

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO USO DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM NA SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VITÓRIA OLAVE DE FREITAS

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO USO DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM NA SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS**

VITÓRIA OLAVE DE FREITAS

Engenheira Química

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Orientador:

Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador:

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a defesa de Dissertação de Mestrado, cujo projeto intitulado *Avaliação do uso da tecnologia de ultrassom na síntese enzimática de ésteres etílicos* elaborada por Vitória Olave de Freitas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento

Prof^a. Dr^a Giandra Volpato

Dr^a. Jakeline Poppe Todeschini

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marco Antônio Záchia Ayub, pelos ensinamentos, pela confiança depositada e pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

Ao meu co-orientador, Rafael Costa Rodrigues, pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho, disponibilidade e ensinamentos.

Aos membros da Comissão Examinadora pela disponibilidade e sugestões.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ), pela oportunidade.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os colegas do BBB (Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise) pela amizade e por todos os momentos compartilhados.

À colega e amiga Carla Matte, que mesmo distante, esteve sempre presente, dando conselhos e ajudando de maneira incondicional para o desenvolvimento deste trabalho.

À bolsista Eliara, que colaborou na execução dos experimentos.

Às colegas do PPGEQ, Maria Eugênia, Letícia e Adriane, pela amizade construída durante o mestrado.

Um agradecimento especial aos meus pais, Magda e Edison, que foram a base para eu chegar até aqui, estiveram sempre ao meu lado, me dando amor, incentivando e apoiando minhas decisões. Amo muito vocês, obrigada por tudo!

Ao meu namorado, Marcelo, que esteve ao meu lado durante esta jornada. Muito obrigada pelo amor, amizade, companheirismo e apoio incondicional. Te amo!

Aos familiares e amigos, em especial a minha amiga-irmã Priscila Baruffi, que mesmo distante, sempre se fizeram presentes, incentivando minha caminhada e tornando os momentos difíceis mais leves. Obrigada pela amizade!

Resumo

Estudos vem mostrando resultados promissores na utilização da tecnologia de ultrassom para a produção enzimática de biodiesel. Estes são atribuídos ao fenômeno de cavitação gerado pelo equipamento de ultrassom, o qual promove um aumento da miscibilidade entre os reagentes, melhorando a transferência de massa e a taxa da reação, proporcionando reações mais rápidas, bem como um menor consumo de reagentes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições da reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel, utilizando o conceito de *combi-lipase* em um reator enzimático assistido por ultrassom. Foram otimizadas as condições do sistema de ultrassom: amplitude (30-70 %), pulso (30-70 %) e tempo de pulso (5-15 s), através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Os parâmetros reacionais: concentração de biocatalisador (5, 15 e 25 % em relação a massa de óleo) e razão molar do substrato (3:1, 6:1 e 9:1) foram estudados, assim como a influência do uso do solvente terc-butanol e de um sistema de agitação combinado ao ultrassom, na conversão de ésteres etílicos. Avaliou-se também a eficiência do *combi-lipase* (75 % Novozym 435 + 10 % Lipozyme TL-IM and 15 % Lipozyme RM-IM) frente ao uso dos biocatalisadores individualmente. Obteve-se como condições ótimas para o sistema de ultrassom: 30 % de amplitude, 50 % de pulso e 15 s de tempo de pulso, 15 % de enzima em relação a massa de óleo e uma razão molar de 3:1 etanol:óleo de soja. Os rendimentos de conversão de ésteres etílicos na ausência do solvente terc-butanol foram similares aos resultados obtidos na presença deste reagente, sugerindo que a tecnologia de ultrassom é capaz de eliminar a necessidade do uso de solventes em reações de transesterificação enzimática. Entretanto, o uso combinado de um sistema de agitação com o ultrassom, reduziu o rendimento da reação. Em relação às enzimas, o *combi-lipase* mostrou melhores resultados para a síntese enzimática de ésteres etílicos, do que o uso das enzimas individualmente. Utilizando as condições ótimas avaliadas neste estudo e o conceito de *combi-lipase* em um reator assistido por ultrassom, obteve-se uma conversão de ésteres etílicos de aproximadamente 75 % em 5 horas de reação.

Palavras-chave: Biodiesel, lipases, *combi-lipases*, ultrassom, reatores enzimáticos.

Abstract

Studies have been showing promising results for the use of ultrasonic technology in enzymatic production of biodiesel, which are attributed to the cavitation phenomenon generated by the ultrasound equipment, that promotes increased miscibility between the reactants, improving mass transfer and reaction rate, providing faster reactions as well as a lower consumption of reagents. The aim of this work was to optimize ultrasonic (amplitude, pulse and time pulse) and reaction (molar ratio and enzyme concentration) parameters, as well as the influence of solvent (tert-butanol) and ultrasound combined with mechanical stirring, on the transesterification of soybean oil catalyzed by *combi-lipase* biocatalyst. It was also evaluated the efficiency of the *combi-lipase* (75 % Novozym 435 + 10 % Lipozyme TL-IM and 15 % Lipozyme RM-IM), compared to individual lipases. The optimum conditions for transesterification reaction, were observed being: enzyme concentration, 15 % (by oil mass); ethanol:oil molar ratio, 3:1; ultrasonic amplitude 30 %, pulse, 30 % and time pulse, 15 s. The yields of conversion of ethyl esters with and without solvent were very similar, indicating that ultrasonic technology is able to supply the need of solvents in enzymatic transesterification reactions. The combined use of a mechanical stirring system with ultrasound, reduced the yields of conversion of this reaction, while the *combi-lipase* showed better results than the use of individual lipases for soybean oil transesterification. Using the optimum conditions evaluated in this study and the concept of *combi-lipase* in an ultrasonic-assisted batch reactor, led to conversions of ethyl esters of about 75% in 5 hours.

Keywords: Biodiesel; lipases; *combi-lipase*; ultrasound; enzymatic reactors.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 – Introdução | 1 |
| CAPÍTULO 2 - Revisão bibliográfica..... | 4 |
| 2.1 Biodiesel | 4 |
| 2.1.1 Matéria prima..... | 5 |
| 2.1.2 Reações de síntese de biodiesel | 7 |
| 2.2 Enzimas como biocatalisadores para a reação de transesterificação | 8 |
| 2.2.1 Lipases | 8 |
| 2.2.2 Estrutura e mecanismo de atuação das lipases..... | 10 |
| 2.2.3 Reação de transesterificação enzimática..... | 11 |
| 2.3 Biorreatores para a síntese de biodiesel | 12 |
| 2.3.1 Reator enzimático em batelada | 13 |
| 2.3.2 Reator enzimático contínuo | 13 |
| 2.4 Ultrassom | 15 |
| 2.4.1 Princípios físicos e químicos do uso do ultrassom | 15 |
| 2.4.2 O uso do ultrassom para a síntese enzimática de biodiesel | 16 |
| CAPÍTULO 3 - Materiais e métodos | 24 |
| 3.1 Materiais | 24 |
| 3.1.1 Biocatalisadores e reagentes utilizados para a síntese de biodiesel..... | 24 |
| 3.1.2 Sistema reacional | 24 |
| 3.2 Procedimento experimental | 26 |
| 3.2.1 Experimentos preliminares | 26 |
| 3.2.1.1 Avaliação de um sistema constituído por reatores de leito fixo conectados em série para a síntese enzimática de ésteres etílicos | 26 |
| 3.2.1.2 Avaliação de reatores de leito fluidizado para a reação de síntese enzimática de ésteres etílicos..... | 27 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 3.2.2 | Condições da reação de transesterificação..... | 31 |
| 3.2.3 | Avaliação de diferentes amplitudes do ultrassom..... | 31 |
| 3.2.4 | Delineamento composto central rotacional..... | 31 |
| 3.2.5 | Avaliação de diferentes concentrações de biocatalisador | 32 |
| 3.2.6 | Avaliação de diferentes razões molares do substrato | 33 |
| 3.2.7 | Efeito do solvente | 33 |
| 3.2.8 | Efeito do uso de um sistema de agitação contínuo | 33 |
| 3.2.9 | Cinética da reação de transesterificação | 33 |
| 3.2.10 | Avaliação do uso das enzimas individualmente comparadas ao <i>combi-lipase</i> 33 | |
| 3.3 | Análise cromatográfica | 34 |
| 3.3.1 | Purificação e preparação da amostra..... | 34 |
| 3.3.2 | Condições cromatográficas..... | 34 |
| CAPÍTULO 4 - Resultados e discussão | | 36 |
| 4.1 | Resultados e considerações dos experimentos preliminares..... | 36 |
| 4.1.1 | Avaliação de um sistema constituído por reatores de leito fixo conectados em série para a síntese enzimática de ésteres etílicos | 37 |
| 4.1.2 | Avaliação de reatores de leito fluidizado para a reação de síntese enzimática de ésteres etílicos..... | 38 |
| 4.2 | Cinética da reação de transesterificação | 41 |
| 4.3 | Otimização das condições do sistema de ultrassom para a reação de transesterificação | 42 |
| 4.4 | Avaliação de diferentes concentrações de biocatalisador | 48 |
| 4.5 | Avaliação de diferentes razões molares do substrato | 51 |
| 4.6 | Efeito do uso do solvente terc-butanol na reação de transesterificação..... | 53 |
| 4.7 | Efeito do uso de um sistema de agitação | 55 |
| 4.8 | Avaliação do uso das enzimas individualmente comparadas ao <i>combi-lipase</i> | |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 5 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros..... | 60 |
| Referências | 62 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1- Reação de transesterificação..... | 7 |
| Figura 2 – Representação esquemática da ativação interfacial de lipases..... | 10 |
| Figura 3 – Distintas conformações da lipase de <i>Candida rugosa</i> | 11 |
| Figura 4 - Esquema das quatro principais configurações de reatores..... | 13 |
| Figura 5 – Reator batelada para síntese de biodiesel com sonda de ultrassom acoplada. | 25 |
| Figura 6 - Reator utilizado para síntese enzimática de biodiesel | 26 |
| Figura 7 - Esquema experimental dos reatores de leito fixo em duplo estágio..... | 27 |
| Figura 8 - Reatores utilizados para as reações de síntese de biodiesel em leito fluidizado..... | 28 |
| Figura 9 - Esquema experimental para o reator de leito fluidizado com recirculação lateral .. | 28 |
| Figura 10- Esquema experimental 1 para o reator de leito fluidizado com recirculação entre a base e o topo do reator..... | 30 |
| Figura 11 - Esquema experimental 2 para o reator de leito fluidizado com recirculação entre a base e o topo do reator..... | 30 |
| Figura 12 – Influência de diferentes amplitudes no rendimento da síntese enzimática de biodiesel..... | 42 |
| Figura 13 – Curvas de contorno para a reação de síntese enzimática de ésteres etílicos em função da taxa inicial da reação, para as variáveis (A) amplitude versus pulso; (B) tempo de pulso versus pulso; (C) amplitude versus tempo de pulso. | 46 |
| Figura 14 – Avaliação de diferentes percentuais de biocatalisador na síntese de ésteres etílicos | 49 |
| Figura 15 - Avaliação de diferentes razões molares do substrato na síntese de ésteres etílicos | 51 |
| Figura 16 - Avaliação do uso do solvente terc-butanol na reação de transesterificação | 54 |
| Figura 17 - Efeito do uso de um sistema de agitação contínuo na reação de transesterificação | 55 |
| Figura 18 - Avaliação do uso das enzimas individualmente comparadas ao <i>combi-lipase</i> | 57 |
| Figura 19 - Cinética da reação de transesterificação para o <i>combi-lipase</i> e para a enzima TLL | 57 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Matéria-prima utilizadas para produção de biodiesel a nível mundial | 6 |
| Tabela 2 - Compilação dos principais parâmetros reacionais otimizados para a síntese enzimática de biodiesel utilizando a tecnologia de ultrassom..... | 18 |
| Tabela 3 – Composição de ácidos graxos e propriedades físico-químicas do óleo de soja | 24 |
| Tabela 4 – Especificação dos equipamentos utilizados no sistema reacional para produção de biodiesel..... | 25 |
| Tabela 5 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR..... | 29 |
| Tabela 6 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR..... | 32 |
| Tabela 7 - Taxa inicial da reação para diferentes amplitudes de ultrassom | 41 |
| Tabela 8 - Resposta do DCCR para as condições do sistema de ultrassom | 43 |
| Tabela 9 – Análise estatística do DCCR para as condições do sistema de ultrassom..... | 44 |
| Tabela 10 – Resultado da otimização das variáveis do sistema de ultrassom para a reação de transesterificação. | 47 |

Lista de abreviaturas

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

CALB - Novozym 435

CG – Cromatógrafo gasoso

CSTR – Reator de tanque agitado

DCCR – Delineamento composto central cotacional

FID –Detector de ionização de chama

FBR – Reator de coluna de leito fluidizado

PBR – Reator de coluna de leito fixo

PNPB – Programa nacional de produção e uso do biodiesel

RML - Lipozyme RM-IM

TLL - Lipozyme TL-IM

CAPÍTULO 1 – Introdução

A crescente demanda mundial por combustíveis como fontes de energia e os graves problemas ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis, resultaram em ações governamentais e incentivos a pesquisa e desenvolvimento de fontes renováveis de energia, como é o caso dos biocombustíveis (AARTHY et al., 2014). O Brasil em 2005 lançou a Lei nº 11.097 que estabelece a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao diesel de petróleo (BRASIL, 2005). Este percentual iniciou com 2 % em 2005 e atualmente (2018) chega a 10 % (MME, 2017), colocando o Brasil em destaque no mercado internacional neste segmento, sendo o segundo maior produtor mundial de biodiesel (BRASIL, 2017).

Segundo a resolução da ANP, o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais, designado B100, conforme especificação contida no Regulamento Técnico ANP nº 4/2004 (ANP, 2008).

Biodiesel pode ser produzido a partir de diferentes fontes lipídicas, dentre elas, óleos vegetais, gordura animal, óleos e gorduras residuais, além de microalgas e cianobactérias (BASKAR; AISWARYA, 2016). A escolha da matéria-prima normalmente depende da produção regional (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014), no caso do Brasil, tem-se o predomínio do óleo de soja, representando aproximadamente 68 % da fonte lipídica usada na produção de biodiesel (ANP, 2018).

Devido a algumas propriedades químicas e físicas dos óleos vegetais, como a acidez, viscosidade, presença de ácidos graxos livres, entre outras, existe uma limitação na aplicação direta destes óleos nos motores a diesel. Sendo assim, a fim de adequar essas propriedades, diferentes métodos vêm sendo aplicados, e a transesterificação vem se mostrando como a melhor alternativa (AMINI et al., 2016).

A reação de transesterificação ocorre entre uma fonte lipídica e um álcool primário (principalmente metanol e etanol), produzindo biodiesel e glicerol como principal subproduto (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014). Essas reações são favorecidas na presença de catalisadores, os quais podem ser químicos (ácidos e básicos) ou enzimáticos. Atualmente, a rota tecnológica mais utilizada para a produção industrial de biodiesel é a rota alcalina, devido a sua rapidez, simplicidade e eficiência. No entanto, durante este processo, ocorrem reações secundárias indesejáveis, como a saponificação dos ácidos graxos livres, que consomem parte do

catalisador, reduzindo o rendimento da reação (YU et al., 2010). Além disso, a catálise química em geral apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade na transesterificação de gorduras com elevado teor de ácidos graxos, o elevado consumo de energia, além da difícil remoção da água e sais inorgânicos do produto final (BAJAJ et al., 2010).

A fim de contornar essas dificuldades, a catálise enzimática vem sendo estudada como uma alternativa promissora para a reação de transesterificação. As lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis. No entanto, em meios reacionais com restrição de água, podem catalisar também reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, 2015). Estes biocatalisadores podem ser obtidos a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo os de origem microbiana os mais utilizados em processos de síntese orgânica, como é o caso das lipases de *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*, entre outras (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007). As principais vantagens da rota enzimática comparada aos demais processos, está na especificidade pelo substrato e seletividade do biocatalisador, características controladas pelas propriedades moleculares da enzima. Além dessas vantagens, as lipases operam em condições brandas de reação, algumas são estáveis em alguns tipos de solventes orgânicos, além de minimizarem a formação de reações secundárias indesejáveis (PAQUES; MACEDO, 2006).

As lipases são classificadas em três grupos: enantiosseletivas, tipo-seletivas e regioseletivas. As lipases regioseletivas apresentam especificidade em relação a posição do grupo funcional da molécula no substrato, sendo classificadas em: não específicas, ácido graxo específicas e 1,3-específicas (PAQUES; MACEDO, 2006). Com base nessa característica, surgiu um novo conceito de biocatalisador, o qual utiliza uma mistura de lipases (*combi-lipase*) com diferentes especificidades, com o propósito de catalisar substratos de constituição heterogênea, melhorando assim a produtividade dessas reações (ALVES et al., 2014).

A escolha do reator é uma etapa crucial para o sucesso de um determinado bioprocessos e deve ser avaliada de acordo com a necessidade de cada caso. Esta escolha será influenciada pelas condições reacionais, bem como pelas características da bioconversão, tais como a cinética de conversão da enzima, mecanismos de transferência de massa e hidrodinâmica do processo. Existem diversas conformações de reatores para processos enzimáticos, sendo as principais: reatores batelada ou contínuo de tanque agitado e reatores em coluna de leito fixo ou fluidizado (POPPE et al., 2015a).

O processo de produção de biodiesel via catálise enzimática apresenta como limitantes a cinética lenta do processo, bem como a dificuldade na transferência de massa entre o substrato e a enzima. Desta forma, estudos utilizando a tecnologia de ultrassom vem sendo realizados afim de melhorar essas características do processo de transesterificação. Isso é possível pois as ondas ultrassônicas geram uma forte vibração no meio líquido em que estão inseridas, fenômeno conhecido por cavitação (MARTINES; DAVOLOS; JÚNIO, 2000). Essa vibração promove uma agitação mais eficiente da mistura reacional que os reatores convencionais, aumentando a miscibilidade entre os reagentes, melhorando assim a transferência de massa e a taxa da reação, proporcionando reações mais rápidas, bem como um menor consumo de reagentes (YU et al., 2010). Em reações assistidas por ultrassom, a potência fornecida pelo equipamento é um fator importante, o qual influencia diretamente no grau de conversão da reação. Ondas ultrassônicas de elevada intensidade proporcionam uma melhor transferência de massa quando comparadas com as de baixa intensidade, no entanto podem levar a desnaturação da enzima (SUBHEDAR; GOGATE, 2016).

Baseado nos aspectos mencionados acima, o objetivo geral deste trabalho foi otimizar as condições da reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel, utilizando o conceito de *combi-lipase* em um reator enzimático assistido por ultrassom.

Os objetivos específicos foram:

1. Estudar a síntese enzimática de ésteres etílicos utilizando o conceito de *combi-lipase* em um reator assistido por ultrassom;
2. Testar diferentes amplitudes de ultrassom na síntese enzimática de ésteres etílicos;
3. Avaliar, através de um planejamento estatístico, a influência das condições do sistema de ultrassom: amplitude, pulso e tempo de pulso na taxa inicial da reação de síntese de ésteres etílico;
4. Otimizar as condições de percentual de enzima e razão molar na síntese de éster etílicos;
5. Verificar a influência do uso do solvente terc-butanol e de um sistema de agitação contínuo combinado ao uso do ultrassom na síntese de ésteres etílicos.

CAPÍTULO 2 - Revisão bibliográfica

2.1 Biodiesel

A crescente demanda mundial por combustíveis como fontes de energia e os graves problemas ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis, vem impulsionando a busca por novas fontes de energia, as quais sejam renováveis, sustentáveis, ao mesmo tempo eficientes e economicamente viáveis. Neste contexto, os biocombustíveis, principalmente o etanol e o biodiesel, vêm ganhando cada vez mais atenção a nível mundial, como uma alternativa aos combustíveis fósseis (AARTHY et al., 2014; JOSHI GIRDHAR, PANDEY JITENDRA K., RANA SRAVENDRA, 2017; MENEZES, 2016).

