



Universidade de Aveiro Departamento Química
2012

**Sara Patrícia de
Oliveira Melo**

**Aplicação de biocatalisadores imobilizados na
produção de biodiesel**



Aplicação de biocatalisadores imobilizados na produção de biodiesel

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, Ramo Química dos Recursos Renováveis e Bio-Refinarias, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Isabel da Silva Nunes, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor João A.P. Coutinho, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

- presidente Artur Manuel Soares da Silva
Prof. Catedrático do Departamento de Química
- vogal Nídia Sá Caetano
Prof.^a. Coordenadora do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de
Engenharia do Porto- Instituto Politécnico do Porto
- vogal Maria Isabel da Silva Nunes
Prof.^a. Auxiliar Convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade
de Aveiro
- vogal João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
Prof. Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Isabel Nunes e Professor Doutor João A.P. Coutinho, pela ajuda, disponibilidade e esclarecimentos prestados no decorrer do trabalho.

Aos meus colegas Paula Figueira, Ana Sofia Fonseca, Márcio Duarte, Vânia Pereira e Kateryna Krupa pelo companheirismo e ajuda durante o decorrer de todo o trabalho experimental.

Aos elementos do grupo Path, Jorge Pereira e Rita Costa, pelo apoio nas análises de cromatografia gasosa.

Aos meus pais, que sempre acreditaram no meu desempenho, pelo apoio e palavras encorajadoras em todos os momentos.

Por fim, e em especial, aos meus sobrinhos Inês e Gonçalo, por todos os dias me fazerem querer ser melhor.

palavras-chave

Óleo Alimentar Usado (OAU), biodiesel, catálise enzimática, Novozyme[®] 435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM, pré-tratamento.

resumo

Os óleos alimentares usados (OAU) constituem um fluxo de resíduos de difícil gestão. Atualmente, a produção de biodiesel é uma das operações de valorização mais promissora deste resíduo, face à procura de fontes de energia alternativas aos combustíveis de origem fóssil. O crescente interesse sobre a utilização dos biocombustíveis como substitutos dos carburantes derivados do petróleo deve-se às alterações climáticas, ao aumento do preço do petróleo e à segurança do abastecimento energético. O biodiesel é produzido através das reações de transesterificação e esterificação entre um óleo vegetal e um álcool, na presença de um catalisador. Todo o desenvolvimento do processo está estritamente relacionado com o tipo de catalisador e depende fortemente deste.

À escala industrial a família de catalisadores homogêneos alcalinos é amplamente usada, com a vantagem de permitirem elevados rendimentos em cerca de 1 a 2h. No entanto, este tipo de catalisadores apresentam limitações como é exemplo a recuperação de subprodutos que é economicamente inviável. A procura de catalisadores alternativos e competitivos com estes tem sido levada a cabo por diversos investigadores.

O principal objetivo deste trabalho consistiu em estudar o desempenho de três enzimas suportadas/imobilizadas: Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM individualmente e combinadas. Relativamente à Lipozyme[®]TL IM avaliou-se ainda a sua eficiência durante dois ciclos de (re)utilização. O mesmo foi feito com a Novozyme[®]435 em três ciclos de (re)utilização, mas também o efeito da presença de um líquido iónico (cloreto de 1-decil-3-metilimidazolio [C₁₀]) na atividade enzimática. Finalmente foi testado o efeito da presença de sílica no meio reacional, na produção de biodiesel, com a Novozyme[®]435. As reações de transesterificação e esterificação foram realizadas com o uso de um solvente (*tert*-butanol). As enzimas virgens foram pré-tratadas, tendo sido testadas duas temperaturas de incubação: (i) ambiente e (ii) 50°C. As condições operatórias para todas as experiências foram as seguintes: $T = 50^{\circ}\text{C}$, razão mássica catalisador:OAU=10%, razão molar metanol:OAU=4:1, razão volumétrica de solvente: OAU 0,75 v/v e agitação orbital de 200 rpm, tempo do ensaio de 30 horas. Nas enzimas utilizadas isoladamente, o desempenho foi melhor quando pré-tratadas a 50°C; das três estudadas a que obteve maior conversão em ésteres foi a Novozyme[®]435. A combinação mais eficiente foi a Novozyme[®]435/Lipozyme[®]TL IM.

