

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GUILHERME MARTINEZ MIBIELLI

**PRODUÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL DE ÉSTERES METÁLICOS A
PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO UTILIZANDO ENZIMA
LIVRE COMERCIAL**

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Bender

Florianópolis - SC

2018

Guilherme Martinez Mibielli

**PRODUÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL DE ÉSTERES METÁLICOS A
PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO UTILIZANDO ENZIMA
LIVRE COMERCIAL**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos - PPGEAL, como
requisito parcial para a obtenção do Grau de
Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de
Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Bender

Florianópolis - SC

2018

Este trabalho foi desenvolvido no
Laboratório de Engenharia Bioquímica na
Universidade Federal de Santa Catarina, no
Laboratório de Resíduos da Universidade
Federal da Fronteira Sul, e nas empresas
Transfertech Gestão e Inovação Ltda
(Erechim/RS) e Prisma Brazil - Divisão
Ésteres (Sumaré/SP).

Dedico este trabalho,

a minha família, Rosiléa, Vinícius e Júlia,
pelo companheirismo e amor sempre
dedicados em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois “tudo posso naquele que me fortalece”.

Ao meu orientador, Professor José Vladimir de Oliveira, pela confiança, pelos momentos de muito trabalho e todos os ensinamentos ao longo deste tempo.

Ao meu coorientador e grande amigo João Paulo Bender, pela contribuição a este trabalho e pela parceria que temos construído no desenvolvimento de pesquisas.

As alunas de iniciação científica Ana Paula Fagundes e Letícia Bohn, que auxiliaram este trabalho, meu muito obrigado.

Aos meus colegas de Doutorado, em especial ao amigo Alcidênio Pessoa, que me acolheu em sua moradia durante a realização das disciplinas.

As doutoras Cláudia Mara Trentin Santin e Daniela Remonato, pelos ensinamentos repassados no início do desenvolvimento experimental.

Aos meus pais, Pedro e Regina, e irmãos, Augusto e Alexandre, pelo apoio incondicional e confiança que sempre depositaram em mim.

A empresa Transfertech Gestão de Inovação Ltda (Erechim/RS), em especial a Marcelo Cantele, Jandir Cantele e Luís Fernando Cantele, pela infraestrutura cedida, sem a qual este trabalho não teria se concretizado. Também ao meu amigo Marshall Paliga, por me auxiliar e contribuir durante a realização dos experimentos.

A empresa Prisma Brazil - divisão ésteres (Sumaré/SP), em especial a Marcos Pina e Diana Feltrin, por ceder a infraestrutura da planta industrial e laboratório para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal da Fronteira Sul, por ceder meu tempo de forma integral para a realização deste trabalho.

Por fim, a todos que fizeram parte desta conquista.

“Os verdadeiros vencedores sabem que
grandes conquistas exigem grandes
sacrifícios, mas mesmo assim nunca
desistem de lutar.”
(autor desconhecido)

RESUMO

A busca por fontes de energias alternativas e renováveis vem crescendo a cada ano, devido ao aumento da demanda energética mundial, e principalmente pelos impactos ambientais que as atuais fontes causam. Com isso a produção de combustíveis renováveis vem se destacando nos últimos anos, inicialmente com a grande produção de álcool, e mais recentemente com a inserção do biodiesel. Este biocombustível possui características semelhantes ao diesel de petróleo, com a vantagem de redução nos impactos causados ao meio ambiente, tornando-o uma alternativa sustentável de produção de energia. No processo atual de produção de biodiesel, a partir da catálise química homogênea básica, devem ser utilizadas matérias-primas refinadas, com baixos teores de ácidos graxos livres e umidade. Desta forma, concorrem diretamente com a indústria de alimentos, aumentando o preço e dificultando o retorno das indústrias produtoras de biodiesel. Neste contexto, este trabalho teve por finalidade a produção industrial de ésteres metílicos a partir de matérias-primas de baixo custo por via enzimática, utilizando como catalisador a enzima livre comercial Lipase NZ. Durante a realização do trabalho foram utilizadas matérias-primas com baixo valor agregado, sendo classificadas em quatro grupos. Inicialmente foi realizado o estudo de atuação da enzima Lipase NZ, onde se observou que esta não realiza a transesterificação dos triglicerídeos. A transformação da matéria graxa em éster metílico ocorre por meio de dois processos independentes, a hidrólise dos mono-, di- e triacilgliceróis em ácidos graxos livre e a esterificação destes em ésteres metílicos. Posteriormente foram realizados ensaios em escala laboratorial (shaker) e piloto (reator de 1 m³), em modo batelada alimentada, onde foram definidas as variáveis de processo para as quatro classes de matérias-primas utilizadas. A partir do estabelecimento das variáveis em laboratório, e confirmadas em escala piloto, foram realizados experimentos em escala industrial utilizando reator de 90 m³, obtendo-se bons resultados. Para a matéria-prima I obteve-se 95,6 % de conversão do ácido graxo livre inicial e 0,16 %_{massa} de glicerina combinada, em 12 horas de reação, para a matéria-prima II a acidez final ficou em 5,06 % e a glicerina combinada em 0,22 %_{massa} em 42 horas de processo, para a matéria-prima III obteve-se 3,43 % de acidez final e 0,20 %_{massa} de glicerina combinada em 24 horas de reação e para a matéria-prima IV o teor final de acidez ficou em 3,51 % e a glicerina combinada 0,22 %_{massa}, com 27 horas de processo. Desta forma, a produção industrial de ésteres metílicos, por via enzimática e com o emprego de matérias-primas graxas residuais, se mostra como alternativa promissora ao processo de produção de biodiesel atualmente utilizado.

Palavras chave: biocombustível, éster metílico, processo enzimático, aumento de escala.

ABSTRACT

The search for alternative and renewable energy sources is growing every year, due to the increase in world energy demand, and especially the environmental impacts that the current sources cause. With this, the production of renewable fuels has been highlighting in recent years, initially with the large production of alcohol, and more recently with the insertion of biodiesel. This biofuel has characteristics similar to petroleum diesel, with the advantage of reducing the impacts caused to the environment, making it a sustainable alternative of energy production. In the current process of biodiesel production, from basic homogeneous chemical catalysis, refined raw materials must be used, with low levels of free fatty acids and moisture. In this way, they compete directly with the food industry, increasing the price and hindering the return of the industries producing biodiesel. In this context, the purpose of this work was the industrial production of methyl esters from inexpensive raw materials by enzymatic route, using the commercial free enzyme Lipase NZ as a catalyst. During the work, raw materials with low added value were used, being classified into four groups. Initially the study of the performance of the enzyme Lipase NZ was performed, where it was observed that it does not transesterify the triglycerides. The transformation of the feedstock into methyl ester occurs by means of two independent processes, the hydrolysis of mono-, di- and triacylglycerols into free fatty acids and the esterification thereof into methyl esters. Subsequently, laboratory-scale (shaker) and pilot (1 m³ reactor) tests were performed in a batch mode, where the process variables were defined for the four classes of raw materials used. From the establishment of the variables in the laboratory, and confirmed in a pilot scale, industrial scale experiments were carried out in a 90 m³ reactor, obtaining good results. For the feedstock I, 95.6 % conversion of the initial free fatty acid and 0.16 %_{mass} of the glycerin combined were obtained in 12 hours of reaction, for the feedstock II splitting the final acidity was 5.06 % and the glycerin combined in 0.22 %_{mass} in 42 hours of the process, for the feedstock III, 3.43 % final acidity and 0.20 %_{mass} glycerin combined were obtained in 24 hours of reaction and for the feedstock IV the final acidity content was 3.51% and the glycerin combined 0, 22 %_{mass}, with 27 hours of process. In this way, the industrial production of methyl esters, by enzymatic route and with the use of residual greasy raw materials, is shown as a promising alternative to the process of production of biodiesel currently used.

Keywords: biofuel, methyl ester, enzymatic process, scale-up.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Demanda de biodiesel considerando um cenário pessimista para a economia brasileira, já incluindo os percentuais de aumento da mistura aprovados em lei para 2016 (7 %), 2017 (8 %), 2018 (9 %) e 2019 (10 %), e com 15 % para 2020.....	27
Figura 3.2	Número de usinas que produziram biodiesel de 2010 a 2017.....	28
Figura 3.3	Número de usinas que produziram biodiesel de 2010 a 2017 separadas por porte de produção.....	29
Figura 3.4	Comparação entre o preço de venda pelo produtor do biodiesel versus diesel nos últimos anos.....	30
Figura 3.5	Preço do óleo de soja para o produtor em R\$/L nos últimos anos nos três principais centros de produção de biodiesel no mundo.....	30
Figura 3.6	Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil (1° trimestre 2018).....	35
Figura 3.7	Principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel de 2010-2018.....	37
Figura 3.8	Visão geral do processo de refino físico e químico de óleos e gorduras.....	38
Figura 3.9	Reações intermediárias da reação de transesterificação entre um triacilglicerol e um álcool de cadeia curta.....	44
Figura 4.1	Plataforma metálica com a unidade experimental montada para a produção enzimática de ésteres metílicos de material graxo em planta piloto (empresa Transfertch Gestão e Inovação Ltda).....	58
Figura 4.2	Quadro de comando para controle de temperatura dos reatores piloto (empresa Transfertch Gestão e Inovação Ltda).....	59
Figura 4.3	Unidade experimental destinada à produção enzimática de ésteres metílicos de material graxo em planta piloto (empresa Prisma Brazil - divisão ésteres).....	60
Figura 4.4	Sistema reacional contendo os frascos de 1,5 L em agitação orbital (shaker) com controle de temperatura e agitação.....	62
Figura 4.5	Fluxograma do procedimento utilizado nas reações de hidrólise e produção de ésteres metílicos em escala laboratorial.....	63
Figura 4.6	Fluxograma do procedimento utilizado nas reações de produção de ésteres metílicos em escala piloto.....	73
Figura 5.1	Fluxograma dos ensaios realizados para estudo da atuação da enzima livre Lipase NZ.....	86
Figura 5.2	Reações de transesterificação do óleo de soja com a enzima livre Lipase NZ nos tempos reacionais de 6 h, 12 h, 24 h e 48 h, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	87
Figura 5.3	Cinéticas reacionais de hidrólise de triacilgliceróis do óleo de soja com a enzima livre Lipase NZ nos percentuais de água de 2 %, 4 % e 6 %, em sistema batelada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	88
Figura 5.4	Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima I.....	90
Figura 5.5	Tudo Falcon com as três fases originadas da reação de produção de ésteres metílicos.....	92

Figura 5.6	Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis e suas interações para o primeiro delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	98
Figura 5.7	Gráfico de Pareto com os efeitos linear e quadrático das variáveis e suas interações para o segundo delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	101
Figura 5.8	Superfície de resposta do percentual de conversão do segundo delineamento de experimentos para a matéria-prima I, com as variáveis % NaOH e % Lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/ 250 rpm) em 24 horas de reação.....	102
Figura 5.9	Superfície de resposta do percentual de conversão do segundo delineamento de experimentos para a matéria-prima I, com as variáveis RM MeOH:MG e % Lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	103
Figura 5.10	Superfície de resposta do percentual de conversão do segundo delineamento de experimentos para a matéria-prima I, com as variáveis RM MeOH:MG e % NaOH, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	104
Figura 5.11	Cinética reacional a partir das variáveis otimizadas para a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	106
Figura 5.12	Cinética reacional a partir das variáveis percentual de água e número de adições de metanol otimizadas para a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	111
Figura 5.13	Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis e sua interação para o delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT com a matéria-prima I sem lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 14 horas de reação.....	115
Figura 5.14	Cinética reacional comparativa das reações com matéria-prima I com e sem lavagem, a partir das variáveis otimizadas, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	117
Figura 5.15	Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima II.....	120
Figura 5.16	Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis e sua interação para o delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT, com a matéria-prima II (amostra 2 - fornecedor “E”), em sistema batelada alimentada (shaker - 45°C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	124
Figura 5.17	Cinéticas reacionais com a matéria-prima II do fornecedor “F” (amostra 1), com e sem ADT, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/ 250 rpm).....	125
Figura 5.18	Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima III.....	126
Figura 5.19	Cinéticas reacionais com a matéria-prima III do fornecedor “I”, com 0,1 e 0,3 % de NaOH, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/ 250 rpm).....	128
Figura 5.20	Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima IV.....	129
Figura 5.21	Cinética reacional com a matéria-prima IV do fornecedor “K”, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	130

Figura 5.22	Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV do fornecedor “K”, variando a quantidade do ADT em 0 %, x %, 2x % e 4x %, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	131
Figura 5.23	Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 1), variando as concentrações iniciais de NaOH e ADT, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).....	133
Figura 5.24	Cinéticas reacionais com a matéria-prima I com lavagem, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).....	137
Figura 5.25	Cinéticas reacionais com a matéria-prima I sem lavagem e com ADT, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).....	139
Figura 5.26	Cinéticas reacionais com a matéria-prima II, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).....	142
Figura 5.27	Cinéticas reacionais dos resultados de MAG, DAG, TAG, teor de AGL e ésteres com a matéria-prima III, em sistema batelada alimentada em reator piloto - quinta reação (45°C ± 1 °C).....	144
Figura 5.28	Cinéticas reacionais com a matéria-prima III (fornecedor “I”), em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e piloto - sexta reação (45°C ± 1 °C).....	145
Figura 5.29	Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).....	147
Figura 5.30	Cinéticas reacionais com a matéria-prima I sem lavagem e com ADT, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - segunda reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - primeira reação (45 °C ± 1 °C).....	150
Figura 5.31	Cinéticas reacionais das duas reações (primeira e segunda) em escala industrial com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (45 °C ± 1 °C).....	151
Figura 5.32	Cinéticas reacionais com a matéria-prima II, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - quarta reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - terceira reação (45 °C ± 1 °C).....	154
Figura 5.33	Cinéticas reacionais com a matéria-prima III, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - sexta reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - quarta reação (45 °C ± 1 °C).....	157
Figura 5.34	Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - oitava reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - quinta reação (45 °C ± 1 °C).....	160
Figura 5.35	Cinéticas reacionais das duas reações (quinta e sexta) em escala industrial com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada (45 °C ± 1 °C).....	161
Figura 5.36	Cinéticas do percentual de glicerina combinada das duas reações industriais (quinta e sexta) com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada (45 °C ± 1 °C).....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Variáveis e respectivos níveis do primeiro delineamento de experimentos da matéria-prima I.....	67
Tabela 4.2	Variáveis e respectivos níveis do segundo delineamento de experimentos da matéria-prima I.....	68
Tabela 4.3	Concentrações de NaOH, ADT e enzima livre nos testes iniciais com a retirada da lavagem da matéria-prima I.....	71
Tabela 4.4	Variáveis e respectivos níveis do delineamento de experimentos utilizado para a matéria-prima I sem lavagem.....	71
Tabela 4.5	Variáveis de processo para as reações de produção de ésteres metílicos em escala piloto.....	75
Tabela 4.6	Variáveis de processo para as reações de produção de ésteres metílicos em escala industrial.....	78
Tabela 4.7	Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos.....	85
Tabela 5.1	Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “A”, amostra 1....	90
Tabela 5.2	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do primeiro teste preliminar com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	92
Tabela 5.3	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do segundo teste preliminar com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	95
Tabela 5.4	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do primeiro delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	97
Tabela 5.5	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do segundo delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	100
Tabela 5.6	Resultados do teor de AGL, conversão e ésteres metílicos da cinética reacional com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 16 e 24 horas de reação.....	107
Tabela 5.7	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios de variação do percentual de água adicionada na reação utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 12 e 24 horas de reação.....	108
Tabela 5.8	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios de variação do número de adições de metanol na reação utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 12 e 24 horas de reação.....	110
Tabela 5.9	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios eliminando a lavagem da matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 12, 14 e 24 horas de reação.....	113
Tabela 5.10	Resultados do teor de AGL e conversão do delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 14 horas de reação.....	114

Tabela 5.11	Resultados do teor de AGL e conversão dos testes de repetibilidade dos novos valores das variáveis para a matéria-prima I sem lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 14 horas de reação.....	116
Tabela 5.12	Características básicas da amostra da matéria-prima I do fornecedor “B”....	119
Tabela 5.13	Resultados do teor de AGL, conversão e ésteres metílicos dos ensaios com a matéria-prima I do fornecedor “B”, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 10, 18 e 24 horas de reação.....	119
Tabela 5.14	Características básicas da matéria-prima II.....	121
Tabela 5.15	Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos testes iniciais com a matéria-prima II do fornecedor “E”, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	122
Tabela 5.16	Variáveis e respectivos níveis do delineamento de experimentos da matéria-prima II do fornecedor “E” (amostra 2).....	123
Tabela 5.17	Resultados do teor de AGL e conversão do delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT, utilizando a matéria-prima II (amostra 2 - fornecedor “E”), em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	123
Tabela 5.18	Características básicas da matéria-prima III.....	126
Tabela 5.19	Resultados do teor de AGL, conversão e ésteres metílicos dos ensaios iniciais com a matéria-prima III, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 48 horas de reação.....	127
Tabela 5.20	Características básicas da matéria-prima IV.....	129
Tabela 5.21	Resultados do teor de AGL e ésteres metílicos do ensaio de validação com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 16 horas de reação.....	132
Tabela 5.22	Condições dos ensaios e resultados do teor de AGL e conversão com a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 1), em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.....	133
Tabela 5.23	Características básicas das matérias-primas I, II, III e IV.....	134
Tabela 5.24	Variáveis reacionais para as matérias-primas I, II, III e IV.....	135
Tabela 5.25	Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “A” (amostra 2), utilizada na primeira reação piloto.....	136
Tabela 5.26	Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “C”, utilizada na segunda reação piloto.....	138
Tabela 5.27	Resultados do percentual de glicerina combinada da segunda reação piloto, utilizando a matéria-prima I do fornecedor “C”, em sistema batelada alimentada (45 °C ± 1 °C).....	140
Tabela 5.28	Características básicas da matéria-prima II dos fornecedores “E” (amostra 3) e “F” (amostra 1), utilizadas nas terceira e quarta reações piloto respectivamente.....	141
Tabela 5.29	Características básicas da matéria-prima III dos fornecedores “H” e “I”, utilizadas nas quinta e sexta reações piloto respectivamente.....	143
Tabela 5.30	Características básicas da matéria-prima IV do fornecedor “L”, amostras 1 e 2, utilizadas nas sétima e oitava reações piloto respectivamente.....	146
Tabela 5.31	Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “D”, utilizadas na primeira e segunda reações em escala industrial.....	149

Tabela 5.32	Resultados do percentual de glicerina combinada da primeira reação industrial, utilizando a matéria-prima I do fornecedor “D”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	150
Tabela 5.33	Resultados do percentual de glicerina combinada da segunda reação industrial, utilizando a matéria-prima I do fornecedor “D”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	152
Tabela 5.34	Características básicas da matéria-prima II do fornecedor “F” (amostra 2), utilizada na terceira reação em escala industrial.....	153
Tabela 5.35	Resultados do percentual de glicerina combinada da terceira reação industrial, utilizando a matéria-prima II do fornecedor “F”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	155
Tabela 5.36	Características básicas da matéria-prima III do fornecedor “J”, utilizada na quarta reação em escala industrial.....	156
Tabela 5.37	Resultados do percentual de glicerina combinada da quarta reação industrial, utilizando a matéria-prima III do fornecedor “J”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	158
Tabela 5.38	Características básicas da matéria-prima IV do fornecedor “L”, amostras 2 e 3, utilizadas na quinta e sexta reações em escala industrial respectivamente.....	159
Tabela 5.39	Resultados do percentual de glicerina combinada da quinta reação industrial, utilizando a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 2), em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	160
Tabela 5.40	Resultados do percentual de glicerina combinada da sexta reação industrial, utilizando a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 3), em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	162

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT - aditivo;

AGL - ácidos graxos livres;

AGL_i - ácidos graxos livres iniciais;

AGL_f - ácidos graxos livres finais;

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis;

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética;

DAG - diacilgliceróis;

FAEE - ésteres etílicos de ácidos graxos;

FAME - ésteres metílicos de ácidos graxos;

KOH - hidróxido de potássio;

MAG - monoacilgliceróis;

MeOH - álcool metílico/metanol

MeOH:MG - álcool metílico/metanol:matéria graxa;

MP I - matéria-prima I;

MP II - matéria-prima II;

MP III - matéria-prima III;

MP IV - matéria-prima IV;

NAD - número de adições de metanol;

NaOH - hidróxido de sódio;

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel;

RM - razão molar;

TAG - triacilgliceróis;

m/m - massa/massa dos substratos

m/v – massa/volume

rpm - rotação por minuto;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS	26
3.1.1 Visão Geral.....	26
3.1.2 Biodiesel.....	31
3.2 MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	33
3.2.1 Óleo de Soja.....	35
3.2.2 Ácido Graxo.....	37
3.2.2.1 Ácido Graxo Destilado.....	38
3.2.2.2 Ácido Graxo de Corte.....	40
3.2.3 Gordura Ácida/Óleo Ácido.....	41
3.2.4 Oleína de Corte de Glicerina.....	42
3.3 ROTAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL	43
3.3.1 Catálise Química.....	45
3.3.2 Catálise Enzimática.....	47
3.4 ENZIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	49
3.5 SCALE-UP DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	51
3.6 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 MATERIAL	55
4.1.1 Catalisador Enzimático.....	55
4.1.2 Substratos Graxos.....	55
4.1.3 Reagentes.....	56
4.1.4 Padrão Químico.....	57
4.1.5 Equipamentos.....	57
4.1.5.1 Laboratório.....	57
4.1.5.2 Planta Piloto.....	57
4.1.5.3 Planta Industrial.....	60
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	61
4.2.1 Reações de hidrólise e produção de ésteres metílicos em sistema batelada alimentada utilizando agitação orbital.....	61
4.2.2 Estudo da Atuação da Enzima Livre Lipase NZ.....	64
4.2.2.1 Verificação do potencial de transesterificação da enzima livre Lipase NZ...	64
4.2.2.2 Avaliação da cinética reacional de hidrólise de triacilgliceróis do óleo de soja em diferentes percentuais de água presentes no meio reacional.....	64
4.2.3 Produção de Ésteres Metílicos com Matérias-Primas de Baixo Custo em Sistema de Batelada Alimentada (Shaker).....	65
4.2.4 Otimização do Processo de Produção de Ésteres Metílicos a Partir da Matéria-Prima I.....	66

4.2.4.1	<i>Estudo das variáveis de processo para a produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker).....</i>	66
4.2.4.2	<i>Avaliação da cinética reacional a partir das variáveis de processo otimizadas, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker).....</i>	68
4.2.4.3	<i>Estudo da influência do percentual de água adicionada na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker).....</i>	68
4.2.4.4	<i>Estudo da influência da dosagem de metanol na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker).....</i>	69
4.2.4.5	<i>Avaliação da cinética reacional a partir dos novos valores das variáveis percentual de água adicionada e número de adições de metanol, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker).....</i>	70
4.2.4.6	<i>Estudo da produção de ésteres metílicos com adição de Aditivo e eliminação da etapa de lavagem, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker).....</i>	70
4.2.5	Definições das Variáveis de Processo para as Diferentes Matérias-Primas em Escala Laboratorial.....	72
4.2.6	Scale-Up Para Piloto da Produção de Ésteres Metílicos a Partir de Matérias-Primas de Baixo Custo em Sistema de Batelada Alimentada.....	72
4.2.6.1	<i>Scale-up para piloto utilizando a matéria-prima I.....</i>	74
4.2.6.2	<i>Scale-up para piloto utilizando outras matérias-primas de baixo custo.....</i>	75
4.2.7	Scale-Up Industrial da Produção de Ésteres Metílicos a Partir de Matérias-Primas de Baixo Custo.....	76
4.2.7.1	<i>Scale-up industrial utilizando a matéria-prima I.....</i>	77
4.2.7.2	<i>Scale-up industrial utilizando outras matérias-primas de baixo custo.....</i>	78
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	79
4.3.1	Determinação do Índice de Iodo.....	79
4.3.2	Determinação do Índice de Saponificação.....	80
4.3.3	Determinação do Teor de Ácido Graxo Livre.....	81
4.3.4	Determinação do Teor de Glicerina Combinada.....	82
4.3.5	Determinação do Teor de Ésteres Metílicos.....	83
4.3.6	Determinação do Teor de Mono-, Di- e Triacilgliceróis.....	84
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.1	ESTUDO DA ATUAÇÃO DA ENZIMA LIVRE LIPASE NZ.....	86
5.1.1	Verificação do potencial de transesterificação da enzima livre Lipase NZ....	86
5.1.2	Avaliação da cinética reacional de hidrólise de triacilgliceróis do óleo de soja em diferentes percentuais de água presentes no meio reacional.....	87
5.2	PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍlicos COM MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO EM SISTEMA BATELADA ALIMENTADA (SHAKER).....	89
5.2.1	Reações com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)....	89
5.2.1.1	<i>Testes preliminares com a matéria-prima I.....</i>	92
5.2.1.2	<i>Estudos das variáveis de processo para produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I.....</i>	96
5.2.1.3	<i>Avaliação da cinética reacional a partir das variáveis de processo otimizadas utilizando a matéria-prima I.....</i>	105

5.2.1.4	<i>Estudo da influência do percentual de água adicionado na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I.....</i>	107
5.2.1.5	<i>Estudo da influência da dosagem de metanol na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I.....</i>	109
5.2.1.6	<i>Avaliação da cinética reacional a partir dos novos valores das variáveis percentual de água adicionada e número de adições de metanol, utilizando a matéria-prima I.....</i>	111
5.2.1.7	<i>Estudo da produção de ésteres metílicos com adição de Aditivo e eliminação da etapa de lavagem, utilizando a matéria-prima I.....</i>	112
5.2.1.8	<i>Comparação da cinética reacional com e sem lavagem utilizando a matéria-prima I.....</i>	116
5.2.1.9	<i>Reações com a matéria-prima I de outro fornecedor.....</i>	118
5.2.2	Reações com outras classificações de matérias-primas em sistema de batelada alimentada (shaker).....	120
5.2.2.1	<i>Reações com a matéria-prima II.....</i>	120
5.2.2.2	<i>Reações com a matéria-prima III.....</i>	125
5.2.2.3	<i>Reações com a matéria-prima IV.....</i>	128
5.3	DEFINIÇÕES DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO PARA AS DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS EM ESCALA LABORATORIAL.....	134
5.4	SCALE-UP PARA PILOTO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍlicos A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO EM SISTEMA DE BATELADA ALIMENTADA.....	135
5.4.1	Scale-Up Para Piloto Utilizando a Matéria-Prima I.....	136
5.4.2	Scale-Up Para Piloto Utilizando Outras Matérias-Primas de Baixo Custo.....	140
5.4.2.1	<i>Reações piloto com a matéria-prima II.....</i>	141
5.4.2.2	<i>Reações piloto com a matéria-prima III.....</i>	142
5.4.2.3	<i>Reações piloto com a matéria-prima IV.....</i>	146
5.5	SCALE-UP PARA REATOR INDUSTRIAL DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍlicos A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO EM SISTEMA BATELADA ALIMENTADA.....	148
5.5.1	Scale-Up Para Escala Industrial Utilizando a Matéria-Prima I.....	148
5.5.2	Scale-Up Para Escala Industrial Utilizando Outras Matérias-Primas de Baixo Custo.....	152
5.5.2.1	<i>Reações em escala industrial com a matéria-prima II.....</i>	153
5.5.2.2	<i>Reações em escala industrial com a matéria-prima III.....</i>	155
5.5.2.3	<i>Reações em escala industrial com a matéria-prima IV.....</i>	158
6.	CONCLUSÕES.....	164
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	166
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Produção em escala industrial de ésteres metílicos a partir de matérias-primas de baixo custo utilizando enzima livre comercial

Por quê?

- Necessidade do emprego de matérias-primas de baixo custo na produção de ésteres metílicos;
- Busca por processos alternativos de produção de ésteres metílicos;
- Investigar desafios impostos pelo escalonamento de um processo do laboratório ao industrial;
- Comportamento do novo processo em escala industrial.

Quem já fez?

- Existem poucos estudos na literatura a respeito da produção de ésteres metílicos por via enzimática a partir de matérias-primas de baixo custo (ácidos graxos, oleínas, óleos ácidos), os quais não apresentam resultados satisfatórios;
- A aplicação industrial deste processo documentada na literatura, ainda que em pequena quantidade, é realizada a partir de matérias-primas de alto custo.

Hipóteses?

- É possível desenvolver um processo alternativo de produção de ésteres metílicos utilizando matérias-primas de baixo custo que apresente resultado satisfatório?
- É possível produzir ésteres metílicos a partir do processo alternativo em escala industrial?

Como fazer?

- Elucidar a atuação da enzima livre comercial Lipase NZ;
- Investigar a produção de ésteres metílicos com matérias-primas de baixo custo;
- Otimizar o processo de obtenção de ésteres metílicos com a matéria-prima de maior disponibilidade;
- Empregar o processo de produção de ésteres metílicos obtido em escala laboratorial para escala piloto e industrial.

Produção em escala industrial de ésteres metílicos a partir de matérias-primas de baixo custo utilizando enzima livre

Atuação da enzima:

- Transesterificação;
- Hidrólise (variação % água).

Produção de ésteres metílicos:

Testes preliminares em laboratório:

- Testes realizados com várias matérias-primas.

Separação das matérias-primas em grupos:

- Características básicas.

Matéria-prima I

- Otimização dos parâmetros de processo;
- Estudos cinéticos;
- Estudos da influência de dois parâmetros;
- Adição de aditivo.

Matéria-prima II

- Testes iniciais;
- Delineamento experimental NaOH x ADT;
- Estudo cinético.

Matéria-prima III

- Testes iniciais;
- Estudo cinético - efeito NaOH.

Matéria-prima IV

- Teste cinético inicial;
- Estudo cinético - efeito ADT;
- Estudos cinéticos variando NaOH e ADT

Produção de ésteres metílicos em escala industrial

Readequação dos parâmetros de processo

Produção de ésteres metílicos em escala piloto

Definição dos parâmetros de processo em escala laboratorial (4 grupos)

1. INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento populacional que ocorre anualmente, bem como o nível de industrialização que o mundo se encontra, a quantidade energética necessária para o desenvolvimento das atividades industriais e para o bem estar das pessoas aumenta gradativamente (GOMES, 2009; VIOMAR, 2013).

A escassez global dos combustíveis fósseis, os impactos ambientais que estes ocasionam, e ainda, o alto preço em virtude dos elevados custos de produção, induzem a busca por fontes renováveis de energia em substituição às de origem fóssil (ESCOBAR et al., 2009). Com exceção de hidrelétricas e da energia nuclear, a maior parte de toda a energia consumida no mundo vem de fontes não renováveis, principalmente do petróleo, do carvão e do gás natural. Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, cerca de 55 % da energia, e 82 % dos combustíveis consumidos no Brasil são provenientes de fontes de energia não-renováveis (ANP, 2016). Tratando-se do restante do mundo, 80,8 % da energia total consumida vêm de fontes energéticas não-renováveis, fato este que coloca o Brasil como pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, alcançando uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo (REN21, 2016).

Segundo Almeida e Clua (2006), na mesma corrente de política pública do Proálcool, o qual foi criado em 1974, foi pensada a inserção do biodiesel na matriz energética brasileira em 2004. O biodiesel se apresenta como um combustível com características físico-químicas semelhantes ao diesel do petróleo, que pode ser produzido a partir de óleos e gorduras vegetais ou animais, in natura ou residuais. O biodiesel apresenta vantagens ambientais consideráveis quando comparado ao diesel de petróleo, pois segundo pesquisas do *National Biodiesel Board* (associação nos Estados Unidos), durante a queima o biodiesel emite menos 47 % material particulado, 48 % monóxido de carbono e 67 % hidrocarbonetos (NBB, 2016). Levando em consideração a necessidade imediata de medidas que reduzam tais emissões e consequente reversão aos danos causados ao meio ambiente, as características apresentadas pelo biodiesel o colocam em destaque como uma alternativa sustentável de produção de energia, ambientalmente correta e preocupada com o meio ambiente (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2010).

A produção nacional de combustíveis, segundo dados da ANP (2016), reduziu 2,6 % no ano de 2015 em relação a 2014, totalizando 140,6 bilhões de litros. Neste contexto de recessão de consumo, a produção de óleo diesel diminuiu 4,7 % na comparação entre 2014 e

2015, passando de 60,0 bilhões para 57,2 bilhões de litros. Deste montante, o biodiesel representou 3,9 bilhões de litros em 2015, com um aumento de 15,1 % nas vendas em relação a 2014. Esse aumento no consumo de biodiesel no Brasil é resultado da implantação de Leis, do Conselho Nacional de Política Energética - CNPE, as quais estabelecem a mistura obrigatória de biodiesel no diesel convencional, sendo ampliado seu percentual de mistura a cada ano de forma crescente.

De acordo com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o país não deve privilegiar rotas tecnológicas, matérias-primas e escalas de produção agrícola e agroindustrial, no entanto, a soja ainda é a oleaginosa preponderante. Atualmente, o processo de produção em escala industrial de biodiesel é quase que majoritariamente realizado pela denominada via química (RAMOS et al., 2011), a qual utiliza o metóxido de sódio como catalisador, exigindo assim óleos neutros, com baixo teor de ácidos graxos livres e com baixo teor de água, óleos estes que competem em quantidade e preço com a cadeia da indústria de alimentos (DABDOUB; BRONZE; RAMPIN, 2009; AHMAD et al., 2011). Segundo a ANP (2018a), em março de 2018 a soja representou em média, 69,6 % da produção de biodiesel no país, seguida pela gordura bovina com 14,5 %, outros materiais graxos com 9,7 % e gordura suína com 2,2 %.

No entanto, a utilização de fontes relacionadas à cadeia alimentícia para a produção de biocombustíveis é um grande dilema, pois pode contribuir para um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de alimentos no mundo, além de sustentar os altos preços desses produtos. Neste contexto, a viabilidade econômica da produção de biodiesel é obstaculizada pelos altos valores comerciais destas matérias-primas oleaginosas. O custo da soja, somado aos insumos de produção, muitas vezes ultrapassam o valor de venda do diesel, tornando o ramo de negócio “biodiesel” insustentável (ZHANG et al., 2003).

Nesse sentido, o grande desafio da produção de biodiesel no mundo está, basicamente, voltado à redução dos custos com a matéria-prima básica, exploração de novas matérias-primas e o emprego de tecnologias que visem à minimização dos custos de produção (BORA et al., 2014). Ao encontro desse desafio vem a busca por fontes de matérias-primas não comestíveis para a produção do biodiesel, como a utilização de resíduos agroindustriais, comerciais e domésticos, as quais tornam o processo de produção deste biocombustível mais atraente em termos de custo final do produto. O óleo residual de fritura, os subprodutos da indústria de óleos (borras), os ácidos graxos com alta acidez (resíduos obtidos da destilação/refino de óleos comestíveis), a oleína (proveniente do “corte” da glicerina), a gordura animal e as caixas de gordura (“grease trap”), são exemplos de matérias-primas

graxas que podem ser empregadas na produção de biodiesel. A utilização destas fontes como matérias-primas na produção de biodiesel contribui para minimizar o possível impacto ambiental devido à sua disposição incorreta, além de reutilizar insumos com baixo valor de mercado, estando mais alinhado com a proposta da química verde (HAAS, 2005; SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013). Entretanto, esses óleos residuais geralmente apresentam alto teor de ácidos graxos livres (AGL), valores da ordem de 30 %, podendo chegar acima dos 90 % dependendo da matéria-prima. Dessa forma, não poderiam ser utilizados diretamente como matéria-prima para a catálise química tradicional, a qual baseia-se no emprego de catalisadores alcalinos. A presença de AGL provoca problemas como a neutralização do catalisador e a consequente formação de sabões (SHAH; PARIKH; MAHERIA, 2014).

Uma alternativa para a utilização de matérias-primas com alto teor de AGL, água e contaminantes, é o emprego do processo enzimático, o qual vem sendo estudado há algum tempo, mas até o presente com carência de estudos mais detalhados concernentes à viabilidade técnica e econômica em escala industrial. Conforme relatado por Dabdoub, Bronzel e Rampin (2009), esta área necessita de muitas pesquisas e avanços para que sua utilização ganhe aplicação prática e competitiva. Apesar dos estudos disponíveis na literatura até o momento não indicarem uma viabilidade para o processo, a aplicação da catálise enzimática proporciona vantagens em relação à catálise química, como por exemplo: fácil recuperação do biodiesel, baixa geração de subprodutos, glicerina de elevada pureza, condições brandas de reação e possibilidade de reúso do biocatalisador (KULKARNI; DALAI, 2006; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

As enzimas são proteínas capazes de promover e acelerar reações químicas que regulam muitos processos biológicos. Elas são encontradas em microrganismos, animais e vegetais, sendo utilizadas nos processos industriais de diferentes áreas, como: química, alimentícia e médica (MUSSATO; MILAGRES; FERNANDES, 2007). A utilização de biocatalisadores na produção de biodiesel apresenta potencialidade, entretanto ainda existem algumas restrições na aplicação em larga escala, como a relativa baixa velocidade de reação, a possibilidade de desnaturação da enzima e o seu elevado custo (BAJAJ et al., 2010; LAM; LEE; MOHAMED, 2010; ZENEVICZ, 2015).

A partir disso, a produção de ésteres metílicos utilizando a rota enzimática utilizando materiais graxos de baixo custo torna-se uma alternativa promissora, combinando benefícios ambientais e econômicos. A grande disponibilidade de resíduos graxos a baixo custo, como por exemplo, alguns tipos de óleo residual de fritura, subproduto da indústria de óleos, ácidos

graxos com alta acidez, oleínas e gorduras animais, aliados a utilização de enzimas capazes de transformar estes materiais em biocombustíveis, tornam a rota enzimática atraente.

Com base nos aspectos expostos, este trabalho visa estudar a produção, em escala industrial, de ésteres metílicos a partir de matérias-primas de baixo custo, utilizando a enzima livre comercial Lipase NZ. Com este intuito foram realizados testes laboratoriais que permitam, em certo grau, a padronização das melhores condições de processo para as diferentes matérias-primas de baixo custo, seguindo para ensaios em escala piloto com reatores de 1 m³, finalizando com produções em escala industrial em reatores de 90 m³.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a produção de ésteres metílicos a partir de matérias-primas de baixo custo por meio de processo enzimático, utilizando como biocatalisador a enzima livre comercial Lipase NZ. Objetivou-se o desenvolvimento de técnica de produção em modo batelada alimentada, desde a escala laboratorial até o escalonamento em piloto (1 m³) e industrial (90 m³).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elucidar a atuação da enzima livre comercial Lipase NZ;
- Investigar a produção de ésteres metílicos com matérias-primas de baixo custo por meio do processo enzimático em modo batelada alimentada, avaliando o efeito das variáveis/parâmetros reacionais em escala laboratorial;
- Otimizar o processo enzimático de obtenção de ésteres metílicos em escala laboratorial com a matéria-prima de maior disponibilidade;
- Classificar as matérias-primas de baixo custo de acordo com características básicas semelhantes e determinar as variáveis de processo para a produção de ésteres metílicos;
- Empregar as condições reacionais investigadas em laboratório para a produção enzimática de ésteres metílicos em escala piloto;
- Empregar as condições reacionais investigadas em laboratório e escala piloto para a produção enzimática de ésteres metílicos em escala industrial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

O desenvolvimento de fontes renováveis de energia é uma escolha decisiva para o crescimento sustentável da população, tendo em vista a dependência energética mundial dos combustíveis fósseis. Aliado a este fato, o aumento da demanda por combustíveis, devido ao crescimento populacional e ao desenvolvimento econômico no setor automotivo e de transporte, incentivaram muitos países a buscar fontes de energia alternativas e renováveis, como os biocombustíveis. Assim a energia renovável tornou-se um dos principais focos de pesquisa na última década, buscando contornar as dificuldades quanto ao abastecimento de petróleo e as implicações que a queima de combustíveis fósseis causa ao meio ambiente (REMONATTO, 2017).

Os combustíveis de petróleo cumprem um papel importante no desenvolvimento de vários setores, industrial, transportes e agrícola, entre as várias aplicações indispensáveis para as necessidades humanas (RASHEDUL et al., 2014). A aceitação e implantação das energias renováveis ocorrem de forma mais lenta devido à falta de oferta e valores econômicos, por mais que estas causem menores impactos ambientais (MISRA; MURTHY, 2010).

Neste contexto, o biodiesel, mistura de ésteres monoalquílicos resultantes da reação entre um álcool de cadeia curta e um substrato graxo, vem ganhando grande destaque, como combustível biodegradável e não poluente, além de ser obtido de uma fonte renovável de energia com maior ponto de fulgor e excelente lubricidade. Para o meio ambiente, os benefícios do uso de biodiesel incluem as reduções das emissões de gases de escape, material particulado, dióxido de carbono (CO₂) e óxidos de enxofre (SO_x) (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2010; KUO et al., 2013).

3.1.1 Visão Geral

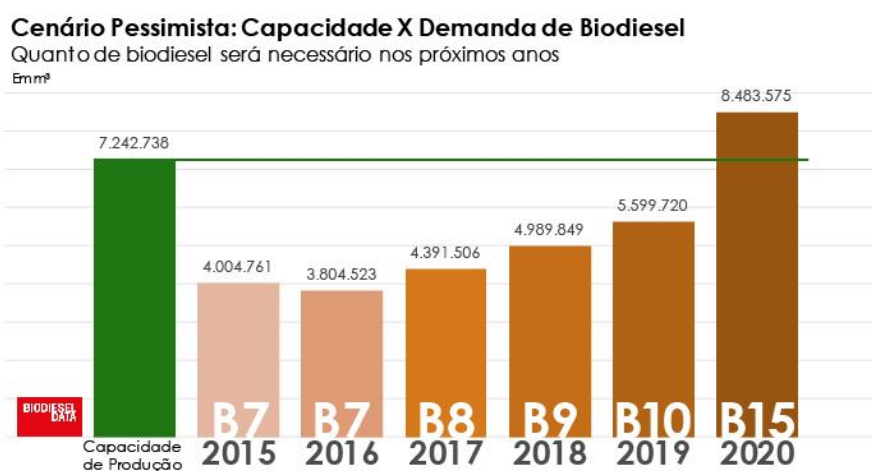
A produção nacional de biodiesel vem crescendo a cada ano, tendo em vista os incentivos adotados pelo governo com a inclusão compulsória deste biocombustível no diesel, por meio de leis e regulamentações. Em dezembro de 2004, o biodiesel foi inserido na matriz energética brasileira com a criação de seu marco regulatório, por meio da Medida Provisória 214, convertida na Lei 11.097/2005 (BRASIL, 2005). Atualmente todo o diesel comercializado no território nacional possui 10 % de biodiesel, sendo este percentual

antecipado de 2019 para 1º de março de 2018, por decisão do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) em novembro de 2017. (AGÊNCIA BRASIL, 2018).

Com a certeza de que o Brasil terá aumentos de mistura nos próximos anos é de fundamental importância conhecer o tamanho do mercado de biodiesel para o futuro próximo. Só assim teremos a convicção de sabermos se a atual capacidade da indústria é suficiente para atender a demanda vindoura. No caso de construção de novas usinas, quando estas devem estar operacionais para que consigam aproveitar ao máximo a crescente demanda.

Neste contexto, o site Biodieselbr.com (BIODIESELBR, 2016) publicou uma matéria sobre o tamanho do mercado de biodiesel do Brasil até 2020. Devido à atual conjuntura política e econômica do país, uma de suas projeções para a demanda de biodiesel foi de pessimismo na recuperação da economia. Nesta projeção ocorreria uma queda de 5 % no consumo em 2016 e um crescimento de apenas 1 % nos anos seguintes. Na Figura 3.1 podem-se observar as projeções de demanda de biodiesel com os acréscimos nos percentuais de inclusão compulsório no diesel aprovados em lei, sem a antecipação realizada pelo CNPE em novembro de 2017, sendo eles: 2016 (7 %), 2017 (8 %), 2018 (9 %) e 2019 (10 %), e fazendo uma previsão otimista para 15 % em 2020.

Figura 3.1 - Demanda de biodiesel considerando um cenário pessimista para a economia brasileira, já incluindo os percentuais de aumento da mistura aprovados em lei para 2016 (7 %), 2017 (8 %), 2018 (9 %) e 2019 (10 %), e com 15 % para 2020.



Fonte: BIODIESELBR, 2016.

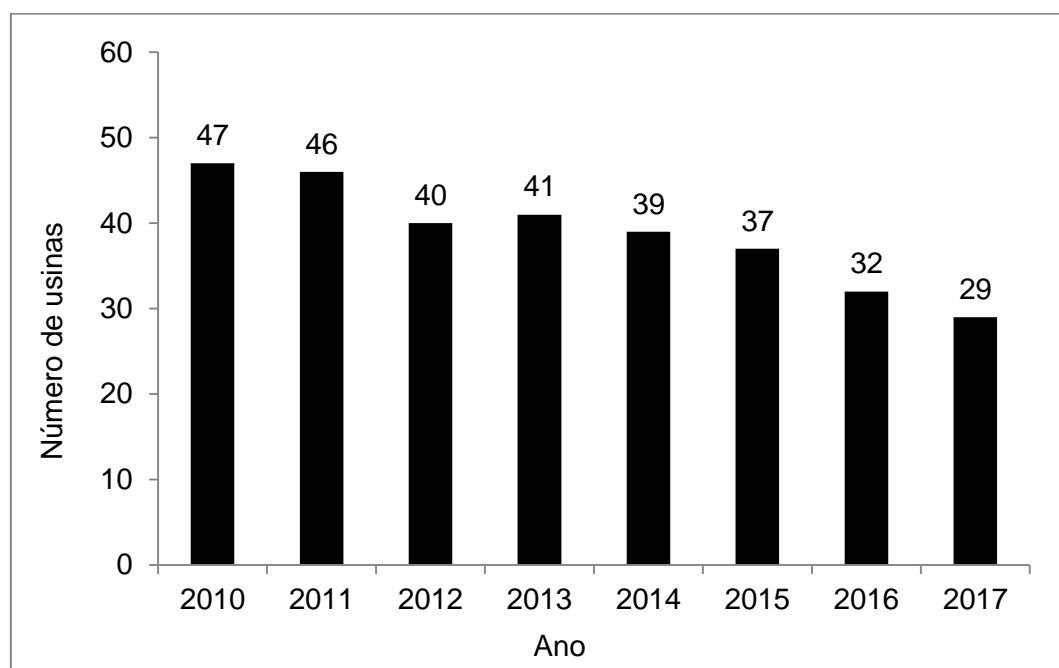
Em 2015 a demanda de biodiesel foi de aproximadamente 4 bilhões de litros, conforme mostra a Figura 3.1, sendo projetada uma demanda de 3,6 bilhões de litros para 2016 segundo o cenário pessimista (BIODIESELBR, 2016). Segundo dados da ANP (2018c),

a produção em 2016 ficou um pouco acima do projetado para este cenário, sendo 3,8 bilhões de litros produzidos. A produção de 2017 foi de 4,3 bilhões de litros produzidos, ficando muito próximo ao estimado. Para a produção de 2018, estima-se um total de 4,5 bilhões de litros produzidos, a partir do relatório ANP (2018b) do primeiro trimestre, ficando este valor um pouco abaixo do valor projetado na Figura 3.1.