O biodiesel tem se tornado uma das fontes de energia renovável mais promissoras deste século (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014). Uma das suas principais vantagens é poder ser utilizado em motores e veículos já existentes, sem grandes alterações na sua estrutura, podendo ser aplicado na sua forma pura (B100) ou misturado, em qualquer proporção, com o diesel de petróleo (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). Além disso, possui um alto ponto de fulgor, que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros, é biodegradável, reduz a emissão dos principais causadores da poluição atmosférica, é derivado de matérias primas renováveis de origem vegetal, as quais absorvem o CO₂ liberado pela sua queima, equilibrando assim o balanço negativo gerado pela emissão deste gás na atmosfera (RODRIGUES, 2009).

Segundo o Art. 2º da Resolução nº 7 de 2008 da Agência Nacional de Petróleo (ANP), biodiesel é definido como:

Biodiesel – B100 - combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico, parte integrante desta Resolução (ANP, 2008);

Ações governamentais em todo o mundo, vem impulsionando a produção e o consumo de fontes renováveis de energia, através de metas para quotas de mistura e do incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de biocombustíveis, através de mecanismos de apoio financeiro e político (CASTANHEIRA et al., 2014). No Brasil, em 2004 foi lançado pelo Governo Federal, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) com o objetivo de inserir este biocombustível na matriz energética brasileira. Com a Lei nº 11.097/2005 ficou estabelecida a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de 2 % de biodiesel ao diesel de petróleo, o qual entrou em vigor em janeiro de 2008. Atualmente este percentual é de 10 %, o qual passou a vigorar em 1º de Março de 2018, com a antecipação

em um ano do prazo máximo determinado pela Lei 13.263/16, aprovado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) (MME, 2017)

A capacidade de produção de biodiesel do Brasil é de 7,4 bilhões de litros ao ano, no entanto em 2016, devido a retração da economia dos últimos dois anos, foi de apenas 3,8 bilhões de litros para atender o mercado obrigatório. Estes dados mostram a capacidade do País em reduzir sua dependência de importação do diesel de petróleo, que no ano de 2015 foi de 7 bilhões de litros, através do aumento da mistura de biodiesel no diesel. Além desta vantagem, o aumento na produção deste biocombustível diversifica a matriz de combustíveis e energética além de gerar novos empregos de forma direta e indireta. Sendo assim, o uso do biodiesel proporciona além dos benefícios ao meio ambiente, benefícios sociais e econômicos ao País (UBRABIO, 2016).

2.1.1 Matéria prima

A escolha das matérias primas envolvidas no processo de síntese de biodiesel representam 75 % do investimento total de produção, influenciando significativamente no custo final deste biocombustível (BASKAR; AISWARYA, 2016). Desta forma, faz-se necessário uma cuidadosa seleção das matérias primas que irão compor a mistura reacional.

Para a síntese de biodiesel as matérias primas utilizadas são basicamente: i) uma fonte lipídica (óleos vegetais, gordura animal, óleos e gorduras residuais, óleos produzidos por algas e cianobactérias); ii) um álcool normalmente contendo entre 1 e 8 carbonos (metanol, etanol, propanol, butanol) e iii) um catalisador (ácido, básico ou enzimático) (BASKAR; AISWARYA, 2016; ISSARIYAKUL; DALAI, 2014).

A escolha da matéria prima lipídica é diretamente influenciada pelo preço e disponibilidade do produto, sendo que a última é influenciada pelo clima e produção regional. Por exemplo, no Brasil e EUA tem-se o predomínio do óleo soja, na Europa do óleo de canola, já nos países tropicais, como Indonésia e Malásia, do óleo de palma, enquanto que nas zonas costeiras utiliza-se o óleo de coco (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014). Atualmente, a principal matéria prima empregada para a produção de biodiesel a nível mundial é o óleo de canola (84 %), seguido pelo óleo de girassol (13 %), palma (1 %), soja e outros (2 %) (ATABANI et al., 2012; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). Já no Brasil a soja representa 68 % da fonte lipídica responsável pela produção deste biocombustível, seguido pela gordura bovina (14 %) (ANP, 2018).

Atualmente, os óleos vegetais, considerados como matéria prima de 1ª geração,

representam 95 % da matéria prima utilizada para a produção de biodiesel (ATABANI et al., 2012). No entanto, cada vez mais pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca por fontes lipídicas alternativas para a geração deste biocombustível (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015; CHEN; YING; LI, 2006; GHARAT; RATHOD, 2013; HUANG et al., 2010; SUBHEDAR; GOGATE, 2016). Isto porque o uso de óleos vegetais compete diretamente com a cadeia alimentar, elevando os custos tanto do biodiesel quanto do óleo, podendo levar à escassez desses insumos. Além disso, existem diversas matérias primas alternativas, tais como, óleos de fritura, óleos não comestíveis, gorduras animais, entre outras, as quais são consideradas matérias primas de 2 e 3ª geração, e apresentam potencial para serem aplicados na produção de biodiesel, podendo reduzir além do custo de produção, os impactos ambientais e sociais. Alguns exemplos são apresentados na Tabela 1 (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; VERMA; SHARMA; DWIVEDI, 2016).

Tabela 1 – Matéria-prima utilizadas para produção de biodiesel a nível mundial

| Óleos comestíveis (1ª geração) | Óleos não comestíveis (2ª geração) | Outras fontes (3ª geração) |
|---|---|---------------------------------------|
| Óleo de Algodão | Óleo de <i>Jatropha curcas</i> | Microalgas |
| Óleo de Coco | Óleo de Mahua | Óleo Residual de Fritura |
| Óleo de Girassol | Óleo de Neem | Gordura Animal |
| Óleo de Canola | Óleo de Eucalipto | Banha |
| Óleo de Soja | Óleo de Semente de Seringueira | Óleo de Peixe |
| Óleo de Mamona | | Gordura de Frango |
| Óleo de Mostarda | | Sebo de Carne Bovina |
| Óleo de Amendoim | | |
| Óleo de Palma | | |
| Óleo de Colza | | |

Fonte: (VERMA; SHARMA, 2016)

O tipo de álcool que será utilizado no processo de transesterificação além de influenciar no rendimento da reação, também influenciará na necessidade do uso de solventes orgânicos, ou seja, álcoois de cadeia maior (propanol ou butanol) são mais solúveis em óleo do que os de cadeia menor (metanol e etanol), dispensando assim o uso de solventes. No entanto, os álcoois mais utilizados são o metanol e o etanol, com destaque para o metanol, que é o mais usado em escala industrial, principalmente pelo seu baixo custo e elevada reatividade. Porém, este álcool é proveniente de combustíveis fósseis, conseqüentemente o biodiesel produzido a partir dessa matéria prima não poderá ser denominado como renovável. Desta forma, o etanol é uma

alternativa interessante para a reação de transesterificação, pois além de ser renovável e consideravelmente menos tóxico, é mais solúvel em óleo do que o metanol, minimizando as limitações de transferência de massa. Além disso, o etanol produz um biodiesel com maior lubricidade, número de cetano, maior estabilidade oxidativa, entre outras propriedades (BANKOVIC-ILIC; STAMENKOVIC; VELJKOVIĆ, 2012; ISSARIYAKUL; DALAI, 2014; VERMA; SHARMA; DWIVEDI, 2016).

2.1.2 Reações de síntese de biodiesel

Os óleos vegetais não são utilizados diretamente nos motores de ciclo a diesel, devido a sua elevada viscosidade, acidez, baixa volatilidade, a composição dos ácidos graxos, ao teor de ácidos graxos livre entre outras características que podem causar problemas aos motores. A fim de adequar essas propriedades, diferentes métodos podem ser utilizados, tais como: craqueamento térmico ou pirólise, micro-emulsão, esterificação e transesterificação. Entre os vários métodos que podem ser empregados, a transesterificação é a mais utilizada, pois além de ser um processo simples, é capaz de produzir um biodiesel com elevada qualidade (AMINI et al., 2016; BASKAR; AISWARYA, 2016).

A transesterificação é uma reação reversível entre um triglicerídeo, proveniente de uma fonte lipídica, com um álcool primário, que em presença de um catalisador, gera ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol, conforme a reação apresentada na Figura 1. Essa reação ocorre em três etapas, onde as moléculas de triglicerídeos são convertidas em diglicerídeos, logo em monoglicerídeos e por fim em glicerol. Em cada etapa a reação consome um mol de álcool e produz um mol de éster, produzindo ao final da reação três mols de éster (biodiesel) e um mol de glicerol (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014).

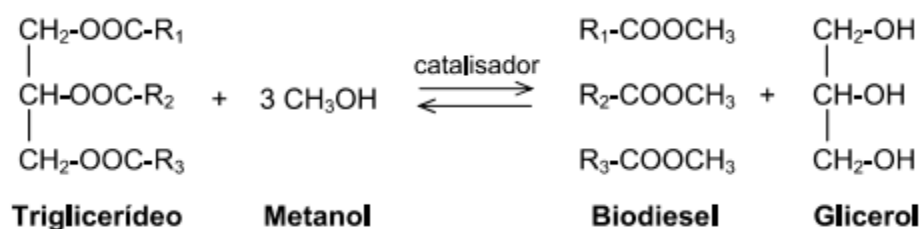


Figura 1- Reação de transesterificação.

O rendimento desta reação é influenciado por diversos parâmetros, tais como: razão molar óleo:álcool, tipo de álcool, tipo e quantidade de catalisador, temperatura, pressão, tempo,

intensidade da mistura e teor de ácidos graxos livres e água presentes no óleo (BANKOVIC-ILIC; STAMENKOVIC; VELJKOVIĆ, 2012).

A reação de transesterificação é favorecida na presença de catalisadores, os quais podem ser químicos (ácidos e básicos) ou enzimáticos. Os catalisadores químicos podem ser homogêneos ou heterogêneos. Atualmente, a rota tecnológica mais utilizada para a produção industrial de biodiesel é a rota alcalina, devido ao baixo custo, rapidez, simplicidade e eficiência. No entanto, durante este processo, ocorrem reações secundárias indesejáveis, como a saponificação dos ácidos graxos livres, consumindo parte do catalisador e reduzindo o rendimento da reação (YU et al., 2010). Além disso, a catálise química apresenta como desvantagens, a dificuldade na transesterificação de gorduras com elevado teor de ácidos graxos, o elevado consumo de energia, além da difícil remoção da água e sais inorgânicos do produto final (BAJAJ et al., 2010).

2.2 Enzimas como biocatalisadores para a reação de transesterificação

2.2.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC. 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, especialmente triglicerídeos de cadeia longa (principais constituintes dos óleos e gorduras), liberando ácidos graxos livres e glicerol. Também catalisam reações de esterificação, acidólise, aminólise, alcoólise e reações de interesterificação (AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, 2015), sendo a atividade de água do meio reacional um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PAQUES; MACEDO, 2006).

Essas enzimas podem ser de origem, animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal. As mais utilizadas, principalmente em escala industrial, são as lipases microbianas devido a sua maior estabilidade, ampla especificidade para substratos, fácil manipulação, menor tempo de geração, entre outras características (AARTHY et al., 2014; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; PAQUES; MACEDO, 2006).

As lipases podem ser utilizadas nas mais diversas reações, tanto na sua forma livre, quanto imobilizada. No entanto, a imobilização oferece vantagens, principalmente a possibilidade de isolar mais facilmente o biocatalisador no final do processo, o que permite sua reutilização. Desta forma, a produtividade do processo é favorecida, reduzindo os custos de operação, além da redução na geração de efluentes (ZANIN, 2004).

As principais vantagens das lipases em relação aos catalisadores químicos, são a

especificidade pelo substrato e a seletividade, sendo essas características controladas por propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato, além de fatores que afetam a ligação enzima-substrato. O conhecimento da especificidade é um fator crucial para a escolha do substrato e também para uma aplicação industrial. Conforme a classificação das enzimas as lipases são divididas em (PAQUES; MACEDO, 2006; POPPE, 2017):

- a) Regiosseletivas: possuem especificidade em relação à posição do grupo funcional da molécula do substrato. Este grupo de lipases é subdividido em:
 - Lipases 1,3 específicas: hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, nas posições *sn-1* e *sn-3*. Exemplos destas enzimas são as lipases produzidas por: *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar* e *Aspergillus niger*.
 - Lipases não específicas: hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários de maneira aleatória. Exemplos destas enzimas são as lipases produzidas por: *Candida antarctica*, *Penicillium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*.
- b) Tipo seletivas ou ácido graxo específicas: apresentam especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica e /ou número de instauração do grupo acila;
- c) Enantiosseletivas: são capazes de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica.

Tendo em vista que as lipases atuam com diferentes especificidades para o substrato, o uso combinado destes biocatalisadores é uma estratégia interessante a fim de aumentar a produtividade de reações com substratos de constituição heterogênea, como é o caso dos óleos e gorduras. Este conceito foi proposto por Alves et al. (2014), quando obtiveram excelentes resultados utilizando uma mistura de lipases (*Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*) na hidrólise do óleo de soja. Confirmando assim, que o uso de lipases com diferentes especificidades para o substrato é mais eficaz, do que o uso de uma única lipase específica. Este novo conceito de biocatalisador foi denominado *combi-lipase* (ALVES et al., 2014). Poppe et al. (2015b) também obtiveram melhores resultados utilizando uma mistura de lipases imobilizadas para a transesterificação dos óleos de oliva e palma. Atingindo um rendimento de 95 % empregando o *combi-lipase* (29 % de TLL + 12,5 % de RML + 58,5 % de CALB), comparado a um rendimento de 50 % com a enzima CALB (melhor resultado individual). Já para o óleo de palma o rendimento foi de 80 % com o *combi* (52,5 % de TLL + 47,5 % RML), comparado a 44 % de rendimento para a enzima TLL (melhor resultado individual).

2.2.2 Estrutura e mecanismo de atuação das lipases

As lipases apresentam um mecanismo peculiar de atuação, conhecido por ativação interfacial, o qual descreve o fato da atividade lipolítica das lipases ser aumentada em função dos substratos insolúveis. Este fenômeno pode ser explicado através da estrutura tridimensional e do sítio catalítico da enzima. (JAEGER; REETZ, 1998).

O sítio catalítico das lipases é bastante complexo e a estrutura da enzima ao redor deste sítio varia consideravelmente entre diferentes lipases. Contudo, existem alguns elementos estruturais comuns a todas as lipases, denominado tríade catalítica, a qual é formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato), e um dobramento característico na conformação α/β hidrolase (JAEGER; REETZ, 1998).

Em geral essa tríade catalítica é protegida por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica em forma de α -hélice, denominada “tampa” ou “*lid*”. Quando esta tampa entra em contato com uma interface lipídeo-água, ocorre uma interação entre ambas, promovendo uma mudança em sua conformação. A “tampa” que estava na forma fechada, se desloca, expondo o sítio catalítico da enzima, permitindo que a catálise ocorra. Ao mesmo tempo em que o centro ativo fica acessível ao substrato, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que interage favoravelmente com a interface lipídica. Já em ambientes aquosos, a “tampa”, cobre este sítio catalítico (forma fechada) e a lipase passa a ser inativa (JAEGER; REETZ, 1998; MATEO et al., 2007; MESSIAS et al., 2011). A Figura 2 apresenta um esquema do mecanismo geral de ativação interfacial de lipases, enquanto a Figura 3 exemplifica este fenômeno para a lipase *Candida rugosa*.

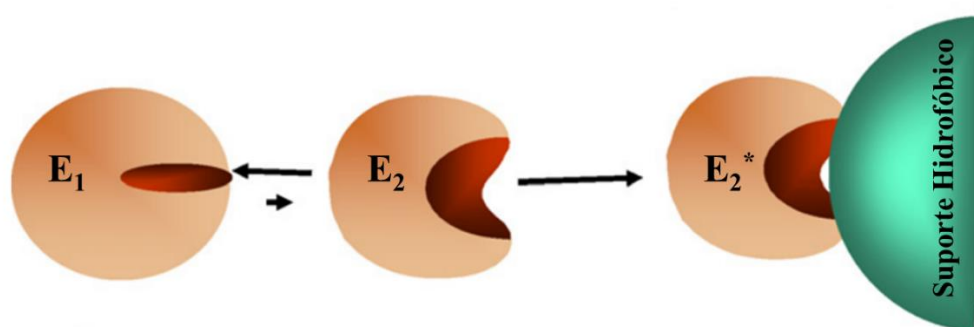


Figura 2 – Representação esquemática da ativação interfacial de lipases. Representação da enzima (E₁) na conformação fechada; (E₂) na conformação aberta; (E₂^{*}) ligada ao suporte hidrofóbico, representando a ativação interfacial.

Fonte: (MATEO et al., 2007)

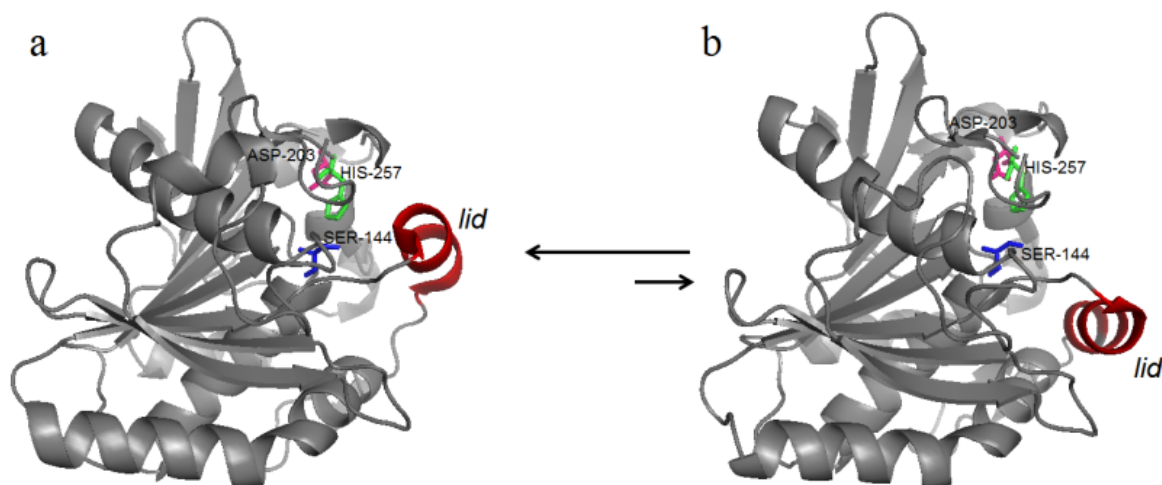


Figura 3 – Distintas conformações da lipase de *Candida rugosa*.

(a) conformação fechada (PDB-3TGL); (b) conformação aberta (PDB-4TGL). Estruturas 3D obtidas através do Protein Data Bank (PDB) utilizando o software Pymol v.0.99.

Fonte: (POPPE, 2017)

2.2.3 Reação de transesterificação enzimática

Devido a sua versatilidade, as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas (AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, 2015). O emprego deste biocatalisador vem ganhando espaço em reações de síntese de biodiesel, principalmente devido a sua especificidade pelo substrato e seletividade. Além disso, trabalham em condições brandas de temperatura e pressão, não necessitam de cofatores, a geração de co-produtos é reduzida, o glicerol é facilmente separado do biodiesel formado, são estáveis em solventes orgânicos e permitem o uso de matérias primas mais baratas com alto teor de ácidos graxos livres e água. Apesar das inúmeras vantagens, existem algumas limitações no uso das lipases, como o elevado custo, sua inativação quando submetida a condições operacionais mais severas e baixa produtividade, que ainda restringem sua aplicação a nível industrial. Contudo, muitas pesquisas vem sendo desenvolvidas a fim de melhorar essas características, ampliando o uso desses biocatalisadores (AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, 2015; BANKOVIC-ILIC; STAMENKOVIC; VELJKOVIĆ, 2012; BASKAR; AISWARYA, 2016).

Para síntese de biodiesel via catálise enzimática é importante o conhecimento de alguns

fatores reacionais, como: origem da enzima, quantidade de biocatalisador a ser utilizado, razão molar óleo:álcool, tipo de álcool a ser utilizado, uso de solvente orgânico, quantidade de água adicionada a mistura reacional, temperatura e a possibilidade de reuso da enzima. Esses fatores irão influenciar diretamente no rendimento desta reação (RODRIGUES, 2009).

