meio isento de solvente. Universidade de São Paulo.
- Soares, N., 2010. Valorização dos Óleos Alimentares Usados para Produção e Utilização de Biodiesel à Escala Municipal. Universidade Técnica de Lisboa.
- Souza, L., 2010. Síntese Enzimática do Biodiesel de *Jatropha curcas* pela Rota Etílica. Universidade de São Paulo.
- Teixeira, J., 2011. Utilização de Co-solventes na Produção de Biodiesel a partir de Óleo Residual e Etanol por Catálise Enzimática Utilização de Co-solventes na Produção de Biodiesel a partir de Óleo Residual e Etanol por Catálise Enzimática.
- Tosa, M., 2000. A produção de biodiesel utilizando transesterificação enzimática - estado atual e perspectivas Palavras-chave.
- Ventura, S.P.M. et al., 2012. Ionic liquids microemulsions: the key to *Candida antarctica* lipase B superactivity. *Green Chemistry*, 14(6), p.1620.
-

- 
- Volpato, G., 2009. Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 Produzidas em Glicerol. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Wang, X., Liu, X., Zhao, C., Ding, Y., 2011. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. *Bioresource technology*, 102(10), pp.6352–5.
- Wang, Y. & Zhang, L., 2010. Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), pp.90–95.
- Xu, Y., Du, W., Liu, D., 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology Letters*, 25, pp.1239–1241.
- Yaakob, Z., Mohammad, M., Alherbawi, M., Alam, Z., 2013. Overview of the production of biodiesel from Waste cooking oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, pp.184–193.
- Zhang, B. Weng, Y., Xu, H., 2011. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), pp.61–70.
- Zhang, Y., 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, 89(1), pp.1–16.

## II. Sites na internet

- [URL1] About Education, Definition of Cetane Number. Disponível em URL: <http://chemistry.about.com/od/chemistryglossary/g/Cetane-Number-Definition.htm> e acedido em 25/10/2014.
- [URL2] Watson Marlow Pumps Groups, Peristaltic pumps for engineers. Disponível em URL: <http://www.watson-marlow.com/us-en/wmpg/product/process-pumps/> e acedido em 23/04/2014.
- [URL3] Lanxess, Product information Lewatit GF 202. Disponível em URL: <http://www.lenntech.com/Data-sheets/Lewatit-GF-202-L.pdf> e acedido em 20/03/2014.

## III. Legislação

EN 14103 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (*FAME*) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents

---

EN 14105 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (*FAME*) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents

DIRECTIVA 2003/30/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 8 de Maio de 2003 relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes

---

---

## Anexos

### A.1 Massa molar do OAU

Após a identificação dos ésteres presentes na mistura e respetiva fração mássica, procedeu-se à determinação da sua fórmula empírica média. Assim, calculou-se a fração mássica dos elementos  $j$ , correspondentes a C (carbono), H (hidrogénio) e O (oxigénio) através da Equação 4 (vide Tabela A. 2):

$$w_{j,bs} \left[ \frac{\text{kg elemento } j}{\text{kg OAU}} \right] = \frac{\sum (w_{i,bs} \times w_{ji})}{\sum w_{i,bs}} \quad (4)$$

Onde  $w_{j,bs}$  representa a fração mássica (em base seca – bs) de cada um dos ésteres detetados por CG e  $w_{ji}$  representa a fração mássica do elemento  $j$  em cada um dos ésteres, sendo dada pela Equação 5 (vide Tabela A. 1).

$$w_{ji} \left[ \frac{\text{kg elemento } j}{\text{kg éster } i} \right] = \frac{n^{\circ} \text{ átomos do elemento } j \times M_j}{M_i} \quad (5)$$

Na equação anterior,  $M$  representa a massa molar. A fórmula empírica geral da mistura de ésteres é então dada por  $C_x H_y O_z$ , onde:

$$x = \frac{\left( \frac{W_{C,bs}}{12} \right)}{\text{mínimo} \left( \frac{W_{C,bs}}{12}; \frac{W_{H,bs}}{1}; \frac{W_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (6)$$

$$y = \frac{\left( \frac{W_{H,bs}}{1} \right)}{\text{mínimo} \left( \frac{W_{C,bs}}{12}; \frac{W_{H,bs}}{1}; \frac{W_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (7)$$

$$z = \frac{\left( \frac{W_{O,bs}}{16} \right)}{\text{mínimo} \left( \frac{W_{C,bs}}{12}; \frac{W_{H,bs}}{1}; \frac{W_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (8)$$