Para uma produção de biodiesel sem preocupações com desabastecimento, a demanda não pode ultrapassar 80 % da capacidade instalada. Neste contexto, considerando uma capacidade instalada atual de 7,8 bilhões de litros/ano, a demanda projetada de 5,6 bilhões de litros em 2019 (10 % de mistura do biodiesel no diesel) não será atingida, levando-se em consideração o atual cenário econômico (baixo crescimento).

Nesta perspectiva, não seria necessária à ampliação ou construção de novas usinas de biodiesel, a não ser que fossem analisadas somente as usinas que realmente produziram biodiesel em 2017. Na Figura 3.2 é mostrado o número de usinas que produziram biodiesel de 2010 a 2017.

Figura 3.2 - Número de usinas que produziram biodiesel de 2010 a 2017.



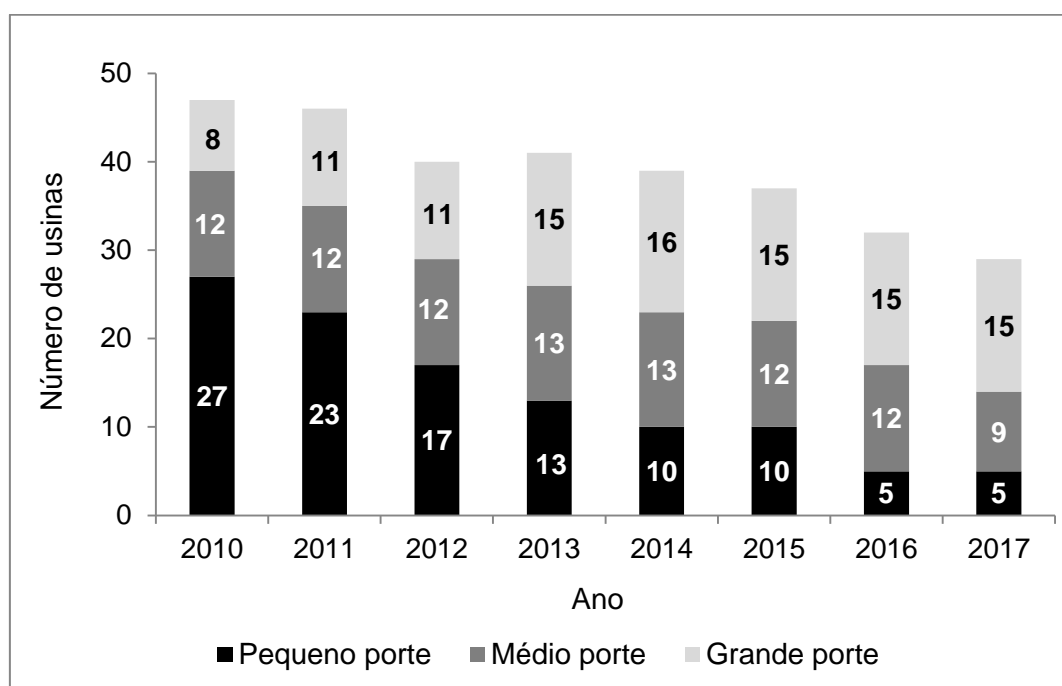
Fonte: BIODIESELBR, 2017

Observando a Figura 3.2 nota-se que apenas 29 usinas de biodiesel produziram em 2017, sendo um número muito menor que as 47 que produziram em 2010, representando uma redução de 38 % no número de usinas. Somando a capacidade instalada destas 29 usinas,

temos uma capacidade de produzir 6 bilhões de litros/ano de biodiesel, elevando para 93 % da capacidade instalada considerando a perspectiva de demanda de 2019 (5,6 bilhões de litros/ano). Nesta situação, com apenas as 29 usinas atualmente produzindo, existe um risco de desabastecimento de biodiesel B100 (demanda maior que 80 % da capacidade instalada).

Outro fator importante a ser analisado é o porte das usinas produtoras, as quais foram classificadas de acordo com sua capacidade de produção anual. Na Figura 3.3 as usinas foram divididas em pequeno, médio e grande porte, sendo considerado pequeno porte as que possuem capacidade de produção de até 36 milhões de litros/ano, médio porte com produção de 36 milhões a 108 milhões de litros/ano e de grande porte acima de 108 milhões de litros/ano.

Figura 3.3 - Número de usinas que produziram biodiesel de 2010 a 2017 separadas por porte de produção.



Fonte: BIODIESELBR, 2017

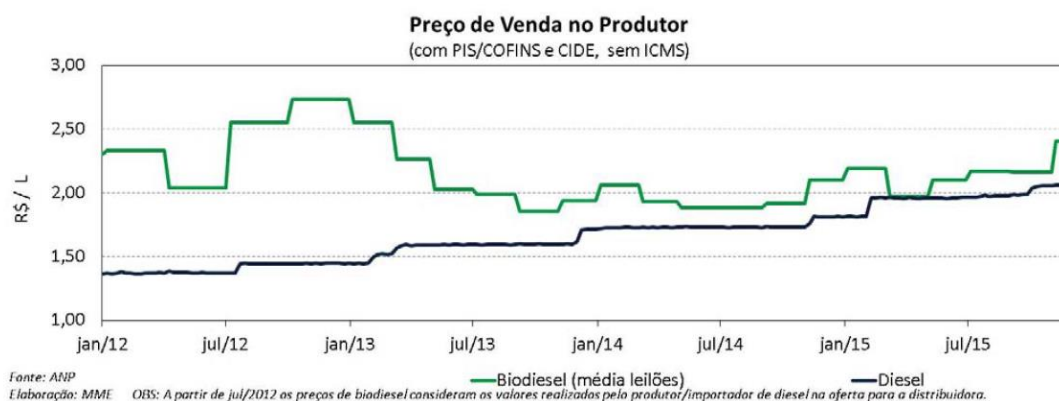
Observa-se na Figura 3.3 uma redução de mais de 80 % das usinas de pequeno porte que produziam biodiesel de 2010 para 2017, e um aumento de 88 % das usinas de grande porte. Na mesma figura as usinas de médio porte tiveram uma redução pequena quando se compara com as variações dos dois outros tipos de usinas.

Este fato de redução do número de empresas produtoras de biodiesel, com a mudança de perfil de pequeno para grande porte, pode ser explicado por um fator determinante, o preço da matéria-prima. Estudos mostram que o preço da matéria-prima representa mais de 75 % do

preço final do biodiesel, sendo determinante para as indústrias do setor (ALBUQUERQUE, 2015; BARBOSA, 2012).

Neste contexto, a viabilidade econômica das indústrias produtoras de biodiesel é freada pelos altos valores comerciais destas matérias-primas oleaginosas, tendo em vista que ainda praticamente 70 % de toda produção de biodiesel é proveniente do óleo de soja. Com a finalidade de elucidar este cenário, na Figura 3.4 é apresentado o valor de venda (produtor) do biodiesel produzido no Brasil, em R\$/L, nos anos de 2012 a 2015 em comparação com o óleo diesel. Enquanto que, na Figura 3.5 é demonstrado o preço do óleo de soja pago pelo produtor para a produção do biodiesel no mesmo período, nos três principais centros de produção de biodiesel no mundo.

Figura 3.4 - Comparação entre o preço de venda pelo produtor do biodiesel versus diesel nos últimos anos.



Fonte: ANP, 2016

Figura 3.5 - Preço do óleo de soja para o produtor em R\$/L nos últimos anos nos três principais centros de produção de biodiesel no mundo.



Fonte: ANP, 2016

Pode-se observar claramente, por meio das Figuras 3.4 e 3.5 que somente o custo da matéria-prima soja para a produção do biodiesel é superior, na maioria dos meses, ao valor de venda do biodiesel. Além disso, somando o valor dos insumos metanol e hidróxido de sódio com o preço do óleo de soja, essa diferença torna-se ainda mais expressiva. Este fato com certeza é o grande causador da inviabilidade da maioria das empresas de biodiesel, sendo fundamental para o fechamento de muitas delas e a mudança de perfil para empresas de grande porte, empresas estas que normalmente possuem o processamento de soja em seu parque industrial (esmagamento e refino).

Nesse sentido, o grande desafio da produção de biodiesel no mundo está, basicamente, voltado à redução dos custos com a matéria-prima básica e o emprego de tecnologias que visem à minimização dos custos de produção. Vale salientar que a redução de custos com a matéria-prima básica, passa pela utilização de outras fontes de materiais graxos, diferentes da atual matriz, e que tenha um custo mais adequado.

3.1.2 Biodiesel

O engenheiro francês de origem alemã Rudolph Christian Carl Diesel (1858-1913) há mais de cem anos, em 1900, utilizava óleos vegetais como combustível em seus estudos com motores de combustão por compressão, com o intuito de desenvolver um combustível barato para motores a diesel (SHAY, 1993). As primeiras experiências foram conduzidas com óleo de amendoim, mas, no entanto, a abundância da oferta de petróleo e o seu preço acessível, determinaram que, nos anos seguintes, os derivados do petróleo fossem os combustíveis preferidos, reservando os óleos vegetais para outros usos (SANTIN, 2013).

Em 1937, o cientista belga G. Chavenne descobriu e patenteou o processo de transesterificação, o qual diminuía a viscosidade do óleo vegetal e melhorava seu processo de combustão no interior do motor (KNOTHE, 2001). Assim, o nome “biodiesel” foi dado ao óleo vegetal transesterificado para descrever seu uso como combustível em motores do ciclo diesel (CERBIO, 2006).

A vantagem de óleos vegetais como combustível era a grande disponibilidade, o conteúdo de calor (80 % do combustível diesel) e ser renovável. Apesar de sua disponibilidade, existiam as desvantagens devido à viscosidade, a baixa volatilidade e a reatividade de cadeias de hidrocarboneto insaturadas. Estas características são malélicas quando os motores estão fazendo uso de óleos vegetais como combustível por longos períodos, especialmente os motores de injeção direta. Durante o armazenamento os ácidos graxos poli-insaturados são muito susceptíveis à polimerização causando a formação de

gomas. A goma formada não queima completamente, resultando em depósitos de carbono e espessamento ao óleo. Assim a ideia de óleos vegetais como combustível foi abandonada por muitos anos, e os derivados do petróleo tornaram-se amplamente disponíveis, dominando o mercado de combustíveis (REMONATTO, 2017).

Existem basicamente duas definições sobre biodiesel, que se constituem nas mais importantes. São elas a definição doutrinária e a definição expressa na lei. A definição doutrinária, diz que o biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, e, ainda, pode ser definido como: um combustível produzido a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como óleos vegetais ou gorduras animais que visa substituir total ou parcialmente o diesel de petróleo, reduzindo assim a poluição gerada pela queima destes combustíveis (ZANETTI, 2012).

A sua definição legal encontra-se prevista no Art. 6º, inciso XXIV da Lei nº 11.097/2005 (BRASIL, 2005) que define o biodiesel como: “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, ou conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

Ainda, existe outra definição, a qual se encontra prevista na Resolução ANP nº 7, de 19 de março de 2008 (ANP, 2008), e se refere à definição química da composição do combustível no Art. 2º, inciso I: “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”.

Importante frisar que o combustível renovável apresenta importantes vantagens ambientais em relação ao combustível fóssil. A queima de biodiesel pode resultar numa emissão média de: 78 % menos monóxido de carbono; 55 % menos material não-particulado; 38 % menos hidrocarbonetos não queimados; e 78 % a 100 % menos gases causadores do efeito estufa. Além disso, o biodiesel é atóxico e biodegradável (BIODIESELBR, 2005).

Quanto à produção de biodiesel, os países europeus foram os precursores, sendo a Alemanha o maior produtor mundial do combustível por alguns anos. Na Alemanha o uso do biocombustível iniciou na década de 90 (OSAKI; BATALHA, 2011), sendo sua principal entidade representativa dos fabricantes de biodiesel a União para a Promoção de Óleos e Proteínas Vegetais (UFOP, na sigla original). Atualmente o Brasil é destaque mundial de produção, produzindo nos últimos dois anos em média cerca de 4 bilhões de litros/ano (BIODIESELBR, 2017).

A viabilidade econômica do biodiesel atualmente ainda é freada pelo alto preço das matérias-primas oleaginosas, sendo que, a maior produção deste biocombustível no Brasil ainda vem da soja. Porém, algumas medidas estão favorecendo e expandindo as pesquisas para a produção no país como, por exemplo, a mistura compulsória do biodiesel no diesel, bem como os incentivos do governo. Pode-se acrescentar ainda que o uso deste biocombustível se torna relevante, pela instabilidade do preço do petróleo e das vantagens ao meio ambiente, quando comparado aos combustíveis fósseis.

3.2 MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Historicamente a biomassa foi largamente empregada como fonte de obtenção de diversos materiais, entre eles os combustíveis. Com a expansão da indústria do petróleo, a biomassa perdeu sua importância devido à obtenção e desenvolvimento de materiais com propriedades diferenciadas, a custos competitivos. No entanto, o constante aumento na demanda por fontes de energia e a ampliação da consciência ecológica têm incentivado pesquisas no sentido de desenvolver novos insumos básicos, de caráter renovável, para diversas áreas de interesse industrial. Neste contexto, os óleos e as gorduras animais e vegetais (triglicerídeos), têm tido um papel importante em muitos segmentos, tais como materiais poliméricos, lubrificantes, biocombustíveis, revestimentos, adesivos estruturais, entre outros (SUAREZ et al., 2007).

Os óleos e gorduras são matérias-primas versáteis, sendo empregados nas mais diversas indústrias, como por exemplo, indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Nas últimas décadas tem aumentado o interesse pela tecnologia de modificação dos óleos e gorduras, visando à produção de compostos com maior valor agregado para as indústrias do setor. Nesse contexto, o enfoque biotecnológico por meio da biotransformação vem se apresentando como uma alternativa atraente para exploração na indústria de óleos e gorduras, principalmente considerando as vantagens dessa rota, tais como maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia e redução da quantidade de resíduos (CASTRO et al., 2004).

Os óleos e gorduras são procedentes de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. São formados, principalmente, por triacilgliceróis (TAG) compostos por três moléculas de ácidos graxos esterificados em uma molécula de glicerol. Também apresentam em suas composições pequenas quantidades de: ácidos graxos livres (AGL), monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), fosfolipídeos,

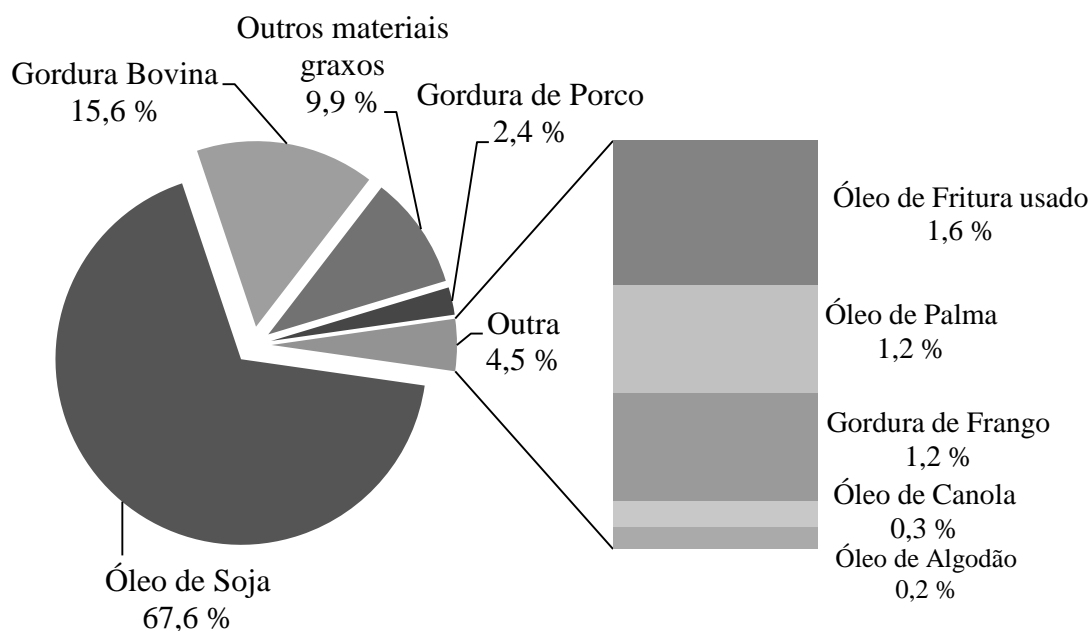
esteróis livres e esterificados, álcoois triterpenos, tocoferóis e tocotrienóis, carotenos, clorofilas, hidrocarbonetos, traços de metais e produtos de oxidação (SHAHIDI, 2005). Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, com cadeia alifática longa, não ramificada, saturada, monoinsaturada ou poli-insaturada (CURI et al., 2002; BACKES, 2011). Os ácidos graxos saturados apresentam apenas ligações simples, sendo principalmente encontrados em alimentos de origem animal. Os ácidos insaturados possuem uma dupla ligação ou mais na cadeia, estão presentes em óleos vegetais e peixes de origem marinha (CURI et al., 2002).

Os ácidos graxos de fontes naturais mais frequentemente encontrados apresentam um número par de carbonos nas suas cadeias (C4 a C24), e quando possuem duplas ligações estão presentes em configuração *cis*, não conjugada. Os mais importantes ácidos graxos encontrados nos óleos vegetais e gorduras animais são: láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), behênico (C22:0), lignocérico (C24:0), oleico (C18:1), erúico (C22:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) (ARRUDA, 2016).

As matérias-primas para a produção do biodiesel podem ser de origem vegetal (óleo de soja, mamona, canola, palma, girassol e amendoim, entre outros) ou animal (gordura bovina, suína e de aves). Com relação às matérias-primas de origem vegetal, os óleos de diferentes fontes podem ser utilizados na sua forma mais nobre, refinados, como também os subprodutos da indústria do óleo, como por exemplo, o óleo de fritura usado, óleos de reúso, ácidos graxos destilados e ácidos graxos provenientes de corte. Já as gorduras animais utilizadas são obtidas das agroindústrias de abate e processamento de carne, sendo as gorduras excedentes não utilizadas em seus processos, como também provenientes dos sistemas de tratamento de efluentes.

No Brasil, a principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel é o óleo de soja refinado, que representa quase 70 % da matéria-prima utilizada pelo setor, conforme pode ser observado na Figura 3.6. A gordura bovina desempenha um papel importante, sendo a segunda maior matéria-prima a ser utilizada, seguida de outros materiais graxos em terceiro lugar. No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor em óleo vegetal, produtividade, adaptação territorial e a região produtora (RAMOS et al., 2003). Um fato a ser considerado para baixar custos da produção do biodiesel é a utilização de materiais graxos que apresentam menor custo que óleos refinados, além de possibilitar uma reciclagem deste tipo de material (AKGUN; ISCAN, 2007).

Figura 3.6 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil (1º trimestre 2018).



Fonte: ANP, 2018a.

O tipo de álcool utilizado na reação de transesterificação para a produção dos biocombustíveis é outro fator importante. A rota etílica possui uma vantagem frente à rota metílica no Brasil, tendo em vista a grande oferta desse álcool em todo o território nacional, entretanto o metanol é o álcool mais utilizado para a síntese do biodiesel, em grande parte devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo (REYERO et al., 2015). No entanto, a transesterificação dos TAG presentes nos óleos vegetais e gorduras animais, pode ser realizada com ambos os álcoois de cadeia curta, sendo na reação de etanolise (etanol) e metanolise (metanol) dando origem aos correspondentes ésteres etílicos (FAEE) e ésteres metílicos (FAME), respectivamente (STAMENKOVIĆ; VELIČKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2011).

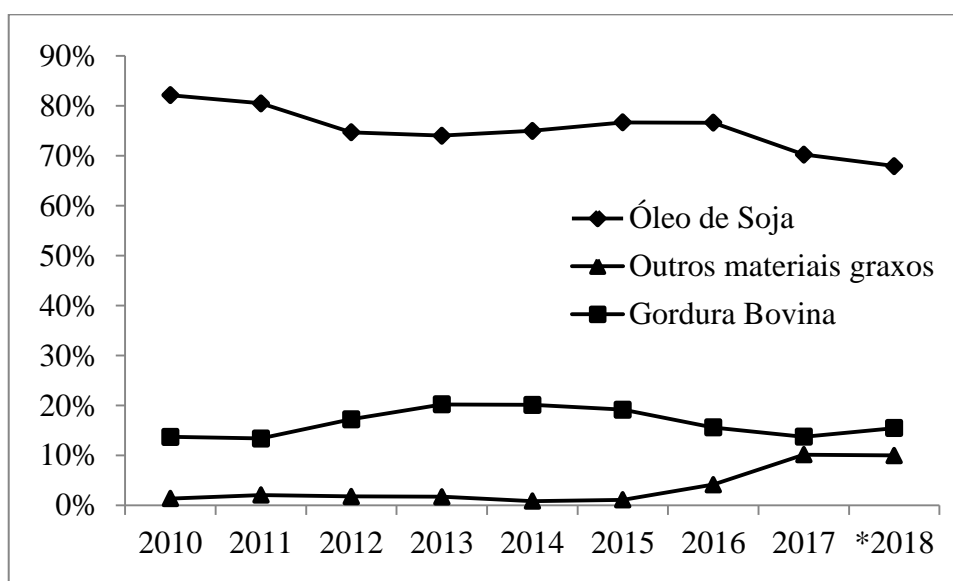
3.2.1 Óleo de Soja

A soja representa 55 % da produção mundial de oleaginosas e representa 90 % do óleo vegetal produzido no Brasil, justamente uma das oleaginosas que possuem os menores teores de óleo por unidade de peso, aproximadamente de 17 a 22 %. A razão por que a soja responde pela maior parcela do óleo vegetal brasileiro tem outras causas, como uma cadeia produtiva bem estruturada, que conta com tecnologias de produção bem definidas, modernas e também existe uma ampla rede de pesquisa que assegura pronta solução de qualquer novo problema

que possa aparecer na cultura. Ainda, oferece rápido retorno do investimento: ciclo de 4 a 5 meses, sendo um dos produtos mais fáceis para vender, porque são poucos os produtores mundiais (EUA, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai), pouquíssimos os exportadores (EUA, Brasil, Argentina e Paraguai), mas muitíssimos os compradores (todos os países), resultando em garantia de comercialização (REMONATTO, 2017).

Os longos tempos que a soja pode ficar armazenada melhoram sua oportunidade de comercialização, sendo uma das vantagens desta oleaginosa. Seu óleo é um dos mais baratos no mercado, sendo mais caro apenas que o óleo de algodão e que a gordura animal, podendo ser utilizado tanto para o consumo humano, quanto para a indústria química, mais especificamente para a produção de biodiesel (BIODIESELBR, 2007). Esses fatores, aliados à boa estabilidade do óleo e ao seu baixo teor de AGL, o tornam o óleo mais utilizado para a produção de biodiesel, cerca de 70 % da produção brasileira, o que acaba encarecendo o biodiesel pelo alto custo e pela competição com o consumo alimentar. Atualmente são produzidas 351 milhões de toneladas de soja anualmente, sendo os Estados Unidos (117 milhões de toneladas) e o Brasil (114 milhões de toneladas) o primeiro e segundo produtores mundiais respectivamente (EMBRAPA, 2017). A produção expressiva desta oleaginosa a torna umas das mais produzidas mundialmente, fazendo com que seja a principal matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil.

Segundo dados da BIODIESELBR (2018), no primeiro trimestre de 2018 a soja representou 67,6 % das matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel, seguida pela gordura bovina com 15,6 % e outros materiais graxos com 9,9 %. Pode-se observar na Figura 3.7 uma pequena queda da utilização da soja como matéria-prima, assim como um aumento significativo de outros materiais graxos vem se consolidando desde 2017. Essa variação está diretamente ligada ao preço praticado pela soja, bem como os aumentos da produção de biodiesel devido ao aumento da mistura, necessitando a busca de matérias-primas alternativas.

Figura 3.7 - Principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel de 2010-2018.

Fonte: BIODIESELBR, 2018

Nesta perspectiva de utilização de matérias-primas alternativas que possuem um custo menor, serão descritas a seguir as utilizadas neste trabalho, que englobam os outros materiais graxos que estão sendo utilizados para produção de biodiesel.

3.2.2 Ácido Graxo

Grande parte dos ácidos graxos naturais encontram-se esterificados com o glicerol (1,2,3-triidroxipropano), formando TAG. Os ácidos graxos, representados por suas unidades acila, representam aproximadamente 95 % da massa molecular dos TAG. O número de átomos de carbono, a posição dos grupos acila e a natureza dos ácidos graxos que compõem os óleos e gorduras determinam suas propriedades químicas, físicas e nutricionais (FRÉ, 2009).

Em seu trabalho, Fré (2009) comenta que a presença dos AGL nos óleos e gorduras está relacionada à ocorrência da rancidez, sendo este o fenômeno deteriorativo mais importante nas matérias-primas graxas. A rancidez é organolepticamente detectável por meio da modificação do sabor e do odor, por isso, os AGLs são removidos durante o refino de óleos e gorduras, a fim de evitar a perda de valor comercial do produto.

Na produção de biodiesel, a remoção dos AGLs da matéria-prima é de fundamental importância, pois aumenta o rendimento de processo. Para a obtenção de altos rendimentos, nas reações de transesterificação de TAG, em presença de catalisadores básicos, os óleos e gorduras devem estar neutralizados, com uma acidez de no máximo 3 %, pois a presença dos

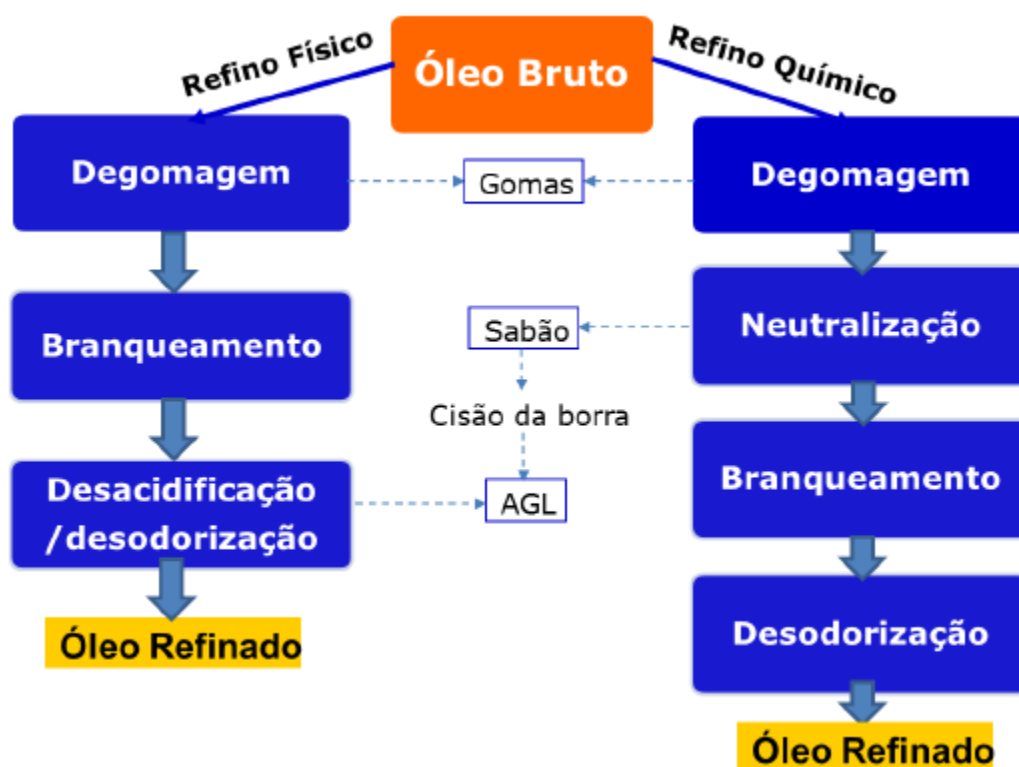
ácidos livres neutraliza a ação catalítica. Além disso, a separação dos sabões formados é difícil e conduz a perdas no rendimento da mistura de ésteres (FRÉ, 2009).

A diferenciação dos ácidos graxos presentes nas matérias-primas ocorre pelo número e posição das duplas ligações, assim como pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada. As ligações duplas dos ácidos insaturados estão localizadas na cadeia de forma não conjugadas (sistema 1,4-diênico), frequentemente separadas por grupo metilênico (α -CH₂). As duas unidades da molécula encontram-se frequentemente num dos lados da ligação dupla, assumindo configuração espacial do tipo *cis* = Z. Todavia, por meio do processo de rancidez autoxidativa e em processos de aquecimento prolongado a altas temperaturas (destilação), a configuração *cis* pode ser convertida no isômero *trans* = E (MORETTO; FETT, 1998).

3.2.2.1 Ácido Graxo Destilado

O processo de refino dos óleos vegetais utilizados para consumo humano visa melhorar a aparência, odor e sabor, que segundo Moretto e Fett (1998) ocorre à remoção de diversos componentes, como por exemplo, substâncias coloidais, proteínas, fosfatídeos, AGL e seus sais, substâncias voláteis, corantes, substâncias inorgânicas, entre outros.

Figura 3.8 - Visão geral do processo de refino físico e químico de óleos e gorduras.



Fonte: ARRUDA, 2016

Para o refino de óleos vegetais existem dois tipos de processos mais aplicados industrialmente, denominados de processo químico e processo físico. Na Figura 3.8 podem-se observar as principais etapas de cada processo.

No refino químico, os AGL são neutralizados com hidróxido de sódio, formando sabões que são removidos posteriormente por meio de centrifugação ou decantação. Enquanto que o refino físico, a neutralização por álcali é substituída por destilação a vácuo com injeção direta de vapor, permitindo a realização simultânea dos processos de desacidificação e desodorização, separando os componentes indesejáveis (ARRUDA, 2016).

Durante o processo de refino químico, após a neutralização e consequente formação de sabão, ocorre à retirada da borra normalmente por centrifugação, que posteriormente poderá sofrer o processo de cisão e geração de AGL. Estes ácidos graxos são denominados de ácidos graxos de corte de borra e serão detalhados no próximo tópico.

Nos últimos anos o refino físico tem ganhado espaço dentre as indústrias de refino de óleos vegetais, pois apresentam algumas vantagens sobre o refino químico em relação ao processo de desacidificação. A principal vantagem é a redução na perda de óleos neutros, apresentando maior rendimento dos produtos, ocasionando também a eliminação da formação de borras. Outros pontos destacados como vantagens são a redução de geração de efluentes e menor consumo de vapor, água e energia, com consequente menor investimento de capital (CVENGROS, 1995; MANDARINO, ROESSING, 2001). Porém, sua aplicação é mais restrita para óleos crus de baixa qualidade, pois necessitam de pré-tratamentos rigorosos para a redução de fosfatídeos e devido ao uso de altas temperaturas durante a destilação pode ocasionar a degradação de componentes nutracêuticos (ARRUDA, 2016).

Além disso, os ácidos graxos destilados possuem inúmeras aplicações no mercado alimentício, tintas e vernizes, fertilizantes, agroquímicos, plásticos, borrachas, resinas, surfactantes, cosméticos, biocombustíveis, entre outros. Variadas vantagens caracterizam os ácidos graxos destilados como valiosa matéria-prima básica, sendo biodegradáveis, renováveis, além de sua disponibilidade e origem vegetal (FRÉ, 2009).

Desta forma, o ácido graxo destilado proveniente dos processos de refino físico de óleos vegetais (desacidificação por destilação) vem aumentando seu volume anualmente, mas devido ao seu alto teor de AGL, sua disposição se torna um problema para as indústrias. Apesar de seu baixo custo, sua utilização para a produção de biocombustíveis a partir das rotas convencionais existentes é inviável, necessitando de novas tecnologias e processos para seu aproveitamento.

Atualmente não existe na literatura tecnologia e processos que utilizem esta matéria-prima para produção de biocombustíveis.

3.2.2.2 *Ácido Graxo de Corte*

Nos processos convencionais de refino (refino químico) de óleos e gorduras, o processo de desacidificação ocorre por via química, com neutralização normalmente com hidróxido de sódio e posterior centrifugação. Neste processo ocorre o descarte da borra, (resíduo), a qual é destinada normalmente para produção de sabões (ARRUDA, 2016; FRÉ, 2009). No Brasil as borras também são comercializadas sob a forma de óleo ácido (ácido graxo de corte), após a reação de acidulação para a liberação dos ácidos graxos e separação da água nelas contidas. Este óleo ácido é matéria-prima bastante procurada como fonte de ácidos graxos de menor custo (FRÉ, 2009).

A borra, que consiste na mistura de sabão, óleo arrastado, substâncias insaponificáveis e impurezas, tais como gomas e fosfatídeos, pode ser usada como tal para a fabricação de sabão em pó ou em barra. O produto original contém cerca de 50 % de água e, para reduzir o custo de seu transporte, a matéria graxa é, às vezes, recuperada por acidificação com ácido sulfúrico, em tachos de madeira revestidos com chumbo ou aço inoxidável, resistentes à ação dos ácidos minerais (MANDARINO, ROESSING, 2001).

A borra bruta contém normalmente entre 35 % - 50 % de ácidos graxos totais e a forma concentrada definida como borra acidulada (ou também como ácido graxo de corte), normalmente apresenta entre 85 % - 95 % de ácidos graxos (FRÉ, 2009). Já os autores Marín, Mateos e Mateos (2003) comentam em seu trabalho que o conteúdo de AGL mínimo na borra está em torno de 50 %.

Os ácidos graxos resultantes da acidulação da borra podem substituir tradicionais insumos na fabricação de rações para aves (RAUBER et al., 2008; VIEIRA et al., 2002). O resíduo graxo da indústria de óleos vegetais sendo utilizado como suplemento dietético em rações para frangos de corte está condicionado a sua composição, principalmente em AGL, e ao processo de obtenção do produto (FRÉ, 2009).

A borra de soja é o principal subproduto da indústria de refino de óleos vegetais, produzindo em 2009 aproximadamente 50.000 toneladas de borra de soja no Brasil, representando cerca de 2 % a 3 % do óleo de soja bruto (RAUBER et al., 2008). Em muitas situações, este subproduto pode ser considerado um problema, porém, de fato, é um produto valioso quando eficientemente recuperado e processado. Além disso, o aproveitamento desse

resíduo é um processo alternativo ao da hidrólise de TAG de óleos e gorduras, ocorrendo a pressões e temperaturas menores, conseqüentemente com um menor custo (FRÉ, 2009).

Assim como ocorre com o ácido graxo destilado, tanto a borra como o ácido graxo proveniente de seu corte não possuem aplicações nobres, que agreguem valor a este resíduo. A produção de biocombustíveis com estes resíduos é uma alternativa, mas não existem trabalhos relacionados ao uso desta matéria-prima para produção de biocombustíveis com as tecnologias convencionais já desenvolvidas.

3.2.3 Gordura Ácida/Óleo Ácido

As gorduras ácidas/óleos ácidos são obtidos em processos de recuperação destes compostos que ocorrem normalmente nas estações de tratamento de efluentes das indústrias. Um exemplo desta matéria-prima é o óleo de vísceras, obtido a partir do tratamento das vísceras dos abatedouros por intermédio do cozimento em digestores, resultando no óleo ácido e na farinha de vísceras. A indústria avícola vinha utilizando em larga escala estes subprodutos adicionados a rações, devido principalmente ao seu baixo custo e elevado conteúdo energético (RACANICCI et al., 2004).

Com o aumento das exportações de frangos nos últimos anos para a Europa e Oriente Médio, ocorreu uma redução no consumo de óleo e farinha de vísceras nas rações de frangos. Na Europa, devido à ocorrência da doença Encefalopatia Espongiforme Bovina decretou-se o banimento de óleos e farinhas de origem animal na fabricação de rações, como também no Oriente Médio devido às questões religiosas. Desta forma, os frangos produzidos para estes mercados necessitam de rações formuladas com ingredientes estritamente vegetais, eliminando tais subprodutos (BELLAVÉR et al., 2005).

Outra fonte de gordura ácida/óleo ácido é o efluente líquido de frigoríficos de abate e industrialização de carnes, o qual é constituído por água de processamento que carrega resíduos de sangue, gordura, líquidos fisiológicos, restos de carne, ossos e vísceras. Por meio de tratamento com agentes coagulantes e subsequente processo de flotação, é possível a separação da fração orgânica (proteínas e lipídios) do efluente líquido. Por intermédio do processamento térmico, seguido de centrifugação e decantação, é possível segregar grande parte do material graxo, tornando-o disponível para utilização (ZANOTTO et al., 2006).

As indústrias processadoras de pele para obtenção de colágeno (suíno e bovino) removem a gordura da pele por sucessivas lavagens em meios básicos e ácidos, enviando esta matéria orgânica para as estações de tratamento de efluentes. Após sua remoção nas estações de tratamento, esta matéria graxa não possui uma disposição definida. Estudos vêm sendo

desenvolvidos para uma melhor aplicação, como por exemplo, para a compostagem (RIBEIRO, 2007).

Neste contexto, observa-se que esta matéria-prima graxa gordura ácida/óleo ácido não possui uma destinação determinada, tendo o seu destino para produtos não nobres. Desta forma, esta matéria-prima apresenta grande potencial para produção de biocombustíveis, mesmo não sendo encontrado na bibliografia estudos para este fim.

3.2.4 Oleína de Corte de Glicerina

Com o aumento na produção do biodiesel, haverá um excedente de glicerina no mercado mundial, levando em consideração que ela representa cerca de 10 % do subproduto formado na reação de transesterificação desse biocombustível. Após o processo de separação do biodiesel, existe a necessidade de realizar um tratamento na glicerina, a qual vem misturada com água, material graxo, ésteres e sais, para que seja alcançado um determinado valor comercial. Um dos tratamentos mais utilizados industrialmente é a neutralização da glicerina com ácidos fortes, como por exemplo, ácido clorídrico, sulfúrico ou fosfórico, promovendo a sua purificação a glicerina “loira”, a qual possui um mínimo de 80 % de glicerol. Neste processo, ocorre a separação do material graxo e ésteres (hidrofóbico) da glicerina, os quais são destinados para queima (MARÇON, 2010; MENDES; SERRA, 2012).

A neutralização da glicerina e consequente purificação em glicerina “loira” (teor de glicerol maior que 80 %) também são realizadas por adição de ácidos fortes nos trabalhos de Van Gerpen et al. (2004) e Swearingen (2006). A reação de hidrólise dos sabões presentes na glicerina bruta pela adição dos ácidos fortes ocasiona a separação em duas ou mais fases distintas. Ainda segundo Swearingen (2006), a adição de ácido fosfórico para a reação de separação das fases, gera um sal insolúvel, proveniente da reação do ácido com o catalisador utilizado na reação de transesterificação (hidróxido de sódio - NaOH ou hidróxido de potássio - KOH).

O ácido graxo proveniente da hidrólise e purificação da glicerina, fase topo, é utilizado para a queima em caldeira, mas também para a produção de biodiesel por meio do processo de esterificação ácida. Marchetti e Errazu (2008) conseguiram conversões de 96 % dos ácidos graxos livres utilizando ácido sulfúrico como catalisador, em amostras de óleo de girassol com 10 % de AGL inicial. Também comentam que grande parte da conversão em ésteres etílicos ocorreu por parte do AGL, sendo apenas 30 % dos TG's sendo transesterificados.

A catálise ácida é uma das rotas de produção de biocombustíveis, mas atualmente não possui grande aplicabilidade, devido seu alto custo de investimento em equipamentos

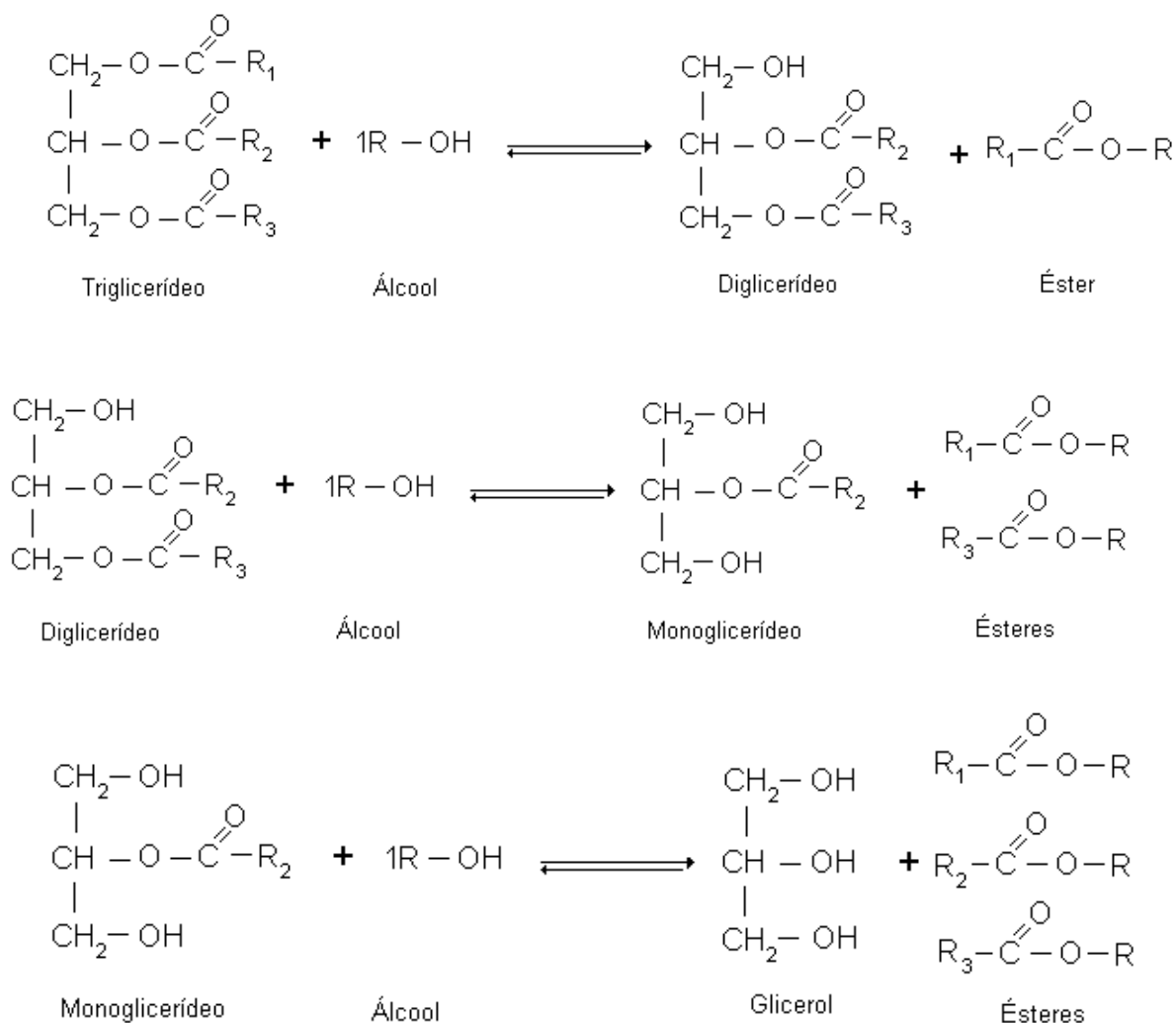
robustos para trabalhar com ácidos fortes com alto poder de corrosão e necessidade de reciclo do catalisador, bem como também por questões de segurança (HAYYAN; HASHIM; HAYYAN, 2014). Outras características negativas da catálise ácida, em comparação com outros processos são: condições mais severas de produção (maior razão molar metanol:matéria graxa - RM MeOH:MG; maiores quantidades de catalisador; temperaturas elevadas), menores velocidades de reação e a formação de produtos secundários indesejáveis, tais como éteres ou dialquílicos, tornando-se menos atraente para os fins industriais (KHAN et al., 2014; LUQUE et al., 2008).

A oleína (material graxo) proveniente da hidrólise da glicerina não possui apenas AGL, mas também uma grande quantidade de éster e outros materiais graxos (MAG, DAG e TAG), que são arrastados juntamente com os sabões formados durante a reação de transesterificação, sendo depositados na fase glicerínica. Esta matéria-prima é uma alternativa para a produção de biodiesel, sendo que atualmente não existem processos industriais, nem mesmo estudos, para sua utilização para produção de biocombustíveis.

3.3 ROTAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Diferentes métodos podem ser utilizados para a produção do biodiesel, como por exemplo: pirólise, diluição (mistura direta), microemulsão, esterificação e transesterificação. Os processos de diluição, pirólise e microemulsão, apesar de simples, são preteridos em detrimento dos outros por apresentarem longos tempos reacionais, não sendo viáveis para grandes produções. Com isso, a transesterificação de triacilglicerol com um álcool de cadeia curta, utilizando óleos vegetais, gorduras animais ou óleo de microalgas é o processo mais comumente utilizado para a produção de biodiesel. Neste processo são utilizados catalisadores alcalinos, ácidos ou enzimáticos (LIN et al., 2011). A Figura 3.9 apresenta as reações intermediárias da reação de transesterificação entre um TAG e um álcool de cadeia curta.

Figura 3.9 - Reações intermediárias da reação de transesterificação entre um triacilglicerol e um álcool de cadeia curta.



Fonte: CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014.

Na reação de transesterificação dos óleos vegetais, um TAG reage com um álcool na presença de um catalisador (enzimático, ácido ou básico), produzindo uma mistura de ésteres e glicerol. A reação estequiométrica exige 1 mol de um triacilglicerol e 3 mols do álcool, resultando na produção de 3 mols de ésteres e 1 mol de glicerol. A transformação dos TAG em ésteres ocorrem em três sucessivas e reversíveis reações, sendo o primeiro passo a conversão de um TAG a um DAG, seguido pela conversão de um DAG a MAG, e posteriormente do MAG para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo em cada fase da reação (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

A transesterificação é o processo de produção com maior aplicação, pois apresenta eficiente conversão de TAG em ésteres metílicos ou etílicos em menor tempo de reação

(DELATORRE et al., 2011). A transesterificação de óleos e gorduras pelo processo químico é simples, rápida e com alto rendimento, no entanto, possui algumas desvantagens. Destacam-se, a dificuldade de separação, purificação e reutilização do catalisador, vestígios de metanol e água, pois no final do processo estes elementos permanecem misturados com a glicerina, principal subproduto (DORADO et al., 2004). Outra desvantagem importante refere-se a uma limitação na transferência de massa e de baixa velocidade da reação devido ao sistema bifásico de mistura entre óleo e álcool. Para superar esses obstáculos, Remonatto (2017) comenta em seu trabalho que uma série de novas abordagens vem sendo estudadas, como catalisadores heterogêneos, catalisadores nano cristalinos MgO, catalisador magnético sólido composto de Ca/Al/Fe₃O₄, funcionalizante SBA-15 desenvolvidos para facilitar a separação entre catalisadores e volume reacional, e aumentar os rendimentos de biodiesel.