Na produção de biodiesel, as lipases mais utilizadas são obtidas principalmente através de fungos (leveduras e fungos filamentosos), com destaque para a lipase produzida a partir da levedura *Candida antarctica* (CALB), a qual vem sendo amplamente aplicada para a síntese deste biocombustível. Além da CALB, as lipases produzidas a partir de fungos filamentosos, como a *Rhizomucor miehei* (RML), a *Rhizopus oryzae* (ROL), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Aspergillus niger* (ANL) também são utilizadas para esta aplicação. As lipases CALB, RML e TLL são comercializadas pela empresa Novozymes, na sua forma imobilizada, sendo denominadas: “Novozym 435”, “Lipozyme RM IM” e “Lipozyme TL IM”, respectivamente (AARTHY et al., 2014; AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, 2015; ROBLES-MEDINA et al., 2009).

2.3 Biorreatores para a síntese de biodiesel

A escolha adequada da configuração de um biorreator é uma etapa fundamental para o sucesso de um determinado bioprocesso e deve ser avaliada de acordo com as características de cada caso. Em processos onde enzimas imobilizadas são empregadas como catalisadores, deve-se levar em consideração aspectos do processo como: características do biocatalisador (formato, tamanho e presença de poros do suporte de imobilização); natureza do substrato; requisitos operacionais (temperatura e fluxo); cinética da reação; características de transferência interna e externa de massa; modo de operação (batelada ou contínuo); custo operacional do biorreator (energia e manutenção); bem como aspectos de construção do biorreator (geometria, hidrodinâmica e condições operacionais) (POPPE et al., 2015a).

Na literatura quatro configurações de reatores enzimáticos são apresentadas: reatores em batelada de tanque agitado, reatores contínuos de tanque agitado, reatores em coluna de leito fixo e reator em coluna de leito fluidizado (POPPE et al., 2015a). Em reações de síntese enzimática de biodiesel, os mais utilizados são os reatores em batelada de tanque agitado e em coluna de leito fixo (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014). A Figura 4 apresenta um esquema dessas quatro configurações de reatores, os quais serão detalhados a seguir.

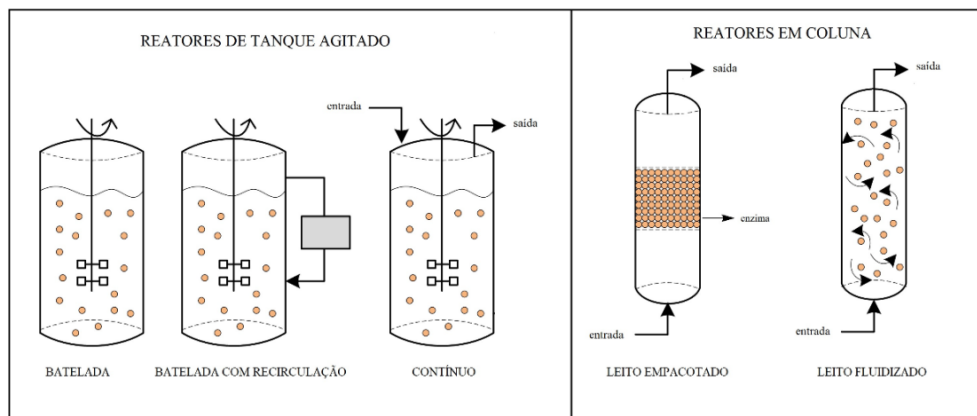


Figura 4 - Esquema das quatro principais configurações de reatores.

Fonte: (POPPE et al., 2015a)

2.3.1 Reator enzimático em batelada

Os reatores em batelada de tanque agitado são o modelo mais simples de biorreatores e também os mais utilizados para a síntese enzimática de biodiesel. Podem ser empregados em soluções com elevada viscosidade, utilizando enzimas tanto na sua forma livre quanto imobilizada (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Este modelo de reator pode ser equipado por um medidor e controlador de temperatura e por um sistema de agitação, normalmente na forma de hélice, que permite a mistura da solução de substrato e a dispersão do biocatalisador no meio reacional. Ao final do processo, normalmente são utilizados sistemas de separação (centrifugação ou filtração), a fim de separar o produto formado da enzima imobilizada, que poderá ser reutilizada em um novo processo (POPPE et al., 2015a).

A principal vantagem na utilização deste sistema é a simplicidade do equipamento e o elevado grau de dispersão do substrato. Porém estes reatores apresentam baixa produtividade e um elevado tempo de volume morto, necessário para esvaziar, limpar e recarregar o reator para uma nova operação. Além disso, tem-se a diminuição gradual da atividade enzimática, proporcionada pelas operações unitárias de limpeza e tensão de cisalhamento imposta pelas hélices do reator (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; POPPE et al., 2015a).

2.3.2 Reator enzimático contínuo

Nos últimos anos, vem crescendo o número de trabalhos utilizando reatores contínuos para processos envolvendo biocatalisadores, mostrando a importância desta tecnologia para o

aprimoramento das reações enzimáticas (RAO et al., 2009). Os reatores em operação contínua, aumentam a produtividade da reação, apresentam maior eficiência energética, menor custo de otimização das condições reacionais e um menor número de operação unitárias durante a separação dos produtos, além de poderem ser operados por longos períodos de tempo sob condições de estado estacionário, características importantes para o escalonamento de um processo a nível industrial (ITABAIANA; MIRANDA; SOUZA, 2013).

Os principais modelos de reatores contínuos são: reator de tanque agitado (CSTR), reator em coluna de leito fixo (PBR) e reator em coluna de leito fluidizado (FPR) (POPPE et al., 2015a).

Um reator CSTR é muito semelhante a um reator batelada de tanque agitado, no entanto, nesta conformação os reagentes são adicionados e os produtos são coletados continuamente ao longo do processo. A agitação deste sistema deve ser constante, e em condições ideais, o conteúdo do reator é perfeitamente misturado, desta forma, a concentração da mistura em todos os pontos do reator, assim como do produto final são iguais. Em um CSTR, a taxa da reação é determinada pela composição final do produto, enquanto em um PBR, a concentração do substrato é maximizada a cada ponto do reator. Com o objetivo de aumentar a concentração final dos produtos, é comum o uso de reatores CSTR em cascata, aproximando-se da configuração de um PBR (RAO et al., 2009). Este modelo de reator é mais indicado para reações onde o excesso de substrato passa a ser um inibidor do processo (KOSSEVA et al., 2009).

Dentre os modelos existentes em operação contínua para preparações enzimáticas, o mais utilizado é o PBR, devido a sua elevada estabilidade operacional, fácil construção/operação e alta eficiência volumétrica. Além disso, as partículas de biocatalisador ficam protegidas de possíveis quebras, pois este modelo de reator apresenta baixas tensões de cisalhamento. Em um reator PBR as enzimas imobilizadas ficam retidas na coluna cilíndrica do reator enquanto o substrato é bombeado através do leito (GROSOVÁ; ROSENBER; REBROS, 2008; POPPE et al., 2015a). O tamanho das partículas de catalisador não deve ser menor que 0,05 mm, para manter a queda de pressão do leito em um limite aceitável. Este tipo de reator apresenta alguns problemas de operação, tais como, o aparecimento de caminhos preferenciais, a facilidade de obstrução do leito de partículas, ineficiência na transferência de calor e massa, assim como a necessidade no uso de solventes (FERNANDES, 2010).

Outro exemplo de reator contínuo, é o de leito fluidizado (FBR), o qual é uma variação do PBR. A diferença neste caso, é que uma menor quantidade de enzima é adicionada ao leito, permitindo que quando o substrato seja bombeado no reator em um fluxo ascendente, com

vazões mais elevadas, as partículas de biocatalisador fiquem em movimento. Devido a estas vazões, os rendimentos da reação são reduzidos, sendo assim, faz-se necessário o uso de um sistema de recirculação para aumentar a conversão de produtos. Neste modelo de reator, as partículas ficam em livre circulação no leito, facilitando a transferência de massa entre o substrato e o catalisador, evitando a ocorrência de caminhos preferências e de elevadas pressões (FERNANDES, 2010; KOSSEVA et al., 2009; POPPE et al., 2015a). Como desvantagens na sua utilização, está a menor eficiência global do sistema, devido a menor quantidade de biocatalisador adicionada ao reator e a maior dificuldade de escalonamento deste processo (KOSSEVA et al., 2009).

2.4 Ultrassom

2.4.1 Princípios físicos e químicos do uso do ultrassom

O termo sonoquímica refere-se ao uso do ultrassom em reações e processos químicos, tais como estabilização de emulsões de óleos, redução de partículas, homogeneização, entre outros. O ultrassom é um som com uma frequência superior àquela que o ouvido humano pode perceber. De acordo com a sua frequência, é classificado em: alta frequência (2-10MHz), utilizado em diagnósticos de imagem e análises químicas e baixa frequência (20-100kHz), aplicado na sonoquímica. O uso deste sistema de baixa frequência, proporciona inúmeras vantagens as reações, tais como: aumento da conversão e conseqüentemente do rendimento da reação, em reações de síntese orgânica é capaz de reduzir o número de etapas, o tempo e a temperatura da reação. Desta forma, cada vez mais esta tecnologia vem sendo empregada nas mais diversas aplicações químicas (TRENTIN et al., 2015; VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ; STAMENKOVIĆ, 2012).

A produção de ultrassom é um fenômeno físico capaz de promover efeitos de ativação em reações químicas. Esses efeitos são atribuídos ao fenômeno de cavitação, que é a formação, crescimento e implosão de bolhas no meio líquido em que está inserido. Quando o ultrassom passa através do líquido ocorre ciclos de expansão (pressão negativa) - compressão (pressão positiva) das ondas, gerando as cavidades, as quais ao atingirem um tamanho crítico implodem-se, liberando grande quantidade de calor e pressão em um curto período de tempo e em pontos localizados do líquido. O colapso dessas bolhas, gera a formação de pequenos redemoinhos que aumentam a transferência de massa no líquido, além de formarem gradientes de velocidade no líquido que resultam em tensões de cisalhamento (MARTINES; DAVOLOS; JÚNIO, 2000; VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ; STAMENKOVIĆ, 2012; YUSUF G. ADEWUYI, 2001).

Normalmente, o uso do ultrassom pode causar efeitos químicos e físicos em reações heterogêneas, através das bolhas de cavitação. Em sistemas heterogêneos líquido-líquido o colapso da bolha de cavitação na interface ou perto dela, provoca a ruptura e mistura desta camada, formando uma emulsão que proporciona um aumento na superfície de contato entre os dois líquidos e, portanto, um aumento na taxa desta reação. A emulsão formada através do ultrassom, normalmente é mais estável que as formadas por processos convencionais (GOGATE; RAYAL; PANDIT, 2006; VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ; STAMENKOVIĆ, 2012).

Em sistemas heterogêneos sólido-líquido o fenômeno de cavitação na superfície da partícula do sólido ou perto desta, forma “jatos” de líquido, devido ao transporte assimétrico do fluido através dos espaços vazios da partícula, podendo reduzir seu tamanho, aumentando assim sua área superficial. Esses “jatos” podem aumentar a transferências de massa entre a fase líquida e a superfície do catalisador através do rompimento da camada limite de líquido. Além disso, eles podem ativar o catalisador sólido e retirar o material que está ocupando o sítio ativo. Sendo assim, este sistema também proporciona um aumento da superfície de contato e da transferência de massa da reação (GOGATE; RAYAL; PANDIT, 2006).

As ondas de ultrassom apresentam diversas aplicações, em áreas como a biologia, engenharia, geologia, medicina, física, em polímeros e também na área industrial. Já na área química, são utilizadas em aplicações como emulsificação e homogeneização de sistemas heterogêneos, limpeza de superfícies, rompimento celular, na indústria de alimentos, na síntese de biodiesel, entre diversas outras aplicações (BARBOZA; SERRA, 1992).

2.4.2 O uso do ultrassom para a síntese enzimática de biodiesel

Atualmente, estudos vem sendo realizados utilizando a tecnologia de ultrassom para a produção de biodiesel, uma vez que os métodos convencionais de esterificação e transesterificação tendem a ser mais lentos e requerem tempos mais longos para separação do glicerol do produto formado na reação. Desta forma, a tecnologia de ultrassom reduz os tempos de processo e de separação de fases, bem como a quantidade de catalisador e o excesso de álcool necessários para a reação, devido ao efeito de ativação das reações químicas proporcionada pelo processo de cavitação, além disso produz um subproduto (glicerol) com maior pureza (KUMAR et al., 2011).

O ultrassom de baixa frequência vem sendo utilizado em reações de transesterificação catalisadas por ácido, bases e também por enzimas (VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ;

STAMENKOVIĆ, 2012). Nos processos envolvendo catalisadores enzimáticos, é preciso ter um maior cuidado com o uso do ultrassom, visto que o fenômeno de cavitação gera um aumento na temperatura da reação e as enzimas são biocatalisadores sensíveis a elevadas temperaturas, podendo ser inativadas. No entanto, essa inativação não ocorre em todas as situações, pois o efeito do uso do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo, e isso dependerá da intensidade das ondas aplicadas ao sistema (SANTIN, 2013).

A irradiação ultrassônica em reatores batelada ou contínuo, pode ser feita de maneira indireta, onde o reator é imerso em banhos ultrassônicos e a energia é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste formato tem-se uma grande dispersão de energia e, conseqüentemente, uma menor influência das ondas de ultrassom sobre a reação. Já a irradiação na forma direta, ocorre através da imersão de uma sonda (*probe*) de ultrassom, diretamente na reação, tornando o processo normalmente mais eficiente. A sonicação pode ser realizada de forma contínua ou em pulsos, neste último caso, o equipamento trabalha de maneira intermitente, ligando e desligando durante todo o processo (BARBOZA; SERRA, 1992; VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ; STAMENKOVIĆ, 2012).

Até o momento poucas pesquisas são encontradas na literatura utilizando a tecnologia de ultrassom para a síntese enzimática de biodiesel, quando comparadas aos estudos já desenvolvidos empregando esta tecnologia para a catálise química (TRENTIN et al., 2015; VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ; STAMENKOVIĆ, 2012). A Tabela 2 apresenta um resumo das condições reacionais e dos resultados obtidos por alguns autores para esta reação.

Tabela 2 - Compilação dos principais parâmetros reacionais otimizados para a síntese enzimática de biodiesel utilizando a tecnologia de ultrassom

| Autor | Reação | Matéria-prima | Álcool – RM (álcool/óleo) | % Enzima | Solvente | Tipo de Ultrassom | Amplitude / Ciclo/ Potência / Frequência/ | Temperatura (°C) | Tempo | Rendimento (%) |
|---------------------------|--------------------|--|----------------------------------|---|---------------------|---------------------------|--|-------------------------|--------------|-----------------------|
| (YU et al., 2010) | Transesterificação | Óleo de soja | Metanol 6:1 | 6 % CALB | Álcool Tert-amílico | Banho (+vibração/50 rpm) | C/O: 50 % C/E: 500W/40kHz | 40 | 4 h | 96 |
| (KUMAR et al., 2011) | Transesterificação | Óleo de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas L.</i>) | Metanol 4:1 | 5 % Lipase obtida a partir de <i>Enterobacter aerogenes</i> imobilizada em sílica | - | Sonda (D: 7 mm) | C/O: 50 % Ciclo: 0,7s C/E: 200 W/ 24 kHz | Não especificada | 30 min | 84,5 |
| (BATISTELLA et al., 2012) | Transesterificação | Óleo de soja | Etanol 3:1 | 12,9 % RML 27,1 % CALB | - | Banho | C/O: 100 % RML / 40 % CALB C/E: 132 W/ 37 kHz | 57°C RML/ 63°C CALB | 4 h | 86 (RML) 57 (CALB) |
| (GHARAT; RATHOD, 2013) | Transesterificação | Óleo de fritura residual | Dimetil-carbonato 6:1 | 10 % CALB | - | Banho (+vibração/100 rpm) | C/E: 200 W/ 25 kHz | 60 | 4 h | 86,61 |
| (SUBHEDAR et al., 2015) | Transesterificação | Óleo de girassol | Metanol 3:1 | 3 % TLL | - | Banho | C/E: 120 W/ 40 khz | 40 | 4 h | 96 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--|---|------------------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| (MICHELIN et al., 2015) | Transesterificação | Óleo de Macaúba/Óleo de Coco | Etanol 9:1 | 20 % CALB | - | Banho | C/E: 132W/40kHz | 65 | 30 min | 70 |
| (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015) | Transesterificação | Resíduo de gordura de sebo bovino | Metanol 4:1 | 6 % CALB imobilizada (empresa CLEA Technologies) | - | Sonda | 40% - 5Hz C/E: 500W/20kHz | Não especificada | 20 min | 85,6 |
| (SUBHEDAR; GOGATE, 2016) | Interesterificação | Óleo de fritura residual | Acetato de metila 1:9 | 3 % TLL | - | Sonda (D: 11 mm) | C.O. 80 W Ciclo: 60% C/E: 120 W/20kHz | 40 | 3 h | 96,1 |
| (BHANGU; GUPTA; ASHOKKUMAR, 2017) | Transesterificação | Óleo de canola | Metanol 5:1 | 0,23 % lipase de <i>Candida rugosa</i> | - | Sonda (D: 35 mm) | C.O. 10% = 40 W 22kHz C/E: 400W/20kHz | Não especificada | 1,5 h | ~100 |
| (SANTIN et al., 2017) | Transesterificação | Óleo de soja/ Óleo de macaúba | Etanol 1:3 soja / 1:9 macaúba | 20 % CALB | - | Banho | C.O. 40 W soja/ 132W macaúba | 70 °C soja/ 65 °C macaúba | 4 h soja/ 1,5 h macaúba | 88 (soja) 70 (macaúba) |
| (GUPTA et al., 2017) | Transesterificação | Óleo de Neem | Metanol 5:1 | N/I* Lipase de <i>Proteus vulgaris</i> | - | Sonda (D: 10 mm) | C.O. 40W/ 20kHz C/E: 400W/20kHz | Não especificada | 30 min | 98 |

*C/O - condições ótimas C/E - condições do equipamento de ultrassom

Através de uma análise geral dos dados da Tabela 2, a qual apresenta um compilado dos últimos trabalhos encontrados na literatura para sistemas utilizando a catálise enzimática combinada ao uso da tecnologia de ultrassom na síntese de biodiesel é possível observar que todos os autores obtiveram bons rendimentos em tempos de reação de no máximo 4 h. Observa-se com este resultado, que a utilização do ultrassom, cumpre com a sua proposta de ativação das reações químicas, possibilitando reduções consideráveis no tempo de reação com elevados rendimentos. Por exemplo, Poppe et al. (2015b) obtiveram rendimentos de aproximadamente 40 % em 10 h, para a reação de transesterificação do óleo de oliva, catalisada pelas enzimas TLL e CALB, utilizando um sistema convencional de agitação. Comparando este resultado com os da Tabela 2, utilizando os mesmos biocatalisadores, pode-se observar uma redução significativa no tempo do processo e melhores resultados de rendimento (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015; MICHELIN et al., 2015; POPPE et al., 2015b; SANTIN et al., 2017; SUBHEDAR; GOGATE, 2016).

Quando se analisa o tipo de matéria prima utilizada nestes trabalhos, pode-se perceber uma tendência, a partir do ano de 2013, por óleos e gorduras residuais, como o óleo de fritura e o resíduo do sebo de carne bovina e também por óleos que não são utilizados tradicionalmente na alimentação, como o óleo de macaúba e de *neem*. Essa tendência deve-se ao fato de que a matéria prima influencia diretamente no custo final do biodiesel, e cada vez mais pesquisadores vem buscando tornar esse biocombustível competitivo ao diesel de petróleo. Sendo assim, a redução dos custos da matéria prima é essencial, e pode ser obtida através da substituição de matérias primas mais caras, como exemplo do óleo de soja, por materiais residuais e de fontes alternativas, não competitivas com a cadeia alimentar, levando a uma redução no custo final do produto (SANTIN et al., 2017).