A partir desta fórmula empírica é possível determinar a fórmula empírica dos triglicerídeos, sabendo que são necessários três ésteres e um glicerol para formar um triglicerídeo. Para tal, retira-se a cada éster um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) e adiciona-se a cadeia correspondente ao glicerol. Deste procedimento resultam as equações 9, 10 e 11, e a fórmula empírica média dos triglicerídeos é dada por C<sub>xx</sub> H<sub>yy</sub> O<sub>zz</sub>, onde (vide Tabela A. 2):

$$xx = (3 \times x) \quad (9)$$

$$yy = (3 \times y) - 4 \quad (10)$$

$$zz = (3 \times z) \quad (11)$$

Na Tabela A. 1 representa a fração mássica (bs) de cada um dos ésteres detetados no GC e respetiva representação mássica do elemento *j* em cada um dos ésteres.

**Tabela A. 1 Massas obtidas de cada um dos ésteres detetados por GC e respetiva representação da fração mássica do elemento *j* em cada um dos ésteres.**

Ésteres	Massa (bs) [%]	W <sub>i,bs</sub> [kg i/kg R]	Fórmula	PM [g/mol]	Elementos [%] bs		
					C	H	O
C16:0	19,5%	0,195	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270,0	0,756	0,126	0,119
C18:2	11,4%	0,114	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294,0	0,776	0,116	0,109
C18:1	61,7%	0,617	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296,0	0,770	0,122	0,108
C18:0	4,2%	0,042	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298,0	0,765	0,128	0,107
C20:1	1,8%	0,018	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	324,0	0,778	0,123	0,099
C20:0	1,4%	0,014	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326,0	0,773	0,129	0,098
C22:0	0,0%	0,000	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	352,0	0,784	0,125	0,091



Tabela A. 2 Fórmula empírica dos *FAME* e triglicerídeo e respectivas massas molares.

Elementos	Fórmula empírica				C19H36O2	C57H104O6
	$W_{j,bs}$ [kg j/kg bs]	PM [g/mol]	$w_{j,bs}/PM$	Índice	<i>FAME</i> PM [g/mol]	Triglicerídeo Índice PM [g/mol]
C	0,768	12	6,40E-02	19		57
H	0,122	1	1,22E-01	36	296,0	104
O	0,110	16	6,87E-03	2		6

## A.2 Índice de acidez da mistura de OAU + ácido oleico

Neste trabalho experimental foram efetuados ensaios, com misturas de OAU com ácido oleico, determinou-se o índice de acidez pelo método automático, na qual se obteve os seguintes resultados (e.g. vide Figura A. 1), que se encontram compilados na Tabela A. 3.

### Sample data

ID1 ..... OAU  
Sample size ..... 1.0 g

### End points

#### DET pH.1

EP1 ..... 5.628 pH ..... 0.0450 mL  
EP2 ..... 8.174 pH ..... 0.7388 mL  
EP3 ..... 9.434 pH ..... 0.8475 mL

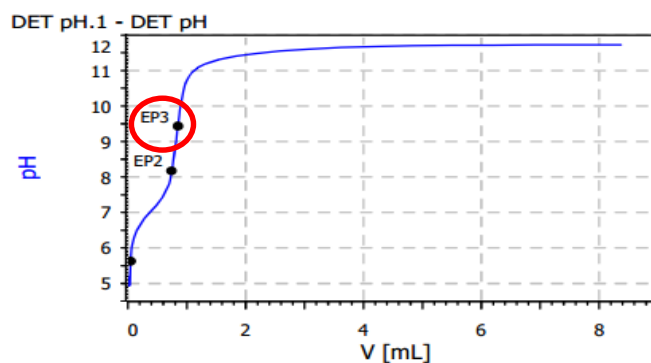


Figura A. 1 Relatório obtido na titulação de automático, para obter o índice de acidez do OAU sem ácido oleico.

Tabela A. 3 Síntese dos parâmetros obtidos em cada mistura de OAU.