Remonatto (2017) também aborda em sua tese que novos processos de reação e reatores são investigados, tais como processos supercríticos e uso de ultrassom. Além disso, reações que utilizam co-solventes, tais como: hexano, benzeno, tetrahidrofurano (THF) e líquidos iônicos. Estes processos são introduzidos para melhorar a miscibilidade entre óleo e álcool. Apesar dos avanços tecnológicos, muitos destes novos métodos apresentam limitações como: baixo rendimento, processos sofisticados, alto consumo de energia, altos custos e riscos ambientais (GU et al., 2015).

Nesse sentido, o processo enzimático pode ser utilizado com uma alternativa para reduzir os problemas associados à catálise química, resultando em biodiesel e glicerina com maior grau de pureza e, portanto, com a possibilidade de reutilização do biocatalisador, além da oportunidade de utilização de etanol ou metanol hidratado (NASCIMENTO; COSTA NETO; MAZZUCO, 2001). No entanto, a rota enzimática também apresenta inconvenientes, como, longo tempo de reação, alto custo das enzimas e baixo rendimento (DELATORRE et al., 2011).

Neste sentido, a seguir serão apresentadas de forma sucinta a principal rota de produção de biodiesel na atualidade, rota química, e a rota foco de estudo neste trabalho, rota enzimática.

3.3.1 Catálise Química

O método mais utilizado na reação de transesterificação é a catálise química homogênea básica, devido às altas conversões em reduzidos tempos de reação proporcionados, conforme relatos na literatura (OLIVEIRA et al., 2005; VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2006; LIMA et al., 2007).

As bases empregadas no processo de transesterificação por catálise química alcalina incluem NaOH, KOH, carbonatos e alcóxidos, como o metóxido de sódio e butóxido de sódio. Os catalisadores mais reativos e que conduzem a maiores rendimentos e tempos reduzidos de processo (cerca de 1 hora) são os alcóxidos, com o inconveniente de serem desativados pela água (SANTIN, 2013; AGUIEIRAS et al., 2014). Apesar do metóxido de sódio ser o catalisador mais utilizado industrialmente, a utilização de NaOH e KOH é uma boa alternativa, no entanto estes catalisadores apresentam o inconveniente de produzirem água na sua reação com o álcool, ocasionando a ocorrência da hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos AGL. A reação de saponificação ocorre devido ao consumo parcial do catalisador, reduzindo o rendimento da produção de ésteres, além de tornar as etapas de separação e purificação dos produtos complexa, dificultando a recuperação do glicerol devido à formação de emulsões (PINTO et al., 2005).

A transesterificação nos moldes atuais exige o uso de óleos neutros, com baixo teor de AGL (menor que 0,5 %) e com baixo teor de água (WANG et al., 2006). A não utilização de óleos, de alta qualidade, resulta na formação de sabões, promovendo o arraste de quantidades variáveis de ésteres junto com a fase glicerosa, resultando na redução de rendimento dos ésteres na fase leve e gerando glicerina com mais contaminantes. Neste contexto o custo da matéria-prima é responsável por 70 à 88 % do preço final do biodiesel, quando utilizado tal processo (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). Alguns estudos realizados apontam que o catalisador básico pode tolerar maior teor de AGL, 0,5 - 2 %. Já para matérias-primas com altos teores de AGL, como por exemplo, óleo de cozinha usado, gordura ácida/óleo ácido, ácido graxo destilado, ácido graxo de corte, oleína, que possuem um teor de acidez bem acima de 5 %, o catalisador alcalino não é adequado para ser utilizado no processo (LOTTERO et al., 2005; LAM; LEE; MOHAMED et al., 2010).

A transesterificação por catálise ácida ocorre de forma mais lenta que a alcalina, apesar de ter um melhor rendimento quando utilizado óleos com quantidades elevadas de AGL e água, como por exemplo, gorduras ácidas/óleos ácidos e óleos de fritura usados. A catálise ácida promove simultaneamente a transesterificação dos TAG e a esterificação dos ácidos graxos (PINNARAT; SAVAGE, 2008; SRIVASTAVA; PRASAD, 2000), apesar de precisar de altos tempos de processo quando se tem altas concentrações de TAG (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007). A reação com catalisador ácido homogêneo incluem os ácidos sulfúrico, fosfórico, hidrolórico e sulfônicos orgânicos (BALAT e BALAT, 2010), sendo obtidos rendimentos acima dos 98 % a partir de processos a temperaturas acima de 100 °C e com tempos de 24 horas (KNOTHE, 2005).

Atualmente a transesterificação alcalina com catalisador metóxido de sódio é a mais utilizada industrialmente, podendo ser 4000 vezes mais rápida que a ácida, dependendo das condições de processo, permitindo ainda conversões elevadas em curtos períodos de tempo (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; DARNOKO; CHERYAN, 2000; FACCIO, 2004; OLIVEIRA et al., 2005a)

Embora a transesterificação química proporcione níveis elevados de conversão dos TAG aos seus correspondentes alquil ésteres de ácidos graxos, este processo traz uma série de desvantagens, como por exemplo: grande gasto de energia, difícil recuperação do glicerol, necessidade de tratamento do efluente alcalino e o catalisador precisa ser retirado do produto (REMONATTO, 2017).

3.3.2 Catálise Enzimática

Como já foi mencionado anteriormente, a viabilidade econômica do biodiesel ainda é freada pelos altos preços das matérias-primas oleaginosas, sendo que a maior produção de biodiesel no Brasil vem da soja. Para uma futura implantação do diesel acima de B15 (15 % de biodiesel e 85 % de óleo diesel), o uso da soja não será suficiente, a qual terá uma concorrência muito acirrada em valor comercial com a alimentação humana. Desta forma o Brasil precisará desenvolver alternativas de matérias-primas para suprir esta demanda, bem como novos processos tecnológicos que permitam a utilização dos novos materiais. Este aumento pode se tornar realidade a partir de estudos que vem sendo realizados com motores a combustão, no qual ficou comprovado que os motores do ciclo diesel podem utilizar até o combustível B25 sem a necessidade de significantes ou onerosas adaptações (GUIMARÃES, 2017). Neste contexto o aumento na produção e uso do biodiesel teria como resultado positivo a redução da importação de petróleo para o Brasil.

Desta forma, a rota enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica, devido às vantagens que se tem em utilizar essa rota alternativa (OLIVEIRA et al., 2005b). Recentemente os catalisadores enzimáticos tornaram-se mais atraentes, pois durante a produção do biodiesel evitam a formação de sabão, além dos processos de purificação dos ésteres formados serem mais simples de realizar. No entanto, eles são menos utilizados comercialmente devido ao maior tempo de reação e maior custo (LEUNG; WU; LUENG, 2010).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECCHIA;

NASCIMENTO; SOLDI, 2004). A capacidade catalítica das lipases é muito grande, o que as tornam vantajosas com relação à rota catalítica convencional (química homogênea), possibilitando o uso de matérias-primas oleosas com índice de acidez elevado (REMONATTO, 2017).

Para suprir a demanda de consumo do novo processo, utilizando a catálise enzimática, existem muitas matérias-primas que podem ser utilizadas, como por exemplo, óleo residual de fritura, os ácidos graxos, gorduras ácidas/óleos ácidos, oleínas, gordura animal e o esgoto sanitário. A utilização desses resíduos resulta numa produção de biodiesel que pode atender o aumento da demanda no Brasil. Ainda, por serem considerados como poluentes, configura-se como uma atividade que reutiliza materiais sem valor no mercado, o que contribui para a redução dos custos de produção, além de caracterizar um tratamento sanitário (IVIG, 2001).

As pesquisas sobre transesterificação de óleos vegetais em sua grande maioria utilizam enzima comercial pura para obtenção de biodiesel, sendo realizadas em diversos meios reacionais, ou suportadas em polímeros na forma imobilizada, a qual facilita sua reutilização (DU et al., 2004). As enzimas são biocatalisadores efetivos por apresentarem alta especificidade ao substrato, grupo funcional específico e estéreo especificidade em meio aquoso (ISO et al., 2001).

Vários estudos na literatura apontam para pesquisas voltadas à produção de biodiesel com utilização de óleos refinados, ou mesmo óleos com valor de mercado muito próximos da soja, onde altas conversões foram obtidas. Remonatto (2017) e Santin (2013) relatam nas revisões da literatura de suas teses a utilização de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel, utilizando a catálise enzimática com enzima livre ou imobilizada, conforme segue: utilização de óleo de soja com a enzima comercial *Lipozyme IM*, obtendo conversões de 96 %; mistura de óleo de colza tratado com lipases imobilizadas (*C. antarctica*) com conversões de até 97 %; óleo de farelo de arroz utilizando lipases comerciais imobilizadas (*Novozym 435*) obtendo conversões de 98 %; óleo de coco utilizando enzimas imobilizadas (*Novozym 435*) com conversões de 80,5 %; utilização de ácidos graxos com enzima lipase *C. Antartica B* (CAL B) imobilizada obtendo conversões de 81 %; utilização de matérias-primas não comestíveis, como óleos de andiroba, babaçu, pinhão-manso, palmeira, em reações de etanolise catalisada por lipase imobilizada (*Burkholderia cepacia*), onde obteve resultados de 92 % de conversão.

Estes trabalhos mostram a evolução que as pesquisas com catálise enzimática vêm ganhando ao longo dos anos, mas o valor comercial das matérias-primas e enzimas utilizadas

pode ser inviável para as aplicações comerciais, tendo valores superiores ao processo convencional, por catálise química, utilizando óleo de soja refinado.

Na busca por matérias-primas alternativas de baixo custo, quando comparadas com o óleo de soja, Remonato (2017) realizou estudos de produção de ésteres metílicos com óleo de fritura usado e resíduos das indústrias de óleo, sendo misturas heterogêneas de diferentes correntes residuais. Nas reações de transesterificação foi utilizada a catálise enzimática com catalisador comercial. Em escala laboratorial, Remonato (2017) em 16 horas de reação, obteve 95 % de conversão em ésteres metílicos a partir de óleo de fritura usado, já com óleo ácido residual, a conversão foi de 92 % em 8 horas de reação.

Além da possibilidade de utilização de materiais graxos de baixo custo, o processo de transesterificação enzimática trabalha com temperaturas amenas, quando comparado ao processo químico, reduzindo o gasto energético. Também no processo enzimático ocorre maior facilidade de separação do glicerol gerado como subproduto e os ésteres produzidos são facilmente purificados (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

3.4 ENZIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O biodiesel pode ser produzido pela esterificação de AGL ou pela transesterificação de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta, sendo o metanol o principal álcool utilizado por causa de seu menor custo em comparação com outros álcoois. A síntese é classificada como produção química ou enzimática de acordo com os catalisadores empregados no processo. Pequenos tempos e altos rendimentos são obtidos quando a transesterificação química é aplicada. No entanto, as desvantagens, como os elevados requisitos de energia, as dificuldades na recuperação do catalisador e o glicerol e a poluição potencial para o meio ambiente são grandes desvantagens nos processos catalíticos alcalinos ou ácidos (TAN et al., 2010).

As enzimas lipases (EC 3.1.1.3 triacilglicerol acil-hidrolases) são um tipo especial de esterases, pertencentes à classe das hidrolases (classe 3 – enzimas hidrolíticas), a subclasse 1 pelo ataque a ligação éster e a subclasse 1 devido à sua especificidade para as ligações éster de ácido carboxílico. A função biológica da lipase é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis para proporcionar ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. As lipases ocorrem amplamente na natureza, no entanto as de origem microbiana são comercialmente significativas por causa do baixo custo de produção, maior estabilidade e maior disponibilidade do que outras fontes (PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011).

As lipases são reconhecidas como eficientes catalisadores para a biotransformação de óleos e gorduras, sendo também resistentes à presença de altos teores de AGL, permitindo assim redução significativa do custo com matéria-prima a ser processada. Além disso, sabe-se que o uso de lipases acaba por reduzir a unidade de processamento de biodiesel, tornando o processo mais simples por meio da redução de etapas no tratamento para a purificação de biodiesel e também para sub/coprodutos gerados, resultando em um processo ambiental compatível (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

As enzimas são catalisadores naturais (biocatalisadores) com excelentes características catalíticas, sendo as lipases amplamente utilizadas para várias aplicações, como síntese orgânica, biocombustíveis, produtos farmacêuticos, detergentes, alimentos, panificação, indústrias de bebidas, cosméticos, couro, indústrias de papel, tratamento de resíduos, entre outros (BADGUJAR; DHAKE; BHANAGE, 2013; ZORN et al., 2016). A massa molecular das lipases está em torno de 20 e 75 kDa, compostas por cerca de 300 aminoácidos, atuando na faixa de pH entre 4 a 10 e na temperatura de 27 a 80 °C (PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011).

As enzimas podem ser empregadas em processos de diferentes formas, em sua forma solúvel (livre), ou também aderida a diferentes matrizes (imobilizada), sendo que em ambas formas os biocatalisadores apresentam muitas vantagens, assim como muitas restrições. Para a sua melhor aplicação se deve levar em conta o tipo de processo ao qual se destina, o designer dos reatores, as características das matérias-primas e os produtos de interesse a serem formados (REMONATTO, 2017).

Nos últimos anos muitos estudos vêm sendo realizados na utilização de enzimas imobilizadas para a produção de biodiesel (ZHANG et al., 2013; CIPOLATTI et al., 2015; TAN et al., 2010; BENASSI et al., 2013). Com os avanços das técnicas de imobilização, bem como a redução dos custos dos materiais de suporte, os processos que utilizam enzimas imobilizadas ganharam força e competitividade no mercado. A reutilização da enzima se torna o principal fator econômico nas reações de produção de biodiesel, mas que deve ser bem estudada devido às complicações ao considerar esta estratégia. Entre os desafios da utilização desta técnica, está a estabilidade da enzima, a qual poderá ser afetada pelo risco de lixiviação enzimática ou ruptura do suporte devido à agitação do meio. Além disso, existe o risco de desativação da enzima causada pelo álcool ou mesmo pelo acúmulo de glicerina no suporte. Neste caso o projeto do reator se torna fundamental para garantir uma alta transferência de massa sem comprometer a estabilidade mecânica do suporte (NIELSEN et al., 2016).

As lipases na forma livre, comparando com as imobilizadas, possuem um custo de obtenção menor, visto que não possuem gastos com suporte e reagentes de imobilização, obtendo também uma maior velocidade de reação devido a sua maior mobilidade (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013). Desta forma, as enzimas livres podem ser produzidas e vendidas entre 30 a 50 vezes mais baratas, quando comparadas às imobilizadas, tornando o processo de produção de biodiesel mais competitivo em relação ao convencional (catálise química alcalina) (CESARINI; PASTOR; DIAZ, 2014). Apesar de Cerasini, Diaz e Nielsen (2013) relatarem a possibilidade de reutilização da enzima livre a partir da fase da glicerina formada (fase pesada), Nielsen et al. (2016) afirmam que com os avanços recentes na produção de enzimas o seu custo foi reduzido, tornando-se desnecessária a sua reutilização, visto que utilizando a enzima uma única vez o processo é economicamente viável.

Apesar de vantagens apontadas pelo processo enzimático utilizando a enzima livre, ainda existem poucos trabalhos relatados na literatura sobre o seu uso nas reações de transesterificação (NIELSEN et al., 2016; PEDERSEN et al., 2014; LV et al., 2010). Entretanto essas reações estão ganhando atenção devido à possibilidade de aceitar água no processo de produção de biodiesel, pois além de ser essencial para manter a estrutura tridimensional específica de algumas lipases, especialmente quando na forma solúvel, possibilitam a utilização de matérias-primas com alto índice de AGL e umidade (REMONATTO, 2017; ZORN et al., 2016). A produção de biodiesel com matérias-primas de baixo custo com altos teores de AGL está se tornando a segunda geração de produção de biodiesel, sendo este processo baseado na catálise enzimática utilizando lipase em fase líquida (NORDBLAD et al., 2014).

3.5 SCALE-UP DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Os novos avanços tecnológicos realizados nos últimos anos para a produção de biodiesel por intermédio de novas tecnologias, principalmente utilizando novas alternativas de matérias-primas, devem passar por aumentos de escala visando à produção de grandes quantidades. Os aumentos de escala devem ocorrer de forma gradual, passando do laboratório para uma unidade piloto e depois para uma unidade industrial.

Nesses últimos anos muitos foram os trabalhos buscando tecnologias diferentes da catálise química básica convencional para a produção de biodiesel, como por exemplo, a catálise ácida e enzimática. Estas propiciam principalmente a utilização de matérias graxas com teores elevados de AGL, tendo uma redução significativa em seus custos. Apesar disso,

poucos foram os trabalhos relacionados a aumento de escala destes novos processos (tecnologia ou matéria-prima), especialmente devido ao alto custo envolvido pelo processo ou pelo catalisador.

Christopher, Kumar e Zambare (2014) relatam em seus estudos algumas empresas que iniciaram a produção industrial de biodiesel a partir da catálise enzimática. Uma delas, em 2007, foi à empresa Lvming Co. Ltd. de Xangai - China, que estabeleceu uma planta com uma capacidade de 10 mil toneladas/ano, utilizando óleo de cozinha residual como matéria-prima e lipase imobilizada de *Candida sp* como catalisador. Um ano antes, em 2006, outra empresa Chinesa chamada Hainabaichuan Co. Ltd. lançou a produção em uma escala de 20 mil toneladas/ano, utilizando a enzima imobilizada Novozym[®]435 (Novozymes), sendo a matéria-prima utilizada a partir de resíduos de óleo de palma. Em 2012, a Piedmont Biofuels - Carolina do Norte desenvolveu uma nova tecnologia (FAeSTER) para uma produção contínua de biodiesel usando enzima imobilizada ou líquida.

No primeiro trimestre de 2014, duas novas empresas nos Estados Unidos entraram em operação para produção de biodiesel utilizando o processo de catálise enzimática. Blue Sun Biodiesel em St. Joseph, Missouri e Viesel Fuel LLC em Stuart, Flórida anunciaram a produção em larga escala de biodiesel catalisado por uma nova lipase em fase líquida. A nova tecnologia de lipase permite o processamento de matérias-primas graxas com qualquer concentração de AGL e com menores custos de energia do que com um catalisador químico padrão, com um custo bem menor do catalisador, frente aos imobilizados utilizados até o momento (NIELSEN, 2014).

Recentemente, Price et al. (2016) relatam em seu trabalho a ampliação de escala na transesterificação enzimática com óleos de baixo custo utilizando um biocatalisador, sendo este uma formulação líquida de uma lipase modificada de *Thermomyces lanuginosus*. Foram utilizados no trabalho óleo de fritura usado (AGL < 15 %) e óleo proveniente de tratamento de esgoto ou efluente (AGL > 55 %) em escalas piloto de 80 L e 4 m³ e em escala industrial de 40 m³ (Viesel Fuel LLC). Bons resultados foram conseguidos com 0,1 % de enzima no meio reacional, sendo um passo importante para a viabilização do custo do processo.

Já Nielsen et al. (2016) propõem em seus estudos um processo completo para produção de biodiesel enzimático em escala industrial utilizando lipase comercial, com rendimentos acima de 95 %. O processo consiste em duas etapas, sendo o primeiro passo a transesterificação de óleo de soja refinado catalisada pela lipase líquida. No segundo passo um processo de polimento do biodiesel para atingir as especificações dos produtos finais, reduzindo o teor de AGL de 2 % para valores inferiores a 0,25 %. Neste processo, com o

avanco das pesquisas em relação ao custo da enzima, o autor comenta em não reutilização, sendo a enzima utilizada apenas uma vez.

O custo das enzimas utilizadas nos processos de produção de biodiesel tem sido o principal desafio encontrado para o aumento de escala deste processo, principalmente quando comparado ao processo por catálise química. Entretanto, com o desenvolvimento recente de aplicações biotecnológicas que buscam novas fontes de enzimas com valores mais acessíveis, fez com que essa disparidade de custo diminua. Além disso, os processos enzimáticos geram alta qualidade do subproduto/coproduto glicerol, possibilitando a obtenção de melhores preços de mercado em sua comercialização e um leque maior de aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, (2014); REMONATTO, 2017).

3.6 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Nos últimos anos as pesquisas referentes à produção de biodiesel têm se intensificado, principalmente com relação ao processo de 1º geração, o qual utiliza matérias-primas nobres, com alto grau de refino. O processo realizado por catálise química homogênea, utilizando o metóxido de sódio como catalisador já é uma tecnologia dominada e bem desenvolvida, no qual as variáveis de processo são conhecidas.

Contudo, algumas novas tecnologias vêm sendo estudadas e desenvolvidas, principalmente no que se refere à utilização de catalisadores enzimáticos. Muitos estudos foram realizados com enzimas imobilizadas, para que o seu reuso possibilitasse a viabilidade desta nova tecnologia. Porém, o alto custo destes catalisadores e as restrições deste processo tem dificultado os avanços das pesquisas para aumentos de escala.

O aumento na produção de biodiesel será maior a cada ano, visto que a substituição dos combustíveis fósseis deverá ocorrer de forma lenta, mas contínua. Para tal, a utilização de matérias-primas nobres que também são utilizadas para alimentação humana poderá afetar o equilíbrio de oferta e demanda, elevando ainda mais o seu custo, e conseqüentemente o preço final do biodiesel.

Dessa forma, os estudos e o desenvolvimento da produção de biodiesel de 2ª geração tem que avançar, para que possa ser possível a utilização de matérias-primas de baixo custo, que muitas vezes são passivos ambientais pela sua disposição e descartes incorretos. Para esta produção, o indicado é a utilização de enzimas livres como catalisador, por apresentarem afinidade reacional tanto com os TAG presentes, como também com altos valores de AGL.

Neste contexto, existem restritos trabalhos na literatura envolvendo este assunto, principalmente quando relacionamos com aumento de escala. Portanto a investigação de produção de biodiesel via catálise enzimática utilizando matérias-primas de baixo custo desponta como uma alternativa atraente para o aumento sustentável na produção de biodiesel.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos, bem como os procedimentos experimentais utilizados para a realização deste trabalho, estando relacionados às seguintes etapas: estudo da atuação da enzima livre; avaliação das variáveis de processo na produção de ésteres metílicos com matérias-primas de baixo custo; otimização das variáveis de processo para produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I; aumento de escala da produção de ésteres metílicos para as escalas piloto e industrial.

O desenvolvimento da parte experimental ocorreu em parceria com a Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Chapecó (SC), a empresa Transfertech Gestão e Inovação Ltda, com sede na cidade de Erechim (RS) e a planta industrial da empresa Prisma Brazil – divisão ésteres, sediada na cidade de Sumaré (SP).

4.1 MATERIAL

4.1.1 Catalisador Enzimático

- Lipase NZ - Lipase solúvel produzida e cedida pela Novozymes[®] (Dinamarca), (NOVOZYMES, 2015).

4.1.2 Substratos Graxos

- Óleo de soja refinado (Soya);
- Matéria-prima I:
 - ✓ Fornecedor “A”: 2 amostras;
 - ✓ Fornecedor “B”: 1 amostra;
 - ✓ Fornecedor “C”: 1 amostra;
 - ✓ Fornecedor “D”: 1 amostra.
- Matéria-prima II:
 - ✓ Fornecedor “E”: 3 amostras;
 - ✓ Fornecedor “F”: 2 amostras.
- Matéria-prima III:
 - ✓ Fornecedor “G”: 1 amostra;
 - ✓ Fornecedor “H”: 1 amostra;

- ✓ Fornecedor “I”: 1 amostra;
- ✓ Fornecedor ”J”: 1 amostra.
- Matéria-prima IV:
 - ✓ Fornecedor “K”: 1 amostra;
 - ✓ Fornecedor “L”: 3 amostras.

4.1.3 Reagentes

- Álcool metílico/metanol (Vetec, 99,9 %);
- Água destilada e da rede pública de abastecimento;
- Hidróxido de sódio P.A - ACS (Dinâmica, mín. 98 %);
- Hidróxido de potássio P.A - ACS (Dinâmica, mín. 85 %);
- Ácido clorídrico P.A - ACS (Dinâmica, 37 %);
- Aditivo P.A - ACS (Dinâmica, mín. 95 %);
- Tetracloroeto de carbono P.A - ACS (Dinâmica, mín. 99,5 %);
- Solução Iodo Cloro segundo Wijs - (Dinâmica);
- Iodeto de potássio P.A - ACS (Synth, mín. 99 %);
- Tiosulfato de sódio P.A - ACS (Anidrol, 100 %);
- Amido P.A - ACS (Anidrol, mín. 99,5 %);
- Ácido sulfúrico P.A - ACS (Neon, 95 %-97 %);
- Tolueno P.A - ACS (Synth, mín. 99,5 %);
- Azul de bromofenol P.A - ACS (Synth);
- Metaperiodato de sódio P.A - ACS (Anidrol, mín. 98 %);
- Bicarbonato de sódio P.A - ACS (Dinâmica, mín. 99,7 %);
- Arsenito de sódio P.A (Vetec, mín. 98 %);
- Éter etílico P.A (Qhemis, 97 %-98 %);
- Álcool etílico Absoluto P.A (Anidrol, 99,5 %);
- Fenolftaleína 1 % (Dinâmica);
- Ácido oleico P.A (Anidrol, mín. 190 índice de acidez);
- Heptano (Vetec, 99,5 %);
- Derivatizante MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida);

4.1.4 Padrão Químico

Os padrões químicos utilizados para as análises em cromatógrafo de gases foram:

- Ésteres metílicos, heptadecanoato de metila (Sigma-Aldrich, 95 %);
- Monoacilgliceróis, monoleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99 % pureza);
- Diacilgliceróis, dioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99 % pureza);
- Triacilgliceróis, trioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99 % pureza).

4.1.5 Equipamentos

4.1.5.1 Laboratório

Os ensaios laboratoriais, as análises dos materiais graxos e as análises dos produtos das reações foram realizados principalmente em dois locais, no laboratório da empresa Transfertech Gestão e Inovação Ltda (Erechim/RS) e no laboratório da empresa Prisma Brazil - divisão ésteres (Sumaré/SP). As análises de MAG, DAG, TAG e ésteres metílicos foram realizadas no laboratório Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A seguir serão listados os equipamentos utilizados para a execução deste trabalho:

- Balança semi-analítica: Marte, BL320H
- Balança analítica: Ohaus, AR-2140
- Shaker: Tecnal, TE - 4200
- Cromatógrafo: CG Shimadzu 2010
- Titulador manual: Jencons, Digitrate Pro
- Capela
- Agitador magnético: Fisaton, 752A
- Centrífuga: Daiki, 80-2B
- Banho termostático: Fisatom
- Chapa aquecedora: SPLABOR, SP-140

4.1.5.2 Planta Piloto

Os testes em escala piloto foram realizados inicialmente nas dependências da empresa Transfertech Gestão e Inovação Ltda, localizada na cidade de Erechim/RS, onde os reatores piloto estavam instalados. Posteriormente, a unidade piloto transferiu-se para a empresa Prisma Brazil - divisão ésteres, localizada na cidade de Sumaré/SP, onde ocorreram os testes finais.

A unidade experimental piloto, quando instalada na empresa Transfertech, estava montada sobre uma plataforma metálica de um andar, com acesso ao piso superior por meio de escada, conforme mostrado na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Plataforma metálica com a unidade experimental montada para a produção enzimática de ésteres metílicos de material graxo em planta piloto (empresa Transfertch Gestão e Inovação Ltda).



Fonte: REMONATTO (2017)

No primeiro andar tinha-se acesso aos dois reatores, identificados como R1 e R2 (este disposto atrás da plataforma - pouco visível), com capacidade de 1000 L cada, sendo constituídos de inox, e com controle de temperatura a partir de um quadro de comando (Figura 4.2) e pressão (manômetro analógico e válvula manual). Nestes reatores estava acoplada uma bomba centrífuga, BCI E603 TM 06 J (Fabo Bombas), para a agitação do meio reacional, e também três bombas dosadoras, IEC EN 60034 (Bonfiglioli), utilizadas no controle da entrada dos substratos metanol e água, e do catalisador Lipase NZ. Os substratos e as lipases estavam dispostos abaixo da plataforma, em containers com capacidade de 1000 litros, tipo IBC com pallet de ferro galvanizado. A entrada de reagentes nos reatores era controlada por meio de um painel eletrônico com controladores, também disposto abaixo da plataforma. A adição das matérias graxa ao reator, assim como a retirada do meio reacional após o tempo de reação, era realizada com uma bomba centrífuga. A separação do produto final ocorria por meio de decantação no próprio reator ou em container tipo IBC (REMONATTO, 2017).

Figura 4.2 – Quadro de comando para controle de temperatura dos reatores piloto (empresa Transfertech Gestão e Inovação Ltda).



Fonte: AUTOR

Quando transferidos para a empresa Prisma Brazil (divisão ésteres) na cidade de Sumaré/SP, os reatores piloto ficaram localizados na planta industrial, sem uso de plataforma, próximo ao laboratório da empresa. Na nova instalação, o reator permaneceu com a bomba centrífuga, BCI E603 TM 06 J (Fabo Bombas) acoplada para a agitação do meio reacional e somente com a bomba dosadora do álcool metílico. Os outros insumos foram alimentados pela janela de inspeção superior. As matérias graxas ficavam dispostas ao lado do reator, em containers com capacidade de 1000 litros, tipo IBC com pallet de ferro galvanizado, sendo alimentadas com uma bomba centrífuga. As demais etapas ocorriam de forma idêntica à realizada na empresa Transfertech. A Figura 4.3 mostra a disposição do reator na empresa Prisma Brazil - divisão ésteres.

Figura 4.3 - Unidade experimental destinada à produção enzimática de ésteres metílicos de material graxo em planta piloto (empresa Prisma Brazil - divisão ésteres).



Fonte: AUTOR

4.1.5.3 *Planta Industrial*

A planta industrial onde foi realizado o scale-up final do processo de produção de ésteres metílicos com matérias graxas de baixo custo está localizada na cidade de Sumaré/SP, de propriedade da empresa Prisma Brazil – divisão ésteres. A empresa possui um reator de 90 m³, construído em aço inox 316, o qual possui os seguintes componentes: 2 bombas centrífugas para agitação da mistura; 6 bocais de sucção do meio reacional (captação das bombas) distribuídos na vertical do reator, dotados de válvula globo; 2 bocais de entrada de matéria-prima localizados na parte superior do reator; bocais de entrada para enzima, insumos e metanol; controladores de vazão antes da entrada dos insumos; serpentina interna para aquecimento do reator por fluxo de vapor; 4 visores para observação da agitação e controle de processo; 2 medidores de nível, sendo uma mangueira de nível externa e um controle por coluna de líquido, com sinal enviado para o supervisório; 3 termômetros, sendo dois analógicos e um digital, com sinal sendo enviado ao supervisório.

Neste reator é possível produzir em torno de 60 m³ de ésteres metílicos por batelada, com tempo de duração entre 16 e 48 horas, dependendo do tipo de matéria-prima.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste item serão descritos os procedimentos experimentais de todos os ensaios realizados, desde a fase de laboratório, passando pela planta piloto e posteriormente a planta industrial.

Na realização deste trabalho foram utilizados diversos substratos graxos, sendo matérias-primas advindas de diferentes fontes. Desta forma, para cálculo da razão molar dos substratos, utilizou-se conforme descrito por Remonato et al. (2015), no qual a matéria-prima com perfil de óleo (constituídas majoritariamente por TAG) foi considerada a massa molar 870 g/mol, e quando a matéria-prima possuía um perfil de ácido graxo (rica em AGL), levou-se em conta a massa molar do ácido oleico 282 g/mol. Também foi utilizada a massa molar do álcool metílico de 32,04 g/mol.

4.2.1 Reações de hidrólise e produção de ésteres metílicos em sistema batelada alimentada utilizando agitação orbital

Neste item será descrito o procedimento utilizado para as reações de hidrólise e produção de ésteres metílicos a partir das diferentes matérias graxas em escala laboratorial. Este procedimento foi utilizado nas seguintes etapas do trabalho: estudo da atuação da enzima livre Lipase NZ; avaliação das variáveis de processo na produção de ésteres metílicos com diversas matérias-primas de baixo custo; otimização do processo de produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I.

Os ensaios realizados por meio de agitação orbital em batelada alimentada consistem na utilização de frascos reacionais, com capacidade de 1,5 L, incubados em shaker com controle de temperatura e agitação. Na Figura 4.4 é apresentado o sistema utilizado.

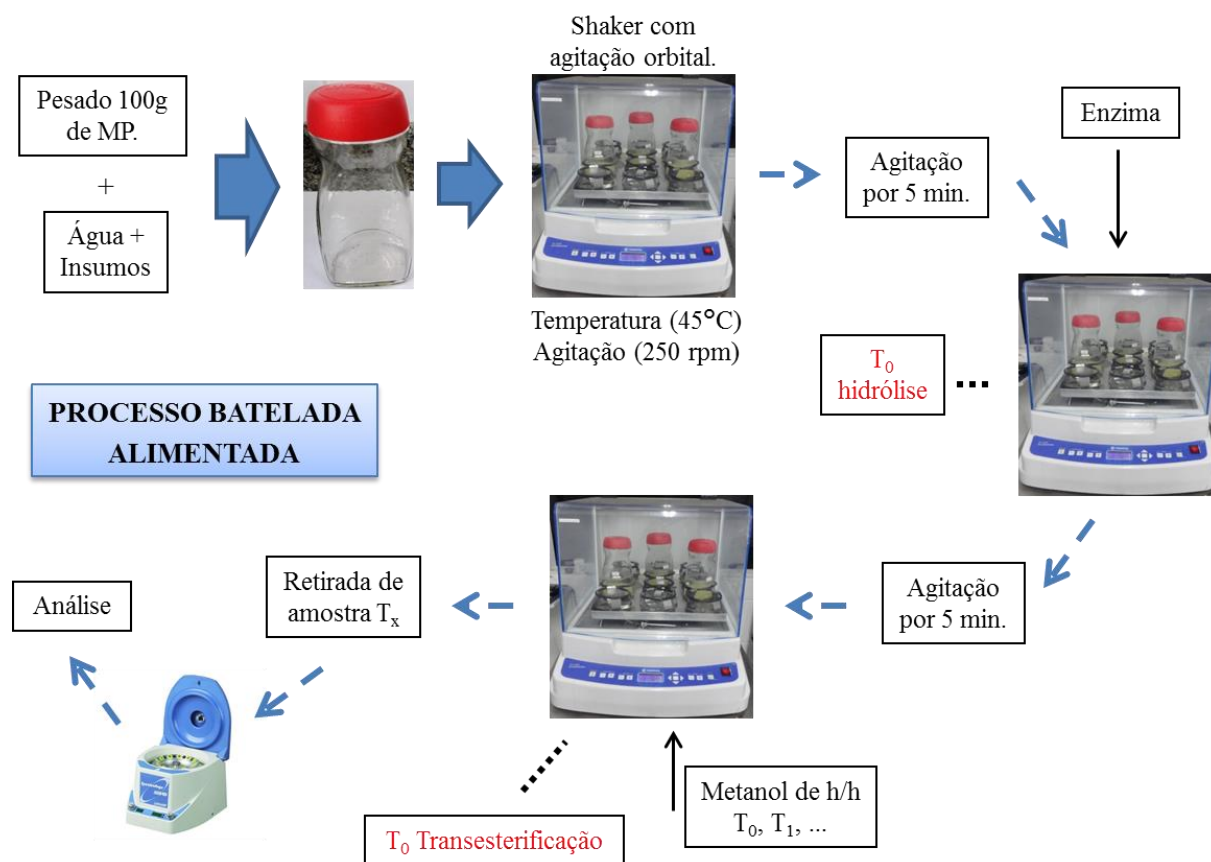
Figura 4.4 - Sistema reacional contendo os frascos de 1,5 L em agitação orbital (shaker) com controle de temperatura e agitação.



Fonte: AUTOR

Na Figura 4.5 é apresentado o fluxograma do procedimento utilizado em escala laboratorial para as reações de hidrólise e produção de ésteres metílicos. No frasco reacional foi pesado 100 g de matéria-prima (MP) - material graxo em balança semi-analítica, adicionado água e demais insumos conforme o experimento previamente determinado. Neste momento o frasco foi fechado e acondicionado no shaker com a temperatura ajustada para 45 °C e com agitação de 250 rpm, permanecendo em agitação por 5 minutos. Este tempo é necessário para estabilização da temperatura e completa mistura de todos os insumos.

Figura 4.5 - Fluxograma do procedimento utilizado nas reações de hidrólise e produção de ésteres metílicos em escala laboratorial.



Fonte: Elaborado pelo autor

Transcorridos este tempo, adicionou-se o catalisador enzimático na quantidade prevista no ensaio. As reações de hidrólise iniciaram-se no momento da adição do catalisador enzimático, sendo este denominado de tempo zero (adição do catalisador - T_0 hidrólise). Nas reações de produção de ésteres metílicos, depois da adição do catalisador, fechou-se o recipiente e colocou-o novamente em agitação por mais 5 minutos. Na sequência adicionou-se álcool metílico em dosagens a cada hora (particionado igualmente em cada dosagem), sendo o número de dosagens uma variável experimental e definida pelo ensaio ao qual estava sendo realizado. O tempo zero (T_0) da reação de produção de ésteres metílicos foi contabilizado a partir da primeira adição do álcool metílico (T_0 Transesterificação).

Transcorrido o tempo especificado de cada reação, foi retirada uma amostra representativa de 8 mL do sistema reacional, a qual foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos. A fase topo apolar (fase de interesse) foi segregada e encaminhada para análise. Nesta fase se encontram os ácidos graxos provenientes da hidrólise ou os ésteres metílicos provenientes do processo de esterificação (transesterificação).

A escolha pelo sistema de batelada alimentada com agitação orbital (shaker) ocorreu devido aos resultados encontrados por Remonato (2017), no qual as melhores conversões de ésteres ocorreram com o sistema batelada alimentada (shaker) em comparação ao sistema de agitação mecânica. De acordo com a autora, isto se justifica devido a melhor vedação do meio reacional pela presença de tampa nos frascos, evitando a evaporação do álcool metílico para o ambiente (muito volátil). Outro fator importante foi a agitação da mistura no sistema de agitação orbital (shaker), a qual propiciou um maior contato entre as fases apolar (matérias graxas) e polar (catalisador enzimático e álcool metílico). Nas mesmas condições de ensaio para substrato, catalisador enzimático e temperatura, a autora obteve resultados de ésteres metílicos três vezes maior com a agitação orbital.

4.2.2 Estudo da Atuação da Enzima Livre Lipase NZ

Neste item será descrito o procedimento adotado para o estudo da atuação da enzima livre Lipase NZ na produção de ésteres metílicos. Realizaram-se testes preliminares objetivando o conhecimento da atuação da enzima por meio de reações transesterificação. Após os testes preliminares foram realizados ensaios para determinação do % de água ideal utilizado nas reações de hidrólise.

4.2.2.1 Verificação do potencial de transesterificação da enzima livre Lipase NZ

Para a verificação do potencial de transesterificação da enzima livre Lipase NZ foi realizado um teste com óleo de soja. Na realização do ensaio foi pesado 100 g de óleo de soja e 1,5 % (m/m, em relação ao substrato) de enzima livre Lipase NZ, sendo a reação iniciada com adição de metanol (MeOH) na razão molar metanol; matéria graxa (RM MeOH:MG) de 6:1, sendo o álcool adicionado em 12 frações iguais de hora em hora, sempre nas 11 primeiras horas da reação. A reação ocorreu em shaker com temperatura de 45 °C e 250 rpm, conforme descrito no item 4.2.1. Amostras foram retiradas nos tempos de 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de reação.

4.2.2.2 Avaliação da cinética reacional de hidrólise de triacilgliceróis do óleo de soja em diferentes percentuais de água presentes no meio reacional

Foram realizados ensaios preliminares para avaliação da cinética reacional de hidrólise do óleo de soja com a enzima livre Lipase NZ. Nestes ensaios foram pesados 100 g de óleo de soja, percentual de água variando 2 %, 4 % e 6 % (m/m, em relação ao substrato), 1,5 % (m/m, em relação ao substrato) de enzima livre Lipase NZ, incubados em shaker em

temperatura de 45 °C e 250 rpm, conforme descrito no item 4.2.1. Foram retiradas amostras de 5 em 5 minutos até o tempo final de 120 minutos, sendo então centrifugadas e analisadas quanto ao teor de AGL.

4.2.3 Produção de Ésteres Metílicos com Matérias-Primas de Baixo Custo em Sistema de Batelada Alimentada (Shaker)

Realizaram-se reações de produção de ésteres metílicos com várias matérias-primas de baixo custo em sistema de batelada alimentada, com o objetivo da redução da acidez e consequentemente o aumento de rendimento de ésteres metílicos ao final da reação.

Inicialmente foram realizados ensaios para entendimento do comportamento da reação e busca do desempenho desejado. Partiu-se do método descrito por Remonato (2017), com algumas modificações definidas a partir de ensaios realizados preliminarmente e o tipo de matéria-prima a ser processada. As matérias-primas, conforme suas características de recebimento foram divididas em quatro grandes grupos: matéria-prima I; matéria-prima II; matéria-prima III; matéria-prima IV.

Todos os ensaios foram realizados seguindo o protocolo descrito no item 4.2.1, utilizando-se as variáveis de processo conforme a matéria-prima empregada e os resultados obtidos. Para as matérias graxas citadas utilizaram-se as condições: matéria-graxa com e sem lavagem*, com percentual de água variando de 0 % a 20 % (m/m, em relação ao substrato); adição de água destilada de 0,0 % a 2,0 % (m/m, em relação ao substrato); adição de 0 a 0,5 % de NaOH; adição de 0 a 40x % de ADT; adição de 1,0 % a 2,5 % (m/m, em relação ao substrato) de enzima livre Lipase NZ. A reação foi iniciada com adição de álcool metílico na razão molar MeOH:MG variando de 3,6:1 á 7,2:1, sendo o metanol adicionado em 3 a 12 frações iguais de hora em hora, sempre nas primeiras horas da reação. Amostras foram retiradas em tempos específicos para serem encaminhadas para análise.

* *lavagem da matéria graxa*: o processo de lavagem consiste em remover possíveis contaminantes presentes na matéria graxa, os quais podem interferir negativamente na ação da enzima, retardando ou fazendo com que não ocorra à reação enzimática (hidrólise ou produção de ésteres metílicos). Nesta etapa de lavagem, utilizou-se de uma balança semi-analítica para pesar, em recipiente apropriado, uma quantidade de matéria graxa, sendo em seguida colocado o recipiente em banho termostático a uma temperatura de 65 °C. Após o aquecimento da matéria graxa, esta foi colocada em um balão de decantação com volume apropriado, sendo este deixado no banho termostático. Em seguida, foi adicionada uma

quantidade pré-determinada de água destilada (% m/m, em relação ao substrato), permanecendo por mais 10 minutos no banho. Após estabilização e uniformidade da temperatura, agitou-se vigorosamente a mistura por 1 minuto, para que ocorresse a mistura/lavagem da matéria-graxa com a água. Após este tempo, deixou-se em balão para decantação por 1 hora. Por fim, retirou-se o fundo (fase aquosa) e utilizou-se o topo (fase graxa) como matéria graxa lavada para as reações.

4.2.4 Otimização do Processo de Produção de Ésteres Metílicos a Partir da Matéria-Prima I

Após a análise de quatro tipos de matérias-primas dos distintos fornecedores, optou-se por eleger um tipo de matéria-prima para ser realizado o trabalho de otimização das variáveis de processo, buscando um maior rendimento de ésteres metílicos em menor tempo de reação.

Neste item será descrito o procedimento de otimização das variáveis de processo da matéria-prima I, cedida pelo fornecedor “A” (amostra 1). A partir dos testes iniciais de produção de ésteres metílicos realizados, optou-se por realizar dois delineamentos de experimentos para a otimização das variáveis de processo, bem como a realização de cinéticas reacionais, estudos de variáveis importantes e utilização de Aditivo com o intuito de eliminação da etapa de lavagem. Todos estes testes foram realizados conforme descrito no item 4.2.1.

4.2.4.1 Estudo das variáveis de processo para a produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)

O estudo das variáveis de processo foi realizado utilizando um delineamento de experimentos, no qual primeiramente foi realizado um delineamento com o intuito de analisar as variáveis mais significativas, para no segundo delineamento ser realizada a otimização propriamente dita. Todos os ensaios foram realizados em incubadora shaker com agitação orbital, com o ajuste de temperatura para 45 °C e 250 rpm, fixando a adição de água em 2 % (m/m, em relação ao substrato) e as adições do álcool metílico em 12 frações iguais nas primeiras 11 horas de reação (T_0 até T_{11}). Amostras foram retiradas em tempos determinados para posteriormente serem encaminhadas para análise.

Com os resultados iniciais dos estudos das diferentes matérias-primas, pode-se observar as variáveis que influenciavam no rendimento de ésteres metílicos e no tempo final de processo. Desta forma, foram escolhidas para o primeiro delineamento as seguintes variáveis: % de água na lavagem (m/m, em relação ao substrato); quantidade de NaOH

adicionada na reação; razão molar MeOH:MG; % de concentração da enzima livre na reação (m/m, em relação ao substrato). No primeiro momento optou-se por um Delineamento Experimental Fatorial Completo 2^4 , quatro variáveis e dois níveis, com triplicata no ponto central. Na Tabela 4.1 são apresentadas as variáveis e seus respectivos níveis experimentais, empregados neste delineamento.

Tabela 4.1 - Variáveis e respectivos níveis do primeiro delineamento de experimentos da matéria-prima I.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
(%) água na lavagem	0	10	20
(%) NaOH	0	0,05	0,1
razão molar (MeOH:MG)	3,6	5,4	7,2
(%) concentração de enzima	0,5	1,0	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados do primeiro delineamento, realizou-se um segundo delineamento objetivando a otimização do processo, no qual foram selecionadas as seguintes variáveis: % de água na lavagem (m/m, em relação ao substrato); quantidade de NaOH adicionada na reação; razão molar MeOH:MG. Nesta etapa utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 , três variáveis e dois níveis, com pontos axiais e triplicata no ponto central. Para estes ensaios fixou-se a concentração da enzima livre Lipase NZ na reação em 1,0 % (m/m, em relação ao substrato), a temperatura em 45 °C, agitação em 250 rpm, adição de água em 2 % (m/m, em relação ao substrato) e o número de adições de álcool metílico (NAD) em 12. Na Tabela 4.2 são apresentadas as variáveis do delineamento e seus níveis utilizados.