Em relação ao tipo de acceptor acila, pode-se notar que mais da metade dos trabalhos usaram o metanol, o qual é o álcool mais utilizado tanto em pesquisas como nos processos em escala industrial de síntese de biodiesel, principalmente pelo seu baixo custo e elevada reatividade (VERMA; SHARMA; DWIVEDI, 2016). Os trabalhos mostrados na Tabela 2 que utilizaram o etanol como acceptor acila foram desenvolvidos no Brasil, onde a produção deste álcool é consolidada, permitindo o seu uso a um custo mais baixo. Além disso, o uso do etanol torna o processo menos tóxico e mais sustentável, visto que este álcool é de origem renovável (POPPE, 2017). Quando se analisa as razões molares álcool:óleo empregadas nas reações, pode-se perceber que mais da metade dos autores obtiveram como condições ótimas, razões molares entre 3:1-5:1. Em reações utilizando sistemas de agitação convencional, as razões

molares variaram entre 4:1 e 12:1 (POPPE et al., 2015b; VERMA; SHARMA; DWIVEDI, 2016). Sendo assim, pode-se observar uma redução na quantidade de álcool necessária para que a reação ocorra. Confirmando que na presença de um sistema de ultrassom é possível reduzir o excesso do álcool necessário, tornando o processo mais barato (KUMAR et al., 2011).

Reações enzimáticas em sistemas isentos de solvente apresentam uma maior viscosidade e imiscibilidade do substrato (DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002), e conseqüentemente a taxa da reação pode ser reduzida por limitações na transferência de massa entre o substrato e a enzima (ROMERO et al., 2007). No entanto, quanto utiliza-se um sistema de ultrassom é possível reduzir essas limitações, através do fenômeno de cavitação, o qual promove uma mistura eficiente das fases, eliminando a necessidade deste reagente (LIU et al., 2008). Este resultado pode ser confirmado através dos trabalhos apresentados na Tabela 2, onde todos os autores, com exceção do Yu et al. (2010), obtiveram bons rendimentos de biodiesel, utilizando sistemas de ultrassom, na ausência de solventes.

Também é possível observar que com o uso de um sistema de ultrassom é possível reduzir a quantidade de biocatalisador na grande maioria das reações, isto porque a transferência de massa é facilitada e o catalisador em alguns casos pode ser ativado (GOGATE, 2008). Além disso, percebe-se que as reações conduzidas na presença de irradiação ultrassônica emitida de forma direta (sonda) utilizaram uma menor quantidade de biocatalisador do que as reações realizadas em banhos, onde as ondas são emitidas de maneira indireta, conseqüentemente a eficiência do processo é menor (BARBOZA; SERRA, 1992).

Avaliando-se a Tabela 2, nota-se que a maioria dos trabalhos foram realizados utilizando banhos ultrassônicos, e que a sonda começou a ser empregada nas reações de síntese enzimática de biodiesel, mais recentemente. Pode-se perceber, que com o uso da sonda, os rendimentos das reações aumentaram e o tempo do processo diminuiu, como exemplos, Gupta et al. (2017) obtiveram aproximadamente 98 % de conversão em 30 min, enquanto Adewale et al. (2015) atingiram 85,6 % em apenas 20 min. Estes resultados podem estar associados com a aplicação direta da irradiação ultrassônica, tornando os efeitos de ativação das reações químicas ainda mais eficientes (BARBOZA; SERRA, 1992). Além disso, o uso da irradiação direta, também permitiu a redução da concentração de enzima, a qual variou entre 3-6 % em relação a massa de óleo, comparado a percentuais entre 6-27,1 % nas reações conduzidas em banhos de ultrassom. Outra vantagem deste sistema, é a maior possibilidade de escalonamento do processo quando comparado ao banho ultrassônico, etapa fundamental para viabilizar a aplicação desta tecnologia a nível industrial.

Veljkovic; Avramovic; Stamenkovic (2012) analisaram os resultados obtidos por diversos autores para a reação de transesterificação, comparando a técnica de ultrassom, com outras técnicas como irradiação por micro-ondas, agitação combinada com aquecimento e cavitação hidrodinâmica. Com esta investigação, observaram que o ultrassom é na maioria dos casos mais eficiente que a agitação mecânica combinada com aquecimento, proporcionando maiores rendimentos em menores tempos de reação, independentemente do tipo de ultrassom, catalisador ou matéria prima. Já a radiação por micro-ondas apresentou resultados ainda mais interessantes que o ultrassom e a cavitação hidrodinâmica, proporcionando reduções drásticas na produção de subprodutos e no tempo de separação das fases, e proporcionando conversões de 100 % em 2 min de reação comparado a 99 % em 5 min utilizando o ultrassom. A técnica de cavitação hidrodinâmica apresentou resultados semelhantes ao ultrassom, no entanto com uma correta configuração do sistema, o consumo energético pode ser menor que o requerido para o sistema de ultrassom.

Apesar das inúmeras vantagens na utilização de um sistema de ultrassom para a síntese de biodiesel, novas pesquisas precisam ser desenvolvidas a fim de superar as limitações técnicas e de processo ainda existentes. Muitas metodologias já vêm sendo desenvolvidas, na busca de melhorar esse processo e reduzir seus custos, possibilitando o aumento de escala. Entre as técnicas mais utilizadas, estão: a otimização das variáveis do processo através de análises estatísticas, o desenvolvimento de modelos cinéticos, o desenvolvimento de um processo contínuo e de novos modelos de reatores utilizando o ultrassom. Acredita-se que uma alternativa promissora para a síntese enzimática de biodiesel é a combinação de um reator contínuo assistido por irradiação ultrassônica (VELJKOVIĆ; AVRAMOVIĆ; STAMENKOVIĆ, 2012).

Tendo em vista o elevado custo das enzimas, o reuso deste biocatalisador é fundamental para que esta tecnologia possa ser implementada em escala industrial para a síntese de biodiesel. Sendo assim, a maioria dos autores apresentados na Tabela 2, avaliaram a estabilidade das lipases com o uso da tecnologia de ultrassom, após alguns ciclos de reuso. Gupta et al. (2017) observaram que após 5 ciclos utilizando a lipase de *Proteus vulgaris*, o rendimento de ésteres passou de 100 para 67 % no último ciclo. Santin et al (2017) encontrou uma redução da atividade enzimática de aproximadamente 6,2 % a partir do 3º ciclo utilizando a lipase CALB, para os dois óleos estudados. Subhedar e Gogate (2016) observaram um decréscimo no rendimento de biodiesel a cada reuso, devido a perda gradativa da atividade da enzima TLL, a qual apresentou apenas 25 % da sua atividade inicial ao final do 7º reuso. Michelin et al. (2015)

obteve um decréscimo de 40 % na conversão de ésteres, após 5 ciclos de reuso da lipase CALB. Os autores consideraram vantajoso o reuso desta enzima para a reação de transesterificação até o 5º ciclo. Já Gharat e Rathod (2013) observaram um decréscimo de apenas 5 %, no rendimento de biodiesel após 5 ciclos de reuso. Os autores associaram a perda da atividade, com a ruptura da enzima e não a sua inativação pelo efeito do ultrassom. Yu et al (2010) também obtiveram um decréscimo de apenas 4 % na atividade da CALB, sugerindo que este biocatalisador é adequado para reações em presença de ultrassom. Batistella et al. (2012) observaram que a lipase CALB mesmo tendo apresentado menores conversões de ésteres, manteve sua atividade enzimática constante durante 8 ciclos de reuso, no entanto, a conversão de ésteres reduziu a partir do 4º ciclo. Já a enzima RML apresentou uma redução tanto na atividade, quanto na conversão de ésteres após o 2º ciclo. Os demais autores não avaliaram o reuso das enzimas.

CAPÍTULO 3 - Materiais e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Biocatalisadores e reagentes utilizados para a síntese de biodiesel

Os experimentos foram realizados utilizando-se como biocatalisadores as lipases: TLL imobilizada em resina acrílica (Lipozyme TL-IM), RML imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme RM-IM) e CALB imobilizada em resina macroporosa (Novozym 435), gentilmente doadas pela empresa Novozymes (Novozymes, Espanha). Como matéria-prima lipídica utilizou-se óleo de soja, adquirido em mercado local. Suas propriedades físico-químicas e composição de ácidos graxos estão apresentadas na Tabela 3. Para a composição do substrato, além do óleo de soja, utilizou-se etanol, e como solvente, terc-butanol, ambos de grau analítico.

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos e propriedades físico-químicas do óleo de soja

| Composição de ácidos graxos | | |
|-------------------------------------|--|----------------|
| Ácido Graxo | Estrutura Química | Composição (%) |
| Palmítico | C16:0 | 11,4 |
| Palmitoléico | C16:1 | 0,2 |
| Esteárico | C18:0 | 4,1 |
| Oleico | C18:1 | 23 |
| Linoleico | C18:2 | 53,4 |
| Linolênico | C18:3 | 6,6 |
| Propriedades físico-químicas | | |
| Parâmetro | | |
| Índice de iodo | $\text{g I}_2 \text{ 100 g}^{-1}$ | 120-141 |
| Índice de saponificação | mg KOH g^{-1} | 180-200 |
| Acidez | $\text{g oleic acid 100 g}^{-1}$ | < 0,3 |
| Índice de peróxido | $\text{m}_{\text{eq}} \text{ kg}^{-1}$ | < 10 |
| Peso molecular | g mol^{-1} | 884 |

Fonte: (POPPE, 2017)

3.1.2 Sistema reacional

O sistema reacional construído neste estudo para a síntese enzimática de ésteres etílicos é composto por um reator de vidro encamisado, com uma sonda de ultrassom acoplada na parte superior do reator, conectado a um banho-maria e a um termopar para o controle e

monitoramento da temperatura da reação. Este sistema está apresentado na Figura 5 e as especificações dos equipamentos utilizados estão descritas na Tabela 4.

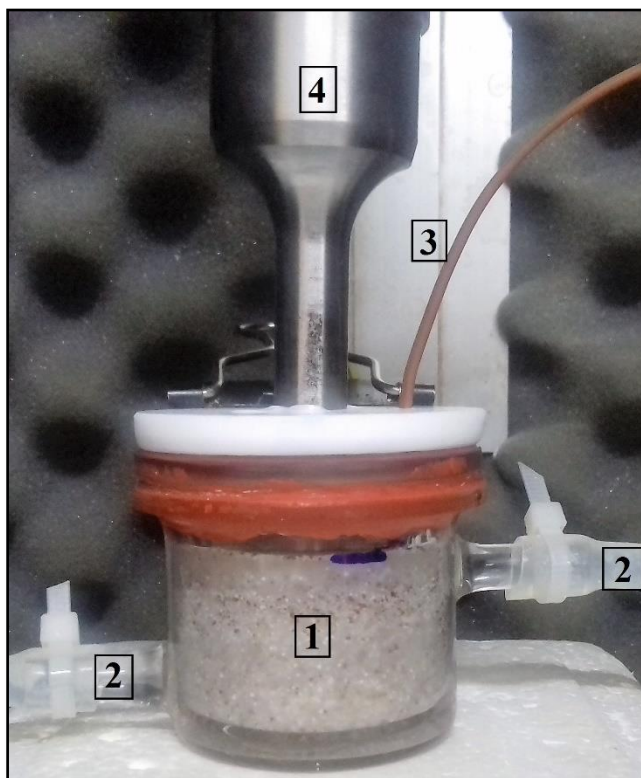


Figura 5 – Reator batelada para síntese de biodiesel com sonda de ultrassom acoplada.

Tabela 4 – Especificação dos equipamentos utilizados no sistema reacional para produção de biodiesel

| Descrição | | Especificação |
|-----------|--|--|
| 1 | Reator de vidro encamisado | Confeccionado em oficina especializada Diâmetro: 34 mm Altura: 45 mm |
| 2 | Mangueiras de entrada e saída da camisa de circulação para o controle de temperatura | |
| 3 | Termopar | Sonda flexível - QSonica |
| 4 | Sonda ultrassônica | Qsonica – Diâmetro: 12,7 mm |
| - | Ultrassom | QSonica – Modelo Q700- 700W/20kHz |

3.2 Procedimento experimental

3.2.1 Experimentos preliminares

3.2.1.1 Avaliação de um sistema constituído por reatores de leito fixo conectados em série para a síntese enzimática de ésteres etílicos

Para estes ensaios utilizou-se o reator apresentado na Figura 6, o qual apresenta 65 mm de altura e 10 mm de diâmetro, com um volume útil de 1,4 mL, equipado com uma camisa externa para o controle de temperatura.

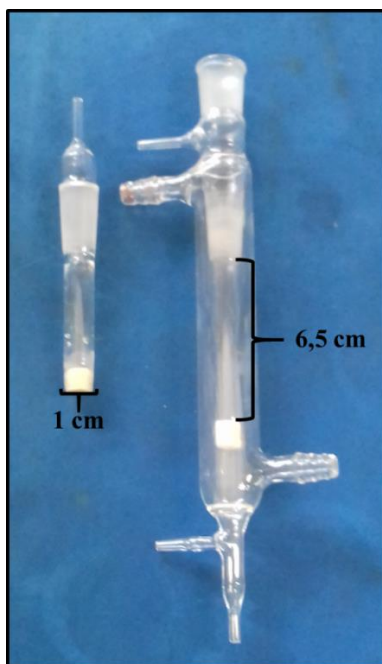


Figura 6 - Reator utilizado para síntese enzimática de biodiesel

A Figura 7 mostra a representação esquemática dos experimentos de transesterificação enzimática do óleo de soja, através de dois reatores de leito fixo empacotados com uma mistura de lipases e conectados em série.

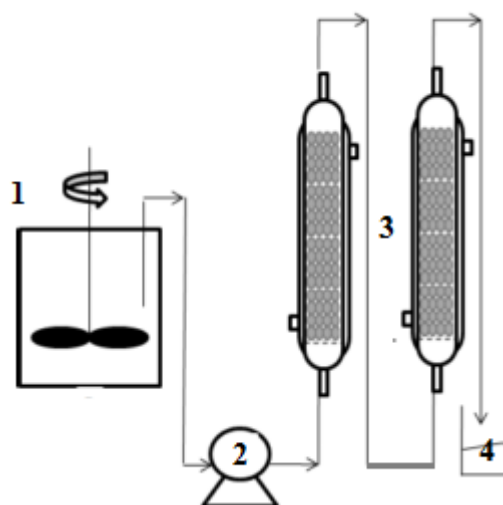


Figura 7 - Esquema experimental dos reatores de leito fixo em duplo estágio

Em (1) tem-se o substrato homogeneizado por um agitador magnético; (2) bomba peristáltica responsável por alimentar os reatores com substrato no sentido ascendente; em (3) reatores de coluna encamisados para o controle da temperatura da reação e empacotados com a mistura de biocatalisadores; (4) frasco de coleta do produto. O controle de temperatura foi realizado a partir de uma banho-maria conectado a camisa do reator.

As condições reacionais utilizadas nestes experimentos preliminares foram baseadas nas condições otimizadas por Poppe (2017), onde a mistura de lipases utilizada foi de 50 % de CALB, 27,5 % de RML e 22,5 % de TLL, a razão molar do substrato foi de 8,09:1 etanol:óleo de soja, o percentual de solvente utilizado foi de 20 % de terc-butanol em relação a massa de óleo e a temperatura da reação foi de 40 °C. Diferentes vazões de alimentação do substrato foram testadas para a avaliação do comportamento do sistema operacional.

3.2.1.2 Avaliação de reatores de leito fluidizado para a reação de síntese enzimática de ésteres etílicos

Inicialmente foram realizados ensaios de fluidização utilizando o reator apresentado na Figura 8 (A), o qual apresenta 150 mm de altura e 15 mm de diâmetro.

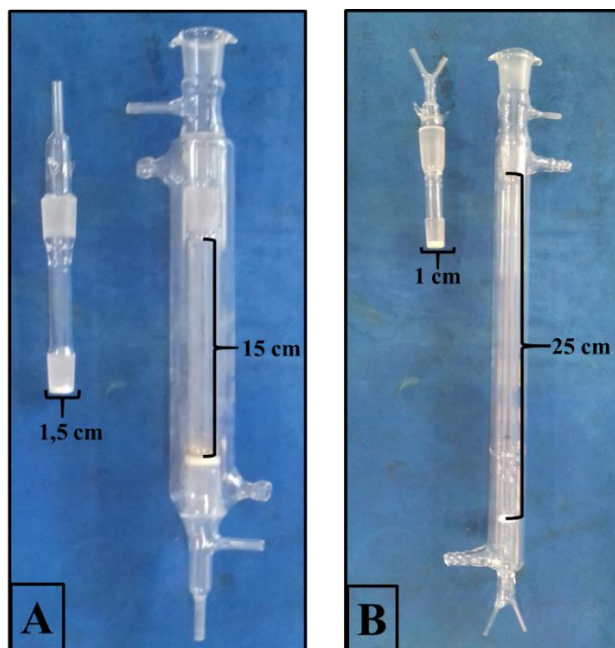


Figura 8 - Reatores utilizados para as reações de síntese de biodiesel em leito fluidizado.

O esquema experimental utilizado para os primeiros ensaios de fluidização realizados no reator da Figura 8 (A) está apresentado na Figura 9. O sistema é composto por: (1) agitador magnético para a homogeneização do substrato; (2) bomba peristáltica para a alimentação do substrato no reator; (3) reator de coluna encamisado para o controle da temperatura, com partículas de biocatalisador; (4) frasco para coleta dos produtos; (5) bomba peristáltica para a recirculação do produto. O controle de temperatura foi realizado a partir de uma banho-maria conectado a camisa do reator.

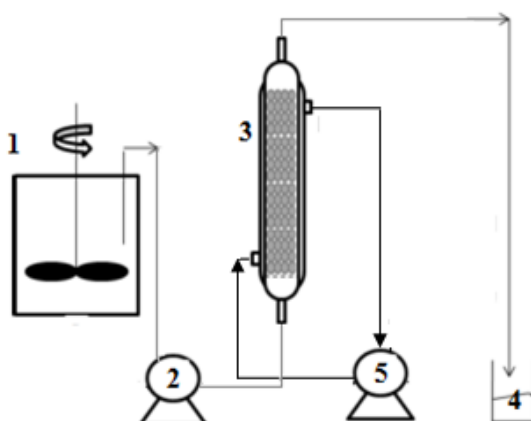


Figura 9 - Esquema experimental para o reator de leito fluidizado com recirculação lateral
Inicialmente foram realizados diversos ensaios de fluidização, utilizando-se as condições

reacionais previamente otimizadas por Poppe (2017) e descritas no item 3.2.1.1. Nestes ensaios avaliou-se o comportamento do sistema operacional, através de diferentes vazões de alimentação e recirculação, além de diferentes quantidades de enzima.

Após alguns testes, decidiu-se por otimizar as condições reacionais do processo através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), avaliando-se as variáveis: temperatura, % de solvente e composição do *combi-lipase*, utilizando apenas as lipases CALB e a TLL. As variáveis e os níveis utilizados estão apresentados na Tabela 5. Como resposta deste planejamento tem-se a conversão de ésteres etílicos. Todas as reações foram conduzidas em batelada utilizando-se como substrato óleo de soja e etanol, com uma razão molar de 6:1, 25 % de enzima em relação a massa de óleo e como solvente utilizou-se o terc-butanol. As reações foram conduzidas por 18 h sob uma agitação de 180 rpm.

Tabela 5 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR

| Variável | Nome | Níveis codificados | | | | |
|----------|------------------|--------------------|-------|----|------|------|
| | | -1,68 | -1 | 0 | 1 | 1,68 |
| X1 | Temperatura (°C) | 30 | 36,07 | 45 | 55,5 | 60 |
| X2 | Solvente (%) | 0 | 6,07 | 15 | 25,5 | 30 |
| X3 | CALB (%) | 0 | 20,24 | 50 | 85 | 100 |

Com as condições reacionais otimizadas, realizou-se novos ensaios de fluidização, onde também foram testadas diferentes vazões de alimentação e recirculação e diferentes quantidades de enzima para a avaliação do comportamento do sistema operacional.