Verificou-se que a reutilização das duas enzimas estudadas provoca uma perda de eficiência/atividade na sua função catalisadora.

O líquido iónico revelou-se não beneficiar a atividade da Novozyme[®]435 e a presença de sílica no meio reacional provocou uma diminuição do rendimento das reações.

O maior rendimento em ésteres foi conseguido para a enzima Novozyme[®]435 pré-tratada a 50°C, atingindo 79% ao fim de 2 horas, sendo o rendimento atingido ao fim de 5 horas de 90%.

keywords

Waste Cooking Oil (WCO), biodiesel, enzymatic catalysis, Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM, pretreatment.

abstract

The waste cooking oils (WCO) are a difficult to manage waste stream, therefore a significant part of them do not have an appropriate destination. Currently, the production of biodiesel is one of the most promising recovery operations of this waste, in order to be an alternative energy source to fossil fuels. The increasing interest to use biofuels as substitutes for petroleum fuels are: the climate changes, increasing oil prices and security of energy supply.

Typically, biodiesel is produced through the transesterification reaction between vegetable oil and an alcohol in the presence of a catalyst. The whole process development is closely related to the type of catalyst and strongly depends on it.

At industrial scale the homogeneous alkaline catalysts are widely used, with the advantage of higher yields at 1 to 2 hours. However, such catalysts have limitations as the examples are by-products recovery economically unfeasible. The search for alternative catalysts and competitive with these, has been undertaken by various researchers.

The main objective of this work was to study the performance of three supported/immobilized enzymes: Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM individually and combined between them. Regarding Lipozyme[®]TL IM was evaluated also its efficiency after two cycles of (re) use. The same was done with Novozyme[®]435 in three cycles (re) use, but also the effect of the presence of an ionic liquid (chloride, 1-decyl-3-methylimidazolium [C₁₀]) in enzyme activity. Finally it was tested the effect of the presence of silica in the reaction medium, to produce biodiesel, in Novozyme[®]435. The transesterification and esterification reactions were carried out using a solvent (*tert*-butanol). The enzymes were pretreated, and was tested two incubation temperatures: (i) environment and (ii) 50 ° C. Operating conditions for all experiments were: T = 50 ° C, weight ratio catalyst: WCO = 10%, molar methanol: WCO = 4:1, volume ratio of solvent:WCO 0.75 v / v orbital agitation of 200 rpm , the test time of 30 hours. Enzymes used alone had better performance when pretreated at 50 ° C, for the three studied the conversion into esters was highest with Novozyme[®]435. The most efficient combination was Novozyme[®]435/Lipozyme[®]TL IM.

It was found that the reuse of the two enzymes studied causes a loss of efficiency / activity in their catalytic function.

The ionic liquid proved not to benefit the activity of Novozyme[®]435 and the presence of silica in the reaction medium caused a decrease in the yield of the reactions.

The highest yield was achieved with Novozyme[®]435 incubated at 50°C, reaching 79% after 2 hours, being the yield achieved after 8 hours of 90%.

Índice

Índice	i
Nomenclatura	vii
Abreviaturas e siglas	viii
Letras gregas.....	viii
1 Introdução	1
1.1 Relevância e motivação.....	1
1.2 Objetivos e estrutura da dissertação	5
2 Estado da arte da produção de biodiesel.....	7
2.1 Introdução.....	7
2.2 Métodos de produção de biodiesel	11
2.2.1 Síntese sob condições supercríticas	12
2.2.2 Pirólise (craqueamento térmico)	12
2.2.3 Catálise homogénea	13
2.2.4 Catálise heterogénea	14
2.2.5 Catálise enzimática.....	15
2.3 Enzimas.....	19
2.3.1 Pré-tratamento e lavagem da enzima.....	21
2.3.2 Superatividade de Enzimas	23
2.4 Conclusão	24
3 Metodologia experimental	27
3.1 Introdução.....	27
3.2 Ensaio a realizar.....	27
3.3 Material e métodos.....	28
3.3.1 Caracterização do OAU	29
3.3.2 Pré-tratamento do OAU	31
3.3.3 Características das enzimas.....	31
3.3.4 Reação de transesterificação	32
3.4 Conclusão	36
4 Resultados e discussão	37