Tabela 4.2 - Variáveis e respectivos níveis do segundo delineamento de experimentos da matéria-prima I.

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
(%) água na lavagem	3,2	10,0	20,0	30,0	36,8
(%) NaOH	0,02	0,05	0,1	0,15	0,18
razão molar (MeOH:MG)	3,6	4,2	5,1	6,0	6,6

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.4.2 Avaliação da cinética reacional a partir das variáveis de processo otimizadas, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)

Após a realização dos ensaios do delineamento de experimentos, a partir das variáveis otimizadas, realizou-se um estudo cinético (destrutivo) para verificar o comportamento da reação de produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I, nas seguintes condições: matéria graxa lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato), sendo incubados em shaker (45 °C/250 rpm), conforme descrito no item 4.2.1. Amostras foram retiradas de hora em hora até o tempo final da reação de 24 horas, e posteriormente encaminhadas para análise.

4.2.4.3 Estudo da influência do percentual de água adicionada na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)

O conteúdo de água presente no meio é uma variável importante para que a reação ocorra de forma satisfatória. Desta forma, foram realizados ensaios para entender seus efeitos na produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I.

* *Reações com variação do percentual de água*: foram realizados 4 experimentos mantendo constantes as variáveis de reação, apenas variando os percentuais de água adicionada. A seguir as condições utilizadas: matéria graxa lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % e 2 % de água destilada (m/m, em relação ao

substrato); 0,1 % NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). As reações ocorrem em shaker (45 °C/250 rpm), conforme descrito no item 4.2.1. Amostras foram retiradas em horários específicos e encaminhadas para análise.

4.2.4.4 *Estudo da influência da dosagem de metanol na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)*

O número de adições de metanol (NAD) pode-se constituir em uma variável importante para a ocorrência da reação, tendo em vista que influencia na concentração de metanol no meio. Desta forma, foram realizados ensaios para elucidar seus efeitos na produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I.

* Reações com variação no número de adições de metanol: foram realizados 4 ensaios para verificar a influência do número de adições de metanol na reação. Nos dois primeiros ensaios o metanol foi fracionado em 8 e 10 partes iguais, sendo adicionado no tempo zero (T_0) e nas 7 horas e 9 horas subsequentes respectivamente. No terceiro ensaio o metanol também foi fracionado em 8 partes, mas de forma escalonada, ou seja, a quantidade de metanol adicionado foi aumentando com o tempo, na seguinte escala: 5,0 % (T_0), 7,5 % (T_1), 10,0 % (T_2), 12,5 % (T_3), 15,0 % (T_4), 15,0 % (T_5), 17,5 % (T_6) e 17,5 % (T_7), sendo atingido no final os 100 %, ou seja, razão molar de MeOH:MG de 6:1. No último ensaio o metanol não foi fracionado, ou seja, foi adicionado todo o volume da reação no tempo zero (T_0). As outras variáveis da reação foram mantidos em: matéria graxa lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). As reações foram realizadas em shaker (45 °C/250 rpm), conforme descrito no item 4.2.1. Amostras foram retiradas em horários específicos e encaminhadas para análise.

4.2.4.5 Avaliação da cinética reacional a partir dos novos valores das variáveis percentual de água adicionada e número de adições de metanol, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)

A partir dos melhores resultados encontrados nos testes de variação no percentual de água e número de adições de metanol (NAD) na reação, realizou-se uma cinética para verificar o comportamento da reação de produção de ésteres metílicos no novo padrão, nas seguintes condições: matéria-graxa lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). As reações foram realizadas em shaker (45 °C/250 rpm), conforme descrito no item 4.2.1. Amostras foram retiradas nos tempos de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 24 horas de reação, sendo encaminhadas para análise.

4.2.4.6 Estudo da produção de ésteres metílicos com adição de Aditivo e eliminação da etapa de lavagem, utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)

Após a otimização do processo de produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I, buscou-se um procedimento que não necessitasse a lavagem desta, evitando assim uma grande quantidade de efluente. Com isso buscou-se a adição de um composto que desempenhasse a função da lavagem, eliminando possíveis contaminantes presentes na matéria graxa. Depois de alguns testes preliminares, optou-se por utilizar um aditivo (ADT) específico.

Foram realizados 5 testes iniciais buscando entender o comportamento da produção de ésteres metílicos com a adição do aditivo e a retirada da lavagem. Estes testes foram conduzidos com as seguintes condições: sem lavagem da matéria-prima I; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação. As variações nas quantidades de NaOH e ADT, bem como a concentração de enzima livre utilizadas (Lipase NZ), podem ser observadas na Tabela 4.3. Amostras foram retiradas em tempos específicos da reação e posteriormente encaminhadas para análise.

Tabela 4.3 - Concentrações de NaOH, ADT e enzima livre nos testes iniciais com a retirada da lavagem da matéria-prima I.

Variáveis	Ensaio				
	01	02	03	04	05
(%) NaOH	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2
(%) ADT	1,2x	1,2x	4x	4x	2,6x
(%) concentração de enzima	1,0	1,5	1,0	1,5	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados iniciais, optou-se por realizar um delineamento de experimentos objetivando encontrar se ambas as variáveis eram significativas para a produção de ésteres metílicos, como também encontrar os melhores valores para as reações com a matéria-prima I. Desta forma, executou-se um Delineamento Fatorial Completo 2^2 , duas variáveis e dois níveis, com triplicata no ponto central. Para estes ensaios foram mantidas as seguintes condições: sem lavagem da matéria-prima graxa; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 4.4 são apresentadas as variáveis do delineamento e os níveis utilizados. Amostras foram retiradas em tempos específicos da reação e posteriormente encaminhadas para análise.

Tabela 4.4 - Variáveis e respectivos níveis do delineamento de experimentos utilizado para a matéria-prima I sem lavagem.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
(%) NaOH	0,1	0,3	0,5
(%) ADT	0,8x	1,6x	2,4x

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a realização do delineamento, foram feitos dois ensaios para verificar a repetibilidade destes, como também um estudo cinético para identificação do novo tempo de

reação. Desta forma buscou-se o maior rendimento para a produção de ésteres metílicos com o menor tempo de reação. Os ensaios foram conduzidos com as seguintes variáveis: sem lavagem da matéria-prima graxa; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Amostras foram retiradas em tempos específicos da reação nos dois ensaios de repetibilidade e de hora em hora até as 14 primeiras horas no estudo cinético. Todas as amostras após a coleta foram encaminhadas para análise.

Todos os ensaios deste item foram conduzidos em incubador shaker (45 °C/250 rpm), conforme descrito no item 4.2.1.

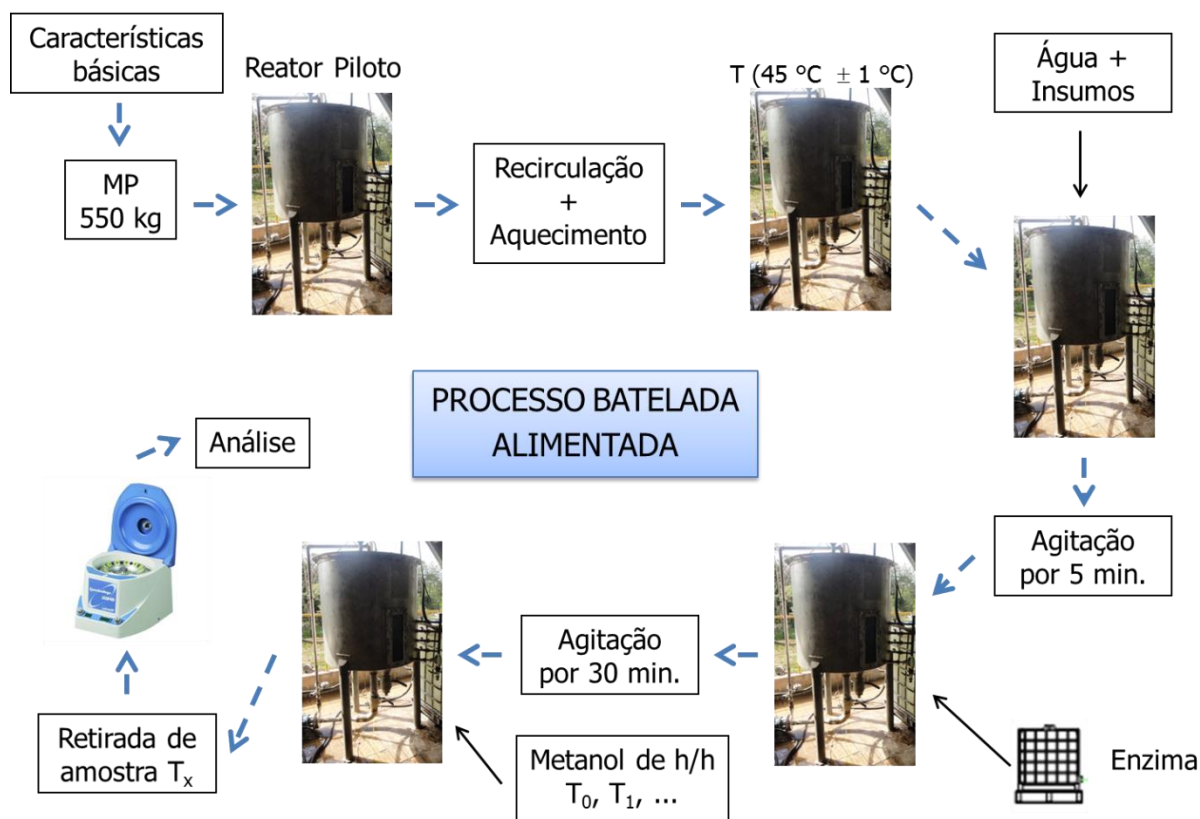
4.2.5 Definições das Variáveis de Processo para as Diferentes Matérias-Primas em Escala Laboratorial

Após todos os ensaios realizados em laboratório e com os diversos resultados obtidos, foi realizada uma compilação dos procedimentos a serem adotados nas reações de produção de ésteres metílicos de acordo com a característica de cada matéria-prima. Com isso, a partir do laudo de análise da matéria-prima, esta pode ser classificada em uma categoria e ter um procedimento a ser seguido.

4.2.6 Scale-Up Para Piloto da Produção de Ésteres Metílicos a Partir de Matérias-Primas de Baixo Custo em Sistema de Batelada Alimentada

Após as realizações dos testes laboratoriais com as diversas matérias-primas, foi realizada a produção de ésteres metílicos em escala piloto, visando entender o comportamento das reações a partir das condições reacionais encontradas e compiladas em laboratório. Os testes em escala piloto foram realizados nas empresas Transfertch Gestão e Inovação Ltda (Erechim/RS) e Prima Brazil – divisão ésteres (Sumaré/SP), conforme já descrito no item 4.1.5.2 e fluxograma da Figura 4.6.

Figura 4.6 - Fluxograma do procedimento utilizado nas reações de produção de ésteres metílicos em escala piloto.



Fonte: Elaborado pelo autor

Toda matéria-prima recebida do fornecedor possuía um laudo contendo os principais parâmetros de caracterização, sendo que em alguns casos análises complementares foram realizadas, bem como análises para confirmação dos resultados presentes no laudo. A partir do laudo a matéria-prima foi classificada dentro de uma categoria pré-estabelecida (matéria-prima I, matéria-prima II, matéria-prima III e matéria-prima IV) e realizada uma reação em shaker com as variáveis padronizadas. Dando início aos testes em escala piloto, a matéria-prima foi adicionada ao reator piloto (550 kg) com uma bomba centrífuga, em seguida, ligada a bomba de recirculação e o aquecimento, deixando em agitação até que a matéria-prima atingisse $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Com a temperatura estabilizada, foi adicionada por meio da bomba dosadora nº1 a água na reação (m/m, em relação ao substrato). Os insumos NaOH e ADT foram adicionados misturando-os em uma quantidade de água conhecida (contabilizada no teor total de água adicionada) e colocados pela janela de inspeção superior do reator. Após, a mistura contendo matéria-prima, água e insumos permaneceu em agitação por 5 minutos, sendo então adicionado o catalisador enzimático (m/m, em relação ao substrato) com uma segunda bomba dosadora. Em seguida o reator foi fechado e deixado em agitação por 30

minutos para completa homogeneização do meio e ajuste da temperatura para $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este tempo, e a temperatura do reator estabilizada em $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ adicionou-se com a terceira bomba dosadora o álcool metílico, alimentado em frações iguais de hora em hora, sempre nas primeiras horas da reação. Importante salientar que na falta das bombas dosadoras, a água e a enzima foram adicionadas ao piloto pela janela de inspeção no topo do reator. Ao longo do processo e ao final da reação foram retiradas amostras do conteúdo reacional, sendo estas centrifugadas e encaminhadas para análise.

As matérias-primas utilizadas nas reações em escala piloto estão descritas nos subitens a seguir, bem como as condições de processo descritas na Tabela 4.5 da seguinte maneira: % de água (m/m, em relação ao substrato); % de NaOH; % de ADT; razão molar MeOH:MG; alimentação do metanol (NAD) em frações iguais de hora em hora durante as primeiras horas de reação; % concentração da enzima livre Lipase NZ (m/m, em relação ao substrato).

4.2.6.1 *Scale-up para piloto utilizando a matéria-prima I*

Após os diversos testes realizados em laboratório com a matéria-prima I, foram realizadas duas reações piloto. A 1ª reação foi realizada com a lavagem da matéria-prima e a 2ª sem a lavagem da matéria-prima, mas com a inclusão do insumo ADT. A seguir serão descritas as matérias-primas utilizadas, bem como na Tabela 4.5 descritas às condições de processo.

* *1ª Reação piloto*: a matéria-prima utilizada foi classificada como matéria-prima I, proveniente do fornecedor “A”, amostra 2, com teor de AGL inicial de 91,42 %. Esta reação ocorreu com lavagem da matéria-prima, utilizando-se 10 % de água (m/m, em relação ao substrato), sendo a única em piloto nesta condição. A lavagem foi conduzida conforme descrito no item 4.2.3, sendo colocada a matéria-prima no reator piloto, fechando-o, ligando-se a agitação e ajustando-se a temperatura para 60-65°C. No momento que a temperatura estava neste patamar, adicionou-se a água na quantidade pré-determinada e deixou-se agitando por 5 minutos. Após este tempo, parou-se a agitação e se deixou decantar por 2 horas. Por fim, retirou-se o fundo (fase aquosa) e manteve-se o topo (fase graxa lavada) dentro do reator para ser realizada a reação.

* *2° Reação piloto*: a matéria-prima utilizada nesta reação também foi classificada como matéria-prima I, proveniente do fornecedor “C”, com teor de AGL inicial de 79,18 %.

Tabela 4.5 - Variáveis de processo para as reações de produção de ésteres metílicos em escala piloto.

Reação	MP	% AGL inicial	Variáveis de Processo					
			% Água	% NaOH	% ADT	RM MeOH:MG	NAD	% Enzima
1°	MP I	91,42	2	0,1	-	6:1	10	1,5
2°	MP I	79,18	2	0,3	2x	6:1	10	1,5
3°	MP II	84,50	2	0,3	4x	6:1	12	1,5
4°	MP II	68,95	2	0,3	4x	6:1	12	1,5
5°	MP III	17,95	2	0,1	-	4,5:1	10	1,5
6°	MP III	34,58	2	0,3	-	6:1	10	1,5
7°	MP IV	40,78	2	0,3	x	4,5:1	10	1,5
8°	MP IV	33,27	2	0,3	x	4,5:1	10	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor

MP - matéria-prima; MP I - matéria-prima I; MP II - matéria-prima II; MP III - matéria-prima III; MP IV - matéria-prima IV.

4.2.6.2 *Scale-up para piloto utilizando outras matérias-primas de baixo custo*

Além da matéria-prima I, nos testes de laboratório foi possível a classificação dos materiais graxos em outros três grupos: matéria-prima II, matéria-prima III e matéria-prima IV. Para estas outras classificações de matérias-primas foram realizados testes em escala piloto para comparação aos resultados em laboratório e acompanhamento das reações quanto à produção de ésteres metílicos. A seguir estão descritas as reações realizadas com cada matéria-prima, sendo as condições de processo descritas na Tabela 4.5.

- **Matéria-Prima II**

* 3º Reação piloto: esta matéria-prima foi fornecida por uma empresa do interior de São Paulo (fornecedor “E”, amostra 3), apresentando um teor de AGL inicial de 84,50 %.

* 4º Reação piloto: a matéria-prima desta reação foi classificada como matéria-prima II (fornecedor “F” - amostra 1), apresentando um teor de AGL inicial de 68,95 %.

- **Matéria-Prima III**

* 5º Reação piloto: a matéria-prima utilizada nesta reação foi classificada como matéria-prima III, proveniente do fornecedor “H”, com teor de AGL inicial de 17,95 %.

* 6º Reação piloto: a matéria-prima desta reação apresentou um teor inicial de AGL de 34,58 %, sendo proveniente do fornecedor “I” e classificada como matéria-prima III.

- **Matéria-Prima IV**

* 7º Reação piloto: a matéria-prima desta reação foi classificada como matéria-prima IV, proveniente do fornecedor “L” (amostra 1), apresentando um teor inicial de AGL de 40,78 %.

* 8º Reação piloto: a matéria-prima para esta reação também foi classificada como matéria-prima IV, com um teor de AGL inicial de 33,27 %, proveniente do fornecedor “L” (amostra 2).

4.2.7 Scale-Up Industrial da Produção de Ésteres Metílicos a Partir de Matérias-Primas de Baixo Custo

Foram realizadas reações em escala industrial utilizando um reator de 90 m³, objetivando a produção de ésteres metílicos, utilizando as matérias-primas de baixo custo. Reações foram realizadas com as quatro classificações de matérias-primas previamente classificadas em laboratório, desta forma avaliando todas as possibilidades de reações em escala industrial.

As reações em escala industrial foram conduzidas conforme descrito no item 4.1.5.3, sendo executadas sempre após os testes realizados em escala laboratorial e piloto com a matéria-prima em questão, reduzindo desta forma a possibilidade de erro na reação. As condições utilizadas nas reações em escala industrial foram as que apresentaram melhores resultados em escala laboratorial e piloto, com pequenas variações em casos especiais.

O reator foi abastecido com a matéria prima, entre 25 ton a 60 ton, sendo em seguida ligada a agitação da bomba 01 (B1), succionando pelos quatro pontos e descarregando no anel inferior ou intermediário (depende da quantidade de MP no reator). Após o início da agitação foi iniciado o aquecimento à temperatura de processo de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por meio da abertura das válvulas de vapor (serpentina de aquecimento). Os insumos foram preparados e alimentados no reator quando a temperatura de reação estivesse estabilizada, normalmente 1 h/2 h após o início do aquecimento (depende da pressão de vapor e quantidade de matéria-prima). Após a adição dos insumos, o reator permaneceu em agitação por 30 minutos, para perfeita homogeneização da matéria-prima com os insumos. Após este tempo foi adicionada a enzima, com uma bomba pneumática, na quantidade especificada para cada teste (depende da classificação da MP e testes anteriores), deixando em agitação por mais 30 minutos. Após este tempo, foi iniciada a adição de metanol por intermédio de uma bomba centrífuga, sendo este adicionado de forma afogada (abaixo do nível do meio reacional). No momento da primeira adição de metanol foi iniciada a contagem do tempo de reação. A quantidade de metanol e o número de adições foram definidos de acordo com cada reação, dependentes principalmente da classificação da matéria-prima. Vale salientar que a adição do metanol ocorre em frações iguais sempre nas primeiras horas da reação. Durante o processo reacional e ao final da reação foram retiradas amostras, sendo as mesmas centrifugadas e encaminhadas para análise.

As matérias-primas utilizadas nas reações em escala industrial estão descritas nos subitens a seguir, bem como as condições de processo descritas na Tabela 4.6 da seguinte maneira: % de água (m/m, em relação ao substrato); % de NaOH; % de ADT; razão molar MeOH:MG; alimentação do metanol (NAD) em frações iguais de hora em hora durante as primeiras horas de reação; % concentração da enzima livre Lipase NZ (m/m, em relação ao substrato).

4.2.7.1 Scale-up industrial utilizando a matéria-prima I

Com os testes realizados em laboratório, bem como a confirmação dos resultados em escala piloto, realizaram-se os testes em escala industrial para a matéria-prima I. Foram realizados dois testes em escala industrial, sendo que as condições de processo seguiram os melhores resultados obtidos em escala piloto, com pequenas modificações (Tabela 4.6).

* *1º Reação industrial*: a matéria-prima utilizada na primeira reação industrial foi classificada como matéria-prima I, proveniente do fornecedor “D”, com teor de AGL inicial de 88,25 %.

Tabela 4.6 - Variáveis de processo para as reações de produção de ésteres metílicos em escala industrial.

Reação	MP	% AGL inicial	Variáveis de Processo					
			% Água	% NaOH	% ADT	RM MeOH:MG	NAD	% Enzima
1º	MP I	88,25	2	0,3	2x	6:1	10	1,5
2º	MP I	88,25	2	0,2	x	6:1	10	1,5
3º	MP II	64,01	2	0,3	2x	4,5:1	9	1,5
4º	MP III	30,28	2	0,3	-	4,5:1	10	1,5
5º	MP IV	33,27	2	0,3	x	4,5:1	10	1,5
6º	MP IV	23,26	2	0,3	2x	4,5:1	10	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor

MP - matéria-prima; MP I - matéria-prima I; MP II - matéria-prima II; MP III - matéria-prima III; MP IV - matéria-prima IV.

* *2º Reação industrial*: nesta reação foi utilizada a mesma matéria-prima da 1º reação industrial.

4.2.7.2 Scale-up industrial utilizando outras matérias-primas de baixo custo

Nos testes industriais foi possível utilizar os outros três tipos de matérias-primas classificadas anteriormente nos testes de laboratório, desta forma conseguiu-se realizar um estudo dos materiais graxos de baixo custo nas escalas laboratorial, piloto e industrial. A seguir estão descritas as reações realizadas com cada matéria-prima e as condições utilizadas (Tabela 4.6):

- **Matéria-Prima II**

* 3° Reação industrial: a matéria-prima desta reação foi proveniente do fornecedor “F”, amostra 2, classificada como matéria-prima II, apresentando um teor de AGL inicial de 64,01 %. Este fornecedor também disponibilizou amostras para os testes laboratoriais e piloto.

- **Matéria-Prima III**

* 4° Reação industrial: a matéria-prima utilizada nesta reação foi classificada como matéria-prima III, proveniente do fornecedor “J”, com teor de AGL inicial de 30,28 %, sendo obtida a partir do processo de refino do óleo de palma.

- **Matéria-Prima IV**

* 5° Reação industrial: a matéria-prima desta reação foi classificada como matéria-prima IV, proveniente do fornecedor “L” (amostra 2), a qual apresentou um teor inicial de AGL de 33,27 %.

* 6° Reação industrial: a matéria-prima para esta reação também foi classificada como matéria-prima IV, com um teor de AGL inicial de 23,26 %, proveniente do fornecedor “L” (amostra 3).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Neste item serão descritos os métodos analíticos utilizados ao longo do trabalho, sendo de fundamental importância para o acompanhamento e verificação nas diferentes fases do estudo. Estes métodos foram utilizados para a validação dos laudos das matérias-primas, bem como para a verificação dos resultados ao longo do processo de transformação das matérias-primas em ésteres metílicos. No decorrer deste item serão descritas as seguintes análises: determinação dos índices de iodo e saponificação, teor de ácido graxo livre, teor de glicerina combinada, bem como a determinação dos teores de mono-, di-, triacilgliceróis e ésteres metílicos.

4.3.1 Determinação do Índice de Iodo

A determinação do índice de iodo das amostras de material graxo foi realizada segundo método AOCS Recommended Practice Cd 1 - 25. Com a matéria-prima graxa liquefeita e completamente seca, pesou-se 0,25 g de amostra em um frasco Erlenmeyer de 500

mL com tampa e adicionou-se 10 mL de tetracloreto de carbono. Adicionou-se também 10 mL de tetracloreto de carbono em outro Erlenmeyer (branco) e deu-se continuidade no procedimento analítico simultaneamente com a amostra. Em seguida adicionou-se 25 mL de solução de Wijs e tampou-se o frasco, agitando-o cuidadosamente com movimento rotacional, assegurando perfeita homogeneização. Em seguida, deixou-se em repouso ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 1 hora. Depois, adicionou-se 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15 % e 100 mL de água destilada. Em seguida, titulou-se com solução tiosulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Neste momento, adicionou-se 1 a 2 mL de solução indicadora de amido 1 %, ocorrendo à formação de uma coloração azul. Continuou-se a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos em gramas de iodo necessários para reagir com 100 gramas de amostra ($\text{g I}_2/100 \text{ g}$), calculado pela Equação 4.1:

$$\text{Índice de Iodo} = \frac{12,69 \cdot M \cdot (V_B - V_A)}{m_a}$$

(Equação 4.1)

Onde:

12,69 = fator proveniente dos valores de k (2 elétrons transferidos) e MI^2 ($253,81 \text{ g mol}^{-1}$);

V_A = volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL);

M = molaridade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, padronizada (mol L^{-1});

m_a = massa da amostra (g).

4.3.2 Determinação do Índice de Saponificação

A determinação do índice de saponificação das amostras de material graxo foi realizada segundo método AOCS Official method Cd 3 - 25. Com a matéria-prima graxa liquefeita e completamente seca, pesou-se de 4 a 5 g de amostra em um frasco Erlenmeyer de 250 mL (boca esmerilhada para conexão com condensador). A quantidade de amostra pesada deve sempre corresponder a 45 - 55 % da titulação do branco. A seguir, adicionou-se 50 mL de solução alcoólica de KOH (4 % m/v). Foi preparado um branco nas mesmas condições (sem amostra) e deu-se continuidade no procedimento analítico simultaneamente com a amostra. Em seguida foi conectado o condensador ao Erlenmeyer e deixado ferver suavemente em chapa aquecedora durante 60 - 90 minutos (completa saponificação da

amostra). Após o resfriamento da amostra, lavou-se o condensador com um pouco de água e desconectou-se o Erlenmeyer do condensador. Em seguida, adicionou-se 6 gotas de indicador fenolftaleína (solução de fenolftaleína 1 % em etanol 95 %) e titulou-se com solução padronizada de ácido clorídrico 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos no número de miligramas de hidróxido de potássio necessários para saponificar um grama de amostra (mg KOH/g), calculado pela Equação 4.2:

$$\text{Índice de Saponificação} = \frac{56,1 \cdot M_{HCl} \cdot (V_{B\ HCl} - V_{A\ HCl})}{m_a}$$

(Equação 4.2)

Onde:

56,1 = massa molar do KOH (g mol^{-1});

$V_{A\ HCl}$ = volume de ácido gasto na titulação da amostra (mL);

$V_{B\ HCl}$ = volume de ácido gasto na titulação do branco (mL);

M_{HCl} = molaridade da solução de HCl, padronizada (mol L^{-1});

m_a = massa da amostra (g).

4.3.3 Determinação do Teor de Ácido Graxo Livre

A determinação do teor de AGL das matérias graxas foi realizada segundo método AOCS Official method Cd 3d - 63. Inicialmente pesou-se de 3 a 5 g de amostra em um béquer de 250 ml. A seguir, adicionou-se 50-100 mL de uma solução neutralizada de etanol/éter etílico (1:1 v/v) para a completa dissolução da matéria graxa. Então, adicionou-se 6 gotas de indicador fenolftaleína (solução de fenolftaleína 1 % em etanol 95 %) e titulou-se com solução padronizada de KOH 0,1 mol L^{-1} . As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como teor de ácidos graxos livres (AGL) em ácido oleico, calculado pela Equação 4.3:

$$\text{Teor de AGL (\% ácido oleico)} = \left(\frac{56,1 \cdot V_{KOH} \cdot M_{KOH}}{m_a} \right) / 2$$

(Equação 4.3)

Onde:

56,1 = massa molar do KOH (g mol^{-1});

V_{KOH} = volume de base gasto na titulação da amostra (mL);

M_{KOH} = molaridade da solução de KOH, padronizada (mol L^{-1});

m_a = massa da amostra (g).

Obs.: Para a determinação de amostras com alto teor de ácido graxo livre, utilizou-se solução padronizada de KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.4 Determinação do Teor de Glicerina Combinada

A determinação do teor de glicerina combinada nas amostras de ésteres metílicos foi realizada segundo método AOCS Official method Ca 14 - 56, com pequenas modificações. Inicialmente pesou-se aproximadamente 3 g da amostra em funil de separação, levou-o até a capela e então se adicionou 60 mL de água destilada e 1,5 mL de ácido sulfúrico 1:3. Homogeneizou-se a solução e deixou-a em repouso até que a separação de duas fases ocorresse. A fase de maior volume (fase inferior) foi descartada. Coletou-se a fase de menor volume (fase superior) em um balão de fundo chato e foi adicionado 20 mL de água destilada, 05 mL de álcool etílico e 03 mL de solução de hidróxido de sódio 50 %. Homogeneizou-se a solução e colocou-a para aquecer a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ com condensador em refluxo até que a amostra estivesse saponificada (translúcida). Transcorrida esta etapa, esperou-se esfriar um pouco a amostra e transferiu-a para um funil de separação, adicionando-se 10 mL de tolueno e 2 gotas de azul de bromofenol. Após, adicionou-se ácido sulfúrico 1:3 em incrementos de 1 mL intercalados por agitação até o aparecimento de coloração amarela (cuidado de não adicionar solução ácida em excesso), em seguida deixando em repouso até que se definam duas fases. A fase inferior foi coletada em um erlenmeyer e adicionado 25 mL da solução de Metaperiodato de sódio (11 g/L), descartando-se a fase superior em um descarte próprio, uma vez que a mesma contém traços de Tolueno. Homogeneizou-se bem a solução (fase inferior + solução metaperiodato) e levou-a para geladeira na ausência de luz por 10 minutos. Decorrido esse tempo adicionou-se aproximadamente 4 g de bicarbonato de sódio a solução e homogeneizou-a. Em seguida adicionou-se aproximadamente 1,5 g de iodeto de potássio e homogeneizou-se novamente. Titulou-se imediatamente em banho de água gelada com a solução de arsenito de sódio $0,05 \text{ mol/L}$ até a mudança de coloração de vermelho tijolo para azul claro. Anotou-se o volume de AsNaO_2 gasto na titulação. Determinou-se em paralelo uma titulação em branco e anotou-se também o volume gasto na titulação do branco. As análises foram feitas em

duplicata e os resultados foram expressos como percentual de glicerina combinada, calculado pela Equação 4.4:

Obs.: massa que contém no máximo 40 mg de glicerina (sensibilidade máxima do método).

$$\text{Glicerina combinada (\%)} = \frac{(V_{B \text{ AsNaO}_2} - V_{A \text{ AsNaO}_2}) \cdot T \cdot 0,1}{m_a}$$

(Equação 4.4)

Onde:

$V_{B \text{ AsNaO}_2}$ = volume de arsenito de sódio gasto na titulação do branco (mL);

$V_{A \text{ AsNaO}_2}$ = volume de arsenito de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

T = Título da solução de arsenito de sódio (%);

m_a = massa da amostra (g).

4.3.5 Determinação do Teor de Ésteres Metílicos

O teor de ésteres metílicos foi determinado segundo método descrito por Remonatto (2017), com o objetivo de verificar o rendimento da reação por meio de seu principal produto. A seguir será descrito o procedimento de determinação dos ésteres metílicos.

Equipamentos e colunas

O teor de ésteres foi determinado por meio de cromatógrafo de fase gasosa (CG) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Para a realização das determinações utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm (Restek, nº de série: 1208976) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. A programação de temperatura da coluna foi a seguinte: 120 °C por 1 min; seguido pelo aumento de 15 °C/min até 180 °C e permanecendo por 2 min; após novo aumento de temperatura num fluxo de 5 °C/min até 250 °C e permanecendo por nesta condição por mais 2 min. As temperaturas do detector e injetor foram de 250 °C, a pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 µL de amostra.

Preparação das amostras

Na preparação das amostras, transferiu-se 250 mg destas para um balão volumétrico (10 mL), completando-se o seu volume até o menisco com heptano. Em um balão volumétrico de 1 mL, transferiu-se uma alíquota de 50 µL da solução da amostra e adicionou-se 50 µL do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) - concentração de 5000 mg.L⁻¹, previamente preparado. O volume do balão foi completado até o menisco com heptano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e levadas para análise em cromatógrafo gasoso.

Calculo do teor de ésteres

Após a injeção e análise dos cromatogramas gerados foi determinado o percentual de ésteres metílicos produzidos pela Equação 4.5:

$$\text{Teor de ésteres (\%)} = \frac{(\Sigma A) - A_{pi}}{A_{pi}} \cdot \frac{C_{pi} \cdot V_{pi}}{m_a} 100$$

(Equação 4.5)

Onde:

ΣA = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1;

A_{pi} = área correspondente ao pico do padrão interno, heptadecanoato de metila;

C_{pi} = concentração da solução de padrão interno heptadecanoato de metila (mg/mL);

V_{pi} = volume da solução de padrão interno adicionado à amostra;

m_a = massa da amostra (mg).

4.3.6 Determinação do Teor de Mono-, Di- e Triacilgliceróis

Os teores de MAG, DAG e TAD foram determinados segundo método descrito por Remonatto (2017), com o objetivo de verificar o conteúdo destes compostos na fase hidrofóbica do meio reacional. A seguir será descrito o procedimento de determinação dos teores de mono-, di- e triacilgliceróis.

Equipamentos e colunas

Os teores de MAG, DAG e TAG foram determinados por meio de cromatógrafo de fase gasosa (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático *on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar MTX[®]-5 (5 % difenil, 95 % dimetil polixiloxano) de 30m x 0,25mm x 0,1µm (Restek, n° de série: 1193990), nas condições cromatográficas de

operação descritas pela norma EN 14105 (2001), do Comitê Europeu para Padronizações. A programação de temperatura da coluna foi a seguinte: 50°C por 1min, seguido pelo aumento de 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C e 10°C/min até 380°C, permanecendo por 8min. A temperatura do detector foi de 380°C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80kPa e o volume injetado foi de 1µL.

Preparação das amostras

Na preparação das amostras, transferiu-se 100 mg de cada amostra para balão volumétrico (10 mL), após foram adicionados 100 µL do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada e esta foi deixada em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, completou-se o volume até o menisco com heptano. As soluções foram transferidas para *vails* de 1,5 mL e levadas para análise em cromatógrafo gasoso.

Determinação dos teores de mono-, di- e triacilgliceróis

Para a quantificação dos produtos MAG, DAG e TAG utilizaram-se padrões externos monooleína, dioleína e trioleína. Para a construção das curvas de calibração preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo, e a partir destas preparou-se 8 soluções de calibração em diferentes concentrações para os glicérides, conforme a Tabela 4.7. As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram realizadas segundo a norma EN 14105 (2001) do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos conforme metodologia adaptada por Krüger (2010). Nas soluções de calibração foi adicionado derivatizante MSTFA, o qual transforma os glicérides em seus respectivos derivados voláteis, para que possam ser quantificados por cromatografia gasosa. Após a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 min para que o derivatizante agisse. Em seguida, completou-se o volume até o menisco com heptano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e o volume de 1µL injetado em cromatógrafo gasoso.

Tabela 4.7 - Preparação das soluções de calibração dos glicérides.

Padrão externo	Soluções de calibração							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Monooleína (mg/L)	1500	1000	500	300	100	50	40	20
Dioleína (mg/L)	1500	1000	700	400	150	100	80	50
Trioleína (mg/L)	2000	1500	1000	800	500	300	100	50

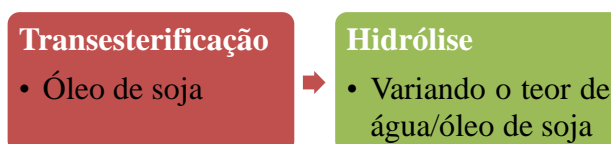
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento de todo o trabalho, estando relacionadas às seguintes etapas: estudo da atuação da enzima livre; produção de ésteres metílicos com matérias-primas de baixo custo; otimização das variáveis de processo para produção de ésteres metílicos da matéria-prima I; scale-up da produção de ésteres metílicos para escalas piloto e industrial.

5.1 ESTUDO DA ATUAÇÃO DA ENZIMA LIVRE LIPASE NZ

Neste subitem serão apresentados e discutidos os resultados referentes à atuação da enzima livre Lipase NZ, por meio de testes de transesterificação e hidrólise realizados em shaker com agitação orbital, conforme descrito no item 4.2.1 e fluxograma apresentado na Figura 5.1. É importante salientar que juntamente com os ensaios foram realizados brancos reacionais, para cada caso, aos quais foram adicionados todos os reagentes utilizados, exceto a enzima. Os resultados do teor de AGL para os brancos foram os mesmos encontrados no óleo de soja, comprovando que as reações ocorreram apenas na presença do catalisador.

Figura 5.1 - Fluxograma dos ensaios realizados para estudo da atuação da enzima livre Lipase NZ.



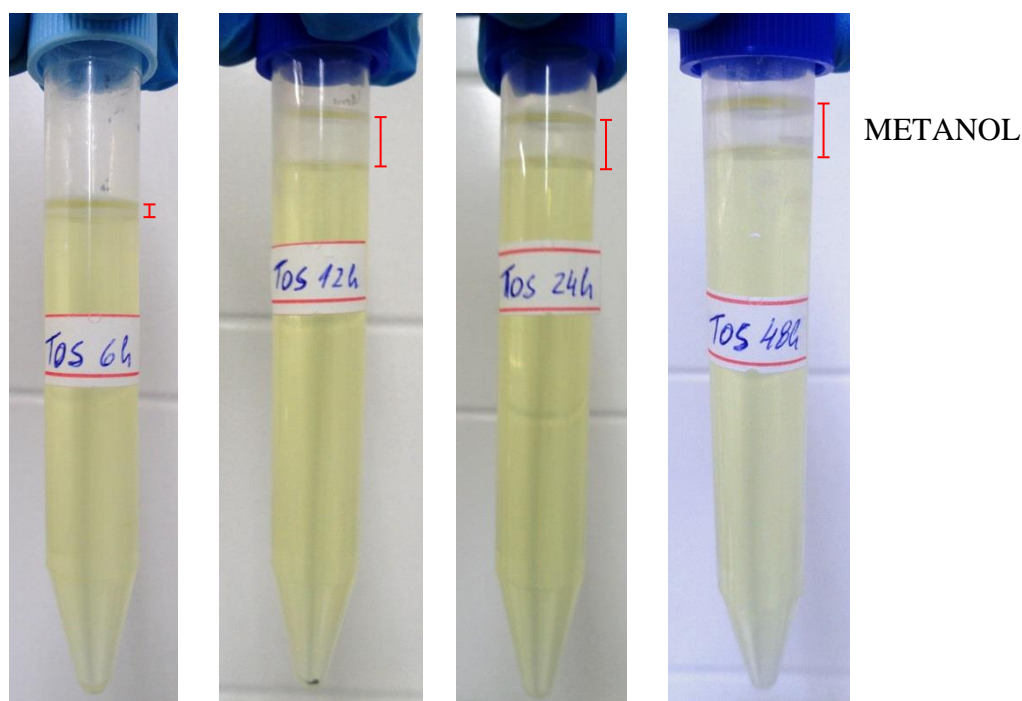
Fonte: Elaborado pelo autor

5.1.1 Verificação do potencial de transesterificação da enzima livre Lipase NZ

O ensaio de verificação do potencial de transesterificação da enzima livre Lipase NZ ocorreu em óleo de soja, adicionando-se 1,5 % de enzima (m/m, em relação ao substrato) e razão molar MeOH:MG de 6:1 em 12 adições iguais de hora em hora. Nesta reação não foi adicionado água no meio reacional, justamente para verificar se a enzima realizaria a transesterificação, em vez de realizar a etapa de hidrólise e posterior esterificação. Na figura 5.2 observa-se que nos diferentes tempos reacionais, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h, não existe formação de glicerol no fundo do tubo Falcon, demonstrando que a enzima não realiza a transesterificação. Nota-se também que na parte superior dos tubos ocorre a separação do

metanol (adicionado nas 11 primeiras horas de reação) e o óleo de soja, confirmando a não ocorrência da transesterificação. Ainda pode ser observado na mesma figura que a quantidade de metanol separado nos tempos 12 h, 24 h e 48 h são maiores que no tempo 6 h, visto que neste tempo nem todo o metanol tinha sido adicionado.

Figura 5.2 - Reações de transesterificação do óleo de soja com a enzima livre Lipase NZ nos tempos reacionais de 6 h, 12 h, 24 h e 48 h, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).

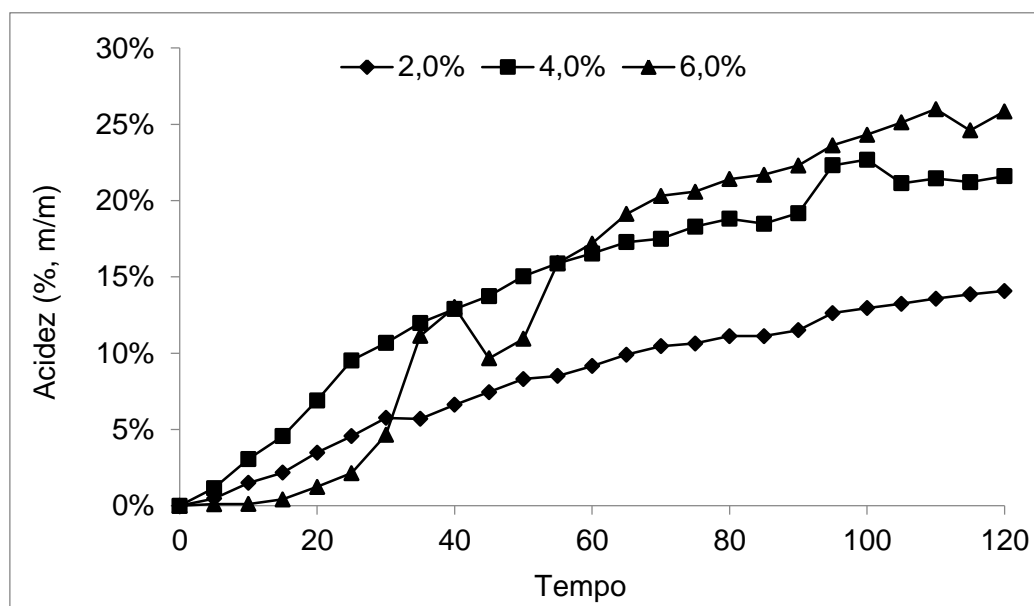


Fonte: Elaborado pelo autor

5.1.2 Avaliação da cinética reacional de hidrólise de triacilgliceróis do óleo de soja em diferentes percentuais de água presentes no meio reacional

Os resultados obtidos para as cinéticas reacionais de hidrólise do óleo de soja utilizando a enzima livre Lipase NZ são apresentados na Figura 5.3. Nesta etapa foram avaliadas as cinéticas de hidrólise variando a concentração de água no meio reacional em 2 %, 4 % e 6 %, realizadas em sistema de batelada em agitador rotativo shaker a 45 °C, com a presença de 1,5 % de enzima (m/m, em relação ao substrato).

Figura 5.3 - Cinéticas reacionais de hidrólise de triacilgliceróis do óleo de soja com a enzima livre Lipase NZ nos percentuais de água de 2 %, 4 % e 6 %, em sistema batelada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando a Figura 5.3 pode-se observar o comportamento das curvas cinéticas reacionais decorrentes da variação nas concentrações de água no meio reacional, principalmente de 2 % para 4 %. Isto está relacionado ao fato da água se constituir em uma variável importante na reação, onde uma concentração menor implica em uma menor hidrólise dos triacilgliceróis formando AGL. Já em teores mais elevados de água no meio reacional, a diferença na hidrólise não é tão acentuada, ocorrendo variações durante toda a análise. Isso pode ter ocorrido devido ao excesso de água no meio formando uma emulsão com o óleo de soja devido à agitação, prejudicando a ação da enzima.

Resultados satisfatórios de hidrólise de triacilgliceróis com óleo de soja com a enzima livre comercial também foram encontrados por Remonato (2017), demonstrando sua capacidade hidrolítica, ampliando desta forma sua gama de aplicação e possibilitando uma melhor compreensão de sua atuação nas reações de produção de ésteres metílicos.

5.2 PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS COM MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO EM SISTEMA BATELADA ALIMENTADA (SHAKER)

Neste subitem serão apresentados e discutidos os resultados dos ensaios realizados para a produção de ésteres metílicos com diferentes matérias-primas de baixo custo em sistema de batelada alimentada (shaker). De forma a facilitar o estudo, as diferentes matérias-primas (provenientes de diferentes fontes) foram segregadas pelas características que estas apresentavam, conforme descrito no laudo de recebimento e confirmados a partir de análises laboratoriais. Estas matérias-primas foram divididas em quatro grupos, como segue: matéria-prima I; matéria-prima II; matéria-prima III; matéria-prima IV. É importante salientar que estas matérias-primas por terem um custo baixo, não apresentam um padrão definido, possuindo características bem distintas dependendo do fornecedor e origem do material utilizado. Muitas delas apresentam contaminantes oriundos de seus processos anteriores, como por exemplo, o elemento fósforo (P) proveniente dos fosfolipídios presentes no óleo bruto, ou mesmo substâncias que são adicionadas para sua obtenção.

Desta forma, dado o tempo de processo necessário para cada perfil de matéria-prima estudada, resultados finais com teores de AGL inferiores a 5,0 % já são considerados satisfatórios, sabendo-se que quanto menor este valor, maior será o rendimento em ésteres metílicos. As reações foram realizadas em shaker (45 °C/250 rpm) conforme descrito no item 4.2.1, sendo suas condições variando conforme as matérias-primas e o avanço nos estudos.

A primeira matéria-prima a ser estudada foi a matéria-prima I, sendo inicialmente realizados testes preliminares, partindo posteriormente para o estudo das variáveis de processo e finalizando com a otimização destas variáveis e reações complementares para seu melhor entendimento. Conforme foi se obtendo resultados satisfatórios com esta matéria-prima, e com o recebimento de outros tipos de matérias-primas, foram sendo realizadas reações paralelas com os diferentes tipos de substratos. Para facilidade de leitura e entendimento, os resultados foram separados pelos quatro tipos de matérias-primas caracterizadas.