Devido a alguns problemas operacionais, um novo reator foi confeccionado, baseado no estudo desenvolvido por Fidalgo (2014). A Figura 8 (B) mostra a nova configuração do reator, o qual apresenta 250 mm de altura e 10 mm de diâmetro.

A Figura 10 representa o esquema experimental utilizado nos ensaios de fluidização realizados com o novo reator.

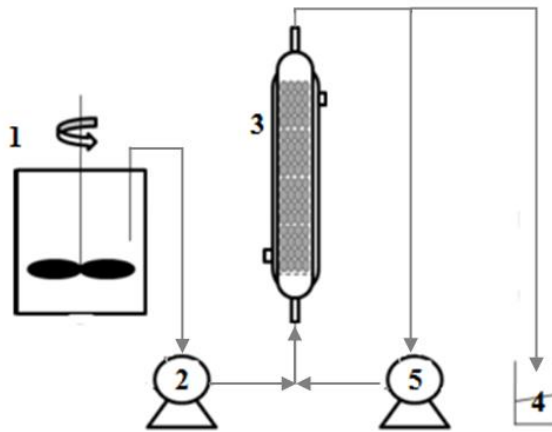


Figura 10- Esquema experimental 1 para o reator de leito fluidizado com recirculação entre a base e o topo do reator

Neste novo esquema experimental, a alimentação do substrato foi realizada através da bomba 2, de maneira ascendente e a recirculação através da bomba 5, no sentido do topo para a base do reator. Os testes de vazão de alimentação e recirculação e quantidade de biocatalisador foram realizados tomando-se como referência as condições ótimas utilizadas por Fidalgo (2014).

Após alguns ensaios, decidiu-se por adicionar uma terceira bomba na linha de saída dos produtos, programada com a mesma vazão da bomba de alimentação, conforme apresentado na Figura 11.

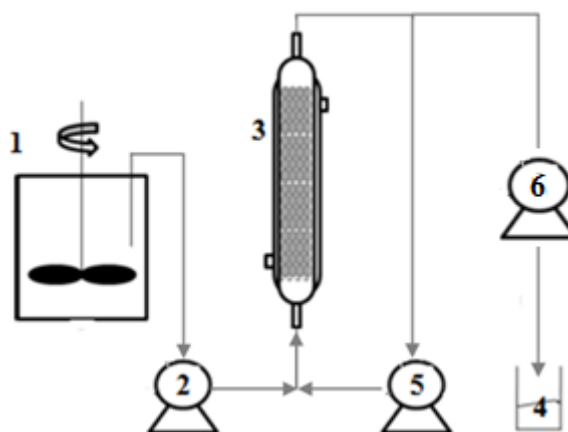


Figura 11 - Esquema experimental 2 para o reator de leito fluidizado com recirculação entre a base e o topo do reator

Com esta nova configuração, o sistema foi ligado em etapas, a fim de evitar a formação de bolhas de ar no sistema. Sendo assim, inicialmente ligou-se a bomba de alimentação,

esperou-se que todo o reator e as mangueiras estivessem completos com o substrato, e então ligou-se a bomba de recirculação e de coleta dos produtos.

As condições reacionais não foram alteradas e novos testes de vazão de alimentação do substrato e quantidade de biocatalisador foram realizados, para a avaliação do comportamento deste novo sistema operacional.

3.2.2 Condições da reação de transesterificação

As reações de transesterificação foram realizadas em batelada no aparato experimental descrito no item 3.1.2.

As condições reacionais utilizadas foram baseadas em estudos prévios realizados pelo grupo, para o óleo de soja (POPPE, 2017):

- 15 % de biocatalisador em relação a massa de óleo;
- Biocatalisador - *combi-lipase*: 10 % TLL, 15 % RML e 75 % de CALB;
- Razão Molar (Etanol:Óleo): 6:1
- Temperatura: 40 °C

As reações foram conduzidas por 1 h, em duplicata, e o percentual de ésteres foi avaliado nos tempos: 15 min, 30 min e 1 h para a determinação da taxa inicial da reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

3.2.3 Avaliação de diferentes amplitudes do ultrassom

Inicialmente utilizou-se o sistema de ultrassom continuamente, avaliando-se o efeito de diferentes amplitudes (10, 20, 30, 40 e 50 %) de ultrassom, na conversão de ésteres etílicos. As reações foram conduzidas por 2 h, e o percentual de ésteres obtido foi avaliado nos tempos: 15 min, 30 min, 45 min, 1 h e 2 h.

As demais condições reacionais seguem o descrito no item 3.2.1.

3.2.4 Delineamento composto central rotacional

Após ter avaliado o efeito das diferentes amplitudes na síntese de ésteres etílicos, e observado uma elevação gradativa da temperatura da reação com o aumento da amplitude e com uso contínuo das ondas de ultrassom, optou-se por otimizar as condições deste sistema, utilizando um DCCR. As variáveis avaliadas neste planejamento foram: amplitude, o uso de pulsos de ultrassom e tempo de pulso, as quais são apresentadas na Tabela 6 juntamente com os níveis codificados e seus respectivos valores. A escolha dos níveis foi realizada através de ensaios preliminares.

As demais condições reacionais seguem o descrito no item 3.2.1.

Tabela 6 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR

| Variável | Nome | Níveis codificados | | | | |
|----------|--------------------|--------------------|------|----|-------|------|
| | | -1,68 | -1 | 0 | 1 | 1,68 |
| X1 | Amplitude (%) | 30 | 38,1 | 50 | 61,9 | 70 |
| X2 | Pulso (%) | 30 | 38,1 | 50 | 61,9 | 70 |
| X3 | Tempo de Pulso (s) | 5 | 7,02 | 10 | 12,98 | 15 |

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o auxílio do programa *Statistica 7.0*, onde foi avaliada a influência das variáveis independentes: amplitude, pulso e tempo de pulso na taxa inicial da reação de transesterificação.

A matriz do planejamento foi construída com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 2 replicatas no ponto central, como apresentada na Tabela 8 (Capítulo 4). Os efeitos das variáveis, os respectivos erros e a significância estatística (p-valor) foram calculados com um limite de confiança de 95 %.

O modelo polinomial de segunda ordem, utilizado para a modelagem dos dados experimentais é apresentado pela Equação 1:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2$$

Equação 1 – Modelo polinomial de segunda ordem.

Onde Y representa a variável de resposta, β_0 a constante, β_i , β_{ii} and β_{ij} são os coeficientes dos efeitos linear, quadrático e de interação, respectivamente. Enquanto X_i e X_j representam os níveis codificados das variáveis x_i e x_j

As superfícies de resposta foram obtidas através do modelo matemático, e utilizadas para definir as condições ótimas de operação para cada variável.

3.2.5 Avaliação de diferentes concentrações de biocatalisador

Utilizando as condições otimizadas do sistema de ultrassom, avaliou-se o percentual ótimo de biocatalisador para a reação de transesterificação. Foram avaliados percentuais de 5, 15 e 25 % de biocatalisador em relação a massa de óleo presente no substrato.

A razão molar, a composição da mistura de lipases e demais condições reacionais seguem o descrito no item 3.2.1.

3.2.6 Avaliação de diferentes razões molares do substrato

Tendo em vista que o uso de ondas de ultrassom promove uma mistura reacional mais eficiente que a agitação mecânica, melhorando a miscibilidade entre os reagentes, podendo assim reduzir a razão molar entre etanol e óleo, avaliou-se diferentes razões molares: 3:1, 6:1 e 9:1 para a reação de transesterificação.

Utilizou-se as condições otimizadas do ultrassom e as demais condições reacionais seguem o descrito no item 3.2.1.

3.2.7 Efeito do solvente

O solvente utilizado nos experimentos foi o terc-butanol, com um percentual de 20 % em relação a massa de óleo. A escolha do solvente, bem como a concentração utilizada foi baseada em estudos prévios do grupo (POPPE, 2017). As demais condições reacionais seguem o descrito no item 3.2.1 e as condições otimizadas do sistema de ultrassom.

3.2.8 Efeito do uso de um sistema de agitação contínuo

Afim de avaliar a necessidade do uso de um sistema de agitação contínuo para a reação de transesterificação, quando o sistema de ultrassom é utilizado de forma intermitente (em pulsos), realizou-se um experimento utilizando um agitador magnético operando continuamente durante toda a reação. As condições reacionais e do sistema de ultrassom, foram as descritas no item 3.2.1 e as otimizadas pelo DCCR, respectivamente.

3.2.9 Cinética da reação de transesterificação

Realizou-se a cinética da reação de transesterificação assistida por ultrassom, com o intuito de avaliar a máxima conversão de ésteres etílicos. Neste experimento utilizou-se as condições descritas no item 3.2.1 e as condições ótimas do sistema de ultrassom. A reação foi realizada durante 6 h, avaliando-se o percentual de ésteres nos tempos de: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h e 6 h.

3.2.10 Avaliação do uso das enzimas individualmente comparadas ao *combi-lipase*

A fim de avaliar a eficiência do *combi-lipase* em relação as enzimas individualmente, realizou-se reações de transesterificação assistidas por ultrassom e catalisadas pelas enzimas TLL, RML e CALB, separadamente. Utilizou-se 15 % de biocatalisador em relação a massa

de óleo do substrato. As demais condições seguem o descrito no item 3.2.1 e as condições ótimas do sistema de ultrassom.

3.3 Análise cromatográfica

3.3.1 Purificação e preparação da amostra

Primeiramente, realizou-se o processo de separação do biodiesel do glicerol formado durante a reação, adicionando-se água destilada e centrifugando-se a mistura durante 15 min (2. 500 × g). Ao final do processo, coletou-se a fase superior, a qual continha os ésteres etílicos, para posterior análise em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GC-17A).

Como padrão interno utilizou-se heptadecanoato de metila, dissolvido em solvente heptano em uma concentração de 10 mg/mL.

Para a preparação da amostra para análise cromatográfica pesou-se 50 mg dos ésteres etílicos obtidos na reação e misturou-se com 1 mL de padrão interno.

O percentual de FAEE foi calculado utilizando o método de normalização com padronização interna, com base na norma europeia DIN EN 14103 22, conforme a Equação 2.

$$C(\%) = \frac{\Sigma A - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \cdot V_{PI}}{M_{amostra}} \times 100\%$$

Equação 2 – Fórmula para cálculo de percentual de FAEE.

Onde:

C (%) = Concentração de ésteres etílicos;

ΣA = Soma da área total dos picos de ésteres alquílicos de C₄ até C₂₄;

A_{PI} = Área do pico correspondente ao padrão interno;

C_{PI} = Concentração do padrão interno (10 mg/mL);

V_{PI} = Volume do padrão interno (mL);

M_{amostra} = Massa da amostra (mg)

3.3.2 Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GC-17A) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 milímetros ID x 0,25 mM, J&W Scientific). As condições da análise foram: temperatura do injetor: 300 °C; razão de split = 1:30; temperatura do detector FID: 310 °C. Como gás de arraste utilizou-se Nitrogênio com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As condições cromatográficas

foram: temperatura inicial da coluna de 50 °C; velocidade de aquecimento: 10 °C min⁻¹ até a temperatura final de 310 °C. O volume injetado de amostra foi de 1 µL, e o tempo total da análise foi de 32 min.

CAPÍTULO 4 - Resultados e discussão

4.1 Resultados e considerações dos experimentos preliminares

Esta dissertação de mestrado faz parte de um projeto maior denominado “Desenvolvimento de um reator de coluna com lipases imobilizadas para a síntese de biodiesel a partir de óleo vegetal residual” do Grupo de Pesquisa Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise, da UFRGS, o qual teve início no ano de 2013. Tendo como objetivo geral desenvolver um reator contínuo para a produção de biodiesel através da catalise enzimática por misturas de lipases imobilizadas usando óleo residual e etanol como matérias primas. Desde então, diversos experimentos já foram desenvolvidos pelo grupo:

- 1) Estudos de diferentes processos de imobilização de enzimas, e suas influências na estabilidade da enzima imobilizada;
- 2) Otimização dos parâmetros reacionais para a reação de transesterificação, utilizando diferentes matérias primas e mistura de lipases;
- 3) Estudo de diferentes sistemas para a reação de transesterificação: agitadores orbitais (shaker), banho de ultrassom e reator de leito fixo.

E alguns destes trabalhos já foram publicados na literatura:

MATTE, C. R.; BUSSAMARA, R.; DUPONT, J.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, p. 1-14, 2014.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 127, p. 67-75, 2016.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. Biotechnology Advances, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M. D. C. R.; FERNANDEZLAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Applied Catalysis A: General*, v. 490, n. 0, p. 50-56, 2015.

Desta forma, este estudo de mestrado objetivou dar continuidade a este projeto, tendo como base os resultados anteriores, buscando utilizar as condições já otimizadas em seus experimentos e aprimorar as técnicas de produção de biodiesel catalisada por mistura de lipases em novos modelos de reatores. Sendo assim, tomou-se como base as sugestões de trabalhos futuros realizadas em Poppe (2017).

4.1.1 Avaliação de um sistema constituído por reatores de leito fixo conectados em série para a síntese enzimática de ésteres etílicos

Poppe (2017), em uma das etapas de sua tese de doutorado desenvolveu um reator de leito fixo, o qual consistia de um cilindro com 65 mm de altura e 10 mm de diâmetro, com um volume útil de 1,4 mL, equipado com uma camisa externa para o controle de temperatura. O leito do reator foi empacotado com uma mistura de lipases, otimizada previamente e por esferas de vidro, que impediam a compactação do leito, e conseqüentemente a formação de caminhos preferencias e limitações na transferência de massa. Com este estudo foi possível obter uma estabilidade operacional de 30 dias para a reação de transesterificação utilizando o óleo de soja e o óleo residual de fritura. No entanto a conversão de biodiesel foi de apenas 50 %.

Tendo em vista a boa estabilidade operacional do sistema, no entanto com baixos rendimentos, decidiu-se por iniciar este projeto de mestrado avaliando a síntese enzimática de biodiesel em reatores de leito fixo com duplo estágio. O objetivo deste estudo foi aumentar o rendimento da reação, adicionando-se um segundo reator ao sistema, aumentando assim o tempo de residência da mistura reacional no reator e conseqüentemente o rendimento da reação (WANG et al., 2011).

Os experimentos iniciaram com o teste de diferentes vazões de alimentação do substrato no sistema reacional. No entanto para que o substrato chegasse no segundo reator, foi necessário aumentar a vazão da bomba a níveis muito elevados para este modelo de reator, gerando uma pressão muito alta na primeira coluna, levando a vazamentos tanto nas mangueiras como na tampa superior do reator, impedindo que a reação continuasse. Após este experimento, novas

tentativas foram realizadas, utilizando-se abraçadeiras de nylon nas mangueiras e algumas técnicas para fixar melhor a tampa do reator, tentando impedir os vazamentos, contudo, os problemas operacionais continuaram e os objetivos esperados com estes experimentos não foram atingidos.

Uma alternativa para minimizar essa pressão interna no primeiro reator, e possibilitar a passagem do substrato até o segundo, seria a inclusão de uma bomba na saída do primeiro reator, succionando o produto formado e alimentando o segundo reator. No entanto, não havia disponibilidade desse equipamento.

Sendo assim, optou-se por dar seguimento no projeto através do estudo da reação de síntese enzimática de biodiesel em reatores de leito fluidizado.

4.1.2 Avaliação de reatores de leito fluidizado para a reação de síntese enzimática de ésteres etílicos

O uso de reatores de leito fluidizado permitem uma melhor transferência de massa do processo, através da homogeneização do meio e movimentação das partículas, evitando a decantação das enzimas no fundo do reator, e impedindo a ocorrência de caminhos preferencias (POPPE et al., 2015a). Motivada por estas vantagens e com o objetivo de obter um processo contínuo, com maiores rendimentos de biodiesel, utilizando um sistema diferente dos que já haviam sido desenvolvidos até o momento, optou-se por avaliar o uso de reatores de leito fluidizado para a produção de biodiesel catalisada por mistura de lipases imobilizadas.

Inicialmente foram realizados ensaios de fluidização utilizando o reator apresentado na Figura 8 (A), o qual foi desenvolvido com o objetivo de aumentar a escala do processo em relação ao reator apresentado na Figura 6.

Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se a mistura de lipases previamente otimizada por Poppe (2017) para o óleo de soja. No entanto, pode-se observar após diversos ensaios e tentativas de melhorar o processo, que as enzimas não fluidizavam de maneira homogênea, enquanto as enzimas CALB e a TLL estavam em movimento ao longo da coluna do reator, a RML permanecia ao fundo, praticamente sem movimento e separada das demais. Este comportamento está associado às características das partículas de biocatalisador, visto que apresentam densidade, conformação e diâmetros diferentes.

Com base neste comportamento, decidiu-se otimizar as condições reacionais do processo em função da síntese de ésteres etílicos: temperatura, % de solvente e composição do *combi-lipase*, através de um DCCR. Então, através de uma análise estatística dos resultados obtidos,

com o auxílio do *Software Statistica*, obteve-se como condições ótimas: temperatura de 60 °C, concentração de solvente de 10,5 % em relação a massa de óleo e para a mistura de lipases 15 % de TLL e 85 % de CALB. Com estas condições obteve-se uma conversão de 90 %.

Com as condições otimizadas, realizou-se os primeiros ensaios de fluidização, onde foram testadas diferentes vazões de alimentação e recirculação e também diferentes quantidades de enzima. Um sistema de recirculação foi utilizado, pois a vazão de alimentação em processos envolvendo biocatalisadores não pode ser muito alta, visto que é preciso um tempo de contato maior entre o substrato e as enzimas para que a reação ocorra. A partir do momento em que obteve-se uma relação entre vazão de alimentação/recirculação e quantidade de biocatalisador, que permitisse uma movimentação homogênea das partículas, deixou-se o experimento funcionando de maneira contínua, a fim de observar seu comportamento e a conversão de ésteres. No entanto, o sistema não manteve-se estável, após alguns minutos de reação já era possível observar que a altura do leito ia diminuindo ao longo do tempo, até que todas as enzimas decantaram, não havendo mais movimentação do leito. Desta forma, manteve-se a vazão de alimentação constante, e testou-se vazões de recirculação mais altas, que levaram a problemas de vazamento tanto nas mangueiras quanto na tampa do reator, sugerindo que a pressão interna dentro do leito era muito alta para a estrutura do reator.

Após algumas discussões e novas pesquisas na literatura, decidiu-se por construir um novo reator com algumas alterações na configuração. Tomou-se como base o trabalho desenvolvido por Fidalgo (2014), o qual realizou a produção enzimática de biodiesel em um reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu. Obtendo conversões de biodiesel de 98 % utilizando como catalisador a lipase CALB, durante 15 dias de operação, sem a perda da atividade do biocatalisador (FIDALGO, 2014).

Sendo assim, o novo reator foi confeccionado mantendo-se as mesmas relações de altura e diâmetro utilizadas pelo autor, assim como a mesma forma de alimentação e recirculação do substrato e produto, respectivamente. As principais diferenças deste novo sistema, quando comparado ao da Figura 9, são a relação de altura e diâmetro do leito, onde o novo reator apresenta uma relação diâmetro e altura 40 % maior que o reator da Figura 8 (A), e o sistema de recirculação que é feito entre o topo e a base do reator.

De acordo com a Figura 10, com a alimentação do substrato sendo realizada através da bomba 2, de maneira ascendente e realizando-se a recirculação através da bomba 5, no sentido do topo para a base do reator, realizou-se os primeiros testes de vazão e quantidade de biocatalisador, tomando como referência as condições ótimas encontradas por Fidalgo (2014).

Porém, mesmo com essa nova configuração, os problemas experimentais continuaram, além das questões relacionadas aos vazamentos, o sistema de recirculação não funcionou de maneira esperada. A bomba 5 de recirculação, que estava conectada na saída do reator juntamente com a saída dos produtos, onde as linhas estavam separadas por um divisor em Y, começou a succionar o produto, invertendo o fluxo do processo no sentido do frasco do substrato, e conseqüentemente, esvaziando a coluna do reator.