4.1	Introdução.....	37
4.2	Caracterização do OAU	37
4.2.1	Densidade.....	37
4.2.2	Viscosidade.....	37
4.2.3	Teor de Humidade.....	38
4.2.4	Valor ácido.....	38
4.2.5	Massa molar	39
4.3	Reação de transesterificação	40
4.3.1	Uso das enzimas individualmente.....	41
4.3.2	Combinação de enzimas.....	48
4.3.3	Reutilização de enzimas	54
4.3.4	Novozyme® 435 com adição de sílica	57
4.3.5	Novozyme® 435 com cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio [C₁₀]	58
4.4	Conclusões.....	59
5	Considerações finais.....	62
5.1	Introdução.....	62
5.2	Conclusões gerais.....	62
5.3	Sugestões para trabalhos futuros	63
	Referências.....	64

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Consumo de energia primária em Portugal (ktep), na década de 2000 (DGEG 2011).</i>	1
Figura 2 <i>Energia consumida (%) em Portugal no ano de 2010, por sector de atividade (DGEG, 2011).</i>	2
Figura 3 <i>Fluxograma do processo de produção convencional de biodiesel por transesterificação[8].</i>	8
Figura 4 <i>Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (a) Reação global; (b) Reações elementares consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' representam os grupos alquil [8].</i>	10
Figura 5 <i>Reação de esterificação por catálise ácida [10].</i>	10
Figura 6 <i>Mecanismo de craqueamento térmico de triglicerídeos[14]</i>	13
Figura 7 <i>Reação sem e com solvente, onde está patente o efeito do metanol na água, na presença/ausência de solvente [20].</i>	18
Figura 8 <i>Fórmula geral do aminoácido [22].</i>	19
Figura 9 <i>Esquema experimental usado na reação de transesterificação e esterificação do OAU. 35</i>	35
Figura 10 <i>Esquema do procedimento experimental.</i>	35
Figura 11 <i>Rendimento em ésteres em função do tempo de reação para as três enzimas pré-tratadas à temperatura ambiente.</i>	42
Figura 12 <i>Rendimento em ésteres em função do tempo de reação para as três enzimas pré-tratadas a 50°C.</i>	44
Figura 13 <i>Influência da temperatura de pré-tratamento da Novozyme® 435 no rendimento em ésteres.</i>	45
Figura 14 <i>Influência, no rendimento da reação de transesterificação, da temperatura do pré-tratamento da enzima Lipozyme® TL IM.</i>	46
Figura 15 <i>Influência da temperatura de pré-tratamento da enzima Lipozyme® RM IM, no rendimento em ésteres.</i>	48
Figura 16 <i>Comparação do desempenho individual das enzimas Novozyme® 435 e Lipozyme® TL IM com a sua combinação Novozyme® 435/ Lipozyme® TL IM.</i>	49
Figura 17 <i>Comparação do desempenho individual das enzimas Novozyme® 435 e Lipozyme® RM IM com a sua combinação Novozyme® 435/ Lipozyme® RM IM.</i>	50
Figura 18 <i>Comparação do desempenho individual das enzimas Lipozyme® TL IM e Lipozyme® RM IM com a sua combinação Lipozyme® TL IM/ Lipozyme® RM IM.</i>	51

Figura 19 <i>Estudo combinado das enzimas Lipozyme[®] TL IM e Novozyme[®] 435 com pré-tratamento a 50°C.</i>	52
Figura 20 <i>Comparação entre a temperatura dos pré-tratamentos do uso combinado das enzimas Novozyme[®] 435/Lipozyme[®] TL IM.</i>	53
Figura 21 <i>Conversão em ésteres para a 1^a e 2^a reutilização da enzima Novozyme[®] 435.</i>	54
Figura 22 <i>Influência da reutilização da Lipozyme[®] TL IM.</i>	56
Figura 23 <i>Influência da adição de sílica ao meio reacional com Novozyme[®] 435.</i>	57
Figura 24 <i>Influência do líquido iônico C₁₀ na atividade da Novozyme[®] 435.</i>	59