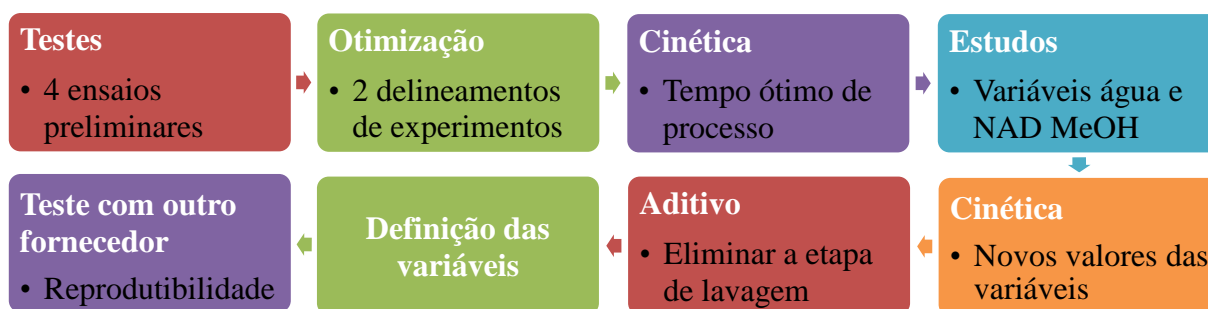
5.2.1 Reações com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker)

As reações de produção de ésteres metílicos com matérias-primas de baixo custo ocorreram inicialmente com a matéria-prima I. A partir dos resultados preliminares, avançou-se em busca da otimização das variáveis deste processo, sendo complementados com experimentos específicos. Com as características desta matéria-prima, foram recebidas

amostras de dois fornecedores para os ensaios em laboratório, sendo o fornecedor A (amostra 1) utilizado para a parte inicial do trabalho (testes preliminares, otimização e experimentos complementares). Após os resultados obtidos com o primeiro fornecedor (A, amostra 1), foram realizados ensaios com o segundo (fornecedor B).

Na Figura 5.4 é apresentado o fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima I, os quais serão descritos detalhadamente neste item.

Figura 5.4 - Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima I.



Fonte: Elaborado pelo autor

Esta matéria-prima apresenta como principal característica alta acidez (teores de AGL acima de 60 %). A partir dos estudos com a matéria-prima I e seu consequente aprendizado, conseguiu-se avançar na produção de ésteres metílicos com outros tipos de matérias-primas. Na Tabela 5.1 são apresentadas as características básicas da matéria-prima I do primeiro fornecedor (A), amostra 1.

Tabela 5.1 - Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “A”, amostra 1.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,5
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	98,55
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	129,4
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	197,3

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.1 pode-se observar alguns pontos importantes, como por exemplo, o alto valor de AGL, indicando que a matéria-prima possui

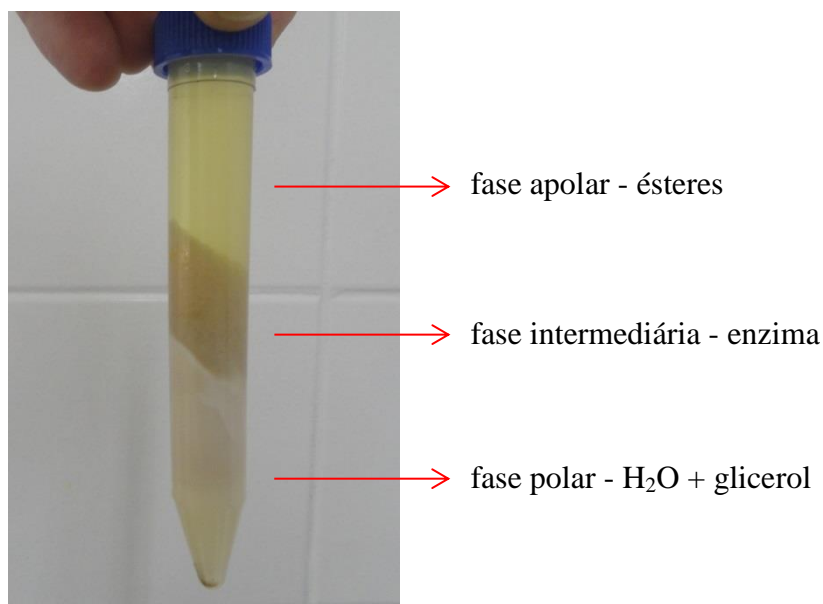
quase que em sua totalidade estes elementos em sua composição. O índice de saponificação é outro ponto importante que deve ser observado, pois segundo estudos realizados por Michelin et al. (2015) ele indica um fator de conversibilidade, ou seja, representa a máxima conversão de ésteres que pode ser atingida a partir de uma matéria graxa. Desta forma, a matéria-prima I em questão poderá ser convertida em aproximadamente 99 % de ésteres, sendo basicamente os 98,55 % de ácido graxo livre encontrado. Já o índice de iodo é um valor importante a ser analisado, pois demonstra o número de insaturações da amostra, sendo uma maneira de identificar a procedência oleaginosa da matéria-prima. Matérias-primas provenientes de soja apresentam um índice de iodo na faixa de 120 a 140 g I₂/100 g.

Após sua caracterização, alguns testes preliminares foram realizados, visando o conhecimento da matéria-prima, assim como a familiarização com a enzima e os equipamentos da reação. Na sequência foram realizados ensaios de otimização das variáveis para esta matéria-prima, como também experimentos complementares buscando o melhor entendimento do processo.

Tendo em vista que a matéria-prima apresenta altos teores de AGL, o acompanhamento da reação ocorreu por meio do % AGL presente, conforme realizado por Price et al. (2016). Visto que existe uma relação inversa entre a quantidade de AGL e a formação de ésteres, somente em algumas amostras foram realizadas a análise de ésteres. As reações foram realizadas conforme descrito no item 4.2.1.

Na Figura 5.5 podem ser observadas as distintas fases originadas da reação, sendo a fase topo apolar, fase intermediária contendo o catalisador enzimático (enzima livre Lipase NZ) e a fase fundo ou fase polar contendo uma mistura de água, glicerol (se houve formação) e álcool metílico que não reagiu.

Figura 5.5 - Tubo Falcon com as três fases originadas da reação de produção de ésteres metílicos.



Fonte: AUTOR

5.2.1.1 Testes preliminares com a matéria-prima I

Para um conhecimento inicial da matéria-prima que se estava trabalhando, foram realizados testes preliminares, os quais serviram de embasamento para as reações futuras. Na Tabela 5.2 são apresentados os primeiros ensaios realizados e os teores de ácidos graxos obtidos ao final da reação.

Tabela 5.2 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do primeiro teste preliminar com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	% Água	% Enzima	Razão MeOH:MG	NAD	% NaOH	AGL _i T ₀	AGL _f T ₂₄	% Conversão
01	0,0	1,0	3,6:1	3	0	98,55 %	81,52 %	17,3
02	0,0	2,0	3,6:1	3	0	98,55 %	79,25 %	19,6

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.2 observa-se que as reações não foram satisfatórias, pois a redução do teor de AGL foi no máximo 19 % no ensaio 02. Este baixo rendimento apresentado nestes ensaios preliminares podem estar diretamente

relacionados à desnaturação da enzima ao longo da reação, visto que o ensaio 2 apresentou uma redução levemente maior do teor de ácidos graxos por ter sido realizado com o dobro de enzima. A desnaturação da enzima pode ocorrer devido a alguns fatores como, por exemplo: alta concentração de metanol no meio reacional e a presença de ácidos inorgânicos.

Em reações de metanólise, quando utilizado catalisadores biológicos, a adição de metanol deve ser particionada, pois o metanol pode ter efeito inibidor sobre a enzima. (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; SHIMADA et al., 2002). Remonatto (2017) em seus estudos obteve 94 % e 92 % de conversão em ésteres em 16 horas de reação a partir de óleo de fritura usado e óleo ácido residual respectivamente, utilizando o metanol para a reação fracionado em 6 vezes. Cesarini, Diaz, Nielsen (2013) utilizaram o metanol fracionado em 4 vezes, nos tempos 0, 3, 5 e 7 horas, obtendo resultados de até 96 % de ésteres em 24 horas a partir de óleo de soja bruto. Sendo assim, entende-se que a adição de metanol pouco fracionada e em curtos intervalos de tempo ocasiona um aumento da concentração deste álcool no meio, podendo ocasionar a desnaturação da enzima. Este fato também é exposto por Firdaus et al. (2016) e Yusoff, Xu, Guo (2014), que comentam que em processo envolvendo lipases é necessária a adição gradual de metanol com o objetivo de preservar a atividade enzimática, tendo em vista a sensibilidade desta enzima a altas concentrações de álcool metílico. Em testes de aumento de escala, Remonatto (2017) utilizou a adição de metanol na reação em até 8 partes iguais, enquanto Price et al. (2016) fizeram uma adição contínua de metanol até a concentração desejada, obtendo bons rendimentos de ésteres em suas reações.

Estudos têm demonstrado que as lipases são muito sensíveis a altas concentrações de metanol, principalmente em sua forma livre. Pessoa e Kilikian (2005) comentaram em seus estudos que uma alta concentração de solventes orgânicos, combinado a altas temperaturas (maior que 10 °C) são condições propícias à desnaturação de proteínas. Uma forma de atenuar esta situação seria a adição de água ao meio reacional diluindo a concentração do metanol no meio, tornando-o menos agressivo à enzima livre. A água é um componente essencial de manutenção da estrutura tridimensional específica de algumas lipases, principalmente as que são utilizadas na forma solúvel (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Para reações sem a presença de água, Remonatto (2017) obteve apenas 22 % de rendimento em ésteres metílicos contra 96 % com utilização de 2,5 % de água, mantendo-se constante as outras variáveis das reações. Em reações de aumento de escala (piloto), esta autora utilizou 2 % de água, obtendo valores em torno 94 % de conversão em ésteres metílicos a partir da matéria-prima óleo ácido residual e gordura ácida. Nestas condições, a água proporciona uma diluição dos elementos

hidrofílicos (principalmente o metanol) nas reações de transesterificação e esterificação, evitando a inibição por substratos e produtos durante a reação (REMONATTO et al., 2016).

Nas reações de esterificação de AGL deve-se ter um cuidado com relação à quantidade de água no final da reação, pois devido à natureza reversível da reação em condições favoráveis de temperatura e na presença de catalisador, pode ocorrer a hidrólise dos ésteres formando novamente AGL. Desta forma, segundo Shibataki-Kitakawa et al. (2015) para reações com altos teores de AGL, deve-se ter uma quantidade de álcool em excesso, visando o deslocamento da reação em direção a formação de ésteres. Em reações de produção de MAG, He et al. (2017) constataram que a lipase livre comercial é insensível à variação do conteúdo de água no meio reacional, mas em conteúdos elevados de água a reação desequilibra para a hidrólise, gerando uma maior quantidade de AGL.

Em reações com matérias-primas contendo altos índices de AGL, Remonatto (2017) obteve resultados satisfatórios na conversão em ésteres metílicos para a variação de AGL em 25 %, 50 % e 75 %, sendo 95,1 %, 97,2 % e 85,9 % respectivamente. Observa-se que na matéria-prima com os teores de AGL acima de 50 % teve-se uma redução na quantidade final de ésteres metílicos. Este fator pode estar relacionado à formação de água ao longo da reação de esterificação, deslocando seu equilíbrio para um maior teor de AGL, e conseqüentemente, menor rendimento em ésteres. Porém, o fato da matéria-prima conter alto teor de AGL, também pode influenciar na atividade enzimática, tendo em vista que este se torna um agente agressivo para a enzima. Desta forma, pode-se acrescentar nas reações agentes que minimizam este efeito, como por exemplo, íons metálicos (Mg^{+2} , Na^{+}), os quais se concentram na interface gordura-água aumentando a atividade enzimática, bem como gerando um efeito estabilizador na enzima (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; YU; QIN; TAN, 2007).

A quantidade de enzima livre presente no meio reacional é um fator importante a ser observado, pois como este catalisador possui um valor comercial elevado, pode ser restritivo na viabilidade do processo. Em busca de uma alternativa industrial, a quantidade de catalisador pode inviabilizar o processo. Neste sentido, Remonatto (2017) estudou a cinética reacional de diferentes concentrações de enzima lipase comercial em óleo ácido residual. A autora variou as concentrações de enzima em 0,25 %, 0,5 % e 1 %, obtendo resultados acima de 90 % de conversão em ésteres metílicos para as concentrações de 0,5 % e 1 % de enzima livre em 28 h de reação. Isso indica que para baixas concentrações de catalisador, deve-se recorrer a tempos maiores de processo, podendo-se obter resultados semelhantes de produção de ésteres metílicos.

Tendo em vista os primeiros resultados obtidos, e a análise de diversos trabalhos, realizou-se um segundo teste preliminar com a matéria-prima I, visando uma redução maior do teor de AGL ao longo da reação. Nestes testes foi acrescentada a lavagem da matéria-prima (m/m, em relação ao substrato), com o intuito de redução de contaminantes presentes. Na Tabela 5.3 estão descritos os ensaios do segundo teste preliminar.

Tabela 5.3 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do segundo teste preliminar com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	% Lavagem	% Água	% Enzima	Razão MeOH:MG	NAD	% NaOH	AGL _i T ₀	AGL _f T ₂₄	% Conversão
03	20	2,0	2,0	7,2:1	8	0,05	98,55 %	3,23 %	96,7
04	20	2,0	2,0	7,2:1	8	0,10	98,55 %	3,05 %	96,9

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados da Tabela 5.3 pode-se verificar que a reação ocorreu de forma satisfatória, e se conseguiu atingir um percentual de conversão acima de 96 % dos AGL. Ensaios sem a presença de lavagem e NaOH na reação não atingiram 20 % de conversão dos AGL presentes inicialmente (primeiro teste preliminar). Desta forma, observa-se a importância da lavagem para a retirada de impurezas que possam estar prejudicando a catálise enzimática.

Assim, faz-se necessário a continuidade dos estudos para otimizar o processo de produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I, buscando entender quais fatores são significativos para o processo, como também buscar os valores destes fatores que possibilitem a obtenção de melhores rendimentos, com um menor custo.

5.2.1.2 Estudos das variáveis de processo para produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I

Tendo em vista os resultados preliminares obtidos, partiu-se para um estudo mais aprofundado do processo utilizando a metodologia de delineamento de experimentos. Foram realizados dois delineamentos, sendo o primeiro com o intuito de analisar as variáveis significativas e o segundo buscando a otimização por meio de superfícies de resposta.

Com os estudos realizados após os testes preliminares, alguns pontos foram estabelecidos para os novos ensaios de modo que interferissem da menor forma possível no processo. A adição de metanol foi fixada em 12 frações iguais, do tempo T_0 até o T_{11} (tempo zero a nas 11 horas subsequentes), reduzindo desta forma a quantidade de metanol no meio, causando uma menor desnaturação da enzima livre presente. O percentual de água foi estabelecido em 2 %, sendo os melhores resultados encontrados por Remonato (2017) em sistema de batelada alimentada em escala de laboratório, onde também foi aplicado posteriormente em escala piloto. A temperatura foi mantida em 45 °C e a rotação do shaker em 250 rpm, sendo os valores recomendados pelo fornecedor do catalisador enzimático.

As variáveis analisadas no primeiro planejamento, água de lavagem (%), adição de NaOH (%), razão molar (MeOH:MG) e concentração de enzima (%) foram escolhidos por apresentarem uma relação direta com o rendimento da reação. A concentração de enzima visava a busca por uma condição de menor custo, tendo em vista que o valor do catalisador enzimático é elevado. O primeiro delineamento realizado foi Fatorial Completo 2^4 com triplicata no ponto central, desta forma sendo possível a análise de significância dos efeitos principais, suas interações e o erro experimental. Todas as reações foram realizadas com a adição de 2 % de água e o metanol em 12 frações iguais. O tempo de processo foi estabelecido em 24 horas, sendo este o tempo necessário para obtenção de resultados satisfatórios de conversão, conforme atingidos nos testes preliminares. Na Tabela 5.4 são apresentados os resultados de acidez e conversão obtidos no primeiro delineamento de experimentos, para a matéria-prima I.

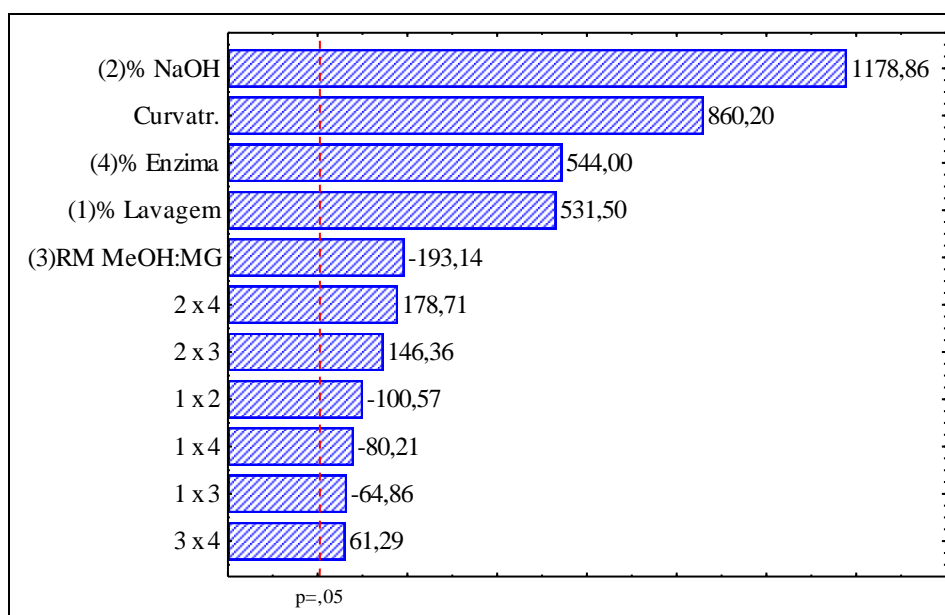
Tabela 5.4 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do primeiro delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	% Lavagem	% NaOH	Razão MeOH:MG	% Enzima	AGL _f T ₂₄	% Conversão
05	0	0	3,6	0,5	77,66 %	21,2
06	20	0	3,6	0,5	57,58 %	41,6
07	0	0,1	3,6	0,5	29,35 %	70,2
08	20	0,1	3,6	0,5	24,09 %	75,6
09	0	0	7,2	0,5	73,97 %	24,9
10	20	0	7,2	0,5	67,29 %	31,7
11	0	0,1	7,2	0,5	68,33 %	30,7
12	20	0,1	7,2	0,5	14,71 %	85,1
13	0	0	3,6	1,5	74,33 %	24,6
14	20	0	3,6	1,5	17,56 %	82,2
15	0	0,1	3,6	1,5	15,26 %	84,5
16	20	0,1	3,6	1,5	13,88 %	85,9
17	0	0	7,2	1,5	69,18 %	29,8
18	20	0	7,2	1,5	64,22 %	34,8
19	0	0,1	7,2	1,5	3,08 %	96,9
20	20	0,1	7,2	1,5	3,01 %	97,0
21	10	0,05	5,4	1,0	4,29 %	95,7
22	10	0,05	5,4	1,0	4,16 %	95,8
23	10	0,05	5,4	1,0	4,18 %	95,8

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se nos resultados da Tabela 5.4 que por meio do primeiro delineamento obteve-se uma variação de 3,01 % a 77,66 % na acidez final após 24 horas, com conversão de AGL de 97,0 % a 21,2 % respectivamente, evidenciando a importância das variáveis escolhidas para o rendimento da reação. Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o fator de conversão, ou seja, quanto maior o percentual de conversão menor a acidez final e como consequência, maior quantidade de ésteres metílicos, facilitando desta forma a interpretação dos resultados. Na Figura 5.6 são apresentados os valores dos efeitos principais e suas interações, relacionados ao percentual de conversão do primeiro delineamento.

Figura 5.6 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis e suas interações para o primeiro delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5.6 observa-se que todos os efeitos principais e secundários foram significativos num intervalo de confiança de 95 %, mostrando que estas variáveis afetam significativamente o rendimento do processo. A variável concentração de NaOH apresentou o maior efeito significativo, positivo, entre as variáveis estudadas, ou seja, nos níveis analisados (0 a 0,1 %) quanto maior a quantidade de NaOH adicionado, maior a conversão da acidez. A concentração enzimática e % lavagem também foram significativos de forma positiva, apesar dos efeitos apresentarem menor intensidade (menos da metade da concentração de NaOH), mostrando que quanto maior a concentração enzimática, na presença da lavagem, maior será a conversão. A razão molar MeOH:MG também apresentou significância neste intervalo de confiança, apesar de ter apresentado um valor bem inferior aos outros. Outro ponto importante com relação a esta variável, é que seu efeito é negativo, ou seja, tem uma tendência de apresentar maiores valores de conversão com uma menor razão MeOH:MG. Também deve ser destacado o alto valor apresentado pelo efeito curvatura, indicando que existem pontos de máximo e mínimo dentro da faixa estudada.

Com os resultados obtidos, e todo o aprendizado adquirido, buscou-se então a realização de um novo delineamento, objetivando a otimização do processo. Neste segundo momento foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional, com três variáveis e

dois níveis, mais seis pontos axiais e três pontos centrais. As variáveis escolhidas foram: % de água na lavagem (m/m, em relação ao substrato); quantidade de NaOH adicionada na reação (%); razão molar MeOH:MG. Nota-se que a variável concentração enzimática não foi utilizada, mantendo-a constante em 1,0 % de concentração da enzima livre na reação (m/m, em relação ao substrato) em todos os ensaios. A manutenção da concentração enzimática visa à redução de custo do processo, tendo em vista que como se trata de um catalisador, quanto maior a sua concentração, maior será a conversão. A escolha do valor de 1,0 % de concentração enzimática se deve aos bons resultados alcançados nos pontos centrais do primeiro delineamento, com conversões acima de 95 %.

As escolhas dos níveis das variáveis no segundo delineamento foram realizadas a partir dos resultados obtidos no primeiro delineamento, no qual se caminhou no sentido do efeito obtido (aumentando o valor do nível para variável com efeito positivo, e vice-versa). Com isso foram aumentados os valores dos níveis das variáveis % de água na lavagem e quantidade de NaOH adicionada, onde seus níveis máximos do primeiro planejamento foram deslocados para o nível zero, sendo eliminados os pontos sem lavagem e sem adição de NaOH. Para a variável razão molar MeOH:MG, devido a seu efeito ter sido negativo, ainda que com um valor menor, reduziu-se para que o valor do ponto $+\alpha$ não atingisse o valor $+1$ do primeiro delineamento. A redução também não foi tão grande visto que alguns autores comentam da importância do metanol nos processos de esterificação (SHIBASAKI-KITAKAWA et al., 2015; HE et al., 2017), como também a obtenção de resultados satisfatórios com altas concentrações de metanol no primeiro delineamento, com conversões acima de 96 %. Para o segundo delineamento foram mantidos fixos as seguintes variáveis: 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 5.5 são apresentados os resultados de acidez e conversão obtidos no segundo delineamento de experimentos, para a matéria-prima I.

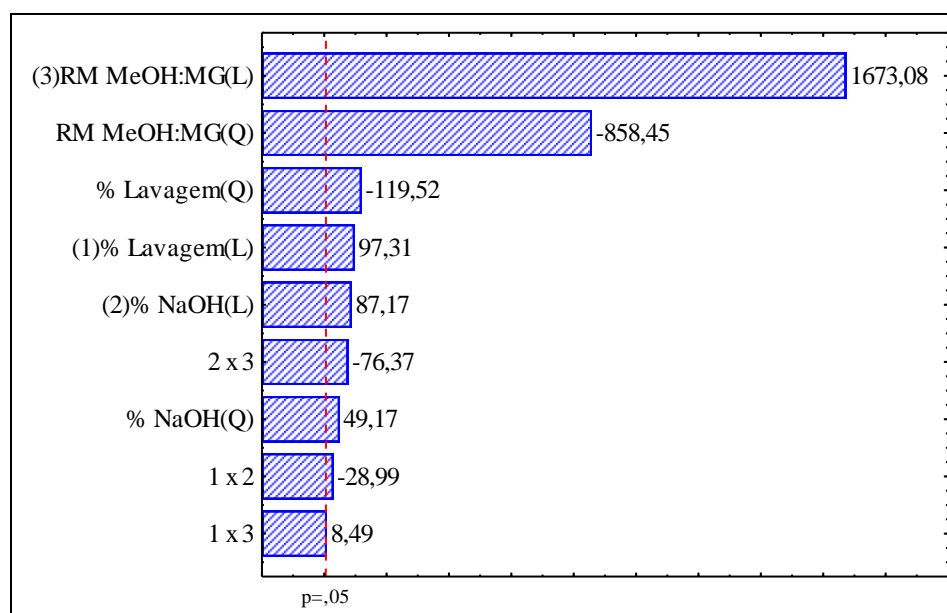
Tabela 5.5 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios do segundo delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	% Lavagem	% NaOH	Razão MeOH:MG	AGL _f T ₂₄	% Conversão
24	10	0,05	4,2	12,30 %	87,5
25	30	0,05	4,2	11,92 %	87,9
26	10	0,15	4,2	10,54 %	89,3
27	30	0,15	4,2	10,99 %	88,9
28	10	0,05	6,0	3,98 %	96,0
29	30	0,05	6,0	3,90 %	96,0
30	10	0,15	6,0	3,72 %	96,2
31	30	0,15	6,0	3,63 %	96,3
32	3,2	0,1	5,1	7,85 %	92,0
33	36,8	0,1	5,1	5,77 %	94,2
34	20	0,02	5,1	5,39 %	94,5
35	20	0,18	5,1	5,39 %	94,5
36	20	0,1	3,6	22,34 %	77,3
37	20	0,1	6,6	3,72 %	96,2
38	20	0,1	5,1	5,19 %	94,7
39	20	0,1	5,1	5,17 %	94,8
40	20	0,1	5,1	5,18 %	94,7

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados do segundo delineamento apresentados na Tabela 5.5, observa-se que a variação de acidez final foi de 3,63 % a 22,34 % para um tempo de 24 horas de reação, com um percentual de conversão de AGL de 96,3 % a 77,3 % respectivamente. Como foram eliminados os pontos extremos dos níveis em relação ao primeiro delineamento, neste segundo ocorreu uma menor variação entre os melhores e piores resultados de acidez final e conversão, aproximando-se da otimização. Para a análise estatística dos dados e montagem dos gráficos de superfície de resposta, foram utilizados os resultados do fator de conversão. Na Figura 5.7 são apresentados os valores dos efeitos principais e suas interações, relacionados ao percentual de conversão do segundo delineamento.

Figura 5.7 - Gráfico de Pareto com os efeitos linear e quadrático das variáveis e suas interações para o segundo delineamento de experimentos com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se que na Figura 5.7 que todos os efeitos principais e suas interações foram significativos ($p < 0,05$) para o percentual de conversão, indicando que todas as variáveis escolhidas influenciam de forma significativa no valor final de conversão. A variável que apresentou maior significância foi a razão molar MeOH:MG, sendo mais de 10 vezes maior que as outras variáveis. As variáveis % Lavagem e % NaOH também se mostraram significativas, apesar de terem uma menor influência nos resultados. Todas as variáveis possuem significância positiva, indicando que quanto maior for o seu valor, maior será o percentual de conversão, apesar de duas das suas interações apresentarem valor negativo, indicando que se ambas foram no sentido do nível mais alto, sua sinergia pode ser prejudicial. Desta forma, deve-se validar o modelo e realizar as análises com ajuda das superfícies de resposta.

O modelo empírico codificado para o percentual de remoção, Equação 5.1, foi avaliado por meio da Análise de Variância (ANOVA), onde o F calculado obtido foi cinco (5) vezes maior que o F tabelado ($F_{9,7}$) a 95 % de confiança.

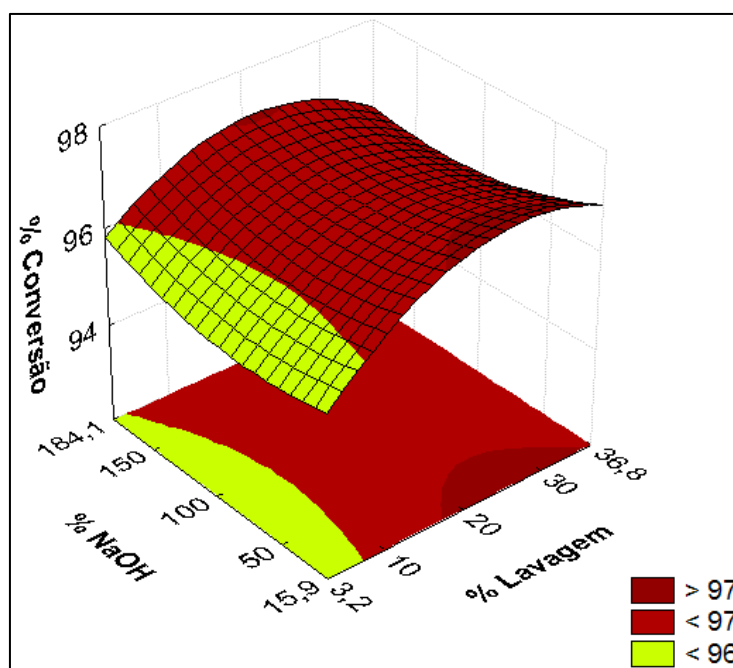
$$\begin{aligned}
 \% \text{ Convers\~{a}o} = & 94,68 + 0,27 \cdot (\% \text{ Lavagem}) - 0,36 \cdot (\% \text{ Lavagem})^2 + 0,24 \cdot (\text{ppmNaOH}) \\
 & + 0,15 \cdot (\text{ppmNaOH})^2 + 4,60 \cdot (\text{RM MeOH : MG}) - 2,60 \cdot (\text{RM MeOH : MG})^2 \\
 & - 0,10 \cdot (\% \text{ Lavagem}) \cdot (\text{ppmNaOH}) + 0,03 \cdot (\% \text{ Lavagem}) \cdot (\text{RM MeOH : MG}) \\
 & - 0,27 \cdot (\text{ppmNaOH}) \cdot (\text{RM MeOH : MG})
 \end{aligned}$$

(Equação 5.1)

Onde: % Lavagem: percentual de água utilizada para a lavagem da matéria-prima codificada; % NaOH: quantidade de NaOH adicionada ao meio codificada; RM MeOH:MG: razão molar de adição de metanol em relação à matéria graxa codificada.

Com o modelo validado foi possível construir as superfícies de resposta para todas as variáveis investigadas. Na Figura 5.8 é apresentada a superfície de resposta para as variáveis % NaOH e % de lavagem da matéria-prima, onde a variável RM MeOH:MG foi fixada em 6:1 (nível +1). Observa-se na Figura 5.8 que o percentual de lavagem não possui uma grande influência no percentual de conversão, mas quando o mesmo se aproxima da condição sem lavagem ($-\alpha = 3,2\%$), ocorre uma queda no percentual de conversão. Já para valores acima dos 10 % de lavagem, ocorre uma estabilidade quanto aos valores do percentual de conversão, ficando acima dos 96 %.

Figura 5.8 - Superfície de resposta do percentual de conversão do segundo delineamento de experimentos para a matéria-prima I, com as variáveis % NaOH e % Lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

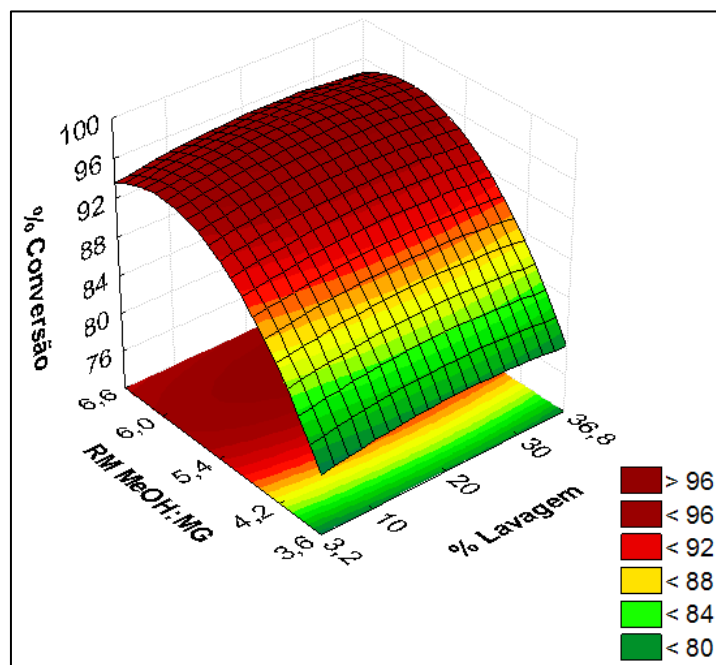


Fonte: Elaborado pelo autor

Na mesma Figura 5.8, observa-se que a variação da quantidade de NaOH (%) adicionada não interfere no percentual de conversão em grande parte da superfície. Existe apenas uma faixa com aumento do percentual de conversão acima de 97 %, faixa esta que compreende a adição de 0,02 a 0,05 % de NaOH ($-\alpha$ a -1) e 20 % a 30 % de percentual de lavagem (0 a +1). Isto se explica porque com o aumento na quantidade de água na lavagem, elimina-se uma maior quantidade de contaminantes da matéria-prima, necessitando de uma menor quantidade de NaOH. Entretanto, este aumento no percentual de conversão não é grande suficiente para justificar um aumento na quantidade de água de lavagem, o qual acarretará em grandes quantidades de efluente.

Dando continuidade a análise das superfícies de resposta, a Figura 5.9 apresenta a superfície de resposta para as variáveis RM MeOH:MG e % de lavagem da matéria-prima, onde a variável % NaOH foi fixada em 0,1 % (nível 0).

Figura 5.9 - Superfície de resposta do percentual de conversão do segundo delineamento de experimentos para a matéria-prima I, com as variáveis RM MeOH:MG e % Lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.



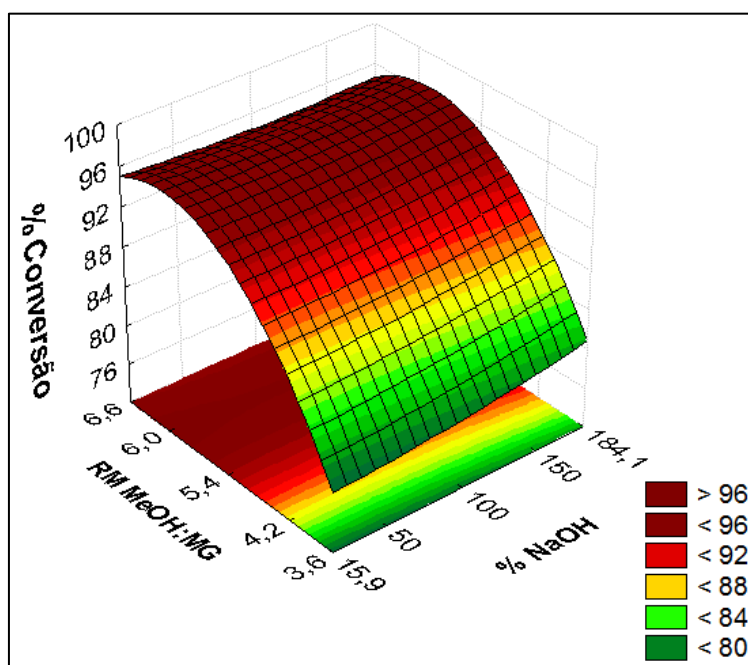
Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Figura 5.9 que a variação do percentual de lavagem (% Lavagem) não interfere no percentual final de conversão dos AGL em toda a superfície de resposta, podendo

esta variável ser utilizada no seu nível -1 (10 % Lavagem). A utilização desta variável abaixo do nível -1 pode ocasionar uma redução na conversão final, tendo este fato sido observado na Figura 5.8, por mais que o teor de % NaOH seja aumentado. Também pode ser observado na Figura 5.9 a forte influência da variável RM MeOH:MG, onde o aumento da razão molar de 3,6 para 6,0 ocasiona um aumento de quase 20 % no percentual final de conversão de AGL. Entretanto, observa-se um leve declínio na superfície de resposta quando o nível desta variável vai ao seu ponto máximo ($+\alpha$), indicando um ponto de inflexão, ou seja, existe um ponto ótimo da RM MeOH:MG, e a partir deste ponto irá ocorrer uma redução no percentual de conversão final de AGL. O ponto ótimo da variável RM MeOH:MG está em torno de 6,0, sendo o seu nível +1. Este mesmo comportamento foi observado no primeiro planejamento, onde a variável RM MeOH:MG foi bastante significativa, mas com seu valor negativo, indicando que no seu ponto máximo tinha-se uma redução no percentual de conversão.

Na Figura 5.10 é apresentada a superfície de resposta para as variáveis RM MeOH:MG e % NaOH, onde a variável % Lavagem foi fixada em 10 % (nível -1).

Figura 5.10 - Superfície de resposta do percentual de conversão do segundo delineamento de experimentos para a matéria-prima I, com as variáveis RM MeOH:MG e % NaOH, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Pode ser observado na Figura 5.10 que a variação na quantidade adicionada de NaOH no meio reacional não interfere no percentual de conversão, pois com o aumento da quantidade de NaOH de 0,02 % para 0,18 %, o percentual de conversão permanece estável. Também na Figura 5.10 observa-se novamente a grande influência da variável RM MeOH:MG, sendo que o aumento de 3,6 para 6,0 provoca um aumento de 80 % para 96 % no percentual de conversão. Outro ponto importante a ser observado é uma inflexão na superfície de resposta no sentido do valor de 6,6 para RM MeOH:MG, indicando um ponto ótimo. Este fato também foi observado na Figura 5.9, indicando que com o aumento acentuado da RM MeOH:MG para o nível $+\alpha$, tem-se uma piora no resultado do percentual de conversão.

Com os resultados apresentados nas superfícies de resposta, observa-se que o melhor valor do percentual de lavagem está em 10 % (nível -1), devido estar acima da zona crítica onde poderá ocorrer redução do percentual de conversão (nível $-\alpha$ - Figura 5.8), e não gerar uma quantidade de efluente muito grande quando comparado com os percentuais de 20 % e 30 %. A quantidade de NaOH adicionados pode ser mantida em 0,1 %, sendo a condição do nível 0, desta forma o sistema fica mais robusto para uma variação da matéria-prima, tendo em vista que esta variável apesar de significativa, mostra um percentual de conversão estável com sua variação de 0,02 % à 0,18 %. Para a variável RM MeOH:MG a melhor condição ficou para o valor de 6,0, tendo em vista sua grande influência positiva no percentual de conversão final, mas também com a inflexão demonstrada com valores superiores a este.

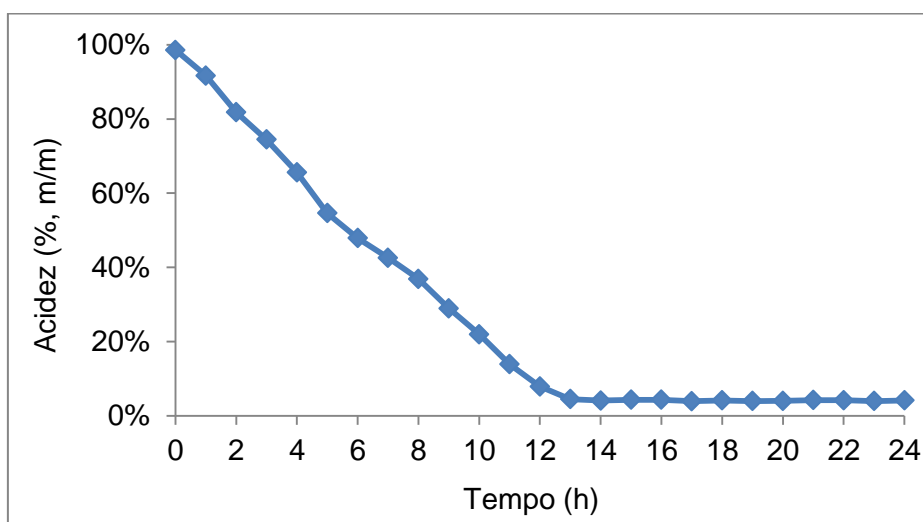
Portanto, com os dois delineamentos realizados, chegou-se nas seguintes condições otimizadas para as reações com a matéria-prima I: material graxo lavado com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato); tempo reacional de 24 horas.

5.2.1.3 Avaliação da cinética reacional a partir das variáveis de processo otimizadas utilizando a matéria-prima I

Após a realização dos dois delineamentos e otimizado o processo de redução de acidez e consequente conversão em éster metílicos, realizou-se um estudo cinético (destrutivo) com o intuito de verificar o comportamento da redução de acidez ao longo do tempo. O estudo foi realizado nas seguintes condições otimizadas: matéria-prima I lavada com 10 % de água

destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Os ensaios foram realizados em incubador (45 °C/250 rpm) e amostras foram retiradas de hora em hora durante as 24 horas de reação e analisadas quanto ao teor de AGL, sendo as amostras das 16 horas e 24 horas analisadas também quanto ao teor de ésteres metílicos. Na Figura 5.11 pode-se observar a variação de acidez ao longo do tempo para a matéria-prima I.

Figura 5.11 - Cinética reacional a partir das variáveis otimizadas para a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se que na Figura 5.11 que a reação possui duas fases distintas, sendo na primeira o percentual de acidez no meio reacional vai caindo ao longo do tempo até a décima terceira hora da reação. Na segunda fase, a partir da décima terceira hora a reação torna-se constante até às 24 horas, ocorrendo o equilíbrio da reação, com os valores de acidez a partir deste momento ficando em torno de 4,15 % de AGL (95,8 % de conversão). Os valores finais de teor de AGL apresentados no estudo da cinética reacional foram muito próximos aos melhores resultados encontrados no delineamento de experimentos, mostrando que os resultados da otimização foram eficazes. Levando-se em consideração a variação que possa existir na matéria-prima, a partir dos resultados apresentados pode-se determinar o tempo necessário para a produção de ésteres metílicos a partir da matéria-prima I, sendo que a reação ocorre em 16 horas nas condições otimizadas. Para a confirmação dos resultados obtidos,

foram realizadas análises do teor de ésteres metílicos para os tempos de 16 horas e 24 horas da cinética reacional, sendo os resultados mostrados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Resultados do teor de AGL, conversão e ésteres metílicos da cinética reacional com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 16 e 24 horas de reação.

Ensaio	Tempo de Reação (h)	AGL	% Conversão	% Ésteres Metílicos
41	16	4,30 %	95,6	98,91
42	24	4,13 %	95,8	100,15

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados de ésteres metílicos mostrados na Tabela 5.6 apontam para uma ótima conversão dos ácidos graxos presentes na matéria-prima em FAME, indicando que o processo de otimização foi consistente. Remonatto (2017) realizou testes utilizando a enzima livre comercial em óleo de soja refinado com acréscimo de 25 %, 50 % e 75 % de ácido oleico, elevando o teor de AGL na matéria-prima, obtendo 95,1 %, 97,2 % e 85,9 % nos teores de FAME respectivamente. Com outras matérias-primas com alto valor de AGL inicial, Michelin et al. (2015) utilizaram em seus estudos óleo de macaúba (teor de AGL de 58 %) para produção de biodiesel utilizando a lipase *Novozym 435* sob a influência de ultrassom, obtendo valores de ésteres etílicos na ordem de 90 % de convertibilidade (90 % do máximo possível).

Desta forma, comparando-se os estudos realizados, observa-se que os resultados de ésteres metílicos alcançados neste trabalho foram superiores, principalmente para matérias-primas com altos teores de AGL. Isso se deve ao estudo realizado nos testes preliminares, e principalmente, nos delineamentos de experimentos realizados, onde a lavagem da matéria-prima, adição de NaOH e o aumento do número de adições de MeOH contribuíram para a eficiência da catálise, auxiliando na eliminação de impurezas e neutralização de possíveis ácidos inorgânicos prejudiciais nestas reações, tornando a enzima ativa por mais tempo.

5.2.1.4 Estudo da influência do percentual de água adicionado na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I

Para que se pudesse ter um melhor entendimento da influência do percentual de água adicionado no início da reação, principalmente com relação à redução da concentração de metanol no meio e o deslocamento do equilíbrio da reação que a água poderia causar,

realizaram-se 4 experimentos a fim de avaliar o teor final de AGL variando-se o percentual de água adicionado, conforme condições a seguir: matéria-prima I lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % e 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 5.7, pode-se verificar os resultados dos teores de AGL ao final das reações e suas respectivas conversões.

Tabela 5.7 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios de variação do percentual de água adicionada na reação utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 12 e 24 horas de reação.

Ensaio	% Água	AGL _f	% Conversão	AGL _f	% Conversão
		T ₁₂	T ₁₂	T ₂₄	T ₂₄
43	0,5	83,36 %	15,4	74,45 %	24,5
44	1,0	67,81 %	31,2	63,51 %	35,6
45	1,5	12,37 %	87,5	4,09 %	95,9
46	2,0	8,31 %	91,6	3,70 %	96,3

Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5.7, observa-se que com a redução do percentual de água inicial, ocorre uma redução drástica de conversão dos AGL em ésteres metílicos, mantendo-se um alto valor de AGL ao final da reação. Este fato ocorre principalmente nos teores de 0,5 % e 1,0 % de água adicionada, os quais são insuficientes para reduzir a concentração de metanol presente no meio, ocasionando à desnaturação da enzima. Com o aumento da adição de água para 1,5 %, nota-se uma melhora em relação aos resultados de 0,5 % e 1,0 % de água adicionada, mas ainda inferior aos resultados de adição de 2,0 % de água, principalmente em tempos curtos de reação. Esta proximidade de resultados comparando as adições de 1,5 % e 2,0 % em longos tempos de processo (24 horas) pode ser devido à formação de água que vai ocorrendo ao longo da reação (formação de água em processos de esterificação), aumentando sua concentração e evitando que a enzima ativa seja desnaturada.

Apesar de não terem sido realizados experimentos específicos com relação à influência da água em reações de esterificação, Remonato (2017), Nielsen, Brask, Fjerbaek (2008),

Remonato et al. (2016) obtiveram melhores resultados de produção de ésteres utilizando no mínimo 2 % de água, tendo em vista que a água é um componente essencial de manutenção tridimensional específica de algumas lipases, principalmente as que se encontram na forma solúvel.

Desta forma, para um melhor desempenho da reação e manutenção dos resultados obtidos anteriormente, deve-se manter o percentual de água adicionada no início da reação em 2 % (m/m, em relação ao substrato).