Não se esperava que a bomba de recirculação fosse influenciar de tal maneira o sistema, uma vez que esta bomba succiona o produto no topo do reator, retornando-o diretamente ao sistema, na mesma vazão. Então, buscando alternativas para solucionar este problema, adicionou-se uma terceira bomba na linha de saída do produto, programada com a mesma vazão da bomba de alimentação, conforme representado na Figura 11.

Nos primeiros 30 minutos de reação, o reator mante-se estável, com uma fluidização homogênea, no entanto, ao longo do processo, bolhas de ar formaram-se e a bomba de recirculação voltou a influenciar no sentido do fluxo, sugerindo que mais uma vez, o dimensionamento e a confecção deste reator não estavam corretos, impedindo a continuidade destes experimentos.

Neste momento, tendo em vista as inúmeras dificuldades enfrentadas com os reatores de leito fixo em duplo estágio e de leito fluidizado, e levando-se em consideração o pouco tempo para o término do mestrado, decidiu-se por mudar a direção do projeto, iniciando-se o estudo da avaliação da influência de um sistema de ultrassom, por irradiação direta, na síntese enzimática de biodiesel utilizando um reator em batelada.

No entanto, em paralelo com estes ensaios, um novo reator de leito fluidizado foi idealizado e começou a ser confeccionado, com novas alterações na sua configuração: i) a tampa do reator será com rosca, impedindo que ocorra vazamentos; ii) a recirculação voltará a ser lateral, pois percebeu-se que com um divisor em Y, não foi possível realizar a recirculação sem influenciar na direção do fluxo do sistema; iii) o suporte utilizado para manter as enzimas aprisionadas no leito, será feito a partir de uma tela metálica e não mais de vidro sinterizado, devido à resistência na passagem do fluxo que este material estava proporcionando. Acredita-se que este é um dos principais fatores da configuração do reator que tem levado a elevadas perdas de carga do sistema, impedindo que o leito mantenha uma fluidização estável, além de auxiliar na pressão interna gerada, resultando no vazamento nas conexões com as mangueiras. Contudo, devido ao prazo para conclusão do mestrado, não foi possível apresentar estes resultados.

4.2 Cinética da reação de transesterificação

A fim de otimizar a eficiência da reação de transesterificação catalisada por lipases imobilizadas, para a produção de biodiesel, utilizou-se um sistema de ultrassom, com o intuito de aumentar a miscibilidade entre os reagentes e assim favorecer a transferência de massa e a taxa da reação, reduzindo o tempo do processo e o consumo de reagentes (YU et al., 2010).

Neste sentido, inicialmente avaliou-se a influência de diferentes amplitudes de ultrassom, atuando de forma contínua na reação de transesterificação, na taxa inicial da reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$). O resultado deste estudo está apresentado na Tabela 7 e na Figura 12.

Tabela 7 - Taxa inicial da reação para diferentes amplitudes de ultrassom

| Amplitude (%) | Taxa inicial da reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) |
|----------------------|---|
| 10 | 266,57 |
| 20 | 284,12 |
| 30 | 307,37 |
| 40 | 378,38 |
| 50 | 491,98 |

Pode-se observar através da Tabela 7 que o aumento da amplitude gerou um aumento na taxa inicial da reação, a qual foi avaliada nos primeiros 30 minutos do processo. No entanto, quando se observa a Figura 12, que apresenta o gráfico da conversão de biodiesel em função do tempo para as diferentes amplitudes estudadas, pode-se verificar que amplitudes superiores a 40 %, após os 50 min iniciais, já começavam a apresentar uma redução no rendimento de conversão de biodiesel. Este resultado pode estar associado com a temperatura da mistura reacional, uma vez que a amplitude de 50 % gerou um aquecimento na reação, atingindo a temperaturas superiores a 60 °C, prejudicial a atividade das enzimas, as quais apresentam uma faixa ótima de trabalho situada entre 25 – 35 °C (RODRIGUES et al., 2008). Amplitudes de 60 e 70 % também foram avaliadas, porém tiveram que ser interrompidas nos primeiros 30 minutos de reação, pois a temperatura da mistura reacional chegou a 80 °C e começou a evaporar, visto que a mesma é composta por etanol, o qual apresenta uma temperatura de ebulição de 78 °C.

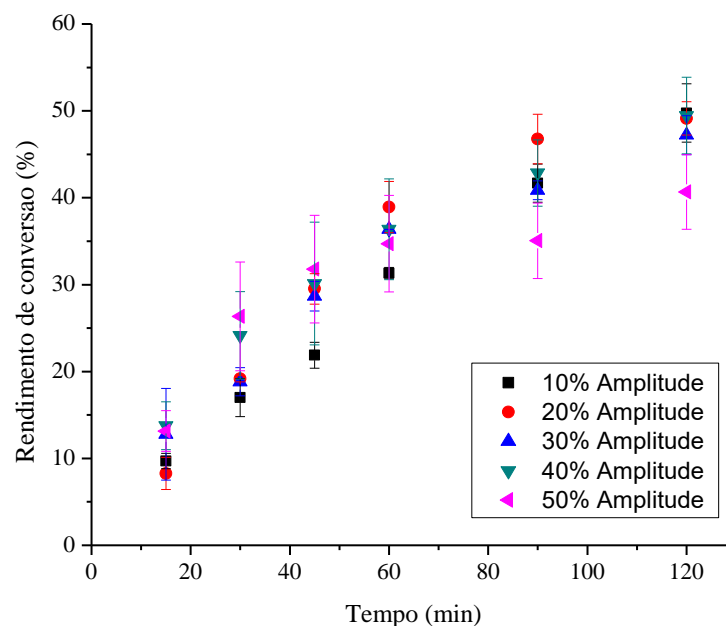


Figura 12 – Influência de diferentes amplitudes no rendimento da síntese enzimática de biodiesel

O ajuste da amplitude está diretamente associado com a potência fornecida pelo equipamento a mistura reacional. Enquanto uma amplitude de 10 % fornece uma potência de 20 W, uma amplitude de 50 % gera uma potência de 60 W. O grau de conversão da reação de transesterificação, assim como de qualquer processo químico conduzido na presença de radiação ultrassônica, é diretamente influenciado pela potência fornecida pelo equipamento. Potências elevadas geram uma melhor transferência de massa quando comparadas com potências mais baixas, devido a maior atividade cavitacional, promovendo uma mistura mais eficiente do meio reacional. No entanto, devido a grande dispersão de energia, ocorre uma elevação na temperatura, podendo levar a desnaturação do biocatalisador (SUBHEDAR; GOGATE, 2016).

4.3 Otimização das condições do sistema de ultrassom para a reação de transesterificação

Com o objetivo de otimizar as condições do sistema de ultrassom para a síntese enzimática de biodiesel, utilizou-se um DCCR, para avaliar a influência das variáveis independentes: amplitude, pulso de ultrassom e tempo de pulso na taxa inicial ($\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

desta reação. Optou-se por estudar as variáveis, pulso e tempo de pulso com o intuito de analisar a influência de amplitudes superiores a 50 %, sem que a temperatura da reação atingisse patamares que pudessem desnaturar o biocatalisador. Isto é possível pois a função pulso permite que o equipamento trabalhe de forma intermitente, ou seja, o mesmo é programado para funcionar ligando e desligando o sistema de ultrassom durante toda a reação, sendo assim, é possível controlar sua temperatura.

A Tabela 8 mostra a matriz do planejamento, com os resultados obtidos da taxa inicial da reação para as condições estudadas.

Tabela 8 - Resposta do DCCR para as condições do sistema de ultrassom

| | X1 – Amplitude (%) | X2 – Pulso (%) | X3 – Tempo de Pulso (s) | Taxa inicial da reação (mmol.L⁻¹.h⁻¹) |
|----|---------------------------|-----------------------|--------------------------------|--|
| 1 | 38 (-1) | 38 (-1) | 7 (-1) | 206,22 |
| 2 | 62 (1) | 38 (-1) | 7 (-1) | 187,37 |
| 3 | 38 (-1) | 62 (1) | 7 (-1) | 217,41 |
| 4 | 62 (1) | 62 (1) | 7 (-1) | 182,48 |
| 5 | 38 (-1) | 38 (-1) | 13 (1) | 225,28 |
| 6 | 62 (1) | 38 (-1) | 13 (1) | 231,70 |
| 7 | 38 (-1) | 62 (1) | 13 (1) | 221,33 |
| 8 | 62 (1) | 62 (1) | 13 (1) | 188,22 |
| 9 | 30 (-1,68) | 50 (0) | 10 (0) | 236,22 |
| 10 | 70 (1,68) | 50 (0) | 10 (0) | 174,88 |
| 11 | 50 (0) | 30 (-1,68) | 10 (0) | 141,55 |
| 12 | 50 (0) | 70 (1,68) | 10 (0) | 187,23 |
| 13 | 50 (0) | 50 (0) | 5 (-1,68) | 264,82 |
| 14 | 50 (0) | 50 (0) | 15 (1,68) | 253,81 |
| 15 | 50 (0) | 50 (0) | 10 (0) | 201,84 |
| 16 | 50 (0) | 50 (0) | 10 (0) | 203,03 |

Exemplificando as condições de reação, no experimento 1 do planejamento, onde a mesma foi realizada com uma amplitude de ultrassom de 38 % (resultando em uma potência de 45 W) com um pulso também de 38 % em um tempo de pulso de 7 s, temos uma reação em que o equipamento de ultrassom se manteve 2,7 s ligado e 4,3 s desligado de forma intermitente até

o final da reação.

Através dos dados apresentados na Tabela 8 e com o auxílio do *Software Statistica* foi possível realizar a análise estatística da influência de cada variável estudada na taxa inicial da reação de síntese de ésteres etílicos. O resultado deste estudo é mostrado na Tabela 9, onde encontram-se os efeitos linear, quadrático e a interação das variáveis amplitude (X_1), pulso (X_2) e tempo de pulso (X_3), além dos coeficientes de regressão, o valor p, e erros padrões.

Entre os efeitos mencionados, os lineares são os mais importantes, representando uma resposta média para a mudança do nível -1 para +1 de cada variável. Quando esse efeito é positivo significa que ocorrerá um aumento na resposta com a mudança de nível, ao contrário do efeito negativo, que promoverá uma diminuição da resposta (POPPE et al., 2015b).

Tabela 9 – Análise estatística do DCCR para as condições do sistema de ultrassom

| Variáveis | Efeito | Coefficiente de regressão | Erro padrão do coeficiente | p-valor |
|-------------------|---------|---------------------------|----------------------------|---------|
| Média* | 202,705 | 202,705 | 0,593 | 0,002 |
| Linear | | | | |
| X_1^* | -26,899 | -13,449 | 0,227 | 0,011 |
| X_2 | 5,219 | 2,610 | 0,227 | 0,055 |
| X_3^* | 7,996 | 3,998 | 0,227 | 0,036 |
| Quadrático | | | | |
| X_1X_1 | 0,936 | 0,4681 | 0,276 | 0,339 |
| $X_2X_2^*$ | -28,230 | -14,115 | 0,276 | 0,012 |
| $X_3X_3^*$ | 39,035 | 19,517 | 0,276 | 0,009 |
| Interações | | | | |
| $X_1X_2^*$ | -13,902 | -6,951 | 0,297 | 0,027 |
| X_1X_3 | 6,772 | 3,386 | 0,297 | 0,058 |
| $X_2X_3^*$ | -13,432 | -6,716 | 0,297 | 0,028 |

*Estatisticamente significativo a 95 % de confiança, onde X_1 – Amplitude (%); X_2 – Pulso (%); X_3 – Tempo Pulso(s).

As variáveis serão estatisticamente significativas, ao nível de confiança de 95 %, se os efeitos apresentarem valor de p inferior a 0,05, sendo assim, neste estudo foram significativos os efeitos: i) lineares para as variáveis: amplitude (X_1) e tempo de pulso (X_3); ii) quadráticos para as variáveis: pulso (X_2) e tempo de pulso (X_3); iii) interação entre as variáveis: amplitude e pulso (X_1 e X_2) e pulso e tempo de pulso (X_2 e X_3); as demais variáveis não foram significativas para o processo. Também foi possível constatar, através destes valores, que a variável amplitude é a que mais impacta a reação de síntese de ésteres etílicos, de forma negativa, ou seja, com o aumento da amplitude, tem-se uma redução na taxa inicial da reação.

A Equação 3 descreve o modelo matemático para a taxa inicial da reação de transesterificação, obtido através do ajuste dos dados experimentais, considerando apenas as variáveis significativas.

$$Y = 202,70 - 26,89X_1 + 7,99X_3 - 28,23X_2^2 + 39,03X_3^2 - 13,90X_1X_2 - 13,43X_2$$

Equação 3 - Modelo matemático das variáveis significativas para a taxa inicial da reação de transesterificação deste estudo

Onde Y representa a taxa inicial da reação ($\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), X_1 , X_2 e X_3 as variáveis amplitude, pulso e tempo de pulso respectivamente.

A Figura 13 apresenta as curvas de contorno para as variáveis do sistema de ultrassom, onde é possível observar a interação entre 2 variáveis, mantendo a terceira variável fixa no ponto central.

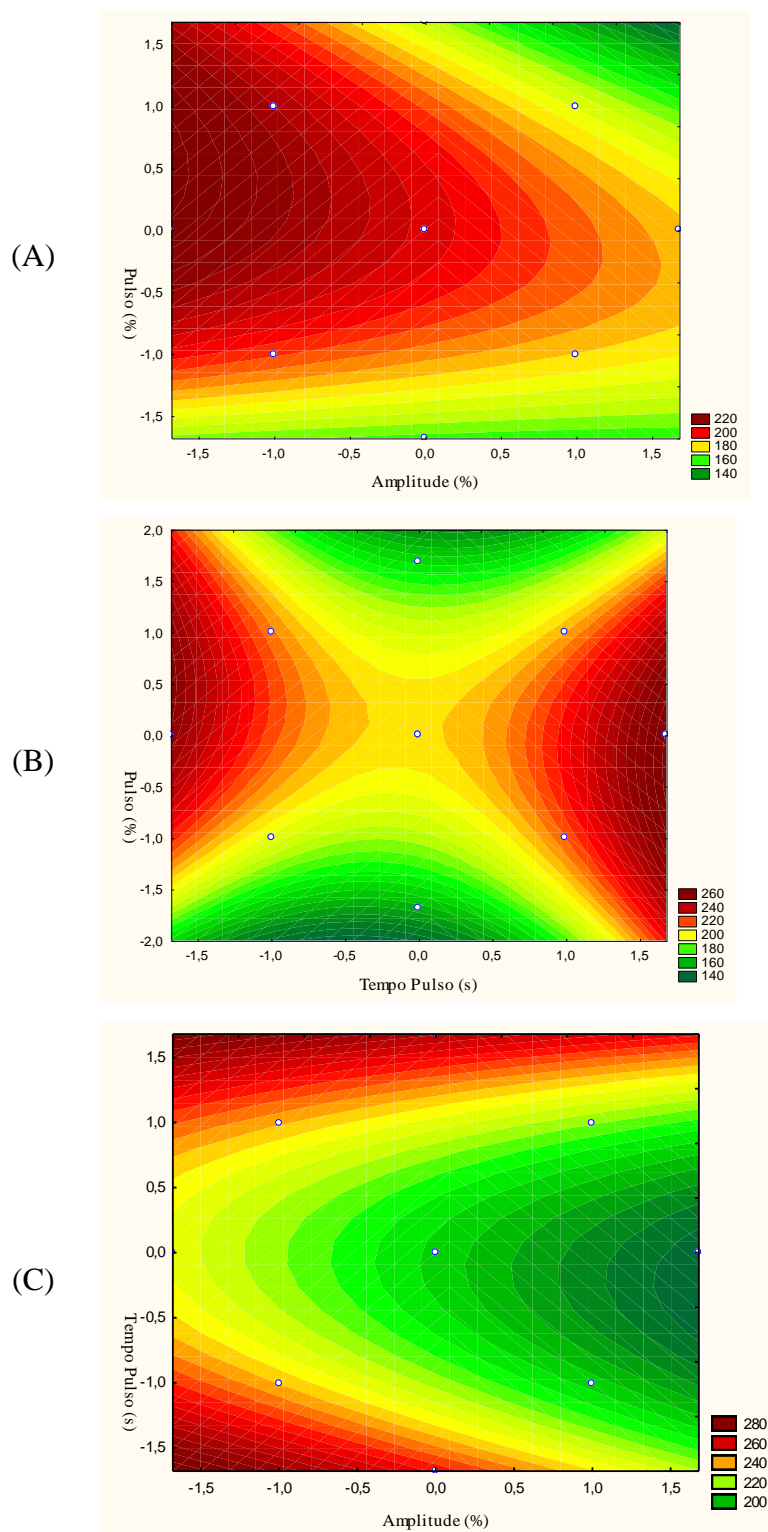


Figura 13 – Curvas de contorno para a reação de síntese enzimática de ésteres etílicos em função da taxa inicial da reação, para as variáveis (A) amplitude versus pulso; (B) tempo de pulso versus pulso; (C) amplitude versus tempo de pulso.

A Figura 13 (A) mostra o efeito da interação entre as variáveis amplitude e pulso,

deixando evidente que menores amplitudes favorecem a taxa inicial da reação (região em vermelho) e que a variável pulso não é significativa para o processo, uma vez que a área em vermelho, a qual representa elevadas taxas de reação, compreende valores de pulso em praticamente toda a região avaliada neste estudo. Através da imagem (B), a qual apresenta o efeito de interação entre as variáveis pulso e tempo de pulso, observa-se que maiores valores de taxa são obtidos próximos aos pontos axiais (-1,68 e +1,68) para a variável tempo, para praticamente qualquer valor de pulso. Já a imagem (C) representa o efeito de interação entre as variáveis amplitude e tempo de pulso, mostrando que baixas amplitudes em tempos de pulso com valores próximos aos pontos axiais resultam nas maiores taxas da reação. Este resultado sugere que em estudos futuros sejam avaliados valores de tempo de pulso inferiores a -1,68 e superiores a +1,68, uma vez que as melhores respostas se situaram em torno dos pontos extremos.

As condições ótimas de trabalho para as variáveis estudadas, obtidas através da análise estatística, são mostradas na Tabela 10. Sob estas condições, o valor predito pelo *Software Statistica* para a maior taxa inicial da reação foi de 265,32 mmol.L⁻¹.h⁻¹.

Então, utilizando as condições otimizadas realizou-se a validação experimental do modelo predito, com duas repetições, obtendo-se um valor para a taxa inicial da reação de 257,40 mmol.L⁻¹.h⁻¹, mostrando uma correlação satisfatória entre os resultados experimentais e o modelo predito.

Tabela 10 – Resultado da otimização das variáveis do sistema de ultrassom para a reação de transesterificação.

| | Codificada | Decodificada | Taxa inicial da reação (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹) | |
|-----------------|------------|--------------|--|---------------|
| | | | Valor obtido | Valor predito |
| Amplitude (%) | -1,68 | 30 | | |
| Pulso (%) | 0 | 50 | 257,40 | 265,32 |
| Tempo Pulso (s) | 1,68 | 15 | | |

Através do planejamento experimental, obteve-se como condição ótima para essa reação uma amplitude de 30 % (Ultrassom: 700 W/ 20 kHz), a qual representa uma potência de aproximadamente 40 W. Este resultado está de acordo com Bhangu et al. (2017), os quais avaliaram a produção de biodiesel, utilizando como biocatalisador a lipase *Candida rugosa* e como substrato óleo de canola e metanol. Com este estudo, analisaram o efeito das condições

experimentais: potência, frequência e diâmetro da sonda de ultrassom, e concentração de enzima, na conversão de ésteres metílicos. Os resultados mostraram que com uma potência de 40 W utilizando uma sonda com 35 mm de diâmetro, com uma concentração de enzima de 0,23 % em relação a massa de óleo e uma razão molar de 5:1 metanol:óleo, a conversão de ésteres chegava a aproximadamente 100 %, e o tempo de reação reduzia de 24 h para 1,5 h. Desta forma, os autores constataram que o uso do ultrassom, em baixas intensidades, é uma ferramenta interessante para a síntese de biodiesel via catálise enzimática, visto que elevadas intensidades tendem a inativar o biocatalisador, reduzindo assim a eficiência do processo.