Índice De Tabelas

Tabela 1 Principais vantagens e desvantagens da utilização de metanol e etanol na produção de biodiesel [13].	11
Tabela 2 Comparação entre processo catalítico químico e enzimático[14]	17
Tabela 3 Vantagens e desvantagens dos catalisadores usados na produção de biodiesel (adaptado de [8]).....	25
Tabela 4 Resumo da principal bibliografia em que se baseou este estudo.	28
Tabela 5 Resumo de todos os ensaios realizados.	28
Tabela 6 Composição média e atividade das enzimas.	32
Tabela 7 Condições operatórias para todos os ensaios.	33
Tabela 8 Densidade do OAU.	37
Tabela 9 Viscosidade cinemática do OAU (T=40°C.).....	38
Tabela 10 Teor de humidade do OAU.	38
Tabela 11 Valor ácido do OAU.	38
Tabela 12 Dados necessários à determinação da massa molar do OAU.	39
Tabela 13 Composição típica em ácidos gordos (% m/m) do óleo de amendoim refinado[35].	40
Tabela 14 Rendimento máximo atingido pelas enzimas individualmente, quando pré-tratadas à temperatura ambiente.	42
Tabela 15 Rendimento máximo atingido para as 3 enzimas com pré-tratamento a 50°C.....	44
Tabela 16 Influência da temperatura de pré-tratamento da Novozyme® 435 no rendimento máximo atingido e no tempo necessário para tal.	46
Tabela 17 Rendimentos máximos, e respetivo tempo em que são atingidos, conseguidos na catálise da reação de transesterificação pela enzima Lipozyme® TL IM.....	47
Tabela 18 Rendimentos máximos, e respetivo tempo em que são atingidos, conseguidos na catálise da reação de transesterificação pela Lipozyme® RM IM.....	48
Tabela 19 Rendimento máximo para a combinação de enzimas Novozyme® 435/ Lipozyme® TL IM pré-tratadas à temperatura ambiente.	49
Tabela 20 Rendimento máximo atingido para a combinação Novozyme® 435/ Lipozyme® RM IM.	50
Tabela 21 Rendimento máximo para a combinação Lipozyme® TL IM/ Lipozyme® RM IM.	51

Tabela 22 <i>Rendimento máximo para a combinação de enzimas Novozyme[®] 435/ Lipozyme[®] TL IM pré-tratadas a 50°C.</i>	52
Tabela 23 <i>Rendimentos máximos para o uso combinado Novozyme[®] 435/ Lipozyme[®] TL IM.</i>	53
Tabela 24 <i>Rendimento máximo atingido nas reutilizações da enzima Novozyme[®] 435.</i>	55
Tabela 25 <i>Rendimento máximo atingido na 1ª reutilização da enzima Lipozyme[®] TL IM.</i>	56
Tabela 26 <i>Influência da adição de sílica ao meio reacional com Novozyme[®] 435.</i>	58
Tabela 27 <i>Influência do líquido iônico na atividade da Novozyme[®] 435.</i>	59

Nomenclatura

<i>A</i>	Área	
<i>C</i>	Concentração	[mg/mL]
<i>C</i>	Carbono	
<i>c</i>	Constante do viscosímetro	[mm ² /s ²]
<i>H</i>	Hidrogénio	
<i>O</i>	Oxigénio	
<i>M</i>	Massa molar	[g/mol]
<i>m</i>	Massa	[kg]
<i>n</i>	Número de moles	[mol]
<i>T</i>	Temperatura	[°C]
<i>t</i>	Tempo	[s]
<i>V</i>	Volume	[L]
<i>w</i>	Fração mássica	[kg/kg]
<i>W</i>	Humidade	[-]
<i>x</i>	Número de átomos de carbono na fórmula empírica geral da mistura de ésteres	
<i>xx</i>	Número de átomos de carbono na fórmula empírica geral da mistura de triglicerídeos	
<i>y</i>	Número de átomos de hidrogénio na fórmula empírica geral da mistura de ésteres	
<i>yy</i>	Número de átomos de hidrogénio na fórmula empírica geral da mistura de triglicerídeos	
<i>z</i>	Número de átomos de oxigénio na fórmula empírica geral da mistura de ésteres	
<i>zz</i>	Número de átomos de oxigénio na fórmula empírica geral da mistura de triglicerídeos.	