5.2.1.5 Estudo da influência da dosagem de metanol na reação no teor final de AGL, utilizando a matéria-prima I

Outro fator importante estudado foi o número de frações de adição da razão MeOH:MG, isto porque na presença de altas concentrações deste álcool no meio reacional pode ser prejudicial para a atividade da enzima, desnaturando-a, tendo em vista seu alto poder reativo. Já em concentrações muito pequenas a reação ocorre de forma lenta prolongando o processo, o que pode causar também a desnaturação do catalisador pelo tempo de exposição. Sendo assim, foram realizados 4 ensaios para o entendimento da adição fracionada de metanol na reação, conforme as seguintes condições: os dois primeiros ensaios o metanol foi fracionado em 8 e 10 partes iguais, sendo adicionado no tempo zero (T_0) e nas 7 horas e 9 horas subsequentes respectivamente. No terceiro ensaio o metanol também foi fracionado em 8 partes, mas de forma escalonada, ou seja, a quantidade de metanol adicionado foi aumentada com o tempo, na seguinte escala: 5,0 % (T_0), 7,5 % (T_1), 10,0 % (T_2), 12,5 % (T_3), 15,0 % (T_4), 15,0 % (T_5), 17,5 % (T_6) e 17,5 % (T_7), sendo atingido no final os 100 %, ou seja, razão molar de MeOH:MG de 6:1. No último ensaio o metanol não foi fracionado, ou seja, foi adicionado todo o volume da reação no tempo zero (T_0). As outras variáveis da reação foram mantidas em: matéria-prima I lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1% de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 5.8 podem ser verificados os resultados dos teores de AGL e conversão em 12 e 24 horas.

Tabela 5.8 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios de variação do número de adições de metanol na reação utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 12 e 24 horas de reação.

Ensaio	NAD	Escalonado	AGL _f	% Conversão	AGL _f	% Conversão
			T ₁₂	T ₁₂	T ₂₄	T ₂₄
47	10	Não	4,08 %	95,9	4,23 %	95,5
48	8	Não	6,66 %	93,2	4,59 %	95,3
49	8	Sim	6,76 %	93,1	3,86 %	96,1
50	1	Não	73,19 %	25,7	71,48 %	27,5

Fonte: Elaborado pelo autor

NAD - número de adições de metanol.

Escalonado - adição de metanol em percentual crescente (cada fração).

Com os resultados obtidos e demonstrados na Tabela 5.8 observa-se um baixo valor do teor de AGL em 12 horas de reação para 10 adições de metanol, com uma conversão de 95,9 %. Os ensaios com 8 adições de metanol, com e sem escalonamento, apresentaram resultados satisfatórios somente com 24 horas de processo, sendo com 12 horas apresentando teores de AGL acima do ensaio com 10 adições. O ensaio sem fracionamento do metanol mostra o grande efeito negativo causado pela sua elevada concentração, ocasionando a desnaturação de boa parte da enzima, fazendo com que não ocorresse a reação por completo. Com estes resultados pode-se obter baixos teores de AGL no final da reação (altos índices de conversão) em tempos mais curtos de reação, em torno de 12 horas, reduzindo o tempo inicialmente estabelecido de 16 horas, obtido pela cinética reacional com as variáveis otimizadas.

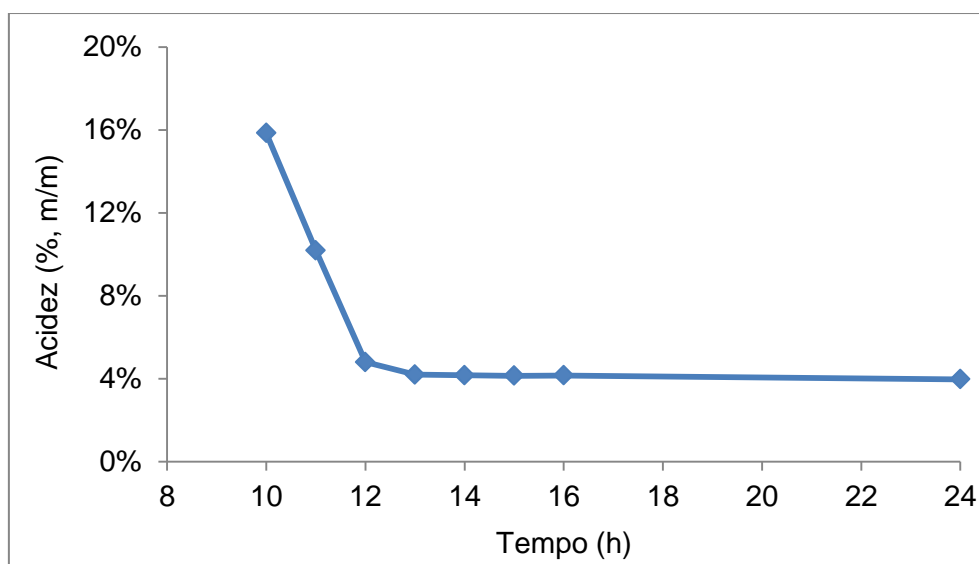
Estes resultados obtidos corroboram com vários outros encontrados na literatura, os quais mostram que a adição particionada de metanol é um ponto importante para que reações com catalisadores biológicos ocorram de forma satisfatória, reduzindo o efeito inibidor deste álcool (PRICE et al., 2016; REMONATTO, 2017; FIRDAUS et al., 2016; YUSOFF; XU; GUO, 2014; CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013). As adições podem correr nas primeiras 8, 10, 12 horas de reação, ou até mesmo de forma contínua, observando sempre as condições de cada reação, as quais serão definidas pela característica de cada matéria-prima.

Com isso, a partir do estudo realizado, observam-se valores satisfatórios de AGL com a adição de metanol fracionado em 10 adições iguais, necessitando de avaliação através de uma cinética reacional.

5.2.1.6 Avaliação da cinética reacional a partir dos novos valores das variáveis percentual de água adicionada e número de adições de metanol, utilizando a matéria-prima I

Com os novos valores das variáveis determinados pelos testes do percentual de água inicial e número de adições de metanol, foi realizada uma nova cinética reacional para que fosse possível verificar a redução do teor de AGL no meio reacional em função do tempo, e desta forma determinar o melhor tempo da reação. O estudo cinético foi realizado nas seguintes condições otimizadas: matéria-prima I lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.12 pode-se observar a variação de acidez ao longo do tempo, para a matéria-prima I. Nos tempos iniciais da reação não foram retiradas amostras, pois o objetivo principal era identificar o ponto de inflexão da curva.

Figura 5.12 - Cinética reacional a partir das variáveis percentual de água e número de adições de metanol otimizadas para a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados apresentados na Figura 5.12 pode-se verificar a existência das duas fases bem definidas, sendo a primeira relacionada com a redução do teor de AGL no meio até a décima terceira hora da reação, e a segunda com a manutenção do teor de AGL

constante no restante da reação até às 24 horas. Dessa forma, com a redução do número de adições de metanol no meio de 12 para 10, pode-se reduzir o tempo de reação de 16 horas para 14 horas.

Sendo assim, tem-se novos padrões de processo com os estudos realizados, que devem seguir as condições otimizadas: matéria-prima I lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato); tempo reacional de 14 horas.

5.2.1.7 Estudo da produção de ésteres metílicos com adição de Aditivo e eliminação da etapa de lavagem, utilizando a matéria-prima I

A etapa de lavagem da matéria-prima é muito importante para a eficiência da reação, visto que a mesma elimina alguns contaminantes presentes, evitando desta forma a inativação da enzima, como verificado nos delineamentos de experimentos realizados anteriormente. Tendo em vista que este procedimento necessita de uma etapa a mais no processo, além de gerar uma grande quantidade de efluente, buscou-se a produção de ésteres metílicos em reações com a matéria-prima I adicionando algum agente que substituísse a etapa de lavagem. Após a realização de testes preliminares, chegou-se na adição de um Aditivo (ADT) como agente substituto da etapa de lavagem, que auxilia na reação. Desta forma, realizaram-se 5 testes iniciais variando as concentrações de ADT e NaOH, para que fosse possível entender o efeito individual de cada um, assim como também seu efeito sinérgico. Também foram variadas as concentrações de enzima, buscando verificar se com a eliminação da etapa de lavagem seria necessária a adição de um maior percentual de catalisador na reação. Estes testes tinham como objetivo principal o alcance de rendimento obtido anteriormente nos testes com a lavagem da matéria-prima (benchmark). As condições a seguir foram mantidas em todos os ensaios: sem lavagem da matéria-prima I; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação. A variação na quantidade de ADT ocorreu a partir de um valor “x” padronizado, sendo o valor da constante a sua frente indicando quantas vezes o mesmo foi adicionado. Na Tabela 5.9 são apresentadas as variáveis utilizadas nos ensaios e os resultados do teor de AGL para os tempos de 12, 14 e 24 horas, como também o percentual de conversão para 14 horas de reação.

Tabela 5.9 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos ensaios eliminando a lavagem da matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 12, 14 e 24 horas de reação.

Ensaio	%	%	%	AGL _f	AGL _f	% Conversão	AGL _f
	NaOH	ADT	Enzima	T ₁₂	T ₁₄	T ₁₄	T ₂₄
51	0,1	1,2x	1,0	6,68 %	4,75 %	95,2	4,34 %
52	0,1	1,2x	1,5	4,00 %	4,01 %	95,9	4,14 %
53	0,3	4x	1,0	4,41 %	4,32 %	95,6	4,01 %
54	0,3	4x	1,5	4,01 %	3,81 %	96,1	4,01 %
55	0,2	2,6x	1,5	3,84 %	3,95 %	96,0	4,00 %

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados apresentados na Tabela 5.9 observa-se que apenas o ensaio 51 apresentou valores maiores de teor de AGL, sendo os demais ficando próximos dos resultados conseguidos anteriormente. Pode-se verificar também que os ensaios com maior concentração enzimática (1,5 %) já apresentavam um valor de teor de AGL satisfatório no tempo 12 horas, permanecendo assim no restante da reação (até 24 horas). Apesar de uma melhor eficiência, os valores no teor de AGL apresentados com uma maior concentração enzimática não foram muito inferiores ao valor obtido com 1,0 % (ensaio 53), principalmente com 14 horas de reação (tempo usado como referência). Sabe-se que em reações de catálise, aumentando-se o catalisador tem-se um aumento da velocidade da reação, ocasionando um aumento substancial de rendimento em tempos iguais, o que não ocorreu neste caso de forma expressiva, não sendo interessante o aumento de 50 % no catalisador, gerando apenas um aumento de custo.

Um fato que deve ser mencionado foi a formação de espuma nos experimentos com quantidade de ADT maior que 1,2x %, onde com a adição de 2,6x % ocorreu leve formação de espuma e com a adição de 4x % ocorreu muita formação de espuma. Este fato deve ser levado em consideração, pois pode ser um problema importante nos estudos futuros de aumento de escala.

A partir dos resultados dos testes iniciais, observa-se uma oportunidade para a produção de ésteres metílicos sem a lavagem da matéria-prima I, necessitando de um estudo mais aprofundado da utilização do ADT. Para tal, foi realizado um delineamento de experimentos variando-se as concentrações de NaOH e ADT, mantendo-se as outras variáveis da seguinte forma: sem lavagem da matéria-prima I; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais

de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 5.10 pode-se verificar os resultados de teor de AGL ao final de 14 horas de processo e suas respectivas conversões.

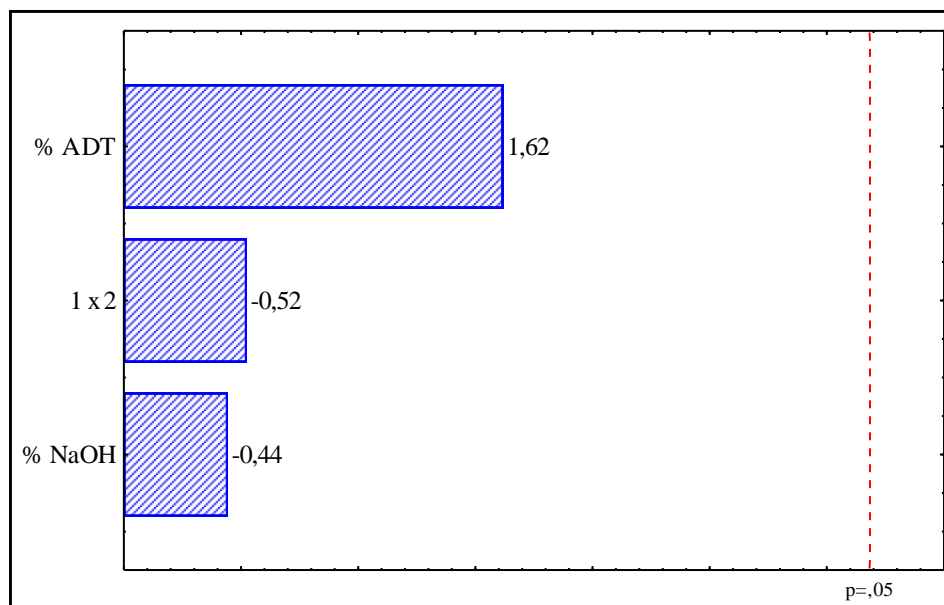
Tabela 5.10 - Resultados do teor de AGL e conversão do delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT utilizando a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 14 horas de reação.

Ensaio	% NaOH	% ADT	AGL _f T ₁₄	% Conversão
56	0,1	0,8x	7,18 %	92,71
57	0,5	0,8x	7,07 %	92,83
58	0,1	2,4x	4,28 %	95,66
59	0,5	2,4x	5,59 %	94,33
60	0,3	1,6x	4,21 %	95,73
61	0,3	1,6x	4,24 %	95,70
62	0,3	1,6x	4,27 %	95,67

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados da Tabela 5.10 pode-se observar que os teores de AGL ao final das 14 horas de reação dos ensaios 58, 60, 61 e 62 apresentaram valores próximos aos obtidos no processo com lavagem de matéria-prima. Na Figura 5.13 são apresentados os valores dos efeitos principais e sua interação, relacionados ao percentual de conversão do delineamento de experimentos com as variações das concentrações de NaOH e ADT sem a lavagem da matéria-prima I.

Figura 5.13 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis e sua interação para o delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT com a matéria-prima I sem lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 14 horas de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Figura 5.13 que para um nível de significância de 95 % as duas variáveis não foram significativas no processo de redução de acidez, podendo ser utilizados quaisquer valores. Para uma melhor determinação dos valores a serem utilizados, deve-se levar em conta a experiência adquirida durante a realização dos experimentos. Foi observado que as reações com 2,4x % de ADT ocorreu uma leve formação de espuma, de menor intensidade que os ensaios anteriores com 2,6x % de ADT. Outro ponto observado foi o menor teor de AGL obtido do ensaio 58 em relação ao ensaio 59, indicando que um aumento muito acentuado dos dois elementos, pode ocorrer uma menor redução do teor de AGL ao final da reação.

Tendo em vista as observações realizadas durante os experimentos, optou-se pela escolha das seguintes condições: 0,3 % NaOH e 2x % ADT. A partir disso, realizaram-se dois experimentos testes para a verificação da repetibilidade dos resultados com a nova condição para este processo, como segue: matéria-prima I sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato); tempo de

reação 14 horas. Na Tabela 5.11 são mostrados os resultados de teor de AGL para os testes de repetibilidade ao final de 14 horas de processo, bem como as suas respectivas conversões.

Tabela 5.11 - Resultados do teor de AGL e conversão dos testes de repetibilidade dos novos valores das variáveis para a matéria-prima I sem lavagem, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 14 horas de reação.

Ensaio	% NaOH	% ADT	AGL _f T ₁₄	% Conversão
63	0,3	2x	4,16 %	95,8
64	0,3	2x	4,26 %	95,7

Fonte: Elaborado pelo autor

Pelos resultados apresentados na Tabela 5.11 pode-se verificar que a obtenção dos teores de AGL iguais aos dos ensaios anteriores, como também estes valores sendo praticamente iguais aos obtidos após a otimização das variáveis com a lavagem da matéria-prima. Desta forma conseguiu-se realizar a produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I de maneira mais engajada com a proposta do trabalho de forma geral, reduzindo o consumo de água e conseqüente geração de efluente, tornando o processo mais ambientalmente correto.

5.2.1.8 Comparação da cinética reacional com e sem lavagem utilizando a matéria-prima I

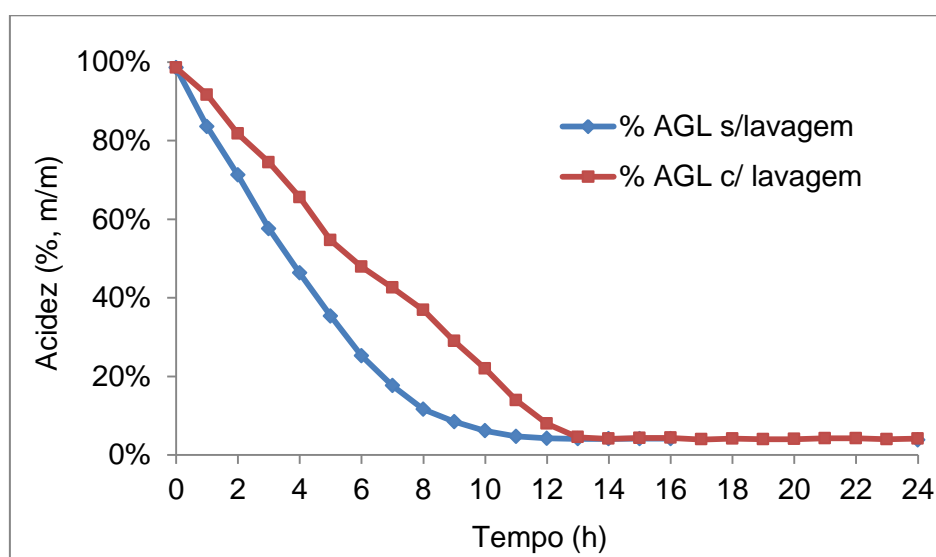
Com as novas variáveis obtidas para a produção de ésteres metílicos com a matéria-prima I sem lavagem, realizou-se uma cinética reacional para verificar o comportamento da redução dos teores de AGL no meio ao longo do tempo. Com a nova cinética reacional sem a lavagem da matéria-prima realizou-se um comparativo entre as duas cinéticas, com e sem lavagem da matéria-prima, as quais foram obtidas com as seguintes variáveis:

a) MP com lavagem: matéria-prima I lavada com 10 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; 0x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato).

b) MP sem lavagem: matéria-prima I sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato).

Na Figura 5.14 podem ser observadas as duas cinéticas reações com e sem lavagem da matéria-prima.

Figura 5.14 - Cinética reacional comparativa das reações com a matéria-prima I com e sem lavagem, a partir das variáveis otimizadas, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

A partir da Figura 5.14 pode ser observada a diferença existente nas duas cinéticas reacionais, quando se conseguiu uma redução dos teores de AGL mais rapidamente sem a lavagem da matéria-prima, com o aumento da concentração de NaOH e adição do ADT. Observa-se também que a partir da décima segunda hora da reação o teor de AGL no meio permanece constante até ao final das 24 h de reação, mostrando que essa foi finalizada. Nesta nova condição de processo, podem-se obter resultados satisfatórios do teor final de AGL com 12 horas de reação, e consequente conversão em ésteres metílicos, estabelecendo-se novo procedimento para a matéria-prima I.

Com os testes realizados com a matéria-prima I, determinou-se o novo procedimento para a realização dos ensaios, sendo nas seguintes condições: matéria-prima I sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9

primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato); tempo de reação 12 horas.

5.2.1.9 *Reações com a matéria-prima I de outro fornecedor*

Após a realização do estudo aprofundado da matéria-prima I do fornecedor “A” (amostra 1), realizaram-se experimentos com esta matéria-prima proveniente de outro fornecedor. Nas análises de recebimento da matéria-prima do fornecedor “B” observou-se que a mesma apresentava características básicas semelhantes à do fornecedor “A” (amostra 1), com isso foi dada sequência aos ensaios. É importante salientar que as variações dos processos geradores das matérias-primas utilizadas podem acarretar diferenças significativas em suas composições (teores de ácidos inorgânicos, elementos como S e P, etc...), por mais que suas características básicas sejam semelhantes, podendo acarretar grandes diferenças nas reações de produção de ésteres metílicos. Portanto, o objetivo não é estabelecer as condições ideais para cada fornecedor, e sim indicar as variáveis gerais para os testes preliminares sem conhecimento prévio do fornecedor e matéria-prima, a partir de características básicas contidas nos laudos de análise enviados pelo fornecedor.

Com este alinhamento, realizaram-se testes com este perfil de matéria-prima, sendo de um fornecedor diferente (B), utilizando-se as mesmas condições onde se obteve o melhor resultado sem lavagem da matéria-prima, apenas aumentando o tempo de processo, conforme segue: matéria-prima I sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,0 % (m/m, em relação ao substrato). A seguir serão mostrados os resultados dos testes realizados.

* Matéria-prima I do fornecedor “B”: recebeu-se uma amostra do fornecedor “B”, sendo inicialmente realizada a sua caracterização, mostrada na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Características básicas da amostra da matéria-prima I do fornecedor “B”.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,5
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	99,95
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	129,4
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	197,3

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados da Tabela 5.12 observa-se que as características desta matéria-prima são semelhantes as do primeiro fornecedor (A, amostra 1), podendo ser utilizadas as mesmas condições de processo. Foram realizados três ensaios para verificar a redução do teor de AGL, sendo o primeiro realizado em 24 horas, com análise do teor de AGL e ésteres ao final da reação, e os outros dois com retirada de amostras nos tempos de 10, 18 e 24 horas para análise de teor de AGL. Na Tabela 5.13 são apresentados os resultados das reações com a matéria-prima I do fornecedor “B”.

Tabela 5.13 - Resultados do teor de AGL, conversão e ésteres metílicos dos ensaios com a matéria-prima I do fornecedor “B”, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 10, 18 e 24 horas de reação.

Ensaio	AGL _f	AGL _f	% Conversão	AGL _f	% Conversão	% Éster
	T ₁₀	T ₁₈	T ₁₈	T ₂₄	T ₂₄	T ₂₄
65	-	-	-	4,01 %	96,0	98,5
66	10,35 %	4,38 %	95,6	4,01 %	96,0	-
67	9,50 %	4,39 %	95,6	4,02 %	96,0	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.13 que os resultados de conversão com 18 horas de processo foram satisfatórios pelo baixo valor de AGL que apresentaram. O ensaio 65, o qual teve duração de 24 horas, não apresentou diferença em relação aos ensaios de 18 horas com relação ao teor final de AGL, sendo complementado com um alto valor de éster. Desta forma, pode-se verificar que as melhores condições encontradas para a matéria-prima I podem ser aplicadas as matérias-primas que apresentam características semelhantes. É importante

ressaltar que devido às variações existentes em cada processo de obtenção das matérias-primas, deve-se sempre realizar reações preliminares para identificação de possíveis desvios.

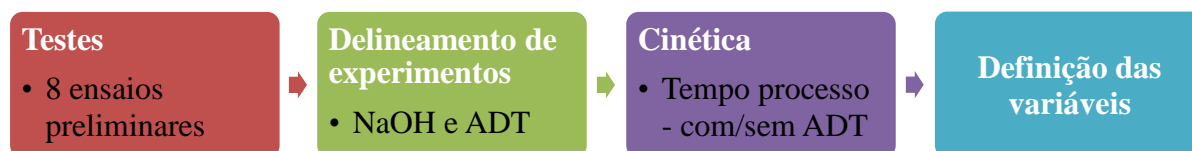
5.2.2 Reações com outras classificações de matérias-primas em sistema de batelada alimentada (shaker)

Após terem sido realizados os testes com a matéria-prima I e definidas as variáveis de processo, realizou-se testes com as outras matérias-primas, classificadas como: matéria-prima II; matéria-prima III; matéria-prima IV. Para as novas matérias-primas não foi utilizada a etapa de lavagem, visto que foi possível produzir ésteres metílicos sem esta etapa. Com o aprendizado adquirido com a matéria-prima anterior, facilitou a busca pelas melhores condições dos novos processos.

5.2.2.1 Reações com a matéria-prima II

Neste item serão descritos os experimentos realizados com a matéria-prima II, sendo os mesmos seguindo o fluxograma apresentado na Figura 5.15.

Figura 5.15 - Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima II.



Fonte: Elaborado pelo autor

A principal característica desta matéria-prima é o alto teor de AGL, sendo este valor acima de 60 %, e o restante é constituído por TAG. A presença de elementos como enxofre (S) e cloro (Cl) presentes no meio é inevitável, tornando-se contaminantes. Foram utilizadas amostras de dois fornecedores (E e F) para o estudo com esta matéria-prima em escala laboratorial, sendo que na Tabela 5.14 são apresentadas suas características básicas.

Tabela 5.14 - Características básicas da matéria-prima II.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,5 – 1,5
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	> 60,0
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	90,0 – 120,0
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	> 185,0

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos conhecimentos adquiridos com os estudos realizados até o momento e alguns testes com esta matéria-prima, foram realizados ensaios iniciais buscando a redução de acidez ao final da reação. Na Tabela 5.15 são apresentados os testes iniciais com a matéria-prima II do fornecedor “E”, utilizando-se duas amostras diferentes, sendo as condições padronizadas em: matéria-prima II sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação. A concentração de enzima foi aumentada em alguns testes em relação à utilizada anteriormente, devido à presença de contaminantes nesta matéria-prima.

Com os resultados da Tabela 5.15 verifica-se que é possível chegar a baixos teores de AGL também com esta matéria-prima, utilizando-se de condições semelhantes da matéria-prima I. O ensaio sem adição de ADT (ensaio 68) não apresentou um bom rendimento, pois o teor de AGL final ficou acima dos 50 %, e a respectiva conversão pouco acima de 40 %, indicando a necessidade de adição de mais elementos para que a reação ocorra. Já os ensaios 69, 70 e 73, apesar de apresentarem baixos teores de AGL ao final da reação, não são exequíveis, pois devido ao alto valor adicionado de ADT ocorre geração intensa de espuma, além de ao final da reação metade do meio reacional ficar como se fosse uma pedra (retirada do pote de reação somente com muita água).

Tabela 5.15 - Resultados do teor de AGL e conversão ao final dos testes iniciais com matéria-prima II do fornecedor “E”, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	% Enzima	% NaOH	% ADT	Amostra	AGL _i T ₀	AGL _f T ₂₄	% Conversão
68	1,0	0,1	0	1	90,03 %	50,92 %	43,4
69	2,0	0,1	20x	1	90,03 %	6,61 %	92,7
70	2,0	0,3	40x	1	90,03 %	4,25 %	95,3
71	2,0	0,1	4x	1	90,03 %	5,90 %	93,5
72	2,0	0,2	2x	1	90,03 %	5,36 %	94,1
73	2,0	0,1	40x	2	93,91 %	4,82 %	94,9
74	2,0	0,2	4x	2	93,91 %	5,05 %	94,6
75	1,5	0,3	4x	2	93,91 %	4,77 %	94,9

Fonte: Elaborado pelo autor

Observando os ensaios 71, 72, 74 e 75 nota-se que com o aumento da adição de NaOH, os valores finais do teor de AGL vão tendendo para 5 %, sendo os resultados obtidos muito expressivos. Também pode ser observado que o melhor resultado encontrado (ensaio 75) ocorreu com uma menor quantidade de catalisador, com redução de 33 % em relação aos outros ensaios.

Tendo em vista os resultados obtidos, realizou-se um delineamento de experimentos com a amostra 2 proveniente do fornecedor “E” variando as concentrações de NaOH e ADT objetivando a confirmação dos resultados e a verificação dos efeitos significativos para este processo. Neste delineamento foram mantidos constantes as seguintes variáveis: matéria-prima II sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 5.16 são apresentados as variáveis e seus níveis do delineamento, bem como na Tabela 5.17 são mostrados seus resultados.

Tabela 5.16 - Variáveis e respectivos níveis do delineamento de experimentos da matéria-prima II do fornecedor “E” (amostra 2).

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
(%) NaOH	0,1	0,3	0,5
(%) ADT	0	2x	4x

Fonte: Elaborado pelo autor

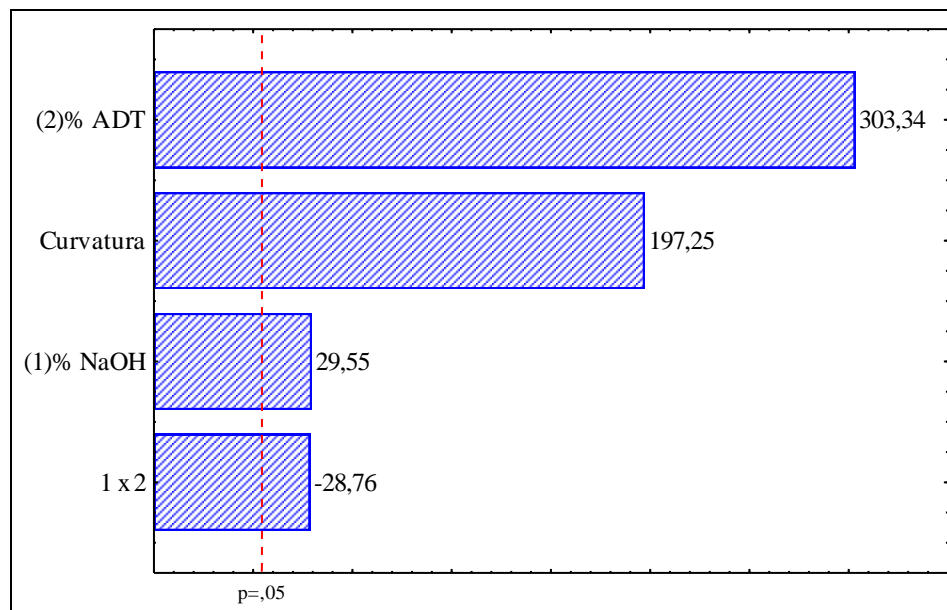
Tabela 5.17 - Resultados do teor de AGL e conversão do delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT, utilizando a matéria-prima II (amostra 2 - fornecedor “E”), em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	% NaOH	% ADT	AGL _i T ₀	AGL _f T ₂₄	% Conversão
76	0,1	0	93,91 %	76,22 %	15,3
77	0,5	0	93,91 %	63,75 %	29,2
78	0,1	4x	93,91 %	5,20 %	94,2
79	0,5	4x	93,91 %	5,03 %	94,4
80	0,3	2x	93,91 %	5,22 %	94,2
81	0,3	2x	93,91 %	5,58 %	93,8
82	0,3	2x	93,91 %	5,20 %	94,2

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados da Tabela 5.17 observa-se que os teores de AGL ao final das 24 horas de reação dos ensaios 78 à 82 foram satisfatórios, com valores próximos a 5 %, conforme os obtidos nos ensaios iniciais. Na Figura 5.16 são apresentados os valores dos efeitos principais e sua interação, relacionados ao percentual de conversão do delineamento de experimentos com as variações das concentrações de NaOH e ADT para a matéria-prima II.

Figura 5.16 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis e sua interação para o delineamento de experimentos variando as concentrações de NaOH e ADT, com a matéria-prima II (amostra 2 - fornecedor “E”), em sistema batelada alimentada (shaker - 45°C/250 rpm) em 24 horas de reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

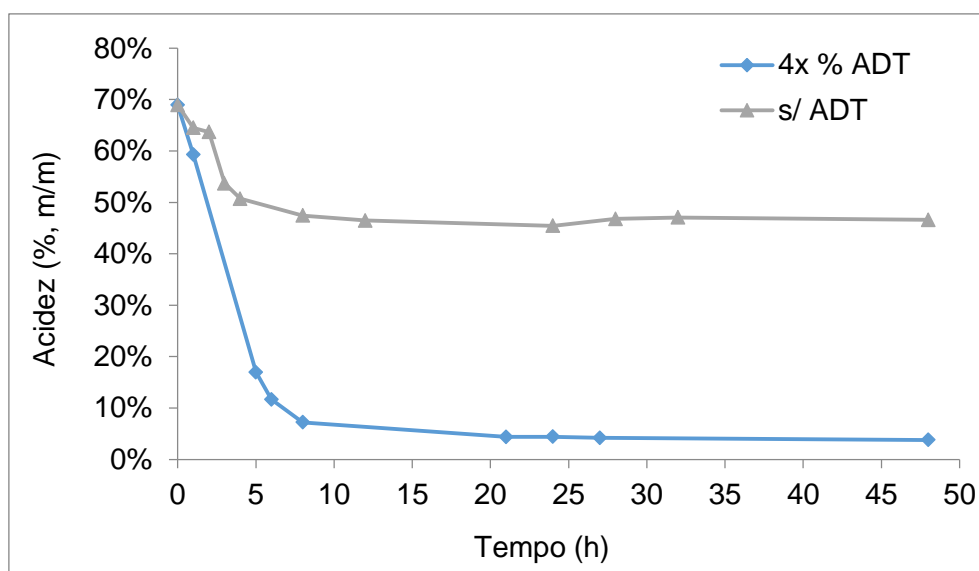
Observa-se a partir do gráfico de Pareto da Figura 5.16 que as duas variáveis foram significativas para o intervalo de 95 % de confiança, sendo 10 vezes maior para a variável ADT em relação a variável NaOH. É importante ressaltar que a sinergia entre as duas variáveis representado pela barra 1x2 obteve um valor negativo, indicando que com o aumento das duas variáveis reduz-se a conversão do teor de AGL. Esta informação deve ser levada em consideração no momento da escolha dos níveis das variáveis para este processo.

Levando-se em consideração os testes iniciais e o delineamento de experimentos realizados, decidiu-se pela adição de 4x % de ADT e 0,3 % de NaOH. Desta forma leva-se em consideração a maior influência do ADT na reação, e também se reduz o NaOH para minimizar o efeito sinérgico negativo.

A partir da definição das variáveis de processo para esta matéria-prima, buscou-se uma amostra de outro fornecedor, para que fosse realizada uma cinética reacional e a confirmação dos resultados obtidos anteriormente. A reação com a matéria-prima II do fornecedor “F” (amostra 1) ocorreu nas seguintes condições: matéria-prima II sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 4x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9

primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Como forma de entender a importância do ADT, foi realizada juntamente com a reação padrão uma cinética retirando o aditivo, onde ambas as cinéticas reacionais para a matéria-prima II do fornecedor “F” (amostra 1) são apresentadas na Figura 5.17.

Figura 5.17 - Cinéticas reacionais com matéria-prima II do fornecedor “F” (amostra 1), com e sem ADT, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).

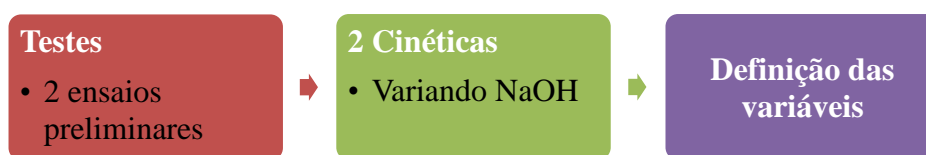


Fonte: Elaborado pelo autor

A partir da Figura 5.17 pode-se observar que a reação sem a presença do ADT não ocorre, ficando o teor de AGL ao final das 48 horas em 46,61 %, mostrando sua importância. Com a presença do aditivo na proporção de 4x % a reação ocorre de forma satisfatória, onde ao final das 48 horas de reação o teor de AGL está em 3,78 % (94,55 % de conversão do AGL inicial). Com estes resultados consegue-se otimizar a produção de ésteres metílicos com a matéria-prima II.

5.2.2.2 Reações com a matéria-prima III

Esta matéria-prima apresenta como principal característica o teor de AGL abaixo de 40 %, e tendo como principal componente os triacilgliceróis (TAG), estando este presente acima de 50 % do total. Na Figura 5.18 é apresentado o fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima III.

Figura 5.18 - Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima III.

Fonte: Elaborado pelo autor

Para esta matéria-prima foram utilizadas amostras de três fornecedores (G, H e I) para o estudo em laboratório, sendo que na Tabela 5.18 são apresentadas as características básicas desta matéria-prima, a qual se caracteriza também por apresentar poucos contaminantes, sendo um meio reacional menos prejudicial para o catalisador.

Tabela 5.18 - Características básicas da matéria-prima III.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,1 - 1,5
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	< 50,0
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	80 - 130
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	> 190

Fonte: Elaborado pelo autor

Devido ao perfil desta matéria-prima as reações são mais longas, desta forma tendem a se estender por até 48 horas.

Com esta matéria-prima foram realizados dois testes iniciais com fornecedores distintos, as quais apresentavam principalmente a característica teor de ácidos graxos livres com perfis diferentes, apresentando os valores de AGL de 2,57 % e 17,95 % para os fornecedores “G” e “H” respectivamente. As reações ocorreram nas seguintes condições: matéria-prima III sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; sem adição de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Tabela 5.19 são apresentados os resultados do teor de AGL, bem como o teor de ésteres para o ensaio do fornecedor “G”, dos testes iniciais com a matéria-prima III.

Tabela 5.19 - Resultados do teor de AGL, conversão e ésteres metílicos dos ensaios iniciais com a matéria-prima III, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 48 horas de reação.

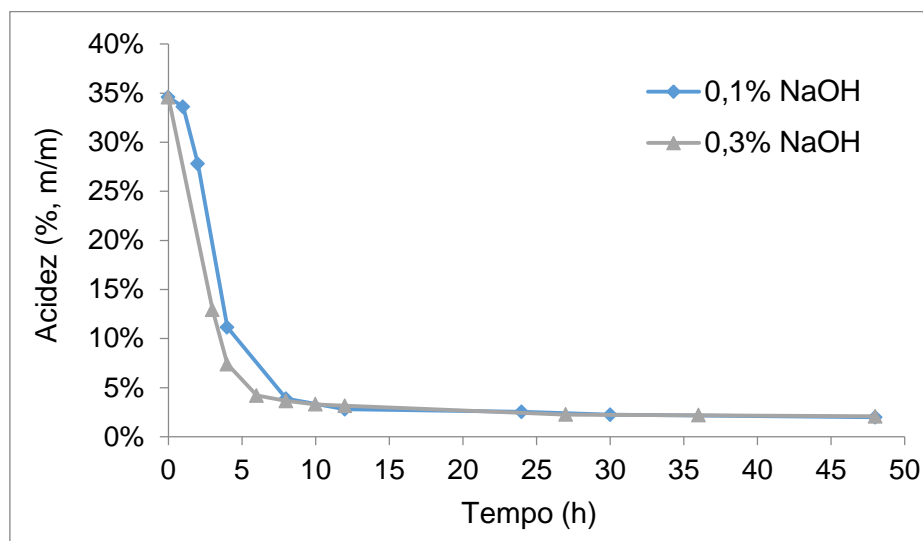
Ensaio	Fornecedor	AGL _i	AGL _f	AGL _f	% Éster
		T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₄₈
83	“G”	2,57 %	1,72 %	1,79 %	98,9
84	“H”	17,95 %	1,91 %	2,10 %	-

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados mostrados na Tabela 5.19, nota-se que não foi feita a comparação do teor de AGL inicial e final do percentual de conversão, pois para esta matéria-prima o teor de AGL é apenas um indicativo de que a reação está ocorrendo, não podendo ser utilizado como parâmetro final da reação. Observando os resultados da Tabela 5.19 pode-se verificar que as reações ocorreram de forma satisfatória, onde a acidez final ficou baixa, indicando uma quantidade muito pequena de AGL no meio reacional. Com o resultado do teor de éster acima dos 96 % para a reação 83 nota-se que praticamente toda a matéria graxa presente inicialmente foi transformada em éster metílico, confirmando o ótimo resultado da reação.

Objetivando a confirmação dos resultados obtidos até o presente momento com a matéria-prima III realizou-se duas cinéticas reacionais com a matéria-prima de outro fornecedor “T”, a qual apresentou teor de AGL inicial de 34,58 %. As duas cinéticas foram realizadas nas seguintes condições padronizadas, apenas variando a concentração de NaOH: matéria-prima III sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,1 e 0,3 % de NaOH; sem adição de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.19 são apresentadas as cinéticas reacionais para a matéria-prima III para o fornecedor “T”.

Figura 5.19 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima III do fornecedor “I”, com 0,1 e 0,3 % de NaOH, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).

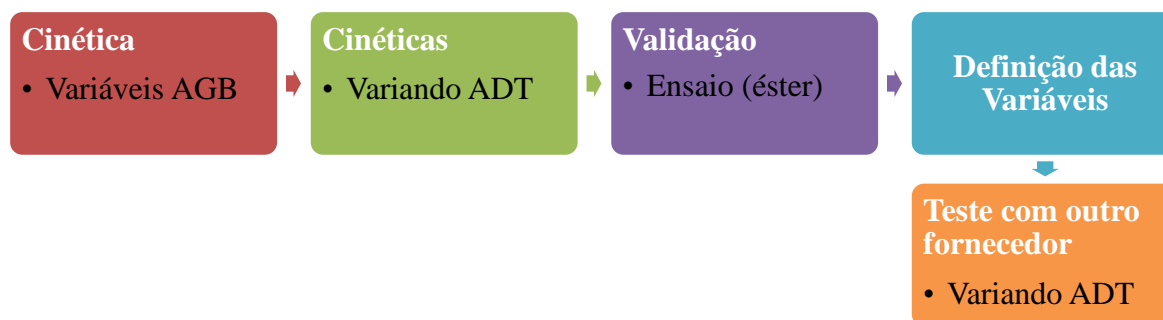


Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5.19 observa-se que ambas as reações tiveram acidez final próximo de 2,0 %, indicando que a reação ocorreu de forma satisfatória. A reação com 0,3 % de NaOH apresentou uma queda de acidez inicial maior, mas ao final das 48 horas de reação não se mostrou tão efetivo, com resultados do teor de AGL praticamente iguais - 1,99 % para 0,1 % e 2,08 % para 0,3 %. Desta forma os resultados demonstram que o NaOH auxilia na reação, mas para este tipo de matéria-prima e longos períodos de tempo reacional não necessita de concentrações elevadas.

5.2.2.3 Reações com a matéria-prima IV

A matéria-prima IV é proveniente do resíduo gerado pelas indústrias de biodiesel. Na Figura 5.20 é apresentado o fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima IV, os quais serão descritos detalhadamente neste item.

Figura 5.20 - Fluxograma dos ensaios realizados com a matéria-prima IV.

Fonte: Elaborado pelo autor

Remonato (2017) utilizou em seus estudos em shaker um material graxo com 33 % de ésteres e 42 % de AGL, tendo denominado como óleo ácido residual. Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras da matéria-prima IV de dois fornecedores diferentes (K e L), sendo que na Tabela 5.20 são apresentadas as características básicas desta matéria-prima.

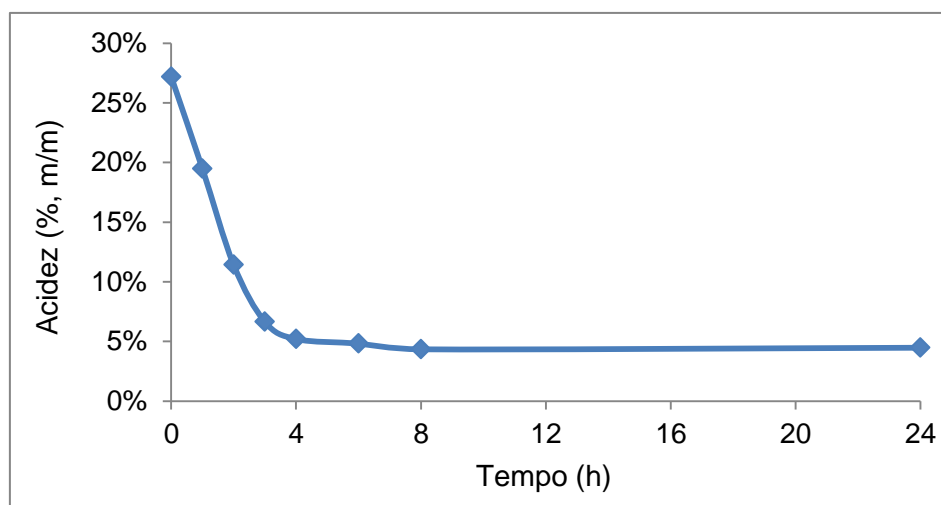
Tabela 5.20 - Características básicas da matéria-prima IV.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,1 - 1,5
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	20,0 - 50,0
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	90 - 120
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	> 190

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados obtidos até o momento, o primeiro ensaio realizado com esta matéria-prima foi uma cinética reacional com o intuito de entender o comportamento da redução do teor de AGL ao longo da reação. Para este ensaio foram utilizadas as melhores condições encontradas para a matéria-prima II, tendo em vista a falta de informações, sendo elas: matéria-prima IV sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 4x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.21 é apresentada a cinética reacional para a matéria-prima IV do fornecedor “K”, realizada em shaker (45 °C/250 rpm) durante 24 horas.

Figura 5.21 - Cinética reacional com a matéria-prima IV do fornecedor “K”, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

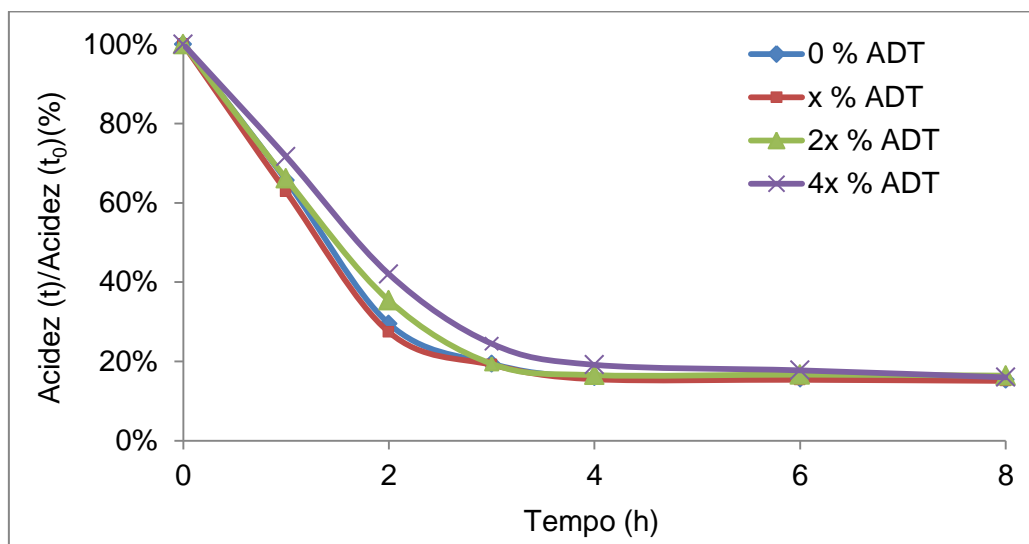
Observa-se na Figura 5.21 que o teor de AGL já se encontra próximo dos valores ideais (5 %) a partir das 4 horas de processo, sendo que neste tempo apenas 4 das 10 adições de metanol tinham sido realizadas. Como a matéria-prima possui em média uma baixa quantidade de TAG's, não se tem necessidade da adição de 6:1 a razão molar MeOH:MG.

Para entender melhor este fenômeno, foram realizadas quatro cinéticas reacionais variando a quantidade de ADT adicionado nas reações em 0 %, x %, 2x % e 4x % e reduzindo-se a razão molar MeOH:MG para 3:1 em 6 adições, mantendo as outras condições constantes, como segue: matéria-prima IV sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 3:1; alimentação do metanol em 6 frações iguais de hora em hora durante as 5 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Para facilitar a comparação das cinéticas, os resultados do teor de AGL para as cinéticas reacionais foram levados a uma mesma base de percentual do teor de AGL presente [teor AGL (t)/teor AGL (t₀)], apresentados na Figura 5.22.