	óleo+0% ácido oleico	óleo+10% ácido oleico	óleo+25% ácido oleico	óleo+50% ácido oleico
pH	9,434	9,068	8,835	8,563
Volume (mL)	0,848	6,005	22,445	32,735
Índice de acidez	2,302	16,785	68,342	104,009

### A.3 Cálculos efetuados na preparação da reação de produção de Biodiesel

Neste anexo é possível consultar-se um exemplo de cálculo de um dos ensaios realizados no planeamento fatorial. Como auxiliar para a medição da razão mássica Novozyme® 435/ OAU, razão molar metanol/ OAU, bem como a razão volumétrica tert-butanol: OAU tanto no processo de produção descontinuo agitado, como de leite lixo continuo.

De seguida, na Tabela A. 4 são apresentados as condições aplicadas nos ensaios, tendo em atenção que em alguns ensaios testavam-se determinadas condições de operação. Um exemplo de cálculo aplicados nesta fase de planeamento estão apresentados a seguir:

(e.g. no ensaio de aplicação do método de regeneração na reutilização da Novozyme® 435)

- Razão molar metanol/ OAU (4:1)

$$m_{MeOH} = \frac{5g \text{ OAU} \times \left(4 \times 32 \frac{g}{mol}\right)}{884 \frac{g}{mol}} = 0,73 \text{ g de MeOH}$$

$$V_{MeOH} = \frac{0,73 \frac{g}{MeOH}}{0,79 \frac{g}{cm^3}} = 0,92 \text{ mL}$$

- Razão volumétrica tert-butanol/ OAU (0.75v/v)

$$\rho_{OAU \ 15^\circ C} = 920,01 \text{ g/L}$$

$$V_{OAU} = \frac{5 \text{ g OAU}}{920,01 \text{ g/L}} = 5,43 \text{ mL OAU}$$

- Razão mássica catalisador/ OAU (10%)

$$m_{Novozyme \ 435} = \frac{5 \text{ g OAU} \times 10\%}{100} = 0,5 \text{ g Novozyme® 435}$$

**Tabela A. 4 Condições de operação na produção de biodiesel, num reator descontínuo agitado.**

	<b>Parâmetros</b>	<b>Ensaio</b>
<b>OAU + ác.oleico</b>	$V_{\text{OAU}}$ [mL]	10
	$V_{\text{ác.oleico}}$ [mL]	0
	$\rho_{\text{OAU}}$ [g/L]	979
	$\rho_{\text{ác.oleico}}$ [g/L]	990
	%OAU [w/w]	50%
	$M_{\text{OAU}}$ [g/mol]	884
	$M_{\text{ác.oleico}}$ [g/mol]	282
	$\rho_{\text{OAU + ác.oleico}}$ (g/L)	837,2
	$m_{\text{OAU + ác.oleico}}$ (g)	3,00
	$V_{\text{OAU + ác.oleico}}$ (mL)	3,58
<b>MeOH</b>	$M$ (g/mol)	32
	$\rho$ 20° (g/cm <sup>3</sup> )	0,79
	$m$ (g) 4:1	0,43
	$V$ (mL)	0,55
<b>Solvente</b>	Solvente:OAU+ác.oleico (v/v)	75%
	$V_{\text{solvente}}$ (mL)	2,69
<b>Catalisador</b>	Catalisador:OAU+ác.oleico (w/w)	10,0%
	$m_{\text{catalisador}}$ (g)	0,3096

**Tabela A. 5 Condições de operação na produção de biodiesel, num reator tubular de leito fixo.**

	<b>Parâmetros</b>	<b>Ensaio 1</b>
<b>OAU + ác.oleico</b>	$V_{\text{OAU}}$ [mL]	10
	$V_{\text{ác.oleico}}$ [mL]	0
	$\rho_{\text{OAU}}$ [g/L]	979
	$\rho_{\text{ác.oleico}}$ [g/L]	990
	%OAU [w/w]	100%
	$M_{\text{OAU}}$ [g/mol]	884
	$M_{\text{ác.oleico}}$ [g/mol]	282
	$\rho_{\text{OAU + ác.oleico}}$ (g/L)	979,3
	$m_{\text{OAU + ác.oleico}}$ (g)	100,00
	$V_{\text{OAU + ác.oleico}}$ (mL)	102,11
<b>MeOH</b>	M (g/mol)	32
	$\rho_{20^\circ}$ (g/cm <sup>3</sup> )	0,79
	m (g) 4:1	14,48
	V(mL)	18,33
<b>Solvente</b>	Solvente:OAU+ác.oleico (v/v)	75%
	$V_{\text{solvente}}$ (mL)	76,59
<b>Catalisador</b>	m catalisador (g) pesada	1.68