Abreviaturas e siglas

AGL	Ácidos Gordos Livres
bs	Base seca
C ₁₀	Cloreto de 1-decil-3-metilimidazolio
CG	Cromatografia Gasosa
DGEG	Direção-Geral de Energia e Geologia
EEAG	Ésteres Etfílicos de Ácidos Gordos
EMAG	Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
GEE	Gases com efeito de estufa
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FID	Flame Ionization Detector
HORECA	Hotéis, restaurantes e cantinas
OAU	Óleo alimentar usado
rpm	Rotações por minuto
tep	Tonelada equivalente de petróleo
UA	Universidade de Aveiro
UE	União Europeia

Letras gregas

ρ	Massa volúmica	[g/L]
$\bar{\rho}$	Massa volúmica média	[g/L]
Δ	Intervalo	[-]
ν	Viscosidade cinemática	[mm ² /s]
η	Rendimento	[%]

1 Introdução

1.1 Relevância e motivação

A promoção e utilização de fontes renováveis para a produção de energia surgem como uma necessidade para garantir um desenvolvimento sustentável. Os sinais de alerta são frequentes e a consciencialização da sociedade em geral para a problemática energética, tem sido crescente.

A excessiva dependência de fontes de energia não renovável da sociedade atual, e a preocupação com as alterações climáticas associadas, cria a necessidade de encontrar fontes alternativas, com menores impactes ambientais e rendimentos energéticos idênticos. A maior parte da energia consumida a nível mundial é proveniente do petróleo, no entanto, com o recurso às energias renováveis, essa é uma tendência que tem vindo a diminuir, e Portugal não é exceção. A Figura 1 representa o consumo da energia primária em Portugal na última década (DGEG 2011).

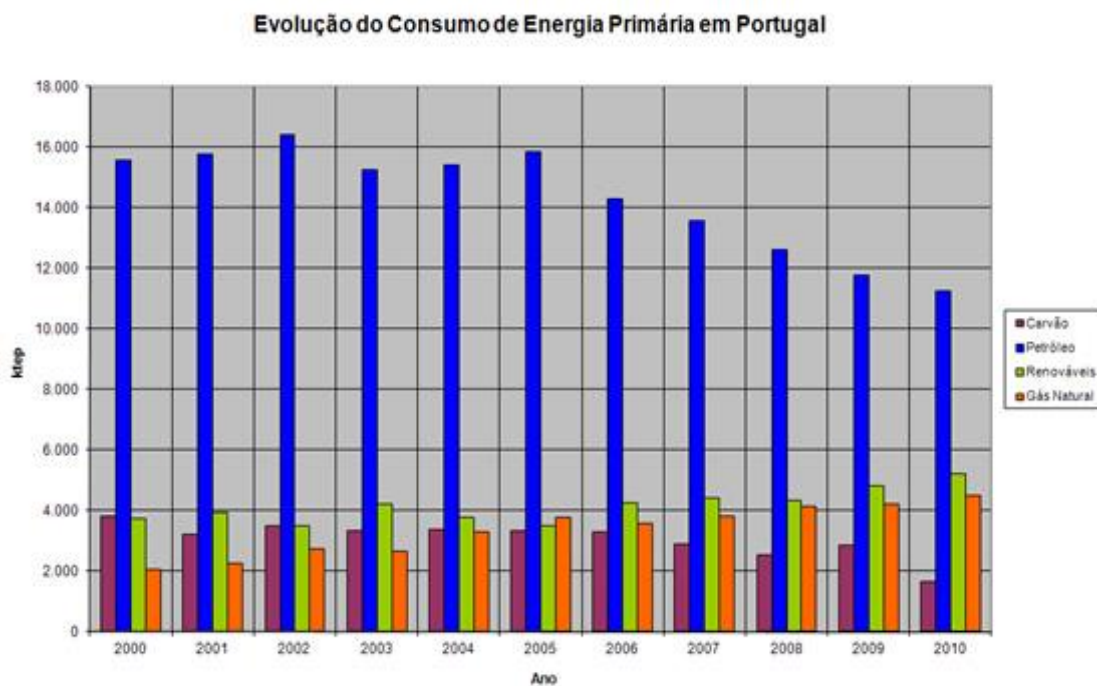


Figura 1 Consumo de energia primária em Portugal (ktep), na década de 2000 (DGEG 2011).