Observa-se nesta figura que com a diminuição da quantidade do ADT adicionado a reação ocorre de forma mais rápida, chegando a uma redução de 14 % na Acidez relativa no tempo reacional de 2 horas, quando comparadas as condições de 0 % e x % em relação a condição de 4x %. Também observa-se que ao final das 8 horas reacionais todas as reações convergem para 16 % do teor de AGL relativo, sendo o teor de AGL próximo de 4 % neste ponto. Outro ponto a ser destacado é que a redução da razão molar de 6:1 para 3:1, juntamente

com a redução das adições de metanol de 10 para 6, não interferiram nas reações, chegando ao final em valores do teor de AGL satisfatórios.

Figura 5.22 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV do fornecedor “K”, variando a quantidade do ADT em 0 %, x %, 2x % e 4x %, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

Para a validação dos resultados foi realizada uma reação de 16 horas com a matéria-prima IV do fornecedor “K”, com as seguintes condições: matéria-prima IV sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 3:1; alimentação do metanol em 6 frações iguais de hora em hora durante as 5 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato).

Na Tabela 5.21 é apresentado o teor de AGL, bem como o percentual de ésteres no final da reação de 16 horas. A escolha pela concentração de x % de ADT ocorreu porque esta concentração apresentou praticamente o mesmo resultado do que sem adição de ADT, mas devido a variabilidade existente na matéria-prima, é importante a presença deste elemento para dar maior robustez ao processo.

Tabela 5.21 - Resultados do teor de AGL e ésteres metílicos do ensaio de validação com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 16 horas de reação.

Ensaio	Fornecedor	AGL _i T ₀	AGL _f T ₁₆	% Éster T ₁₆
85	“K”	25,88 %	3,53 %	95,9

Fonte: Elaborado pelo autor

Na Tabela 5.21 pode-se verificar que a reação nas novas condições ocorreu de forma satisfatória, apresentando baixo valor no teor de AGL em 16 horas de reação e um excelente valor de ésteres metílicos. É importante salientar que o tempo reacional deve estar sempre relacionado com a quantidade de AGL presentes na matéria-prima, pois caso este valor seja muito baixo, significa a existência de uma maior quantidade de MAG, DAG e TAG, necessitando de um tempo maior de reação para hidrólise e posterior esterificação.

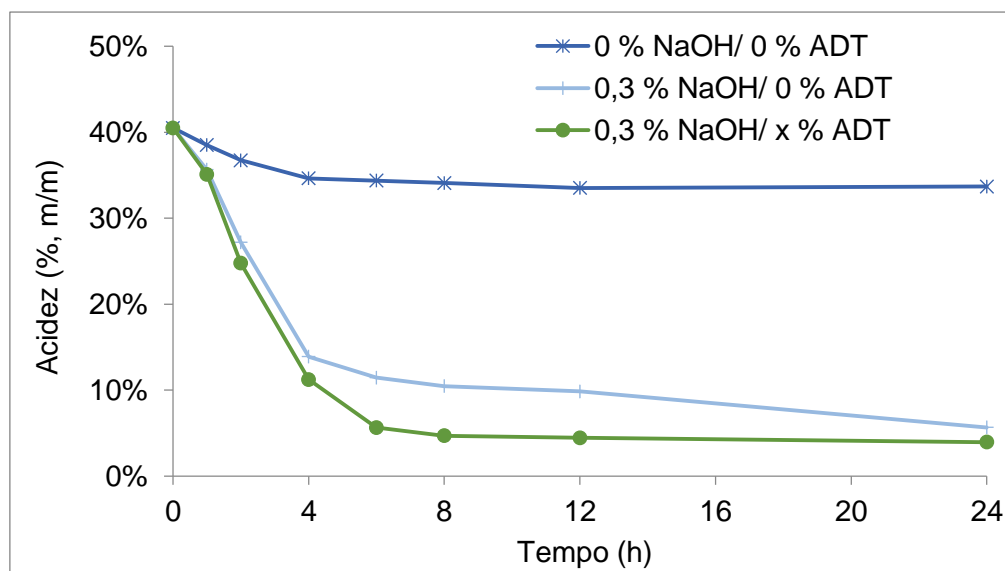
Com o intuito de confirmar os resultados obtidos com esta matéria-prima, buscou-se uma amostra de outro fornecedor (“L”) para que fossem realizados alguns testes. Com a amostra do novo fornecedor (amostra 1) foram realizadas três cinéticas reacionais variando as quantidades adicionadas de NaOH e ADT, visando entender o efeito destes elementos na reação com a matéria-prima IV. A acidez inicial da amostra foi de 40,34 %, sendo um pouco acima do padrão inicialmente utilizado, desta forma optou-se por manter a reação por 24 horas. Na Tabela 5.22 são apresentadas as condições utilizadas nos três ensaios para os elementos NaOH e ADT e os resultados do teor de AGL ao final da reação, sendo que as seguintes variáveis permaneceram constantes: matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 1) sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); razão molar MeOH:MG de 3:1; alimentação do metanol em 6 frações iguais de hora em hora durante as 5 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.23 são apresentadas as três cinéticas reacionais para os respectivos ensaios.

Tabela 5.22 - Condições dos ensaios e resultados do teor de AGL e conversão com a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 1), em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm) em 24 horas de reação.

Ensaio	Fornecedor	% NaOH	% ADT	AGL _i T ₀	AGL _f T ₂₄
86	“L”	0	0	40,34 %	33,69 %
87	“L”	0,3	0	40,34 %	5,65 %
88	“L”	0,3	x	40,34 %	3,94 %

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.23 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 1), variando as concentrações iniciais de NaOH e ADT, em sistema batelada alimentada (shaker - 45 °C/250 rpm).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5.23 pode-se observar bem a importância dos dois elementos nas cinéticas reacionais, resultando em valores bem diferentes do teor de AGL ao final da reação. Sem a presença de ambos os elementos a reação não ocorre, onde menos de 20 % do teor de AGL inicial foi utilizado. Já na presença do NaOH e sem o segundo elemento ADT a reação ocorre mais lentamente, não atingindo um valor ideal do teor de AGL ao final das 24 horas de reação. Quando são adicionados os dois elementos, a reação ocorre de forma satisfatória, atingindo-se níveis abaixo de 5 % no teor final de AGL, confirmando assim os resultados inicialmente conseguidos com o fornecedor “K”. Este mesmo efeito sinérgico com NaOH e

ADT foi observado com a matéria-prima II, sendo imprescindível a presença de ambos para que a reação ocorra.

5.3 DEFINIÇÕES DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO PARA AS DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS EM ESCALA LABORATORIAL

Neste item serão descritas as variáveis adotadas para as quatro matérias-primas classificadas e estudadas, visando obter uma metodologia para os testes de aumento de escala em piloto e planta industrial. Sabe-se que todo aumento de escala precisa-se posteriormente de ajustes devido às variações inerentes a equipamentos e dificuldades de controle das variáveis, mas sempre é importante ter-se um padrão pré-estabelecido para se iniciar os referidos testes.

Na Tabela 5.23 são apresentadas as características básicas das matérias-primas I, II, III e IV. As variáveis e seus respectivos valores para a obtenção do menor teor final de AGL e a maior produção de ésteres metílicos em shaker são apresentados na Tabela 5.24. É importante salientar que as matérias-primas que não se enquadrarem nas características básicas das quatro classificadas neste estudo, merecem uma atenção especial com estudo aprofundado e ensaios mais detalhados.

Tabela 5.23 - Características básicas das matérias-primas classificadas como I, II, III e IV.

Análises	Resultados/Matéria-prima			
	MP I	MP II	MP III	MP IV
<i>Umidade (%)</i>	0,5 - 2,5	0,5 - 2,0	0,1 - 2,0	0,1 - 2,0
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	> 60	> 60	< 50	20 - 50
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	110 - 135	90 - 135	80 - 135	90 - 135
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	> 185	> 185	> 185	> 185

Fonte: Elaborado pelo autor

MP I - matéria-prima I; MP II - matéria-prima II; MP III - matéria-prima III; MP IV - matéria-prima IV.

Tabela 5.24 - Variáveis reacionais para as matérias-primas classificadas como I, II, III e IV.

Variável	Valor/Matéria-prima			
	MP I	MP II	MP III	MP IV
<i>Teor de água adicionada (%)</i>	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Concentração da enzima (%)</i>	1,0	1,5	1,5	1,5
<i>Razão molar (MeOH:MG)</i>	6:1	6:1	6:1	3:1
<i>Número de adições de MeOH (NAD)</i>	10	10	10	6
<i>Adição de NaOH (%)</i>	0,3	0,3	0,1 - 0,2	0,3
<i>Adição de ADT (%)</i>	2x	4x	-	x
<i>Tempo de reação (h)</i>	16 - 36	24 - 48	24 - 48	16 - 36

Fonte: Elaborado pelo autor

MP I - matéria-prima I; MP II - matéria-prima II; MP III - matéria-prima III; MP IV - matéria-prima IV.

* *Tempo reacional*: o tempo reacional pode variar principalmente pela presença de diferentes quantidades de MAG, DAG e TAG, devido à necessidade de hidrólise e esterificação da matéria-prima.

5.4 SCALE-UP PARA PILOTO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO EM SISTEMA DE BATELADA ALIMENTADA

Com as definições das variáveis para as quatro classificações de matérias-primas realizadas em shaker, pode-se dar sequência ao trabalho na etapa de aumento de escala, sendo no primeiro momento para a escala piloto. As reações em escala piloto foram realizadas nas empresas Transfertch Gestão e Inovação Ltda e Prisma Brazil - divisão ésteres, conforme descrito no item 4.1.5.2.

A reação com a matéria-prima I foi a primeira a ser realizada em escala piloto, por ter sido a matéria-prima mais estudada em escala laboratorial, sendo posteriormente realizados os ensaios piloto com as demais matérias-primas. Nos subitens a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios de aumento de escala para piloto, sendo o procedimento adotado conforme o item 4.2.6.

5.4.1 Scale-Up Para Piloto Utilizando a Matéria-Prima I

Para a matéria-prima I foram realizadas duas reações em escala piloto, com e sem lavagem, com o intuito de verificar os resultados de produção de ésteres metílicos, comparando-os com os obtidos em shaker. A matéria-prima utilizada na primeira reação foi proveniente do fornecedor A, amostra 2, sendo o mesmo fornecedor utilizado nos testes de otimização realizados em laboratório. Na tabela 5.25 são apresentadas as características básicas da matéria-prima I do fornecedor A (amostra 2).

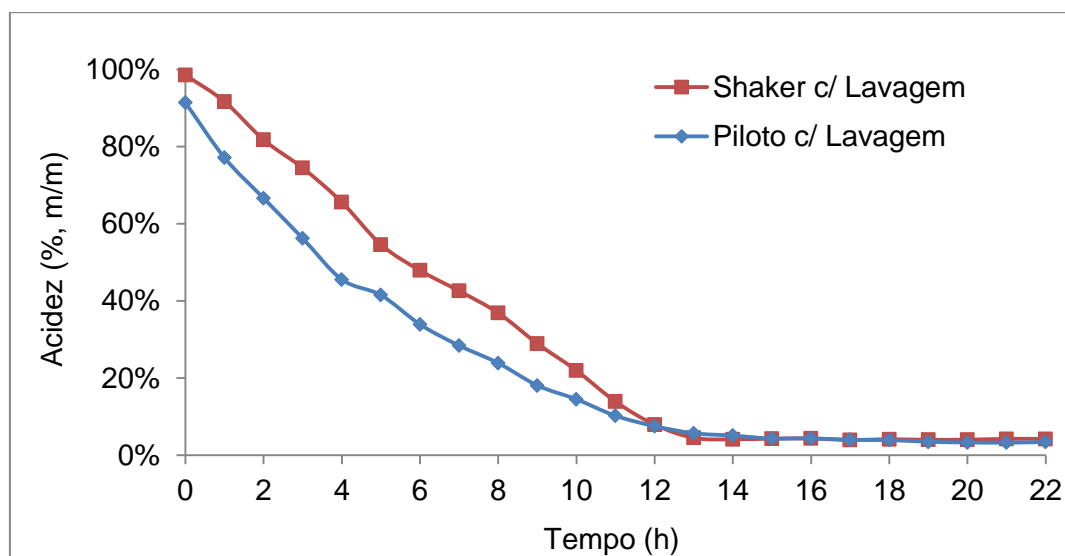
Tabela 5.25 - Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “A” (amostra 2), utilizada na primeira reação piloto.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,5
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	91,42
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	128,4
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	197,6

Fonte: Elaborado pelo autor

A primeira reação em escala piloto ocorreu com a lavagem da matéria-prima I com 10 % de água da rede de abastecimento, sendo após iniciado o processo reacional. Esta primeira reação ocorreu nas seguintes condições: matéria-graxa lavada com 10 % de água (m/m, em relação ao substrato); 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.24 são apresentadas as cinéticas reacionais com a matéria-prima I do fornecedor A com lavagem, nos sistemas shaker (amostra 1) e piloto (amostra 2).

Figura 5.24 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima I com lavagem, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Figura 5.24 que a reação em escala piloto ocorreu de forma satisfatória, com a redução do teor de AGL inicial de 91,42 % para valores próximos a 4 %. Nota-se que a partir da décima quinta hora da reação o teor de AGL já estava abaixo dos 5 % (4,35 %), permanecendo praticamente constante até o final das 22 horas de reação. Esses valores estão muito próximos ao encontrado em escala laboratorial, mostrando a possibilidade de produção de ésteres metílicos em escalas maiores (piloto). É importante salientar que as condições utilizadas em shaker e piloto foram as mesmas, apenas foi aumentada a concentração enzimática em piloto de 1,0 % para 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Esse aumento se fez necessário para garantir que a reação ocorresse, tendo em vista a quantidade de matéria-prima utilizada, o que poderia se tornar um subproduto sem destinação. A partir dos resultados realizados em laboratório, com aumento do catalisador a reação ocorre mais rapidamente, ou seja, o tempo total é menor, não afetando outras variáveis do processo.

É importante ressaltar que apesar das matérias-primas utilizadas nas reações de shaker e piloto serem do mesmo fornecedor “A”, apresentam pequenas variações em suas características básicas, principalmente no teor de AGL inicial, sendo shaker - 98,55 % e piloto - 91,42 %, o que não ocasionou diferença ao final da reação.

Como a otimização final da matéria-prima I ocorreu sem lavagem e com adição de ADT, foi realizada uma segunda reação piloto com esta matéria-prima, para verificar o comportamento do novo procedimento em maior escala. Esta matéria-prima foi proveniente

do fornecedor “C”, apresentando um teor de AGL inicial de 79,18 %, com as características básicas sendo apresentadas na Tabela 5.26.

Tabela 5.26 - Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “C”, utilizada na segunda reação piloto.

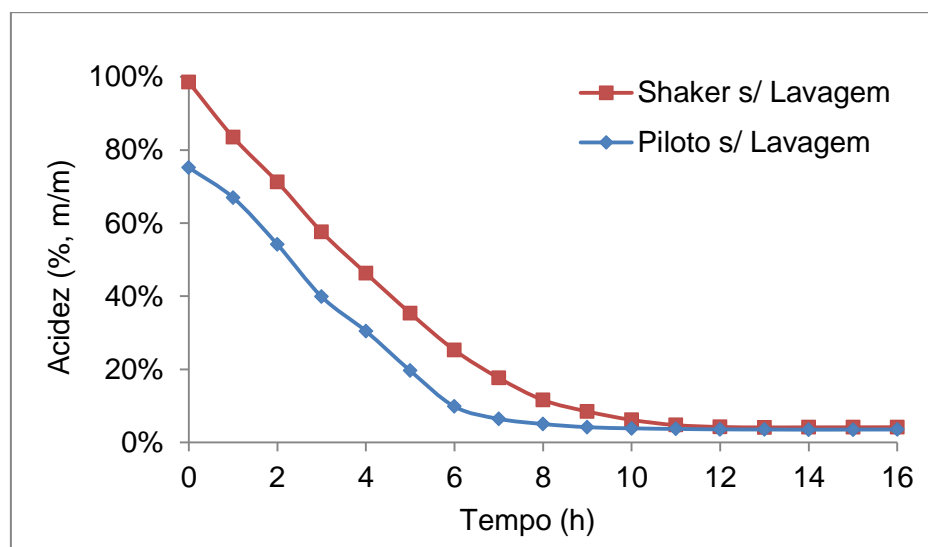
Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	5,2
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	79,18
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	107,4
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	194,2

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.26 que duas características básicas ficaram fora dos padrões pré-estabelecidos para esta matéria-prima (apresentados na Tabela 5.23), sendo a umidade de 5,2 % acima dos 2,5 % estabelecidos e o índice de iodo de 107,4 g I₂/100g ficando abaixo dos 110 g I₂/100g do padrão. Apesar destes valores diferentes da especificação pré-determinada, foi realizada a reação como sendo matéria-prima I, tendo em vista que a umidade não interfere de forma significativa neste processo enzimático e o índice de iodo ficou muito próximo do valor padrão, não descaracterizando por completo a amostra. O valor baixo do índice de iodo pode significar que a matéria-prima está contaminada com outros materiais graxos diferentes de soja, o que não inviabiliza o processo.

As condições de processo para a segunda reação piloto foram: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.25 são apresentadas as cinéticas reacionais da matéria-prima I sem lavagem e com adição de ADT em escala laboratorial e piloto.

Figura 5.25 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima I sem lavagem e com ADT, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

A partir da Figura 5.25 pode-se observar que a reação em escala piloto ocorreu de forma satisfatória, apresentando resultados de teor de AGL abaixo de 5 % após 9 horas de reação (4,18 %). A diferença existente na cinética entre shaker e piloto se deve a maior quantidade de enzima utilizada na reação do piloto, fazendo com que a queda no teor de AGL ocorra mais rapidamente. Outro ponto importante que influencia na redução mais rápida na acidez é que a matéria-prima utilizada na reação piloto apresentou um teor de AGL inicial menor.

Para o melhor acompanhamento da reação, além das análises do teor de AGL no meio reacional, foram realizadas análises do percentual de glicerina combinada na fase éster. A glicerina combinada inclui mono-, di- e triglicerídeos, sendo proveniente da reação incompleta dos glicerídeos, logo é uma importante grandeza utilizada na avaliação da eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; PRICE et al., 2016). Estes autores também comentam que a glicerina combinada é calculada a partir das concentrações de mono-, di- e triglicerídeos presentes na amostra, aplicando-se fatores de conversões individuais baseados na massa molar média dos ácidos graxos que participam da composição da matéria-prima. A glicerina combinada tem sido muito utilizada nas indústrias de biodiesel no intuito de verificar a eficiência da reação, sendo que seu limite máximo deve ser de 0,23 %_{massa}.

Desta forma, na segunda reação em reator piloto foi realizado também o acompanhamento por meio de análises de glicerina combinada, conforme os resultados podem ser verificados na Tabela 5.27.

Tabela 5.27 - Resultados do percentual de glicerina combinada da segunda reação piloto, utilizando a matéria-prima I do fornecedor “C”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
0/MP	0,71
10	0,18
12	0,17
14	0,14

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados apresentados na Tabela 5.27 pode-se observar que a glicerina combinada já estava abaixo do limite máximo de 0,23 %_{massa} a partir de 10 horas de reação. Este valor, combinado com o valor do teor de AGL de 3,87 % neste mesmo tempo reacional, indica que a produção de ésteres metílicos poderia ser finalizada.

Desta forma, o aumento de escala para piloto se mostrou satisfatório para a matéria-prima I a partir das variáveis definidas em laboratório, tendo que ser verificado para as demais matérias-primas de baixo custo.

5.4.2 Scale-Up Para Piloto Utilizando Outras Matérias-Primas de Baixo Custo

Após a realização dos testes em piloto com a matéria-prima I e os resultados satisfatórios obtidos, foram realizadas reações com os outros três tipos de matérias-primas: matéria-prima II; matéria-prima III; matéria-prima IV. Todos os testes foram realizados conforme descrito no item 4.2.6, sendo seus resultados apresentados e discutidos a seguir.

5.4.2.1 Reações piloto com a matéria-prima II

Para esta matéria-prima foram realizadas duas reações em escala piloto com amostras provenientes de fornecedores diferentes. Na Tabela 5.28 podem ser observadas as características básicas da matéria-prima II dos fornecedores “E” e “F” que foram utilizadas na terceira e quarta reações piloto respectivamente.

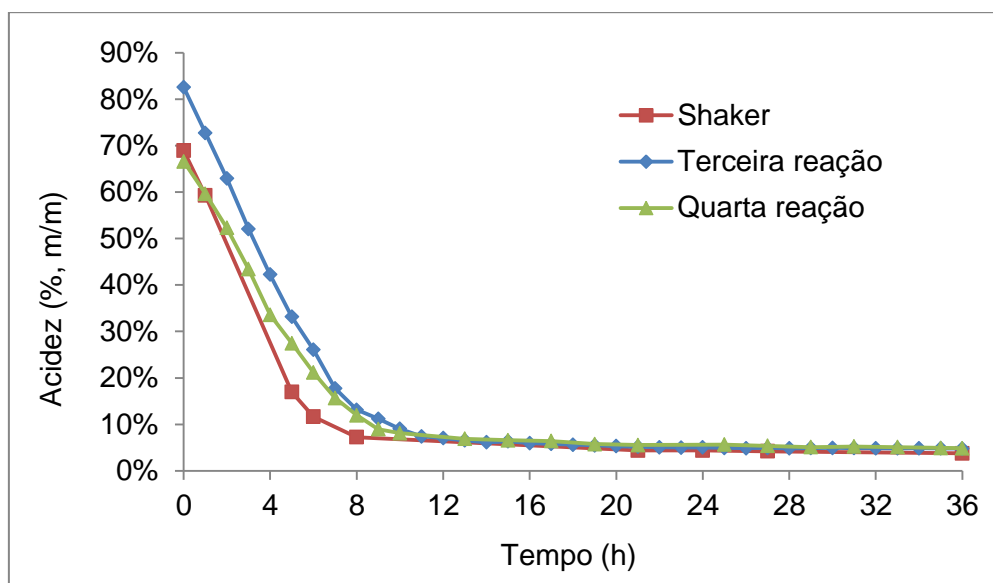
Tabela 5.28 - Características básicas da matéria-prima II dos fornecedores “E” (amostra 3) e “F” (amostra 1), utilizadas nas terceira e quarta reações piloto respectivamente.

Análises	Resultados	
	Fornecedor “E”	Fornecedor “F”
<i>Umidade (%)</i>	1,0	1,1
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	84,50	68,95
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	99,6	114,2
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	199,3	197,8

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.28 que as duas matérias-primas utilizadas se enquadram dentro das características básicas definidas para este material graxo, conforme apresentadas na Tabela 5.23. A terceira e a quarta reações piloto realizadas seguiram as variáveis padronizadas após as reações em shaker, apenas alterando o número de adições de metanol de 10 para 12. Esse ajuste se faz necessário devido a grande variação que esta matéria-prima apresenta, sendo que com uma menor quantidade de metanol no meio reacional ocorrerá uma menor inativação da enzima por este fator. Outro fator que implica na quantidade de adições de metanol é o longo tempo reacional, existindo a necessidade da enzima ficar ativa por mais tempo. As duas reações realizadas seguiram as seguintes condições: matéria-prima II sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 4x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 12 frações iguais de hora em hora durante as 11 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.26 são apresentadas as cinéticas reacionais da matéria-prima II em escala laboratorial (shaker) e piloto (terceira e quarta reações).

Figura 5.26 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima II, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Pode-se observar na Figura 5.26 que as reações em escala piloto obtiveram resultados satisfatórios, chegando ao final das reações com um teor de AGL abaixo dos 5 %. Pode-se observar na mesma Figura que a matéria-prima da terceira reação possuía um teor de AGL inicial mais alto, entretanto ao final da reação seu valor também estava abaixo dos 5 %. Outro ponto importante a ser analisado é que as cinéticas reacionais do shaker e da quarta reação piloto apresentam diferenças na redução do teor de AGL, mesmo sendo realizadas com a mesma matéria-prima. Essa diferença é atribuída ao aumento do número de adições de metanol realizadas no ensaio piloto (10 adições - shaker e 12 adições - piloto), ocasionando uma menor concentração de metanol no meio e uma redução do teor de AGL mais lenta.

5.4.2.2 Reações piloto com matéria-prima III

Para a matéria-prima III foram realizadas duas reações em escala piloto, sendo amostras provenientes dos fornecedores “H” e “I”. As matérias-primas para a quinta e sexta reações apresentaram perfis dentro das características básicas definidas no item 5.3, as quais estão descritas na Tabela 5.29.

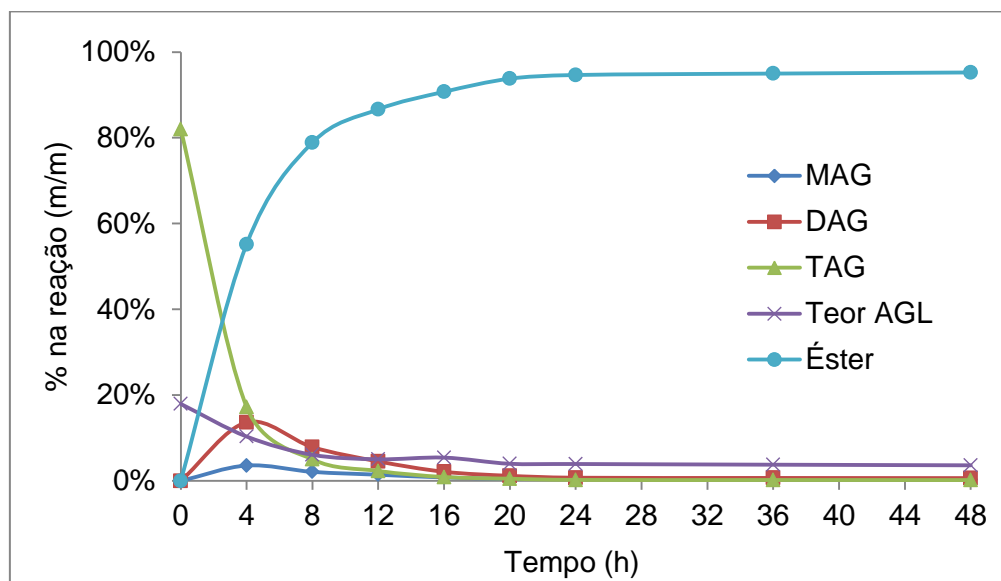
Tabela 5.29 - Características básicas da matéria-prima III dos fornecedores “H” e “I”, utilizadas nas quinta e sexta reações piloto respectivamente.

Análises	Resultados	
	Fornecedor “H”	Fornecedor “I”
<i>Umidade (%)</i>	1,4	0,1
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	17,95	34,58
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	82,6	122,1
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	194,5	195,5

Fonte: Elaborado pelo autor

A quinta reação piloto foi realizada com a matéria-prima III, apresentando um baixo índice de iodo. Esta reação ocorreu nas seguintes condições: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,1 % de NaOH; sem adição de ADT; razão molar MeOH:MG de 4,5:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 2,0 % (m/m, em relação ao substrato). As condições desta reação nas variáveis razão molar e concentração de enzima sofreram alteração em relação aos padrões descritos para esta matéria-prima em escala laboratorial. A razão molar utilizada em reações com matérias-primas que apresentam baixa acidez inicial pode ser reduzida segundo estudos realizados por Remonatto (2017), tendo em vista que a maior parte da água do processo reacional será utilizada para a hidrólise dos TAG, sendo reduzido seu teor no final da reação. Com um menor percentual de água ao final da reação, será necessária uma menor concentração de metanol no meio para o deslocamento da reação no sentido da produção de ésteres. Desta forma a quinta reação piloto foi realizada com uma redução da quantidade de metanol adicionado (razão molar MeOH:MG) de 6:1 para 4,5:1. A concentração enzimática foi aumentada de 1,5 % para 2,0 % pois as reações com este tipo de matéria-prima tendem a ser longas (48 horas), desta forma garante-se a que a reação será finalizada neste período. Na Figura 5.27 são apresentadas as cinéticas reacionais com a matéria-prima III do fornecedor “H” da quinta reação piloto, sendo apresentados os resultados de MAG, DAG, TAG, teor de AGL e ésteres.

Figura 5.27 - Cinéticas reacionais dos resultados de MAG, DAG, TAG, teor de AGL e ésteres com a matéria-prima III, em sistema batelada alimentada em reator piloto - quinta reação ($45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Elaborado pelo autor

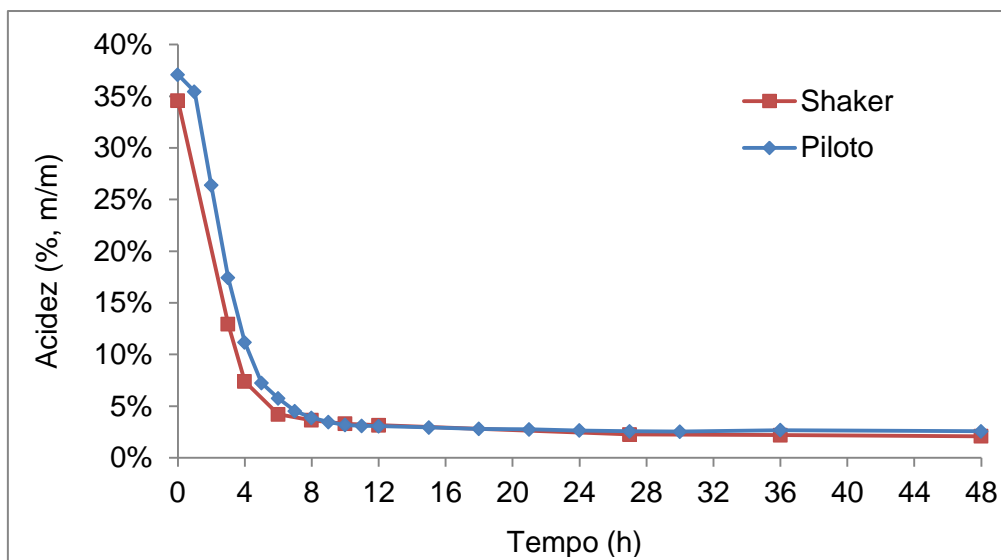
Como a matéria-prima III possui um baixo teor de AGL inicial, somente o acompanhamento desta por acidez não seria suficiente para a verificação do andamento da reação, sendo necessárias as análises de MAG, DAG e TAG, ou a análise de glicerina combinada. Observa-se na Figura 5.27 que a reação ocorreu de forma satisfatória, sendo que após 24 horas de reação o teor de AGL já estava abaixo de 4 % (3,94 %) e o teor de éster maior que 94 % (94,65 %). Estes valores são considerados muito bons, visto que se trata de uma matéria-prima subproduto da indústria, que possui um baixo valor de mercado. Os valores de MAG, DAG e TAG estavam em 0,43 %, 0,75 % e 0,23 %, respectivamente, em 24 horas de processo, também sendo considerados satisfatórios. Estes resultados estão muito próximos aos encontrados por Remonatto (2017), onde a autora utilizando material graxo residual com 3,52 % de acidez inicial obteve os resultados de MAG, DAG, TAG, teor de AGL final e éster de 0,36 %, 3,16 %, 0,57 %, 0,73 % e 95,17 % respectivamente.

Buscando a diversificação das reações em escala piloto, e desta forma o conhecimento das variações existentes nas matérias-primas, a sexta reação piloto também ocorreu com a matéria-prima III de outro fornecedor (fornecedor "I"), sendo que a amostra apresentou teor inicial de AGL de 34,58 %. Apesar de classificada como -matéria-prima III devido suas características básicas padronizadas (Tabela 5.23), a reação com este material graxo com maior acidez teve algumas variáveis ajustadas em relação à quinta reação piloto, sendo a

razão molar aumentada de 4,5:1 para 6:1 e a quantidade de NaOH adicionado aumentado de 0,1 % para 0,3 %. O aumento na razão molar de metanol se deve a necessidade do aumento da concentração final de metanol no término da reação, objetivando deslocar o equilíbrio no sentido da formação de éster. A maior quantidade de soda se faz necessária para propiciar um meio mais adequado para a enzima, evitando sua desnaturação.

Na sexta reação piloto foram utilizadas as seguintes condições: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; sem adição de ADT; razão molar MeOH:MG de 6,0:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.28 são apresentadas as cinéticas reacionais da matéria-prima III (fornecedor “I”) em escala piloto (sexta reação) e escala laboratorial.

Figura 5.28 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima III (fornecedor “I”), em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e piloto - sexta reação (45°C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5.28 constata-se que o teor de AGL reduziu rapidamente nas primeiras horas de reação, tanto no ensaio em shaker, como no ensaio em piloto, tornando-se constante a partir da vigésima hora de reação. Como se trata de uma matéria-prima com alto teor de TAG, somente a medida de acidez não é suficiente para verificação do andamento da reação, com isso foi realizada a análise de glicerina combinada no tempo de 36 horas na reação piloto, obtendo-se o resultado de 0,21 %_{massa}. Desta forma, verifica-se que a reação já estava

completa nas 36 horas, com um valor de glicerina combinada dentro do limite estabelecido (< 0,23 %_{massa}) e com um teor de AGL de 2,68 %.

Para ambas as matérias-primas classificadas como matéria-prima III, independente da variabilidade devido ao fornecedor e origem de obtenção, o processo de aumento de escala para piloto se mostrou satisfatório, sendo seus resultados próximos aos obtidos em escala laboratorial.

5.4.2.3 Reações piloto com a matéria-prima IV

A matéria-prima IV foi utilizada em duas reações em escala piloto, a sétima e oitava reações. Nestas reações a matéria-prima utilizada foi proveniente do fornecedor “L”, sendo as amostras 1 e 2. As características básicas destas amostras estavam dentro do perfil previamente estabelecido no item 5.3, sendo descritas na Tabela 5.30.

Tabela 5.30 - Características básicas da matéria-prima IV do fornecedor “L”, amostras 1 e 2, utilizadas nas sétima e oitava reações piloto respectivamente.

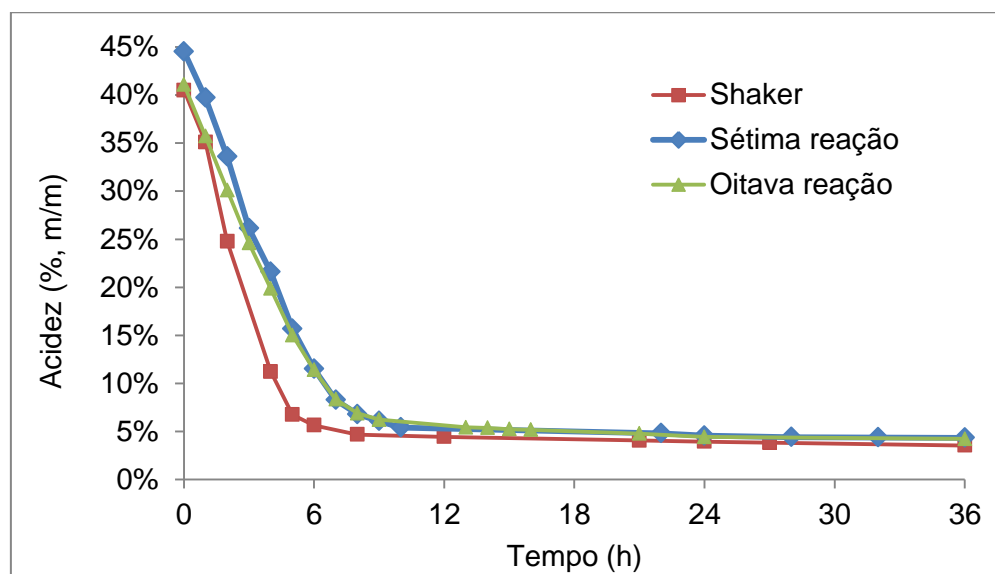
Análises	Resultados	
	Amostra 1	Amostra 2
<i>Umidade (%)</i>	0,8	0,4
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	40,78	33,27
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	103,2	97,2
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	197,9	197,8

Fonte: Elaborado pelo autor

A Sétima reação piloto foi realizada com a mesma matéria-prima das reações em shaker para o fornecedor “L” (amostra 1). Já a oitava reação piloto ocorreu com matéria-prima proveniente do mesmo fornecedor, sendo outra amostra, a qual apresentou um teor de AGL inicial um pouco menor (amostra 2). Ambas as reações piloto realizadas seguiram as variáveis padrões pré-estabelecidas após as reações em shaker, apenas alterando o número de adições de metanol de 6 para 10, evitando assim uma concentração elevada de metanol no meio, podendo ser prejudicial para a enzima. As duas reações foram realizadas com as seguintes condições: matéria-prima IV sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 4,5:1; alimentação do

metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.29 são apresentadas as cinéticas reacionais da matéria-prima IV em escala laboratorial (shaker) e piloto (sétima e oitava reações).

Figura 5.29 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm) e reator piloto (45°C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Figura 5.29 que as duas cinéticas reacionais em escala piloto (sétima e oitava) apresentaram comportamentos semelhantes, apesar de possuírem um valor inicial de AGL diferentes. Estas duas reações tiveram valores de AGL abaixo de 5 % após 20 horas de reação, permanecendo constantes após 24 horas. Outro ponto importante a ser verificado é que a cinética do shaker ocorreu de forma mais rápida comparando-se com as cinéticas em piloto. Esse fato está relacionado à reação em shaker ter sido realizada com apenas 6 adições de metanol, ou seja, a concentração de metanol no meio na reação em shaker foi maior do que os reações em escala piloto (10 adições de metanol - menor concentração no meio), fazendo com que a queda do teor de AGL ocorresse mais rapidamente.

Apesar desta matéria-prima possuir um teor de AGL elevado no início da reação, possui uma grande quantidade de TAG que precisa ser transformada em éster, portanto somente o valor de acidez final do processo não é um indicativo de que a reação está finalizada. Para esta verificação final, foi realizada a análise de glicerina combinada para a sétima e oitava reações piloto em 24 horas de processo, sendo que os valores obtidos foram

0,17 %_{massa} e 0,15 %_{massa} respectivamente. Estes valores estão dentro do limite de especificação, demonstrando que as reações estavam finalizadas em 24 horas.

Com a realização das reações em escala piloto e os resultados obtidos para as quatro classificações de matérias-primas, habilita-se a produção de ésteres metílicos em escala industrial.

5.5 SCALE-UP PARA REATOR INDUSTRIAL DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXO CUSTO EM SISTEMA BATELADA ALIMENTADA

A partir dos resultados obtidos em escala laboratorial, definições das variáveis e posteriores validações em escala piloto foram realizados os testes em escala industrial, objetivando a produção de ésteres em grande escala. As reações em escala industrial ocorreram na empresa Prisma Brazil – divisão ésteres, na cidade de Sumaré/SP, conforme descrito no item 4.1.5.3.

Foram realizadas as reações com as quatro classificações de matérias-primas das reações em shaker, tendo assim um amplo espectro de material graxo sendo testado em escala industrial. Primeiramente realizou-se a reação com a matéria-prima I, sendo posteriormente realizada com os outros três tipos. Nos subitens a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios de aumento de escala para industrial, sendo o procedimento adotado conforme o item 4.2.7.

5.5.1 Scale-Up Para Escala Industrial Utilizando a Matéria-Prima I

A matéria-prima I foi utilizada em duas reações em escala industrial, com o intuito de verificar os resultados de produção de ésteres metílicos, comparando-os com os obtidos em shaker e piloto. A matéria-prima utilizada na primeira reação foi proveniente do fornecedor “D”, sendo de fornecedor diferente dos testes realizados na otimização em laboratório (Fornecedor A) e dos testes realizados em escala piloto (Fornecedores A e C). Na Tabela 5.31 são apresentadas as características básicas da matéria-prima I do fornecedor D.

Tabela 5.31 - Características básicas da matéria-prima I do fornecedor “D”, utilizadas na primeira e segunda reações em escala industrial.

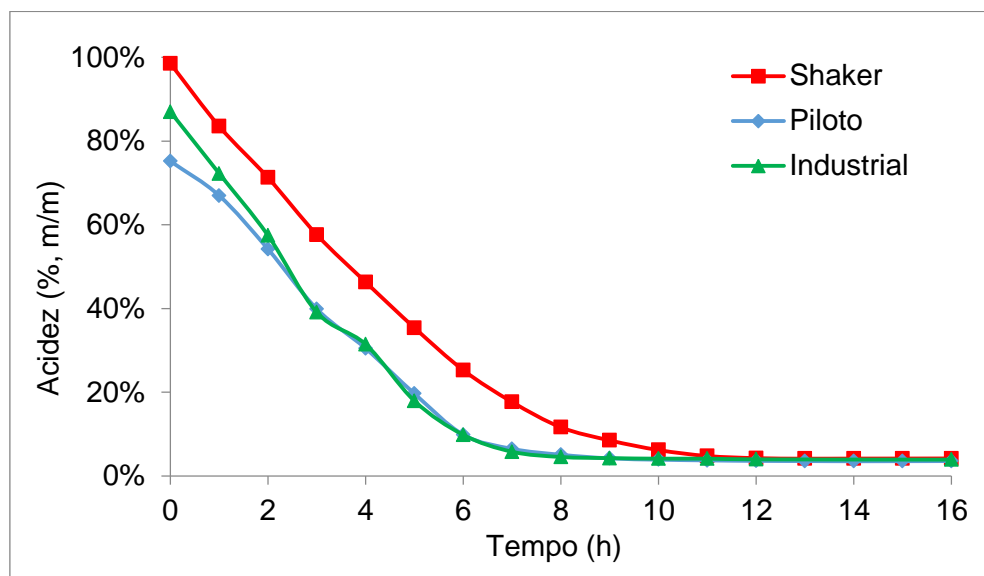
Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,1
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	88,25
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	126,3
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	198,2

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.31 que as características básicas da matéria-prima do fornecedor “D” se enquadram no perfil da matéria-prima I, conforme Tabela 5.23. Sendo assim, a matéria-prima foi utilizada nas duas reações industriais, sendo a primeira ocorrendo nas seguintes condições de processo: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.30 são apresentadas as cinéticas reacionais com a matéria-prima I sem lavagem, no sistema de batelada alimentada em shaker (fornecedor A, amostra 1), piloto (fornecedor C) e industrial (fornecedor D). Observa-se nesta figura que a primeira reação industrial ocorreu de forma satisfatória, onde após 8 horas reacionais o teor de AGL estava em 4,59 %, abaixo dos 5 % estabelecidos, sendo que no mesmo tempo os valores de acidez no piloto e shaker estavam acima de 5 %. Também pode ser observado na Figura 5.30 que a cinética reacional do reator foi muito parecida com a que ocorreu em escala piloto, demonstrando que as variáveis de processo estão adequadas para ambas as escalas.

O melhor desempenho apresentado nas cinéticas reacionais do piloto e industrial, em relação ao shaker, deve-se principalmente à utilização de uma maior concentração enzimática nestas reações (1,5 % - piloto e industrial; 1,0 % - shaker), ocasionando uma queda mais rápida do teor de AGL. A utilização de uma quantidade maior de enzima nestas reações se fez necessário para garantir a ocorrência da reação, evitando assim que uma grande quantidade de mistura reacional se tornasse um descarte.

Figura 5.30 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima I sem lavagem e com ADT, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - segunda reação (45 °C \pm 1 °C) e reator industrial - primeira reação (45 °C \pm 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Além das análises do teor de AGL no meio reacional, também foram realizadas análises do percentual de glicerina combinada na fase éster, verificando desta forma a eficiência de conversão dos mono-, di- e triglicerídeos em ésteres. Na Tabela 5.32 podem ser verificados os valores do percentual de glicerina combinada para a primeira reação industrial.

Tabela 5.32 - Resultados do percentual de glicerina combinada da primeira reação industrial, utilizando a matéria-prima I do fornecedor “D”, em sistema batelada alimentada (45 °C \pm 1 °C).

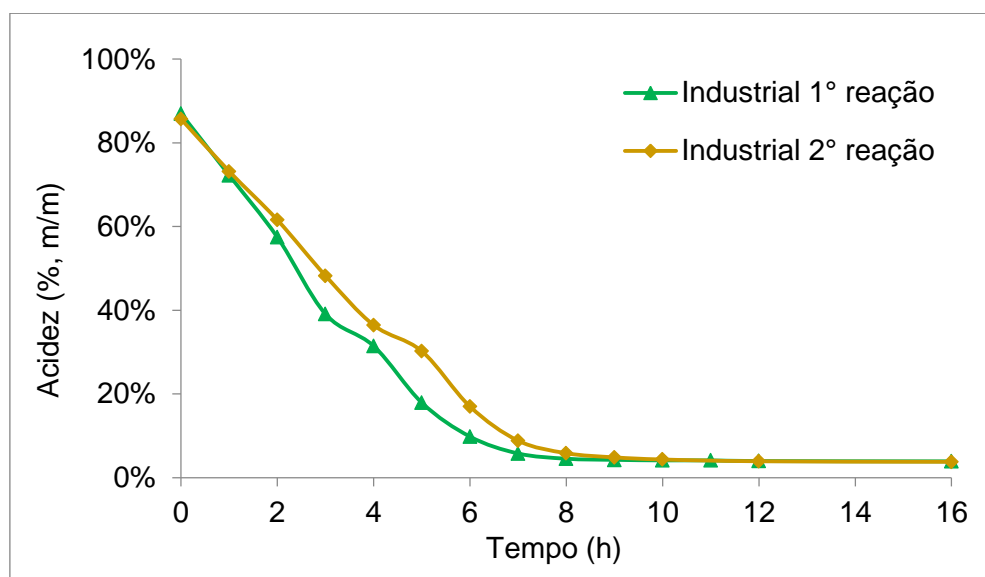
Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
12	0,10
16	0,08

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados apresentados na Tabela 5.32 observa-se que com 12 horas de reação o valor da glicerina combinada estava em 0,10 %_{massa}, bem abaixo do limite máximo de 0,23 %_{massa}. Neste mesmo tempo reacional o teor de AGL era de 3,95 %, indicando que a reação poderia ter sido finalizada.

Buscando a confirmação dos resultados alcançados até o momento, foi realizada a segunda reação industrial, utilizando-se a mesma matéria-prima da reação anterior (fornecedor D). Tendo em vista a complexidade da cadeia de produção de biodiesel, principalmente nos processo que sucedem a produção dos ésteres, nesta segunda reação industrial realizou-se pequenas alterações nos valores das variáveis utilizadas na primeira reação. Objetivando uma menor quantidade de resíduos inorgânicos nos subprodutos reacionais (glicerina, água, metanol, etc...), foi reduzida a quantidade de NaOH e ADT adicionados na segunda reação industrial, sendo as condições apresentadas a seguir: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,2 % de NaOH; x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 6:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.31 são apresentadas as cinéticas reacionais das duas reações industriais para a matéria-prima I.