Kumar et al. (2011) estudaram a produção de ésteres metílicos em um sistema assistido por ultrassom, utilizando como substrato óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*) e metanol. Como biocatalisador utilizaram a lipase produzida a partir da bactéria *E. aerogenes*, imobilizada em sílica, e obtiveram o máximo de conversão (84,5 %) em 30 min de reação utilizando uma amplitude de ultrassom de 50 % com um sistema de pulso de 0,7 (Ultrassom: 200 W/ 24 kHz). Observaram também que valores de amplitude e pulso superiores a estes não influenciavam significativamente no rendimento de biodiesel.

Adewale et al. (2015) avaliaram o efeito das variáveis amplitude e ciclo de ultrassom na reação de transesterificação do resíduo de sebo bovino com metanol, catalisada pela enzima CALB, em um sistema livre de solventes. Investigaram amplitudes entre 30 e 50 %, utilizando um equipamento de ultrassom de 500 W com uma frequência de 20 kHz. Com este estudo, observaram que a amplitude de 30 % era muito baixa para a matéria prima utilizada, uma vez que a mesma apresenta uma viscosidade muito alta. Sendo assim, obtiveram como condição ótima de trabalho uma amplitude de 40 % e um ciclo de 5 Hz. Através do teste de Tukey observou-se que o efeito das variáveis amplitude e ciclo, bem como a interação entre elas, foram significativas ($p < 0,05$) para a reação de transesterificação.

Após otimizadas as condições do ultrassom, foram avaliados os parâmetros reacionais: razão molar óleo:álcool, concentração de biocatalisador, necessidade do uso de solvente e de um sistema de agitação em conjunto com o ultrassom. O estudo dessas variáveis é fundamental, visto que elas influenciam diretamente no rendimento da reação de síntese enzimática de biodiesel.

4.4 Avaliação de diferentes concentrações de biocatalisador

Tendo em vista que a taxa de uma reação enzimática é diretamente influenciada pela concentração de biocatalisador presente no processo, experimentos foram conduzidos variando-

se o percentual de enzima em 5, 10 e 25 % em relação a massa de óleo, com o intuito de obter a quantidade ótima de catalisador capaz promover maiores conversões de ésteres etílicos. A Figura 14 apresenta o resultado do rendimento de conversão de ésteres etílicos (%) em função do tempo (s) para os diferentes percentuais de biocatalisador avaliados, onde fica evidente que um aumento de 5 para 15 % de enzima é essencial para a reação, uma vez que o rendimento da reação passa de 9,17 para 33,16 %. No entanto, quando este percentual passa de 15 para 25 %, o rendimento aumenta apenas em 10 %, acréscimo muito pequeno comparado ao aumento gerado no custo do processo, uma vez que a quantidade de catalisador precisa ser aumentada em aproximadamente 70 %.

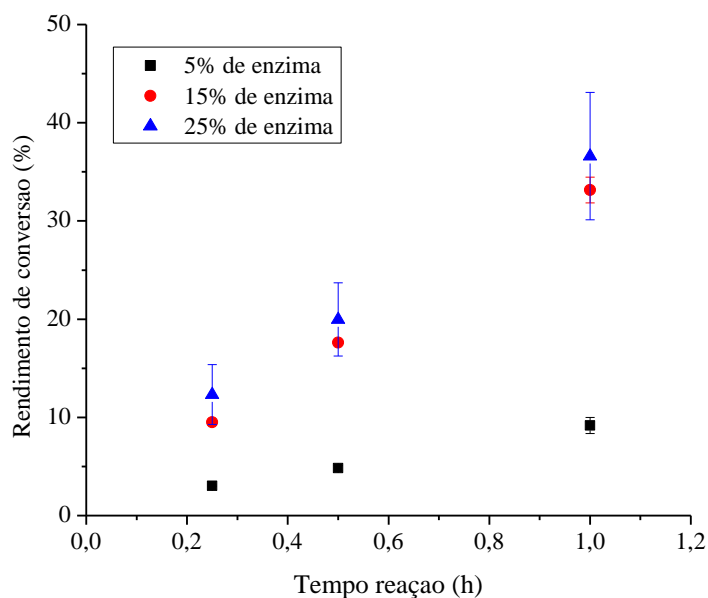


Figura 14 – Avaliação de diferentes percentuais de biocatalisador na síntese de ésteres etílicos

Em condições ideais, a taxa da reação tende a aumentar com o acréscimo na concentração de enzimas, até um ponto onde a superfície de contato entre o biocatalisador e o substrato satura e a taxa da reação passa a manter-se constante mesmo com a adição de mais enzima. Este comportamento é observado principalmente em reações conduzidas por sistemas com agitadores convencionais, onde as partículas tendem a se aglomerar, reduzindo a taxa da reação (LIU et al., 2008).

Neste sentido, o uso de um sistema de ultrassom é uma alternativa para solucionar este problema, pois o mesmo é capaz de promover uma maior dispersão das partículas, evitando sua aglomeração, aumentando a superfície de contato entre as enzimas e o meio reacional,

permitindo assim um aumento na quantidade de biocatalisador sem prejudicar o rendimento da reação, como pode ser observado através deste estudo, onde a concentração de 25 % de enzimas, apresentou melhores rendimentos do que as demais concentrações.

No entanto, em alguns estudos utilizando sistemas ultrassônicos é possível observar maiores conversões de produtos, com menores concentrações de biocatalisador, isso porque o processo de cavitação gerado pelo ultrassom pode ativar o catalisador sólido, e retirar o material que está ocupando o sítio ativo, aumentando a superfície de contato e da transferência de massa entre o catalisador e o substrato (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015; GOGATE; RAYAL; PANDIT, 2006; KUMAR et al., 2011)

Michelin et al. (2015) estudaram o processo de transesterificação enzimática utilizando como substrato óleo de macaúba e etanol, e como biocatalisador a lipase comercial CALB, em um banho ultrassônico. Através de um planejamento experimental 2^{4-1} , para avaliar o efeito das variáveis: temperatura, concentração de enzima, razão molar e amplitude de ultrassom, na conversão de biodiesel, observaram que a única variável significativa ao processo era a concentração de biocatalisador. Sendo assim, avaliaram posteriormente, a influência de diferentes % de enzima (1, 5, 10 e 20 %), mantendo fixas as condições razão molar, temperatura e potência em: 1:9, 65 °C e 132 W, respectivamente. Com este estudo obtiveram maiores conversões (aproximadamente 80 %), utilizando 20 % de biocatalisador em 30 min de reação.

Batistella et al. (2012) estudaram a transesterificação enzimática do óleo de soja, utilizando um sistema de banho ultrassônico, utilizando como biocatalisadores as lipases CALB e RML. Através de um estudo estatístico, também observaram que a concentração de enzima era uma variável que influenciava de maneira positiva a reação de transesterificação, para os dois biocatalisadores estudados. Obtiveram em 4 h de reação, conversões de 57 % e 86 % para as lipases CALB e RML, utilizando uma concentração de 27,1 % 12,9 % de enzima em relação a massa de óleo, respectivamente.

Também utilizando como biocatalisador a lipase imobilizada CALB para a reação de transesterificação do sebo de carne bovina, Adewale et al. (2015) obtiveram maiores conversões de biodiesel com um percentual de 6 % de biocatalisador. Aumentando este percentual para 8 % não observaram nenhuma diferença no rendimento da reação. Neste estudo, foi utilizado um sistema de ultrassom por irradiação direta, através de uma sonda, o que torna o processo normalmente mais eficiente, justificando assim, a menor concentração de enzima utilizada neste estudo quando comparada aos demais trabalhos citados.

4.5 Avaliação de diferentes razões molares do substrato

A razão molar é uma das variáveis que mais afeta a conversão da reação de transesterificação para a produção de biodiesel (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015). A estequiometria desta reação, requer 3 moles de álcool para 1 mol de triglicerídeo, entretanto, por ser uma reação reversível, normalmente utiliza-se um excesso de álcool a fim de favorecer a reação no sentido dos produtos (KUMAR et al., 2011).

Através do estudo realizado por Kalva et al. (2009) a fim de descrever os mecanismos físicos gerados pela radiação ultrassônica e que auxiliam no processo de transesterificação, ficou estabelecido que o mecanismo físico responsável por promover melhores rendimentos na reação de síntese de biodiesel é a formação de uma fina emulsão entre o óleo e o álcool, aumentando a área interfacial da reação. Este mecanismo é diretamente influenciado pela razão molar entre os dois meios.

Na presença de um sistema de ultrassom é possível reduzir o excesso de álcool necessário para esta reação (KUMAR et al., 2011), sendo assim, avaliou-se neste estudo diferentes razões molares 1:3, 1:6 e 1:9 de óleo de soja/etanol, para a síntese de biodiesel. O resultado desta análise esta apresentado na Figura 15.

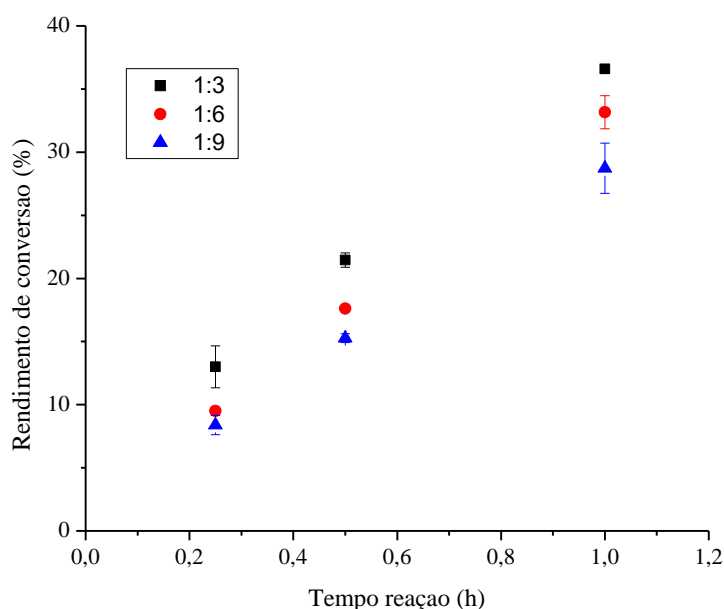


Figura 15 - Avaliação de diferentes razões molares do substrato na síntese de ésteres etílicos

Analisando as curvas de rendimento de conversão (%) em função do tempo (h), é possível observar que menores razões molares resultaram em maiores conversões de biodiesel na

presença do ultrassom e o melhor resultado foi obtido para uma razão molar de 1:3. As bolhas de cavitação formadas pelo ultrassom provocam uma microturbulência localizada nas vizinhanças entre a interface óleo/álcool, resultando na emulsificação desses dois líquidos. A dispersão do álcool no óleo e vice-versa, depende diretamente da intensidade dessa microturbulência, a qual é dependente das propriedades físicas do meio líquido, tais como densidade, viscosidade e tensão superficial, bem como da amplitude das ondas de ultrassom. Devido as propriedades físicas do óleo e do álcool serem diferentes, a intensidade da microturbulência também será. Em baixas razões molares, onde o volume de álcool é consideravelmente menor que o de óleo, a dispersão do álcool será responsável por estabelecer a área interfacial entre os dois meios, enquanto a elevada microturbulência permitirá que o álcool se disperse de maneira uniforme na fase do triglicerídeo, aumentando essa área interfacial, influenciando significativamente na conversão de ésteres. Quando a razão molar aumenta, e o volume de álcool passa a ser semelhante ao do óleo, a área interfacial da reação não é mais estabelecida apenas pela dispersão do álcool no óleo, mas também pela dispersão do óleo no álcool. No entanto, devido a elevada viscosidade do óleo, a magnitude da microturbulência é muito baixa, e este não é capaz de se dispersar de maneira uniforme no álcool. Com isso, a área interfacial é reduzida e conseqüentemente os rendimentos de ésteres (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015; KALVA; SIVASANKAR; MOHOLKAR, 2009)

Poppe (2017) realizou a reação de transesterificação do óleo de soja catalisada pela mesma mistura de lipases empregada neste estudo, em um banho ultrassônico. Com este estudo, encontrou como condições ótimas para a reação: 25 % de enzima e uma razão molar de 1:4,95 óleo de soja:etanol, obtendo uma conversão de ésteres etílicos em torno de 30 % para 1 h de reação. Comparando estes resultados com o presente estudo, é possível observar uma redução de 40 % tanto no percentual de álcool, quanto na concentração de enzima, necessários para esta reação. Desta forma, sugere-se que as reações conduzidas por uma sonda de ultrassom serão mais eficientes, isso porque a irradiação ultrassônica entra em contato direto com o sistema reacional, enquanto no banho, a irradiação é transmitida através de um líquido, havendo uma grande dispersão de energia, conseqüentemente uma menor influência nos sistemas reacionais (BARBOZA; SERRA, 1992).

Batistella et al (2012) também verificaram que um aumento na razão molar etanol: óleo de soja, influenciava negativamente a reação de transesterificação catalisada pelas lipases CALB e RML em um banho ultrassônico com uma potência de 132 W, atingindo os melhores resultados de conversão com uma razão molar de 1:3. Resultados semelhantes foram

encontrados por Adewale et al. (2015) e Kumar et al. (2011), os quais obtiveram os maiores rendimentos de biodiesel, com uma razão molar de 1:4, para a reação de transesterificação utilizando como substratos: resíduo de sebo de carne:metanol e óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*):metanol, respectivamente. Ambas reações foram conduzidas utilizando uma sonda de ultrassom. Já para Yu et al. (2010) a condição ótima para a razão molar óleo de soja:metanol foi de 1:6, para a transesterificação. A razão molar adequada para a reação de transesterificação, depende de diversas variáveis, como a frequência e a intensidade do ultrassom, o tipo de sonicator (banho ou sonda), o tipo do triglicerídeo e do álcool escolhido, assim como das dimensões do reator, (ADEWALE; DUMONT; NGADI, 2015; KALVA; SIVASANKAR; MOHOLKAR, 2009), explicando assim as diferenças encontradas por estes autores.

4.6 Efeito do uso do solvente terc-butanol na reação de transesterificação

O uso de solventes em reações de transesterificação enzimática para a produção de biodiesel, tem como principais objetivos, aumentar a solubilidade do álcool, proteger a lipase da desnaturação e criar uma mistura homogênea, aumentando assim a transferência de massa e a taxa da reação, além de proporcionar uma redução na viscosidade e estabilização das lipases imobilizadas (POPPE, 2017). No entanto, o uso desse reagente, torna o processo mais oneroso, tóxico e inflamável, além de requerer maiores investimentos, a fim de atender os requisitos necessários de segurança de uma planta industrial (LIU et al., 2008).

Neste sentido, o sistema de ultrassom é um método alternativo que pode ser utilizado a fim de reduzir as limitações de transferência de massa nas reações onde não são utilizados solventes. Sendo assim, avaliou-se a influência do solvente terc-butanol na reação de transesterificação enzimática do óleo de soja, em presença do ultrassom. O resultado deste estudo é apresentado na Figura 16.

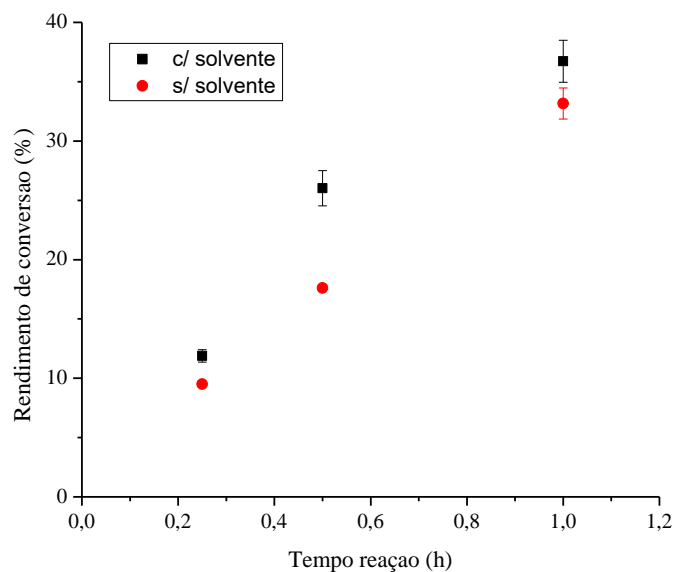


Figura 16 - Avaliação do uso do solvente terc-butanol na reação de transesterificação

Através deste estudo foi possível observar um comportamento bastante semelhante entre as reações, principalmente ao final do processo, sugerindo que apenas a presença do ultrassom foi suficiente para melhorar a miscibilidade da mistura reacional, favorecendo a transferência de massa entre o substrato e o sítio ativo da enzima. Desta forma, o uso do ultrassom mostra-se como uma alternativa promissora a fim de eliminar o uso de solventes orgânicos (TRENTIN et al., 2015), tornando o processo mais seguro, permitindo aumentar a concentração de reagentes na reação, reduzindo os riscos ambientais e permitindo a recuperação dos produtos sem a necessidade de processos complexos de purificação (DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; LIU et al., 2008)

Yu et al. (2010) avaliaram a ação de diferentes solventes na reação de transesterificação do óleo de soja, catalisada pela lipase CALB em um sistema composto por vibração (50 rpm) e irradiação ultrassônica (250 W). Com este estudo puderam observar que a síntese de biodiesel era influenciada de maneira positiva pela presença de solventes e que as reações conduzidas na ausência deste reagente apresentavam atividade enzimática muito baixa, devido a toxicidade excessiva do metanol ao biocatalisador. Entre os solventes avaliados, a melhor atividade enzimática foi obtida com o álcool terc-amílico, seguido pelo terc-butanol. Sendo assim, os demais experimentos foram conduzidos com o álcool terc-amílico, e a concentração de solvente foi otimizada para esta reação, onde foi encontrada uma razão volumétrica ótima de 1:1

solvente:óleo, valores superiores de solvente ocasionavam um decréscimo na atividade enzimática.

O resultado encontrado por Yu et al. (2010) mostra-se como uma exceção quando comparado aos demais trabalhos encontrados na literatura utilizando a catálise enzimática combinada ao uso do ultrassom, como pode ser analisado através dos dados apresentados na Tabela 2 (Capítulo 2) deste trabalho, onde 10 dos 11 trabalhos reportados não utilizaram solventes na reação, e obtiveram excelentes resultados de conversão apenas com o uso do ultrassom.

4.7 Efeito do uso de um sistema de agitação

Uma vez que as reações de síntese de biodiesel foram conduzidas em um sistema de ultrassom trabalhando de forma intermitente (sistema de pulsos), onde as partículas de biocatalisador permaneciam em agitação apenas quando o ultrassom estava ligado, resolveu-se avaliar a influência de adicionar ao sistema reacional um agitador magnético, trabalhando de forma contínua a fim de manter as partículas em movimento durante toda a reação, na conversão de biodiesel. O resultado desse estudo é apresentado na Figura 17.

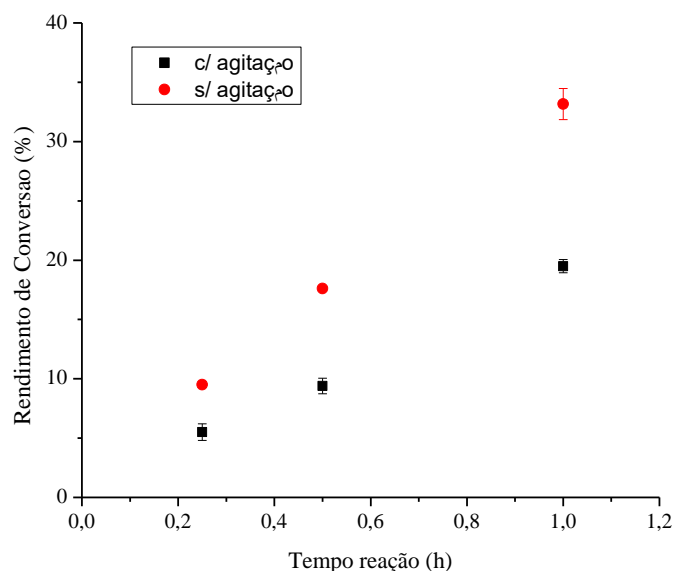


Figura 17 - Efeito do uso de um sistema de agitação contínuo na reação de transesterificação

Esperava-se que mantendo as partículas em movimento durante toda a reação, as mesmas estariam mais dispersas no meio reacional, facilitando ainda mais o contato entre o substrato e

o biocatalisador, resultando em maiores conversões de biodiesel. Surpreendentemente, ficou claro que o uso de um agitador prejudicou no rendimento desta reação, sugerindo que o seu uso pode ter provocado a ruptura das enzimas, levando a perda da sua atividade (YU et al., 2010). Através dos experimentos realizados foi possível verificar que o sistema de ultrassom, mesmo trabalhando de forma intermitente, foi mais eficiente para síntese enzimática de biodiesel, do que o uso combinado com um agitador magnético.