Em Portugal na década de 2000 registou-se um decréscimo do consumo de recursos não renováveis, e as energias renováveis apresentam-se cada vez mais como uma

alternativa. O setor dos transportes é um dos maiores consumidores de energia em termos mundiais, e é totalmente dependente da energia proveniente do petróleo.

De acordo com a Direção-Geral de Energia e Geologia (DGEG), em 2010, o setor dos transportes representava em Portugal, tal como na União Europeia (UE), aproximadamente 40% do consumo final de energia (vide Figura 2). Nos últimos anos, o setor dos transportes (terrestres) foi o que mais energia consumiu em Portugal, ultrapassando claramente o dos serviços e da indústria, prevendo-se uma tendência para aumentar até 2015 [1].

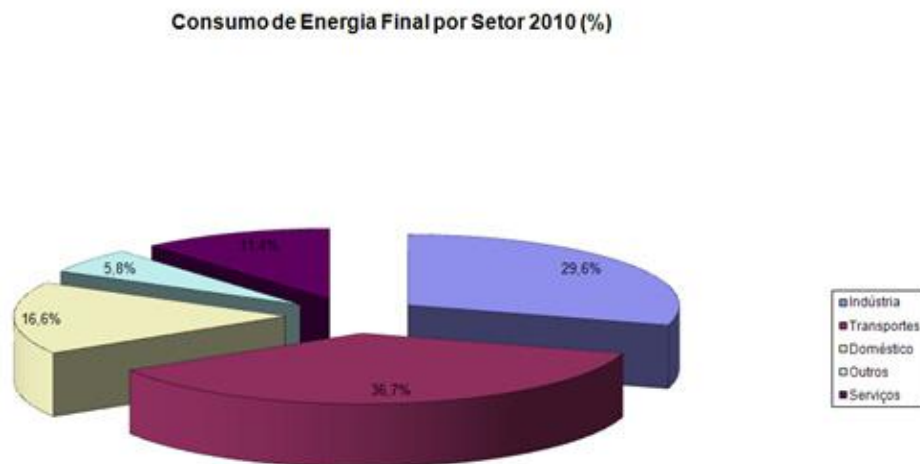


Figura 2 Energia consumida (%) em Portugal no ano de 2010, por sector de atividade (DGEG, 2011).

Devido ao constante aumento do preço do petróleo e aos problemas ambientais associados ao seu uso (por ex. o aquecimento global), os biocombustíveis são cada vez mais atraentes. A possibilidade de aplicação destes combustíveis em motores do ciclo diesel é bastante atrativa tendo em conta o aspeto ambiental, por constituírem uma fonte renovável de energia e permitirem a redução da dependência relativamente às importações do petróleo [2]. A sua procura tem crescido e deverá, a longo prazo, assim continuar visto que, atualmente já são incorporados nos de origem fóssil, e prevê-se que essa percentagem de incorporação aumente, devido a metas estabelecidas pela Diretiva n.º2003/30/CE, transposta para a ordem jurídica nacional pelo Decreto-lei nº 62 de 21 de março de 2006.

Os biocombustíveis são fontes de energia renovável de origem biológica, e podem ser líquidos, sólidos ou gasosos. No âmbito do Decreto-lei mencionado anteriormente são considerados para mistura/substituto da gasolina [3]:

- **Bioetanol:** Etanol produzido a partir de biomassa e ou da fração biodegradável de resíduos para utilização como biocombustível;
- **Biogás:** Gás combustível, constituído predominantemente por uma mistura dióxido de carbono e metano, produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos, que pode ser purificado até à qualidade do gás natural, ou gás de madeira;
- **Biometanol:** Metanol produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível;
- **Bioéter dimetílico:** Éter dimetílico produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível;
- **Bio-ETBE (bioéter etil-ter-butílico):** Produzido a partir do bioetanol, sendo a percentagem em volume de bio-ETBE considerada como biocombustível igual a 47%;
- **Bio-MTBE (bioéter metil-ter-butílico):** Produzido com base no biometanol, sendo a percentagem em volume de bio-MTBE considerada como biocombustível de 36%;
- **Biocombustíveis sintéticos:** Hidrocarbonetos sintéticos ou misturas de hidrocarbonetos sintéticos produzidos a partir de biomassa;
- **Biohidrogénio:** Hidrogénio produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos;

Do mesmo modo, são considerados biocombustíveis para mistura/substituto do gasóleo[3]:

- **Biodiesel:** Éster metílico ou etílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores diesel;
- **Óleo vegetal puro:** Óleo produzido a partir de plantas oleaginosas, em bruto ou refinado, mas quimicamente inalterado, quando a sua utilização for compatível com o tipo de motores e os respetivos requisitos relativos a emissões.