Figura 5.31 - Cinéticas reacionais das duas reações (primeira e segunda) em escala industrial com a matéria-prima I, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5.31 pode ser observado o bom desempenho da segunda reação industrial com a matéria-prima I, a qual apresentou resultados de AGL abaixo de 5 % após 9 horas de reação (4,84 %). A diferença existe na queda do teor de AGL da primeira reação para a segunda, está diretamente ligada na redução de 33 % do NaOH e 50 % do ADT adicionados.

Para a confirmação dos resultados foram realizadas as análises de glicerina combinada, conforme apresentados na Tabela 5.33.

Tabela 5.33 - Resultados do percentual de glicerina combinada da segunda reação industrial, utilizando a matéria-prima I do fornecedor “D”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
12	0,16
16	0,13

Fonte: Elaborado pelo autor

Na Tabela 5.33 observa-se que a glicerina combinada da segunda reação industrial está dentro do limite máximo de $0,23\text{ \%}_{\text{ massa}}$ a partir das 12 horas de reação, apesar de apresentar um valor maior que o da primeira reação ($0,10\text{ \%}_{\text{ massa}}$). Neste tempo reacional o teor de AGL era de $3,91\text{ \%}$, também estando abaixo dos 5% estabelecidos. Levando-se em consideração que as reações com a matéria-prima I devem ocorrer em torno de 12 a 16 horas reacionais, ambas as reações industriais com esta matéria-prima são consideradas satisfatórias.

Desta forma, o aumento de escala para industrial se mostrou satisfatório para a matéria-prima I a partir dos testes realizados em laboratório e piloto, tendo que ser verificado para as demais matérias-primas de baixo custo.

5.5.2 Scale-Up Para Escala Industrial Utilizando Outras Matérias-Primas de Baixo Custo

Com os testes realizados em escala industrial com a matéria-prima I, e os resultados satisfatórios obtidos, foram realizadas reações com os outros três tipos de matérias-primas: matéria-prima II, matéria-prima III e matéria-prima IV. A seguir serão apresentados e discutidos os resultados, sendo realizados conforme descrito no item 4.2.7.

5.5.2.1 Reações em escala industrial com a matéria-prima II

Para esta matéria-prima foi realizada uma reação em escala industrial, sendo utilizada amostra proveniente do fornecedor “F” (amostra 2). Na Tabela 5.34 pode ser observada as características básicas da matéria-prima II do fornecedor “F”, amostra 2, que foi utilizada na terceira reação industrial.

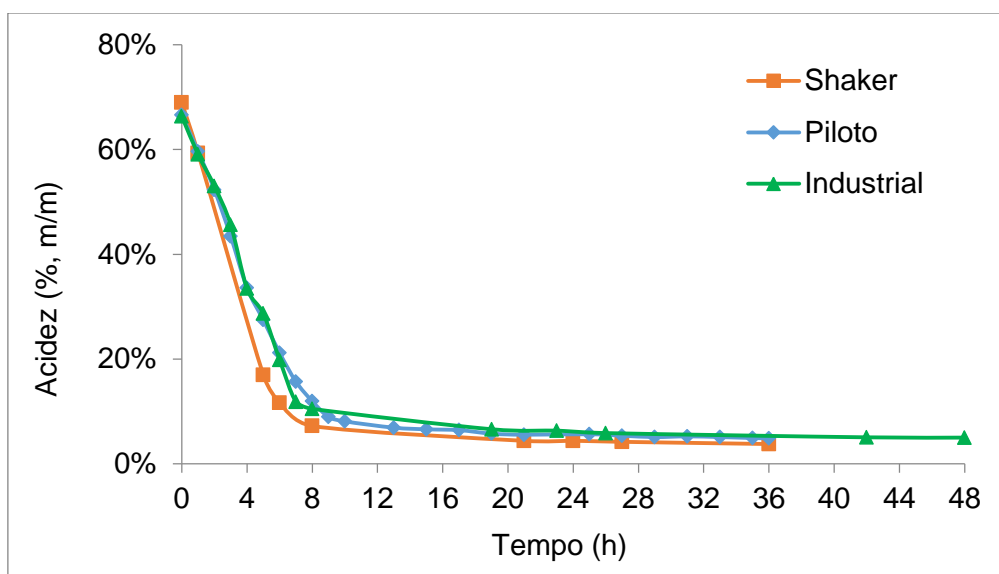
Tabela 5.34 - Características básicas da matéria-prima II do fornecedor “F” (amostra 2), utilizada na terceira reação em escala industrial.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	2,4
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	64,01
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	91,68
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	193,6

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.34 que a amostra 2 do fornecedor “F”, utilizada na terceira reação industrial, se enquadra dentro das características básicas definidas para a matéria-prima II (Tabela 5.23), apenas com o valor de umidade um pouco acima. Apesar desta característica ser importante na análise, não influencia diretamente na ação da enzima e no resultado final, portanto não foi realizado um procedimento específico para tal. A terceira reação industrial foi realizada com pequenas alterações das variáveis das reações piloto, como seguem: matéria graxa sem lavagem; 2 % de água (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 4,5:1; alimentação do metanol em 9 frações iguais de hora em hora durante as 8 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.32 são apresentadas as cinéticas reacionais da matéria-prima II em escala laboratorial (shaker), piloto (quarta reação) e industrial (terceira reação).

Figura 5.32 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima II, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - quarta reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - terceira reação (45 °C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Figura 5.32 que a terceira reação industrial ocorreu de forma satisfatória, apesar de atingir o teor de AGL próximo a 5 % apenas com 36 horas de reação (5,06 %), fato este que está diretamente relacionado às mudanças nas condições de processo realizadas, quando comparadas com a reação piloto. A obtenção da estabilidade reacional em valores de acidez um pouco acima de 5 % está diretamente ligada à redução da quantidade final de metanol adicionado na reação industrial (razão molar MeOH:MG 4,5:1), o que desloca o equilíbrio reacional em direção a formação de AGL.

É importante salientar que as alterações realizadas nas variáveis de processo desta reação seguiram os bons resultados alcançados na segunda reação industrial com a matéria-prima I, mas que não foram tão satisfatórios neste caso. Isto pode estar relacionado com a grande variabilidade da matéria-prima II, principalmente com relação a sua origem (oleaginosa).

Para uma melhor observação da terceira reação industrial, foram realizadas análises do percentual de glicerina combinada, verificando desta forma a eficiência de conversão dos mono-, di- e triglicerídeos em ésteres. Na Tabela 5.35 podem ser verificados os valores do percentual de glicerina combinada para a terceira reação industrial.

Tabela 5.35 - Resultados do percentual de glicerina combinada da terceira reação industrial, utilizando a matéria-prima II do fornecedor “F”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
20	0,58
24	0,46
42	0,22
48	0,20

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.35 que a glicerina combina da terceira reação industrial atingiu o valor abaixo do limite máximo de 0,23 %_{massa} apenas após 42 horas de reação (0,22 %_{massa}), estando neste momento o teor de AGL em 5,06 %. Os valores apresentados de glicerina combinada comprovam a dificuldade existente na conversão da matéria-prima II nesta reação industrial. Essa dificuldade apresentada está diretamente ligada com as mudanças nas condições de processo realizadas nesta reação, ocorrendo à inativação do catalisador de forma mais acentuada ao longo das 48 horas reacionais e a consequente não transformação por completo dos glicerídeos do material graxo em ésteres. Ambos os fatores são relacionados à redução dos elementos NaOH, ADT e razão molar MeOH:MG utilizados nesta reação, conforme já discutidos anteriormente.

Desta forma, o aumento de escala para industrial da matéria-prima II se mostrou satisfatório, apesar de serem necessários reações nas condições estabelecidas em shaker e piloto, para verificação e validação dos resultados obtidos com a terceira reação industrial.

5.5.2.2 Reações em escala industrial com a matéria-prima III

Com a matéria-prima III foi realizado uma reação em escala industrial, sendo utilizada amostra proveniente do fornecedor “J”. Na Tabela 5.36 podem ser observadas as características básicas desta matéria-prima que foi utilizada na quarta reação industrial.

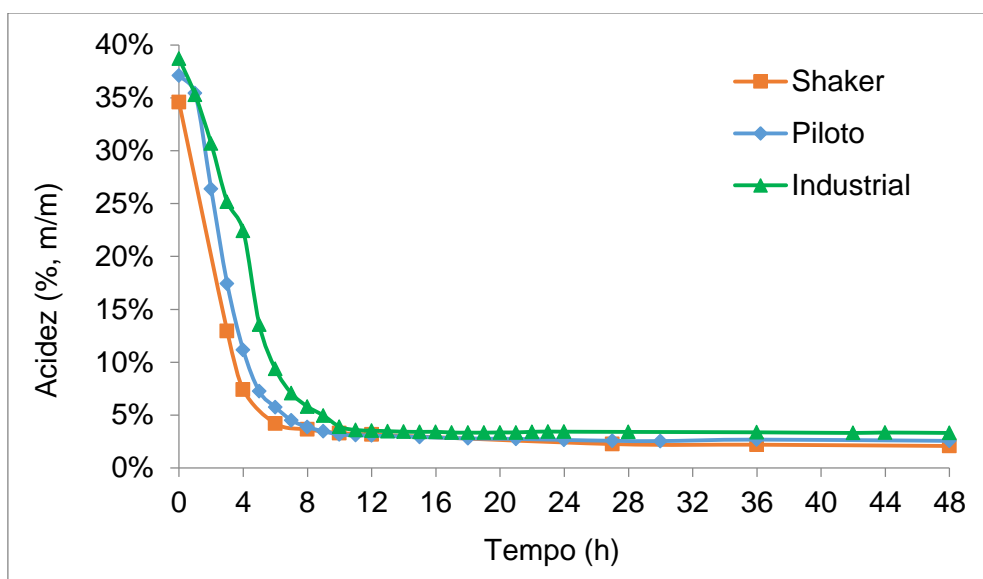
Tabela 5.36 - Características básicas da matéria-prima III do fornecedor “J”, utilizada na quarta reação em escala industrial.

Análises	Resultados
<i>Umidade (%)</i>	0,8
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	30,28
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	57,08
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	197,5

Fonte: Elaborado pelo autor

A amostra do fornecedor “J” utilizada na quarta reação industrial, conforme mostrado na Tabela 5.36, se enquadra dentro das características básicas definidas para a matéria-prima III, conforme item 5.3, apenas com o valor bem abaixo do índice de iodo, sendo esta característica diretamente relacionada com o tipo de oleaginosa. A amostra utilizada do fornecedor “J” é proveniente de Palma, o que justifica o baixo valor do índice de iodo, sendo uma matéria-prima que não tinha sido utilizada nas reações em laboratório e piloto. Como esta característica não influencia diretamente na ação da enzima e no resultado final de produção de ésteres, não foi realizado um procedimento específico para tal, apenas realizado um acompanhamento em shaker antes da reação industrial. A quarta reação industrial foi realizada nas seguintes condições: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; sem adição de ADT; razão molar MeOH:MG de 4,5:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.33 são apresentadas as cinéticas reacionais da matéria-prima III em escala laboratorial (shaker), piloto (sexta reação) e industrial (quarta reação).

Figura 5.33 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima III, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - sexta reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - quarta reação (45 °C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Figura 5.33 que a quarta reação industrial ocorreu de forma satisfatória, atingindo valores abaixo de 5 % de AGL após 9 horas de reação. É importante salientar que o final da reação deve ser confirmado com a realização da análise de glicerina combinada, pois se trata de uma matéria-prima rica em triglicerídeos. A estabilidade em valores próximos a 3 % de acidez se mantém após 16 horas de reação, finalizando às 48 horas com 3,31 %. Pode-se observar também na Figura 5.33 que a cinética reacional de redução dos teores de AGL da reação industrial foi mais lenta em comparação aos experimentos em shaker e piloto, bem como o valor de acidez final ficou um pouco acima (2,08 % - shaker; 2,56 % - piloto; 3,31 % - industrial). Este fato está relacionado com a menor razão molar (MeOH:MG 4,5:1) utilizada na reação industrial em comparação as reações de shaker e piloto (MeOH:MG de 6,0:1), fazendo com que se tenha uma concentração menor de metanol nas primeiras horas de reação e uma consequente menor atuação da enzima. Esta razão molar reduzida faz com que ao final da reação tenha-se uma concentração de metanol menor no meio, deslocando o equilíbrio no sentido do ácido graxo livre e fazendo com o teor de acidez fique mais elevado.

Para a verificação da eficiência da conversão dos mono-, di- e triglicerídeos em ésteres, bem como o final da quarta reação industrial, foram realizadas análises do percentual de glicerina combinada, os quais podem ser verificados na Tabela 5.37.

Tabela 5.37 - Resultados do percentual de glicerina combinada da quarta reação industrial, utilizando a matéria-prima III do fornecedor “J”, em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
20	0,36
24	0,20
28	0,16
32	0,14
36	0,12

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se na Tabela 5.37 que a glicerina combina da quarta reação industrial atingiu o valor abaixo do limite máximo de $0,23\text{ \%}_{\text{massa}}$ após 24 horas de reação ($0,20\text{ \%}_{\text{massa}}$), estando neste momento o teor de AGL em $3,43\text{ \%}$. Apesar de ser uma matéria-prima com uma grande quantidade de triglicerídeos, o seu alto valor inicial de AGL reduz o tempo total de reação.

Comparando-se os valores de glicerina combinada da reação industrial com o obtido em piloto ($0,21\text{ \%}_{\text{massa}}$ após 36 horas), observa-se que o tempo de processo necessário para atingir os parâmetros de final de reação no processo industrial foi menor, indicando uma maior eficiência. Este fato pode estar relacionado com a agitação do meio reacional, pois quanto maior o contato existente entre a fase hidrofílica (água, enzima e metanol) com a fase hidrofóbica (material graxo), mais rapidamente ocorrerá à reação.

Sendo assim, os resultados da reação industrial com a matéria-prima III ocorreram de forma satisfatória, tornando esta matéria-prima viável para a produção de ésteres metílicos em grande escala.

5.5.2.3 Reações em escala industrial com a matéria-prima IV

A matéria-prima IV foi utilizada em duas reação em escala industrial, sendo as amostras 2 e 3 provenientes do fornecedor “L”. Na Tabela 5.38 podem ser observadas as características básicas desta matéria-prima que foram utilizadas na quinta e sexta reações em escala industrial.

Tabela 5.38 - Características básicas da matéria-prima IV do fornecedor “L”, amostras 2 e 3, utilizadas na quinta e sexta reações em escala industrial respectivamente.

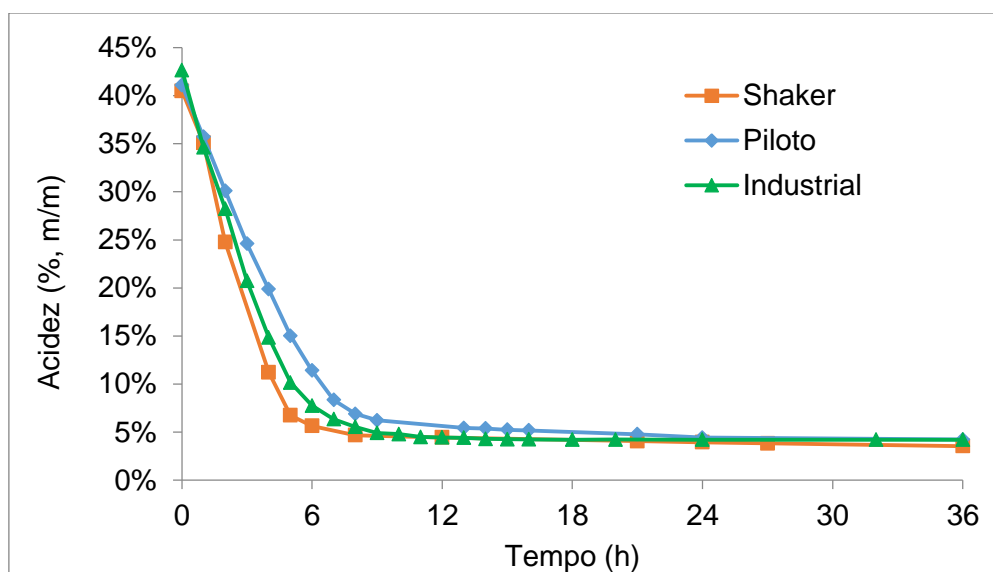
Análises	Resultados	
	Amostra 2	Amostra 3
<i>Umidade (%)</i>	0,4	0,3
<i>Teor de ácido graxo livre (%)</i>	33,27	23,26
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	97,2	107,5
<i>Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)</i>	197,8	197,7

Fonte: Elaborado pelo autor

Na Tabela 5.38 pode ser observado que as amostras 2 e 3 do fornecedor “L” utilizadas na quinta e sexta reações industrial se enquadram dentro das características básicas definidas para a matéria-prima IV, conforme apresentado no item 5.3. A quinta reação industrial utilizando a matéria-prima IV ocorreu nas seguintes condições: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 4,5:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.34 são apresentadas as cinéticas reacionais com a matéria-prima IV do fornecedor “L”, no sistema de batelada alimentada em shaker (amostra 1), piloto (amostra 2) e industrial (amostra 2).

Observa-se na Figura 5.34 que a quinta reação industrial ocorreu de forma satisfatória, onde após 9 horas reacionais o teor de AGL estava em 4,91 %, abaixo dos 5 % estabelecidos para a acidez final. Também pode ser observado que a cinética reacional está muito próxima da reação em shaker, e um pouco mais rápida que a reação piloto. Isto pode estar relacionado com a agitação do meio reacional, mesmo fato identificado na reação com a matéria-prima III, demonstrando que a agitação no reator é mais eficiente que a agitação do piloto.

Figura 5.34 - Cinéticas reacionais com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada em shaker (45 °C/250 rpm), reator piloto - oitava reação (45 °C ± 1 °C) e reator industrial - quinta reação (45 °C ± 1 °C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Além das análises do teor de AGL no meio reacional, também foram realizadas análises do percentual de glicerina combinada na fase éster, verificando desta forma a eficiência de conversão dos mono-, di- e triglicerídeos em ésteres. Na Tabela 5.39 podem ser verificados os valores do percentual de glicerina combinada para a quinta reação industrial.

Tabela 5.39 - Resultados do percentual de glicerina combinada da quinta reação industrial, utilizando a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 2), em sistema batelada alimentada (45 °C ± 1 °C).

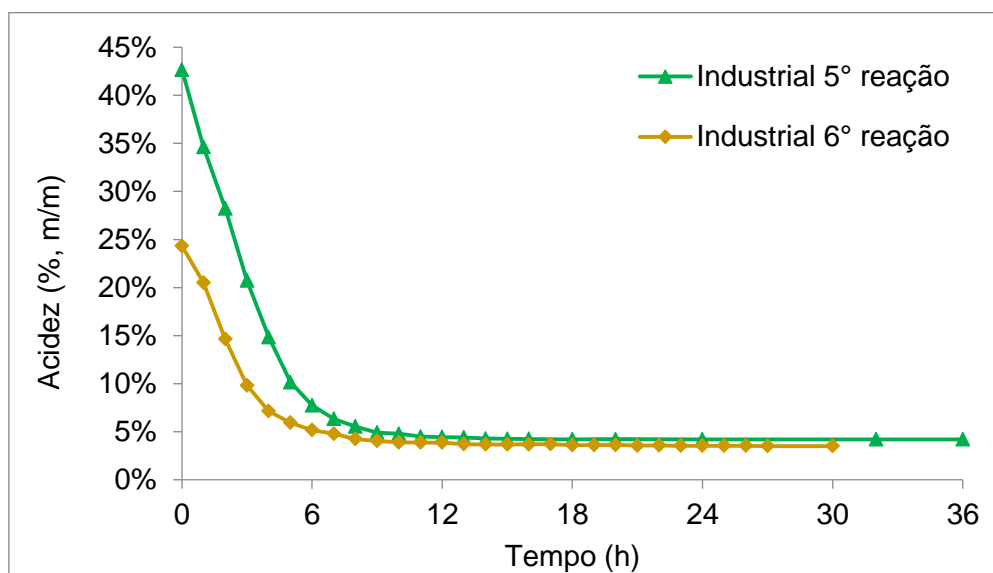
Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
12	0,45
16	0,35
20	0,30
24	0,27
28	0,25
32	0,23
36	0,21

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados apresentados na Tabela 5.39 observa-se que somente com 36 horas de reação o valor da glicerina combinada estava em 0,21 % _{massa}, abaixo do limite máximo de 0,23 % _{massa}. Neste mesmo tempo reacional o teor de AGL era de 4,21 %, indicando que a reação poderia ser finalizada.

Na busca da confirmação dos resultados alcançados com a matéria-prima IV, foi realizada a sexta reação industrial utilizando-se a amostra 3 do mesmo fornecedor (“L”). Nesta reação procurou-se um melhor desempenho do processo, e para tal foi realizada uma alteração na variável ADT, aumentando a sua adição de x para 2x, objetivando a manutenção da atividade enzimática por mais tempo. Neste sentido, a sexta reação industrial foi realizada nas seguintes condições: matéria-graxa sem lavagem; 2 % de água destilada (m/m, em relação ao substrato); 0,3 % de NaOH; 2x % de ADT; razão molar MeOH:MG de 4,5:1; alimentação do metanol em 10 frações iguais de hora em hora durante as 9 primeiras horas de reação; concentração da enzima livre Lipase NZ de 1,5 % (m/m, em relação ao substrato). Na Figura 5.35 são apresentadas as cinéticas reacionais das duas reações industriais para a matéria-prima IV.

Figura 5.35 - Cinéticas reacionais das duas reações (quinta e sexta) em escala industrial com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 5.35 pode ser observado o bom desempenho da sexta reação industrial, apresentando resultados de AGL abaixo de 5 % após 7 horas de reação (4,79 %). Apesar de possuírem uma diferença grande de acidez inicial entre as duas amostras, o que propicia uma

redução do teor de AGL mais rápida na sexta reação, após 10 horas reacionais ocorre uma estabilização do valor final de acidez em torno de 4 %. Como o valor da acidez não pode ser o único parâmetro para matérias-primas que contenham triglicerídeos, foi realizada a análise de glicerina combinada para verificar o término da reação e possibilitar a comparação. Na Tabela 5.40 são apresentados os resultados das análises de glicerina combinada da sexta reação industrial.

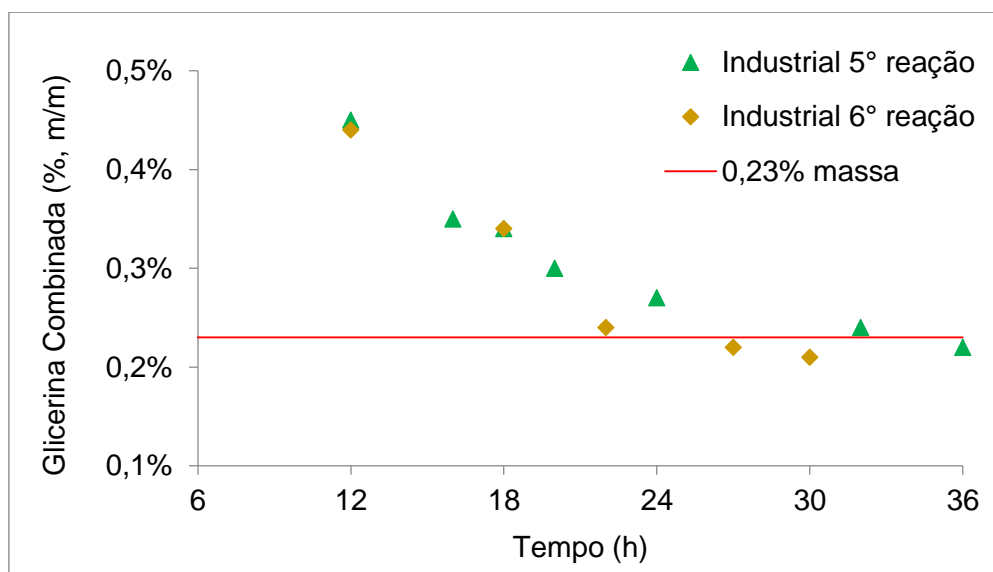
Tabela 5.40 - Resultados do percentual de glicerina combinada da sexta reação industrial, utilizando a matéria-prima IV do fornecedor “L” (amostra 3), em sistema batelada alimentada ($45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo reacional (h)	% Glicerina combinada
12	0,44
18	0,34
22	0,24
27	0,22
30	0,21

Fonte: Elaborado pelo autor

Pra uma melhor comparação entre as duas reações industriais com a matéria-prima IV, foram realizadas as curvas cinéticas do percentual de glicerina combinada das reações, conforme mostrado na Figura 5.36. Observa-se nesta figura que na parte inicial da reação, até 18 horas de processo, a redução na glicerina combinada ocorreu igualmente nas duas reações, sendo diferente após este tempo. Verifica-se também na Figura 5.36 que após 27 horas de processo a sexta reação industrial atingiu o valor de 0,22 % _{massa}, estando abaixo do limite superior, enquanto a quinta reação somente conseguiu atingir o limite de especificação apenas com 36 horas de processo. Esta redução mais acentuada da glicerina combinada na sexta reação pode estar relacionada com a melhora no sistema de agitação, sendo realizada a limpeza das tubulações antes desta reação.

Figura 5.36 - Cinéticas do percentual de glicerina combinada das duas reações industriais (quinta e sexta) com a matéria-prima IV, em sistema batelada alimentada ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Desta forma, os resultados de aumento de escala para industrial com a matéria-prima IV se mostraram satisfatórios, tornando-se mais uma alternativa para a produção de ésteres metílicos em grande escala.

6. CONCLUSÕES

O trabalho realizado apresentou resultados satisfatórios para a produção de ésteres metílicos em escala laboratorial, piloto e industrial, sendo utilizado um catalisador enzimático e matérias-primas alternativas de baixo custo no processo reacional. A nova rota tecnológica utilizando o catalisador biológico se apresentou como grande potencial de produção de biocombustíveis, possibilitando elevada conversão a partir de matérias-primas que são resíduos industriais.

Com os resultados obtidos ao longo do trabalho, pode-se concluir que:

- O estudo da atuação da enzima Lipase NZ mostrou que esta não realiza o processo de transesterificação, sendo que a transformação da matéria graxa em éster ocorre em dois processos independentes, a hidrólise dos MAG, DAG e TAG e a esterificação dos AGL;
- As 18 amostras de matérias-primas recebidas e utilizadas no trabalho para a produção de ésteres metílicos foram classificadas em quatro grupos, de acordo com a semelhança de suas características básicas.
- Os resultados de conversão de acidez e percentual de ésteres metílicos obtidos em escala laboratorial para as quatro matérias-primas foram satisfatórios, sendo que para a matéria-prima I obteve-se 96,0 % de conversão do AGL inicial e 98,5 % de ésteres, para a matéria-prima II a conversão do AGL inicial ficou em 94,5 %, para a matéria-prima III obteve-se 98,9 % de ésteres ao final da reação e para a matéria-prima IV o teor final de ésteres foi de 95,9 %.
- A partir dos resultados obtidos em escala laboratorial, definiu-se as variáveis de processo para as matérias-primas classificadas nos quatro grupos, sendo de fundamental importância para a realização dos testes em escalas piloto e industrial;
- Em escala piloto, os resultados de conversão de acidez e percentual de ésteres metílicos obtidos para as quatro matérias-primas foram satisfatórios, sendo que para a matéria-prima I obteve-se 95,1 % de conversão do AGL inicial e 0,18 %_{massa} de glicerina combinada, em 10 horas de reação, para a matéria-prima II a conversão do AGL inicial foi de 94,3 % em 36 horas de processo, para a matéria-prima III obteve-se 2,68 % de acidez final e 0,21 %_{massa} de glicerina combinada em 36 horas de reação e

para a matéria-prima IV o teor final de acidez foi menor que 4,60 % e a glicerina combinada 0,17 %_{massa}, com 24 horas de processo;

- Os resultados em escala industrial para conversão de acidez e percentual de ésteres metílicos foram muito bons, sendo que para a matéria-prima I obteve-se 95,6 % de conversão do AGL inicial e 0,16 %_{massa} de glicerina combinada, em 12 horas de reação, para a matéria-prima II a acidez final foi de 5,06 % e a glicerina combinada em 0,22 %_{massa} em 42 horas de processo, para a matéria-prima III obteve-se 3,43 % de acidez final e 0,20 %_{massa} de glicerina combinada em 24 horas de reação e para a matéria-prima IV o teor final de acidez foi de 3,51 % e a glicerina combinada 0,22 %_{massa}, com 27 horas de processo;
- O processo enzimático apresenta vantagens reacionais, como condições brandas de temperatura, tolerância a matérias-primas com altos índices de AGL e conteúdo de água, tempo razoável de processo, sistemas reacionais simples, proporcionando produtos finais de alta qualidade (glicerina e éster);
- A tecnologia enzimática utilizando a enzima Lipase NZ se mostra promissora para a produção de biocombustíveis, tornando-se uma alternativa frente ao processo convencional.

A partir dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, referente ao uso de matérias-primas de baixo custo para a produção industrial de ésteres metílicos, com a aplicação do processo enzimático, conclui-se que esta nova tecnologia é capaz de se tornar uma alternativa industrial viável tecnicamente para a produção de biocombustível.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar a enzima solúvel Lipase NZ;
- Realizar análises de índice de peróxidos, sabões, teores de Enxofre (S) e Fósforo (P) na caracterização básica da matéria-prima;
- Estudar o reuso da enzima Lipase NZ em escalas piloto e industrial;
- Estudar as etapas de polimento dos ésteres metílicos produzidos, a fim de enquadrar o produto dentro da especificação do Biodiesel;
- Realizar uma análise econômica da produção de biocombustível comparativa entre o processo de catálise química básica (convencional) e o processo enzimático;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASIL **Aumento para 10 % do percentual de biodiesel no diesel entra em vigor**. 2018. Disponível em <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2018-03/aumento-para-10-do-percentual-de-biodiesel-no-diesel-entra-em-vigor>> (acessado em 25 de abril de 2018).

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 584-593, 2011.

AKGÜN, N.; ISCAN E. Effects of process variables for biodiesel production by transesterification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 486-492, 2007.

ALBUQUERQUE, A. A. **Processo alternativo de produção de biodiesel a partir de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, 2015.

ALMEIDA, S. C. A.; CLUA, E. W. G. **Perspectivas do uso da biomassa para geração descentralizada de energia no Mercosul**. Trabalho submetido ao Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia, 2006. Disponível em: <<http://www.observatorioambiental.iff.edu.br/publicacoes/publicacoes-cientificas/TrabalhoIntegracao21.pdf>> (acessado em 31 de março de 2017).

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.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS **Anuário Estatístico**, 2016.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
Processamento de matérias-primas. 2018a. Disponível em <
http://www.anp.gov.br/images/PROD_FORN_BIOCOMBUSTIVEIS/Biodiesel/Processamento_de_materias-primas.xlsx> (acessado em 25 de abril de 2018).

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
Produção de biodiesel. 2018b. Disponível em <
http://www.anp.gov.br/images/PROD_FORN_BIOCOMBUSTIVEIS/Biodiesel/Producao_de_Biodiesel.xlsx> (acessado em 25 de abril de 2018).

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
Produção de biodiesel m³. 2018c. Disponível em <
http://www.anp.gov.br/images/DADOS_ESTATISTICOS/Producao_biodiesel/Producao-de-Biodiesel-m3.xls> (acessado em 25 de abril de 2018).

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
Resolução n° 7 de 19 de março de 2008. Regulamenta a especificação do biodiesel a ser comercializada no território nacional. Disponível em:
<http://www.udop.com.br/download/legislacao/comercializacao/juridico_legiscalcao/res_7_comercializacao_biodiesel.pdf> (acessado em 15 de fevereiro de 2016).

ARRUDA, A. L. L. **Separação de ácidos graxos livres e triacilgliceróis por destilação a vácuo.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, 2016.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1999-2008, 2010.

BACKES, A. M. **Desenvolvimento de produto cárneo fermentado adicionado de óleo de canola.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, 2011.

BADGUJAR, C. K.; DHAKE, P. K.; BHANAGE, M. B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. **Process Biochemistry**, v.48, p.1335-1347, 2013.

BAJAJ, A.; JOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.9-14, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, p. 1815-1835, 2010.

BARBOSA, F. G. F. T. **Avaliação econômica de um processo de produção de biodiesel utilizando THF como co-solvente**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

BELLAVER, C.; COSTA, C. A. F.; AVILA, V. S.; FRAHA, M.; LIMA, G. J. M. M.; HACKENHAR, L.; BALDI, P. Substituição de farinhas de origem animal por ingredientes de origem vegetal em dietas para frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 671,677, 2005.

BENASSI, V. M.; SILVA, T. M.; PESSELA, B. C.; GUIBAN, J. M.; MATEO, C.; LIMA, M. S.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93-101, 2013.

BIODIESELBR **Biodiesel: combustível renovável e ambientalmente correto**. 2005.

Disponível em: < <https://www.biodieselbr.com/destaques/2005/combustivel-renovavel.htm>> (acessado em 15 de Março de 2016).

BIODIESELBR **Dados Básicos**. 2017. Disponível em: <

<https://www.biodieselbr.com/tag/2990-dados-basicos/>> (acessado em 10 de Agosto de 2017).

BIODIESELBR **Matérias-primas usadas para produzir biodiesel**. 2018. Disponível em: <

<https://www.biodieselbr.com/estatisticas/materias-primas-usadas-produzir-biodiesel.htm>> (acessado em 25 de abril de 2018).

BIODIESELBR **Porque fazemos biodiesel de soja**. 2007. Disponível em:

<<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja.htm>> (acessado em 15 de agosto de 2016).

BIODIESELBR **Tamanho do mercado de biodiesel do Brasil até 2020**. 2016. Disponível

em: < <https://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/producao/tamanho-mercado-biodiesel-brasil-ate-2020-290316.htm>> (acesso em 30 de março de 2016).

BORA, P.; KONWAR, L. J.; BORO, J.; PHUKAN, M. M.; DEKA, D.; KONWAR, B. K. Hybrid biofuels from non-edible oils: A comparative standpoint with corresponding biodiesel. **Applied Energy**, v. 135, p. 450-460, 2014.

BRASIL Lei n° 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Disponível em:

<[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml?f=templates\\$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml?f=templates$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu)>. (acesso em 22 de abril de 2016).

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

CERBIO - CENTRO BRASILEIRO DE REFERÊNCIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS. **O biodiesel**. Publicação da Divisão de Biocombustíveis – DBIO, ano II, ed. 12, Maio, 2006.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 484-487, 2013.

CESARINI, S.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Improvement of *P. aeruginosa* 42A2 lipase preparations for FAMES production, both in immobilized and soluble form. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99 p. 1-7, 2014.

CHRISTOPHER, L. P., KUMAR, H., ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

CIPOLATTI, E. P.; MORENO-PÉREZ, S; SOUZA, L. T. A.; A; GUISÁN, J. M.; ARAÚJO, P. H. H.; C.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 163-169, 2015.

CURI, R.; POMÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2002.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 776-792, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DARNOKO, D.; CHERYAN, M. Kinetics of palm oil: transesterification in a batch reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 1263-1267, 2000.

DELATORRE, A. B.; RODRIGUES, P. M.; AGUIAR, C. J.; ANDRADE, V. V. V.; ARÊDES, A.; PEREZ, V. H. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. **Perspectivas on line**, v. 1, n. 1, 2011.

Disponível em:

<http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas_e_saude/article/view/510>. (acessado em 23 de março de 2017).

DORADO, M. P.; BALLESTEROS, E.; LÓPEZ, F. J.; MITTELBAACH, M. Optimization of alkali catalyzed transesterification of *Brassica carinata* oil for biodiesel production. **Energy & Fuels**, v. 18, p. 77–83, 2004.

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

EMBRAPA Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **Dados econômicos safra 2016/2017**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> (acessado em 08 de agosto de 2017).

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1275–1287, 2009.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, RS, 2004.

FIRDAUS, M. Y.; BRASK, J.; NIELSEN, P. M.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 55-64, 2016.

FRÉ, N. C. **Obtenção de ácidos graxos a partir da acidulação da borra de neutralização de óleo de soja**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

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

GOMES, M. M. R. **Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

GU, L.; HUANG, W.; TANG, S.; TIAN, S.; ZHANG, X. A novel deep eutectic solvent for biodiesel preparation using a homogeneous base catalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 647–652, 2015.

GUIMARÃES, C. C. **Desempenho de motor estacionário em função da proporção de biodiesel de óleo de soja e de mamona adicionada ao diesel** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola. Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, Juazeiro, BA, 2017.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Process Technology**, v. 86, p. 1087-1096, 2005.

HAYYAN, A.; HASHIMA, M. A.; HAYYAN, M. Agro-industrial acidic oil as a renewable feedstock for biodiesel production using (1R)-(-)-camphor-10-sulfonic acid. **Chemical Engineering Science**, v. 116, p.223–227, 2014.

HE, Y.; LI, J.; KODALI, S.; BALLE, T.; CHEN, B.; GUO, Z. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445-456, 2017.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, 2001.

IVIG - Instituto Virtual Internacional de Mudanças Globais, CDM-PDD-Biodisel. **Produção de biodiesel a partir de óleos residuais**. Relatório Interno, UFRJ, 2001.

KHAN T. M. Y.; ATABANI, A. E.; BADRUDDIN, I. A.; BADARUDIN, A.; KHAYOON, M. S.; TRIWAHYONO, S. Recent scenario and technologies to utilize non-edible oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 840–851, 2014.

- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.
- KNOTHE, G. Perspectivas históricas de los combustibles diesel basados en aceites vegetales. **Revista Aceites & Grasas**, v 47, n. 2, Tomo XII, 2001.
- KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K. Waste cooking oil - An economical source for biodiesel: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 9, p. 2901-2913, 2006.
- KUO, C.-H., PENG, L.-T., KAN, S.-C., LIU, Y.-C., SHIEH, C.-J. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 229-232, 2013.
- LAM, M. K.; LEE, K.T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500-518, 2010.
- LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B., SILVA, C. C. M., SANTOS, L. S. S., SANTOS JR. J. R., MOURA, E. M., MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya Sp.*) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.
- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083-1095, 2010.
- LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, p. 1020-1031, 2011.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C., CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.
- LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN JR, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353-5363, 2005.
- LUQUE, R.; HERRERO-DAVILA, L.; CAMPELO, J. M.; CLARK, J. H.; HIDALGO, J. M.; LUNA, D.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A. Biofuels: a technological perspective. **Energy Environmental Science**, v. 1, n. 5, p. 542-564, 2008.
- MANDARINO, M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para produção de óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Documentos 171 - EMPRABA - Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, PR, 2001.

- MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 892-895, 2008.
- MARÇON, R. O. **Pré-tratamento da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais e gordura animal**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Agroenergia. Universidade Federal do Tocantins - UFT, Palmas, TO, 2010.
- MARÍN, J. P.; MATEOS, F. B.; MATEOS, P. A. Aprovechamiento de las oleinas residuales procedentes del proceso de refinado de los aceites vegetales comestibles, para la fabricación de biodiesel. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 2, p. 130-137, 2003.
- MEHER, L.C.; SAGAR, V. D.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.
- MENDES, D. B.; SERRA, J. C. V. Glicerina: uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p. 01-09, 2012.
- MICHELIN, S.; PENHA, F. M.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R.P.; TREICHEL, H.; VALÉRIO, A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. J.; OLIVEIRA V. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. **Renewable Energy**, v.76, p. 388-393, 2015.
- MISRA, R. D.; MURTHY, M. S. Straight vegetable oils usage in a compression ignition engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 3005–3013, 2010.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1998.
- MUSSATO, S. A.; MILAGRES, A. M. F.; FERNANDES, M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.
- NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras: utilização de lipases para obtenção de biocombustível. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.19, p.28-31, 2001.
- NATIONAL BIODIESEL BOARD - NBB. **Biodiesel**. 2016. Disponível em: <<http://biodiesel.org/>> (acessado em 18 julho de 2016).

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 692-700, 2008.

NIELSEN, P. M. Enzyme-catalyzed biodiesel made from low-quality oils. **Biodiesel Magazine**, 2014. Disponível em: <http://www.biodieselmagazine.com/articles/127509/enzyme-catalyzed-biodiesel-made-from-low-quality-oils> (acessado em 15 de Junho de 2017).

NIELSEN, P. M.; RANCKE-MADSEN, A.; HOLM, H. C.; BURTON, R. Production of biodiesel using liquid lipase formulations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, p 905-910, 2016.

NORDBLAD, M.; SILVA, V. T. L.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Identification of critical parameters in liquid enzyme-catalyzed biodiesel production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 12, p. 2446-2453, 2014.

NOVOZYMES NEWS. 2015. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/en/news/news-archive/Pages/New-enzyme-technology-converts-waste-oil-into-biodiesel.aspx>> (acessado em 18 de Agosto de 2015).

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

OLIVEIRA, D.; NASCIMENTO FILHO, L.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of Enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 231-241, 2005 (b).

OSAKI, M.; BATALHA, M. O. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: realidade e desafio. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 227-242, 2011.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

PEDERSEN, A. T.; NORDBLAD, M.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 105, p. 89-94, 2014.

- PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Editora: Manole, 456 p., 2014.
- PINNARAT, T.; SAVAGE, P. E. Assessment of noncatalytic biodiesel synthesis using supercritical reaction conditions. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 6801-6808, 2008.
- PINTO, A. C.; GUARIEIROA, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: An Overview. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.
- PRICE, J.; NORDBLAD, M.; MARTEL, H.H.; CHRABAS, B.; WANG, H.; NIELSEN, P.M.; WOODLEY, J.M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, p. 1719-1728, 2016.
- RACANICCI, A. M. C.; MENTEN, J. M.; REGITANO-D´ARCE, M. A. B.; GAIOTTO, J. B.; LONGO, F. A.; PEDROSO, A. A.; SORBARA, J. O. B. Oxidação lipídica do óleo de vísceras de aves para redução de seu conteúdo de energia metabolizável para frangos de corte na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 919-923, 2004.
- RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMIGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.
- RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.
- RASHEDUL, H. K.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ASHRAFUL A. M.; RAHMAN, S. M. A.; SHAHIR S. A. The effect of additives on properties, performance and emission of biodiesel fuelled compression ignition engine. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 348-364, 2014.
- RAUBER, M. R.; RIBEIRO, A. M. L.; KESSLER, A. M.; ARNAIZ, V.; LABRES, R. V. Desempenho, metabolismo e níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides em frangos de corte alimentados com óleo ácido e óleo de soja. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1730-1736, 2008.

- REMONATTO, D. **Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases *Eversa Transform* e *Eversa Transform 2.0***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, 2017.
- REMONATTO, D.; SANTIN, C.M.T.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa[®] Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 254-262, 2016.
- REMONATTO, D.; SANTIN, C.M.T.; VALÉRIO, A.; LERIN, L.; BATISTELLA, L.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Lipase-Catalyzed Glycerolysis of Soybean and Canola Oils in a Free Organic Solvent System Assisted by Ultrasound. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 850-862, 2015.
- REN21 - Rede de Políticas de Energia Renovável para o Século 21. **Energias Renováveis 2016 - Relatório da situação atual**. 2016. Disponível em: < http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2016/11/REN21_GSR2016_KeyFindings_port_02.pdf > (acessado em 15 de Junho de 2017).
- REYERO, I.; ARZAMENDI, G.; ZABALA, S.; GANDÍA, L. M. Kinetics of the NaOH-catalyzed transesterification of sunflower oil with ethanol to produce biodiesel. **Fuel Processing Technology**, v. 129, p. 147–155, 2015.
- RIBEIRO, R. M. **Tratamento do resíduo da indústria de gelatina através de compostagem, com emprego de serragem e palha de café**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, 2007.
- SANTIN, C. M. T. **Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, RS, 2013.
- SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25 p. 97-108, 2013.

SHAH, K. A.; PARIKH, J. K.; MAHERIA, K. C. Biodiesel synthesis from acid oil over large pore sulfonic acid-modified mesostructured SBA-15: Process optimization and reaction kinetics. **Catalysis Today**, v. 237, p. 29-37, 2014.

SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6. ed. New Jersey: Wiley Interscience, p. 3616, 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 1993.

SHIBASAKI-KITAKAWA, N.; HIROMORI, K.; IHARA, T.; KASHIMA, O.; YONEMOTO, T. Production of high quality biodiesel from waste acid oil obtained during edible oil refining using ion-exchange resin catalysts. **Fuel**, v. 139, p. 11-17, 2015.

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

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

STAMENKOVIĆ, O.S.; VELIČKOVIĆ, A.V.; VELJKOVIĆ, V.B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141-3155, 2011.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v.30, n. 3, p. 667-676, 2007.

SWEARINGEN, T. **Separating glycerine/FFAs: Journey to Forever**. 2006. Disponível em: <http://journeytoforever.org/biodiesel_glycsep.html> (acessado em 16 de fevereiro de 2017).

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

- VAN GERPEN, J.; SHANKS, J. V.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D; KNOTHE, G. **Biodiesel production technology**. National Renewable Energy Laboratory - U.S. Department of Energy, Julho 2004. Disponível em: <www.nrel.gov/docs/fy04osti/36244.pdf> (acessado em 16 de fevereiro de 2017).
- VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Kinetics of *Brassica carinata* oil methanolysis. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 1722-1726, 2006.
- VIEIRA, S. L.; RIBEIRO, A. M. L.; KESSLER, A. M.; FERNANDES, L. M.; EBERT, A.R.; EICHNER, G. Utilização da energia de dietas para frangos de corte formuladas com óleo ácido de soja. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 1270-139, 2002.
- VIOMAR, A. **Estudo das variáveis da produção de biodiesel**. Dissertação De Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioenergia. Universidade Estadual do Centro-Oeste - Unicentro, Guarapuava, PR, 2013.
- WANG, Y.; OU, S.; LIU, P.; XUE, F.; TANG, S. Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 252, p. 107-112, 2006.
- YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 384-391, 2007.
- YUSOFF, M.F.M.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: a review on processing and production requirements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 525-531, 2014.
- ZANETTI, M. **Produção de biodiesel a partir de gordura abdominal de frangos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, 2012.
- ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C.; COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; JUNIOR, A. C.; AJALA, L. C. **Flotado de efluentes de frigorífico de suínos e aves - 1. Composição Química**. Documentos Técnico 440. Concórdia, SC: EMBRAPA Suínos e Aves, 2006.
- ZENEVICZ, M.C.P. **Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, 2015.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 61-70, 2012.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technology assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 1-16, 2003.

ZORN, K.; OROZ-GUINEA, I.; BRUNDIEK, H.; BORNSCHEUER, U. T. Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update. **Progress and Lipid Research**, v. 63, p. 153-164, 2016.