Yu et al (2010) avaliaram a reação de transesterificação enzimática do óleo de soja, utilizando como biocatalisador a enzima CALB. Neste estudo foram analisadas a influência de três sistemas reacionais: i) com uma vibração de 50 rpm, ii) com uma potência de 50% de um banho ultrassônico de 500 W e iii) com os dois sistemas trabalhando conjuntamente. O sistema com ultrassom atingiu 92 % de conversão de ésteres metílicos em 12 h de reação, enquanto que o sistema com vibração atingiu apenas 62 %. Contudo, quando os dois sistemas operaram juntos, foi possível obter 92 % de rendimento em apenas 4 h. Indicando que a combinação desses sistemas facilita a síntese de biodiesel, através da rápida emulsificação gerada pelo sistema de ultrassom, e do contato otimizado entre a enzima e o substrato proporcionado pelo sistema vibracional, acelerando assim, o transporte de reagentes e produtos, consequentemente aumentando a taxa da reação. Gharat e Rathod (2013) observaram o mesmo comportamento de Yu et al (2010), obtendo melhores resultados utilizando um sistema combinado de ultrassom (banho) e agitador mecânico, atingindo rendimentos de 86,61 % em 4 h para a reação de transesterificação enzimática do óleo residual de fritura.

Estes resultados diferem dos encontrados no presente estudo, o que pode estar associado com a forma de irradiação ultrassônica utilizada nos experimentos. Gharat e Rathod (2013) e Yu et al (2010) utilizaram o banho ultrassônico, o qual fornece uma irradiação de maneira indireta, desta forma menos eficiente que o sistema com sonda, requisitando um sistema auxiliar de agitação, para promover melhores rendimentos.

4.8 Avaliação do uso das enzimas individualmente comparadas ao *combi-lipase*

A fim de avaliar o desempenho do *combi-lipase* frente ao uso das enzimas individualmente, realizou-se reações de transesterificação utilizando as condições otimizadas previamente, alterando apenas o catalisador em cada reação. O resultado deste estudo é apresentado na Figura 18, onde é possível verificar através das curvas, que a enzima TLL mostrou-se mais eficiente na conversão de ésteres etílicos na primeira hora de reação, seguido pelo *combi-lipase*.

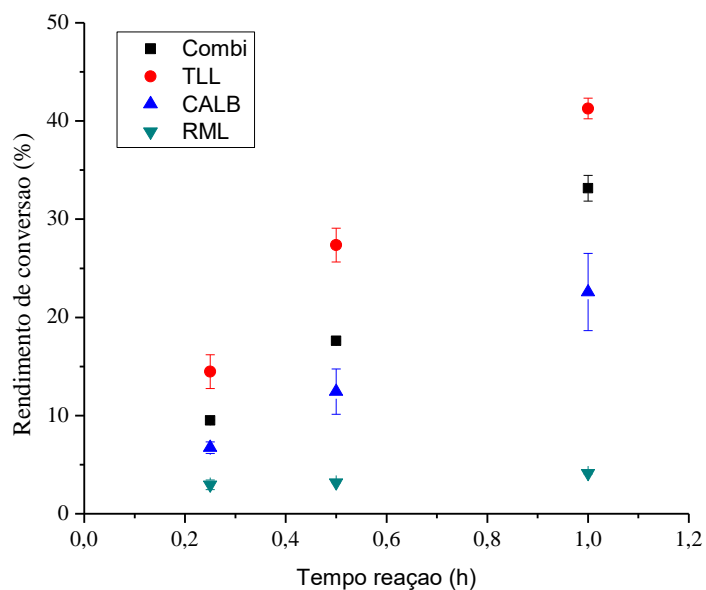


Figura 18 - Avaliação do uso das enzimas individualmente comparadas ao *combi-lipase*

Tendo em vista esses resultados, decidiu-se por avaliar a cinética das reações utilizando o *combi-lipase* e a enzima TLL, durante 6 h, a fim de avaliar a máxima conversão de ésteres, bem como a estabilidade desses biocatalisadores em processos mais longos e assistidos por ultrassom. A Figura 19 apresenta o resultado deste estudo.

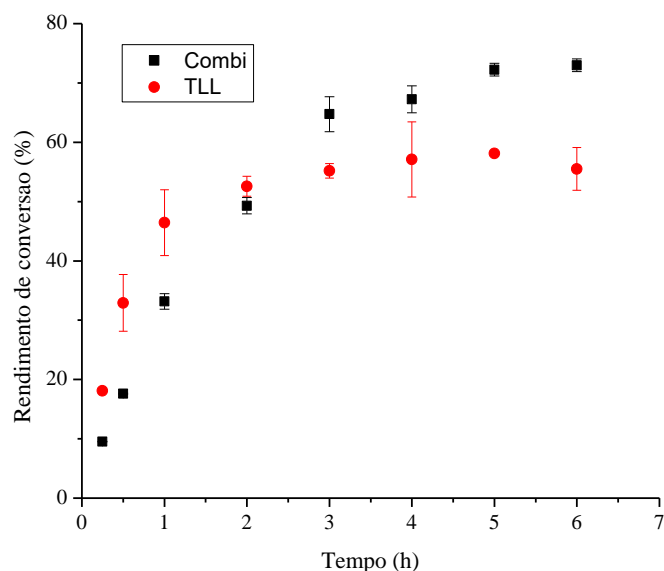


Figura 19 - Cinética da reação de transesterificação para o *combi-lipase* e para a enzima TLL

Pode-se observar que a enzima TLL apresenta uma taxa inicial da reação (263,68 mmol

$L^{-1}h^{-1}$) maior que o *combi-lipase* ($239,76 \text{ mmol L}^{-1}h^{-1}$) para primeira hora de reação. No entanto, em 2 h já pode-se observar uma estabilização no rendimento de ésteres etílicos para esta lipase, em aproximadamente 55 % de conversão. Este percentual manteve-se praticamente constante até o final do processo, apresentando um pequeno decréscimo a partir da quinta hora de reação. Por outro lado, o uso de uma mistura de lipases, apresentou uma menor taxa inicial da reação, no entanto seu desempenho ao longo do processo foi melhor que a enzima individualmente. O uso *combi-lipase* proporcionou um aumento considerável no rendimento de ésteres até a terceira hora de reação, aproximadamente 65 %, a partir de então, observou-se um aumento em torno de 12 % até o final do processo.

Sendo assim, o *combi-lipase* é capaz de promover maiores conversões de biodiesel em tempos mais longos de reação, sendo uma alternativa mais interessante que o uso das enzimas individualmente, principalmente em reações de constituição heterogênea, como é o caso dos óleo e gorduras. Esse comportamento pode ser explicado ao fato da enzima TLL ser 1,3 específica, ou seja, catalisa a liberação de ácidos graxos especificamente nas posições *sn-1* e *sn-3* dos acilgliceróis. Enquanto a mistura de lipases é composta por enzimas 1,3 específicas (TLL e RML) mas também pela enzima CALB, a qual é não específica, ou seja, catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis de maneira aleatória, proporcionando assim maiores rendimentos ao longo da reação (PAQUES; MACEDO, 2006), como pode ser observado com este estudo.

Poppe et al. (2015b) utilizando o *combi-lipase* para a reação de transesterificação do óleo de oliva e do óleo de palma, observaram que a taxa inicial da reação era bastante semelhante entre as enzimas individualmente e o *combi-lipase* nas primeiras horas de reação, principalmente para o óleo de palma, no entanto, a partir de 4 h de processo, a reação conduzida pela mistura de lipases passou a se destacar, promovendo rendimentos superiores aos das enzimas individualmente. Sendo assim, o presente trabalho está de acordo com os resultados reportados por Poppe et al (2015b).

Avaliando-se a cinética da reação para o *combi-lipase* observa-se uma conversão de ésteres etílicos de aproximadamente 65 % em 3 h, atingindo 73 % em 5 h e mantendo essa conversão até o final da reação. Santin et al. (2017) utilizando a enzima CALB na reação de transesterificação assistida por ultrassom (banho), obteve rendimentos de 88 % para o óleo de soja em 4 h de reação e de 70 % para o óleo de macaúba em 1,5 h. Já Gharat e Rathod (2013) utilizando o ultrassom (banho) combinado a um sistema de agitação, conduziu a reação de transesterificação do óleo residual de fritura catalisa pela enzima CALB, obtendo resultados de conversão de 86,61 % ao final de 4 h reação. Comparando estes resultados com o presente

estudo, pode-se observar que estes autores encontraram rendimentos um pouco superiores, na ordem de 15 %. No entanto, uma das vantagens em se utilizar o *combi-lipase* é a redução do custo da reação, quando comparada ao uso da enzima CALB individualmente, visto que essa lipase apresenta custo bastante elevado quando comparada as demais, chegando a custar 16 vezes mais do que a TLL (LI; ZHENG; YAN, 2010).

Subhedar et al. (2017) e Adewale et al. (2015), utilizando um sistema de ultrassom na forma de sonda, assim como o utilizado neste estudo, atingiram conversões de 96,1 % em 3 h, para a reação de interesterificação do óleo de fritura catalisada pela enzima TLL e de 85,6 %, em 20 min, para a transesterificação da gordura de sebo bovino catalisada pela lipase CALB, respectivamente. Comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho, observa-se que estes autores obtiveram rendimentos superiores em menores tempos de reação, o que pode estar associado com as diferentes condições operacionais tanto do reator como do sistema do ultrassom, assim como do tipo de matéria prima utilizada.

CAPÍTULO 5 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver diferentes tipos de reatores para a síntese enzimática de biodiesel, utilizando como substrato o óleo de soja e etanol, e como biocatalisador, uma mistura de lipases comerciais. Inicialmente foram realizados diversos testes com reatores de leito fixo de duplo estágio e de leito fluidizado. No entanto, como descrito no capítulo 4.1 deste trabalho, devido aos diversos problemas experimentais enfrentados, decidiu-se por mudar o foco do trabalho, e iniciou-se o estudo da avaliação do uso de um sistema de ultrassom na síntese enzimática de biodiesel.

Avaliando-se a influência de diferentes amplitudes (10, 20, 30,40 e 50 %) do ultrassom na síntese de biodiesel pode-se observar que com o aumento da amplitude, aumentava-se a taxa inicial da reação. No entanto, amplitudes superiores a 40 % elevaram a temperatura da mistura reacional a níveis prejudiciais ao biocatalisador, reduzindo a conversão de ésteres etílicos.

Através de um DCCR otimizou-se as condições do sistema de ultrassom para a síntese enzimática de biodiesel. As variáveis amplitude e tempo de pulso se mostraram significativas para o processo, e as condições ótimas para essa reação foram: amplitude 30 %, pulso 30 % e tempo de pulso 15 s. Nessas condições o valor predito e experimental para a taxa inicial da reação foram de 257,40 mmol L⁻¹h⁻¹ e 265,32 mmol L⁻¹h⁻¹, respectivamente, mostrando uma correlação satisfatória entre esses resultados.

Sob as condições do sistema de ultrassom otimizadas, a concentração de biocatalisador e razão molar de maior resposta foram de 15 % de enzima em relação a massa de óleo e razão molar de 3:1 etanol:óleo de soja.

O rendimento de ésteres etílicos para a reação livre de solvente foi muito parecido com as reações conduzidas na presença deste reagente. Já o uso combinado de um sistema de agitação com o ultrassom, não se mostrou como uma alternativa interessante para esta reação, provocando uma redução na conversão dos produtos.

Estes resultados confirmam que o uso do ultrassom é capaz de aumentar a miscibilidade entre os reagentes, melhorando a transferência de massa e a taxa da reação, proporcionando reações mais rápidas, bem como um menor consumo de reagentes.

Comparando a eficiência das reações catalisadas pelo *combi-lipase* com o uso dos biocatalisadores individualmente, pode-se perceber que o *combi* apresenta um melhor

desempenho ao longo do processo, mostrando-se como uma alternativa mais interessante que o uso das enzimas individualmente, principalmente em reações de constituição heterogênea, como é o caso dos óleo e gorduras.

Utilizando as condições ótimas avaliadas neste estudo e o conceito de *combi-lipase* em um reator assistido por ultrassom, obteve-se uma conversão de ésteres etílicos de aproximadamente 75 % em 5 horas de reação. Este resultado mostra-se de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura. No entanto, esta tecnologia ainda precisa ser aprimorada, uma vez que alguns trabalhos reportam rendimentos de aproximadamente 100 % em menos de 1 hora de reação, utilizando sistemas de irradiação direta, assim como o empregado neste estudo.

Sendo assim, novos estudos precisam ser realizados, na busca por configurações de reatores enzimáticos que sejam capazes de obter melhores conversões de biodiesel, em menores tempos de processo, reduzindo o consumo de reagentes, principalmente de biocatalisador, assim como o consumo energético do sistema, possibilitando a aplicação dos biocatalisadores em escala industrial.

Como sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar o reuso das enzimas, após o processo de transesterificação assistido por ultrassom;
- Estudar a reação de síntese enzimática de biodiesel assistida por ultrassom, utilizando o óleo residual de fritura;
- Aumentar a escala do reator enzimático em batelada assistido por ultrassom;
- Avaliar um sistema contínuo para a transesterificação enzimática assistida por ultrassom;
- Analisar a viabilidade econômica do processo de síntese de biodiesel, catalisada por uma mistura de lipases em um reator assistido por ultrassom.

Referências

AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases : An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p. 1591–1601, 2014.

ADEWALE, P.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic-assisted biodiesel production from waste tallow. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 1–9, 2015.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951–960, 2007.

ALVES, J. S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixture of biocatalysts. **RCS Advances**, v. 4, p. 6863–6868, 2014.

AMINI, Z. et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, 2016.

ANP, A. N. D. P. G. N. E. B. **Resolução ANP n° 7, de 19.3.2008 – DOU 20.3.2008**. Disponível em: <http://www.udop.com.br/download/legislacao/comercializacao/juridico_legiscalcao/res_7_cmercializacao_biodiesel.pdf>.

ANP, A. N. D. P. G. N. E. B. **PERFIL NACIONAL DE MATÉRIAS-PRIMAS CONSUMIDAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2070–2093, 2012.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9–14, 2010.

BANKOVIC-ILIC, I. B.; STAMENKOVIC, O. S.; VELJKOVIĆ, V. B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3621–3647, 2012.

BARBOZA, J. C. DE S.; SERRA, A. A. Ultra-som(I): Influência do ultra-som na química. **Quimica Nova**, v. 15, p. 302–316, 1992.

BASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 496–504, 2016.

BATISTELLA, L. et al. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 452–458, 2012.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 305–309, 2017.

BRASIL. **LEI Nº 11.097, DE 13 DE JANEIRO DE 2005**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm>.

BRASIL. **Percentual obrigatório de biodiesel no óleo diesel passa para 8%**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/03/percentual-obrigatorio-de-biodiesel-no-oleo-diesel-passa-para-8>>.

CASTANHEIRA, É. G. et al. Environmental sustainability of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 65, p. 680–691, 2014.

CHEN, G.; YING, M.; LI, W. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, p. 911–921, 2006.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. v. 119, p. 497–520, 2014.

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

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, p. 10–19, 2010.

FIDALGO, W. R. R. **Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais**. [s.l.: s.n.].

GHARAT, N.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 900–905, 2013.

GOGATE, P. R. Cavitation reactors for process intensification of chemical processing applications: A critical review. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 515–527, 2008.

GOGATE, P. R.; RAYAL, R. K.; PANDIT, A. B. Cavitation: A technology on the horizon. **Current Science**, v. 91, p. 35–46, 2006.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBER, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilised B-Galactosidase in Food Industry. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, p. 1–14, 2008.

GUPTA, S. et al. Biodiesel synthesis assisted by ultrasonication using engineered thermo-stable *Proteus vulgaris* lipase. **Fuel**, v. 208, p. 430–438, 2017.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. v. 87, p. 38–46, 2010.

ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 446–471, 2014.

ITABAIANA, I. J.; MIRANDA, L. S. DE M. E; SOUZA, R. O. M. A. DE. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 1–9, 2013.

JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. September, p. 396–403, 1998.

JOSHI GIRDHAR, PANDEY JITENDRA K., RANA SRAVENDRA, R. D. S. Challenges and opportunities for the application of biofuel.pdf. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 850–866, 2017.

KALVA, A.; SIVASANKAR, T.; MOHOLKAR, V. S. Physical mechanism of ultrasound assisted synthesis of biodiesel. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, 2009.

KOSSEVA, M. R. et al. Use of immobilised biocatalysts on the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437–447, 2009.

KUMAR, G. et al. Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 923–927, 2011.

LI, Q.; ZHENG, J.; YAN, Y. **Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent** **Fuel Processing Technology**, 2010.

LIU, Y. et al. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 402–407, 2008.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIO, M. J. O EFEITO DO ULTRASOM EM REAÇÕES QUÍMICAS. **Quimica Nova**, v. 23, n. 2, p. 251–256, 2000.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via

immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MENEZES, R. S. **Biodiesel no Brasil: Impulso Tecnológico**. [s.l.: s.n.].

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas : Produção , propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, p. 213–234, 2011.

MICHELIN, S. et al. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from macauba coconut oil. **Renewable Energy**, v. 76, p. 388–393, 2015.

MME, M. D. M. E. E. **CNPE aprova a 4ª Rodada de Licitações no Pré-Sal e a 15ª Rodada de Concessões**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticias/-/asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/cnpe-aprova-a-4-rodada-de-licitacoes-no-pre-sal-e-a-15-rodada-de-concessoes>.

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

POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511–525, 2015a.

POPPE, J. K. et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, p. 50–56, 2015b.

POPPE, J. K. **Síntese enzimática de biodiesel em reatores contínuos e em batelada: aspectos do uso de diversas fontes de óleos, do conceito de combi-lipases e do ultrassom**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

RAO, N. N. et al. Continuous Biocatalytic Processes. **Organic Process Research & Development**, v. 13, p. 607–616, 2009.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398–408, 2009.

RODRIGUES, R. C. et al. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 85, n. 925, p. 925–930, 2008.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. [s.l.: s.n.].

ROMERO, M. D. et al. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 269–277, 2007.

SANTIN, C. M. T. **Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom**. [s.l.: s.n.].

SANTIN, C. M. T. et al. Comparison of macauba and soybean oils as substrates for the enzymatic biodiesel production in ultrasound-assisted system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.

35, p. 525–528, 2017.

SUBHEDAR, P. B. et al. Ultrasound intensification suppresses the need of methanol excess during the biodiesel production with Lipozyme TL-IM. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 530–535, 2015.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 67–75, 2016.

TRENTIN, C. M. et al. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 437–448, 2015.

UBRABIO, U. B. DO B. E B. **Biodiesel em foco**, 2016.

VELJKOVIĆ, V. B.; AVRAMOVIĆ, J. M.; STAMENKOVIĆ, O. S. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 2, p. 1193–1209, 2012.

VERMA, P.; SHARMA, M. P. Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 62, p. 1063–1071, 2016.

VERMA, P.; SHARMA, M. P.; DWIVEDI, G. Impact of alcohol on biodiesel production and properties. v. 56, p. 319–333, 2016.

WANG, X. et al. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6352–6355, 2011.

YU, D. et al. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 519–525, 2010.

YUSUF G. ADEWUYI. Sonochemistry environmental science and engineering applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 10, p. 4681–4715, 2001.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. C. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, 2004. p.35-85