Estes combustíveis são apontados como uma das soluções para a curto prazo reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) pelos transportes, bem como uma alternativa à utilização de combustíveis derivados de recursos não renováveis.

Em Portugal, 80% do combustível usado nos transportes é o gasóleo (diesel), um dos combustíveis alternativos, e o que é alvo do maior número de estudos é o biodiesel. Trata-se de um combustível produzido a partir de recursos renováveis, como óleos vegetais ou animais, não é tóxico, e é livre de compostos aromáticos e enxofre. A principal vantagem deste combustível reside no facto de poder ser adicionado ao gasóleo convencional em qualquer percentagem ou ser usado puro nos motores a diesel (o biodiesel degrada os vedantes dos motores mais antigos, porque estes não foram construídos para este efeito).

Atualmente este combustível é maioritariamente produzido a partir de óleo de soja e colza.[4] No entanto, a utilização de terrenos agrícolas para as denominadas culturas energéticas, i.e., plantas oleaginosas, levanta inúmeras preocupações, das quais se destacam as de ordem social relativamente à falta de alimentos e/ou subida dos preços dos mesmos e as de ordem ambiental, já que a utilização intensiva dos solos além de potenciar a libertação de GEE (CO₂, N₂O) em maior escala que um terreno em pousio, pode supor um elevado uso de fertilizantes e outros químicos onde são consumidas elevadas quantidades de combustíveis fósseis na sua produção [5] .

Uma solução para esta problemática poderá ser o recurso aos óleos alimentares usados (OAU), que são um resíduo não perigoso de difícil gestão e que representam um problema ambiental se não forem geridos convenientemente. Estima-se que em Portugal a produção de OAU seja de 43 000 a 65 000 toneladas por ano, das quais 62 % provêm do setor doméstico, 37% do setor da hotelaria e restauração (HORECA) e apenas uma fração residual é produzida pela indústria alimentar [6].

Relativamente ao resíduo OAU a legislação portuguesa, pelo Decreto-lei n.º 267/2009, de 29 de setembro, proíbe [6]:

- A sua descarga nos sistemas de drenagem, individuais ou coletivos, de águas residuais;
- A sua introdução ou de substâncias recuperadas de OAU na cadeia alimentar;

- A sua deposição em aterro, nos termos do regime jurídico da deposição de resíduos em aterro;
- A sua mistura com substâncias ou resíduos perigosos;
- A realização de operações de gestão de OAU por entidades não licenciadas nos termos do Decreto-lei n.º 178/2006, de 5 de setembro;
- A sua utilização, como combustível em veículos, que não cumpram os requisitos técnicos aplicáveis aos biocombustíveis previstos no Decreto-lei n.º 62/2006, de 21 de março.

O biodiesel, quando produzido a partir de OAU é um exemplo de um ciclo ecologicamente correto, uma vez que um resíduo problemático passa a ser utilizado como matéria-prima renovável. [6]

Em suma, torna-se cada vez mais necessário proceder a uma racionalização do consumo de fontes energéticas e fazer uso prioritário de energias renováveis, pelo que o objetivo do presente trabalho é estudar a valorização de OAU na produção de biodiesel aplicando processos mais limpos.

Atualmente a nível industrial o biodiesel é produzido através de uma reação de transesterificação com o recurso a catalisadores homogéneos alcalinos. Neste tipo de catálise, a recuperação do catalisador é economicamente proibitiva e a mistura reacional contendo ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos gordos encontra-se bastante impura no final da reação. Para a obtenção do biodiesel com um grau de pureza que permita a sua comercialização, a referida mistura terá de ser submetida a um processo de purificação, originando um volume significativo de efluentes. Optando por outro tipo de catálise, nomeadamente a biocatálise, i.e., o uso de catalisadores enzimáticos imobilizados, o processo de purificação é mais simples, e o catalisador não só pode ser removido com facilidade, como reutilizado.