#### **A.4 Ficha técnica da Lewatit® GF 202**

A resina Lewatit® GF 202 foi desenvolvida pela Lanxess especialmente para purificação de biodiesel removendo o glicerol. As propriedades físico-químicas desta resina de troca iónica estão disponíveis na Tabela A. 6 e Tabela A. 7

**Tabela A. 6 Descrição geral da resina Lewatit® GF 202 [URL3].**

<b>Descrição geral</b>	
<b>Forma iónica</b>	Neutro
<b>Grupo funcional</b>	0,00
<b>Estrutura</b>	0,65
<b>Aparência</b>	52-57

Tabela A. 7 Propriedades físicas e químicas da resina Lewatit® GF 202 [URL3].

Propriedades físicas e químicas	
Temperatura máxima (°C)	50
Densidade (g/mL)	1,24
Capacidade de absorção de glicerol (g/L)	250
pH	6-10
Tamanho de poros (mm)	(0,65±0,05)

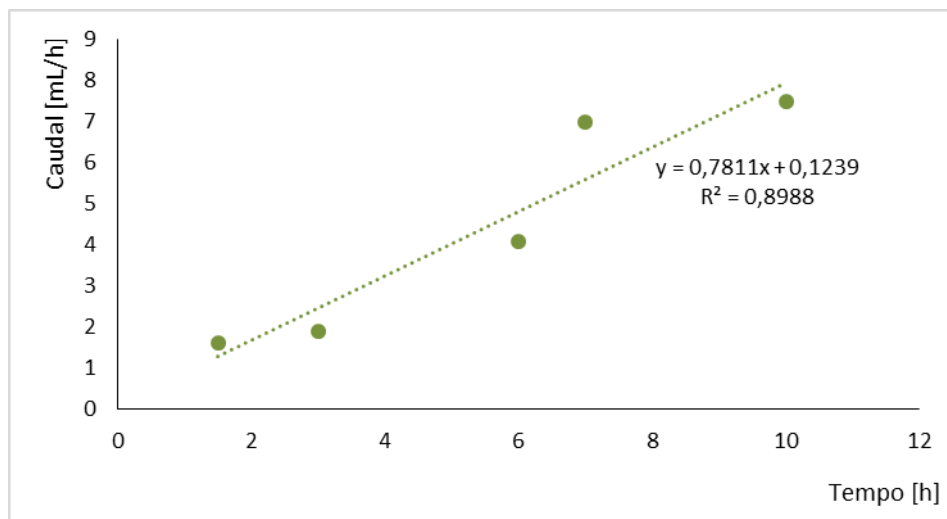
### A.5 Valores de caudal obtidos nos testes do caudal da bomba peristáltica

Neste anexo estão presentes, os testes que se realizou para calibrar a bomba peristáltica Watson Marlow 505S tubo de 0,64 mm de diâmetro [URL2].

Tabela A. 8 Calibração da bomba Watson Marlow 505S.

Rotação [rpm]	$\Delta t$ [h]	Q [mL/h]	$\sigma$	Coef.var.
1,5	1,027	1,60	0,30	19,0%
3	1,903	1,90	1,90	3,9%
6	3,890	4,10	1,00	15,0%
7	1,600	8,00	1,30	16,0%
10	0,789	7,50	0,07	0,9%

Na Figura A. 2 apresenta a reta de calibração, com a respetiva equação obtida aonde se pode retirar o declive, correlação e interceção.



**Figura A. 2** Retas de calibração da bomba peristáltica Watson Marlow 505 S.

A rotação que se definiu para bombear a mistura reacional pelo sistema foi 7 rpm, correspondente a um caudal de 8 mL/h.

### A.6 Quantidade de Novozyme® 435 necessária para operar num reator tubular de leito fixo

No presente anexo é possível consultar-se os cálculos efetuados para determinar a densidade da Novozyme® 435, bem como a quantidade de lipase necessária para operar num reator tubular de leito fixo.

A densidade da *Novozyme*® 435 foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com *tert*-butanol à 20°C. Adicionou-se uma massa conhecida de *Novozyme*® 435 no interior do balão. O balão volumétrico foi aferido com *tert*-butanol, determinando o volume ocupado pela lipase por diferença de massa após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelas lipases. Todos estes parâmetros e cálculos estão representados na Tabela A. 9, bem como as respetivas equações usadas (vide Equação 12,13,14 e 15).

**Tabela A. 9** Densidade da *Novozyme*® 435 na presença de *tert*-butanol.

	$\rho_{\text{t-butanol}}^{(13)}$ [g/mL]	$m_{\text{total}}^{(14)}$ [g]	$m_{\text{lipase}}^{(14)}$ [g]	$V_{\text{lipase}}^{(15)}$ [mL]	$\rho_{\text{lipase}}^{(16)}$ [g/mL]	$\rho_{\text{lipase}}$ [g/mL]	$\sigma$	Coef .var.
# R1	0,7481	63,5856	1,0060	0,8091	1,2433			
# R2	0,7463	63,4120	1,0124	0,9345	1,0834	1,1964	0,10	8,2%
# R3	0,7482	63,6050	1,0089	0,7991	1,2626			

$$\rho_{\text{tert-butanol}} = \frac{m_{\text{tert-butanol}}}{V_{\text{tert-butanol}}} \quad \text{Eq. (12)}$$

$$m_{\text{lípase}} = m_{\text{total}} - m_{\text{tert-butanol}} \quad \text{Eq. (13)}$$

$$V_{\text{lípase}} = V_{\text{picnómetro}} - V_{\text{tert-butanol}} \quad \text{Eq. (14)}$$

$$\rho_{\text{lípase}} = \frac{m_{\text{lípase}}}{V_{\text{lípase}}} \quad \text{Eq. (15)}$$

Na seguinte tabela esta resumido a quantidade de Novozyme<sup>®</sup> 435 utilizada, bem como as dimensões do reator tubular de leito fixo.

**Tabela A. 10 Síntese dos parâmetros usadas nos ensaios de produção de biodiesel em reatores tubulares de leito fixo.**

	1º reator de <i>Novozyme<sup>®</sup> 435</i>	2º reator de <i>Novozyme<sup>®</sup> 435</i>
$\rho$ do Novozyme <sup>®</sup> 435 (g/mL)	1,196	1,196
m Novozyme <sup>®</sup> 435 (g)	1,680	1,550
V Novozyme <sup>®</sup> 435 (mL)	1,404	1,296
Raio do reator (cm)	0,800	0,800
Comprimento do reator (cm)	10,000	10,000
V reator (mL)	20,106	20,106

## A.7 Tempos de retenção dos GC

Do presente anexo consta, os tempos de retenção das diferentes colunas cromatográficas.

**Tabela A. 11 Tempos de retenção dos ésteres de metil de cada coluna.**

Éster de metil	Tempos de retenção		
	coluna TRB-5MS (60 m×0,25 mm ×0,25 μm)	coluna capilar <i>CP Select<sup>TM</sup></i> <i>biodiesel for FAME</i> (30 m×0,32 mm ×0,25 μm)	coluna TRB-1MS (30 m×0,32 mm ×0,25 μm)
C16:0	26.46	22.94	37.29
C17:0	28.36	24.60	38.71
C18:2	29.69	26.24	-
C18:1	30.14	26.80	-
C18:0	-	-	39.61
C20:1	33.25	28.90	-
C20:0	33.64	31.50	42.12
C24:0	39.99	34.27	46.59

---

## A.8 Destino dos resíduos produzidos neste trabalho

Na tabela que se segue sumaria-se os resíduos produzidos no presente trabalho, assim como o respetivo destino.

**Tabela A. 12 Resíduos gerados neste estudo e respetivo destino**

<b>Resíduo</b>	<b>Destino</b>
Enzimas	Armazenamento para posterior reutilização.
<i>FAME</i>	Armazenamento em recipiente com vista a posterior valorização.
Resíduos indiferenciados	Encaminhamento para tratamento juntamente com os restantes resíduos produzidos pelo Departamento de Ambiente e Ordenamento.
Solventes recuperados	Armazenamento e reutilização em trabalhos posteriores.