1.2 Objetivos e estrutura da dissertação

Com o presente trabalho pretende-se valorizar o resíduo -OAU-, utilizando-o como matéria-prima na produção de biodiesel, e simultaneamente avaliar o desempenho de alguns catalisadores enzimáticos imobilizados (Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM), sob condições operatórias específicas. A perda de eficiência/atividade dos catalisadores será avaliada quando estes são reutilizados, para

finalmente concluir até que ponto as enzimas usadas constituem uma alternativa competitiva aos catalisadores atualmente usados à escala industrial. Testou-se também o uso destes biocatalisadores de forma combinada numa proporção 50/50 (m/m) a fim de avaliar o efeito do rendimento da reação, i.e. na conversão dos triglicerídeos e ácidos gordos livres em ésteres de ácidos gordos.

Foram testados dois tipos de pré-tratamento para o estudo das enzimas isoladamente e para a combinação destas. Um em que a enzima foi incubada à temperatura ambiente e outro em que foi incubada à temperatura da reação (50° C).

A enzima Novozyme[®] 435 foi ainda testada: (i) com um líquido iónico com o intuito de ver aumentada a sua atividade, e (ii) com a adição de sílica ao meio reacional a fim de se produzir um biodiesel mais puro, partindo do pressuposto que a sílica irá absorver o glicerol (um dos produtos da reação de transesterificação).

Com vista a alcançar os objetivos propostos, iniciou-se este trabalho com uma revisão bibliográfica, no que diz respeito ao estado da arte na produção de biodiesel, e que se apresenta resumida no Capítulo 2. No terceiro capítulo é apresentada a planificação experimental, sendo os resultados experimentais obtidos neste trabalho e sua discussão apresentados no Capítulo 4. Por fim, no Capítulo 5, são tecidas as principais conclusões decorrentes da realização deste trabalho e feitas algumas sugestões para trabalhos futuros.

2 Estado da arte da produção de biodiesel

2.1 Introdução

A história do biodiesel remonta ao século XIX quando o primeiro motor que funcionou de forma eficiente foi apresentado por Rudolph Diesel, em agosto de 1893. O combustível então utilizado foi o óleo de amendoim. Diesel acreditava que o combustível, feito de biomassa, fosse uma alternativa viável aos motores a vapor.

O funcionamento dos primeiros motores tipo diesel era de injeção por compressão, alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais e até mesmo por óleos de peixe. Durante a década de 20, este género de motores passou a ser por injeção direta, impossibilitando a partir dessa altura, o uso de óleos vegetais, tanto devido a fatores técnicos como económicos. Esta situação proporcionou a implementação do gasóleo, que até então era considerado um resíduo petrolífero, que derivava do processo de produção de querosene utilizado na iluminação. O preço inferior deste produto de origem mineral fez com que durante muitos anos, o uso dos óleos vegetais caísse no esquecimento, adiando a evolução da tecnologia associada à sua utilização como combustível. Os motores foram sendo sucessivamente adaptados para a utilização exclusiva de diesel mineral, e deixou de ser possível utilizar diretamente óleos vegetais nesses motores principalmente devido à sua elevada viscosidade. [7]

Apesar de ter sido preterido em relação aos derivados do petróleo, o biodiesel é uma alternativa aos combustíveis fósseis, uma vez que é um combustível biodegradável e não tóxico, fabricado a partir de fontes renováveis, como óleos vegetais e gordura de animal.

Os métodos para a obtenção de biodiesel podem diferenciar na escolha da matéria-prima e a via de obtenção, nomeadamente: pirólise (craqueamento térmico), síntese sobre condições supercríticas, reação de esterificação (de ácidos gordos livres) e reação de transesterificação (de triglicerídeos). Esta última pode ser catalisada por diferentes vias: homogénea (básica ou ácida), heterogénea (por ex. resinas) e enzimática (por ex. lipases).

No fluxograma seguinte (vide Figura 3) são apresentadas as principais etapas de fabricação convencional do biodiesel

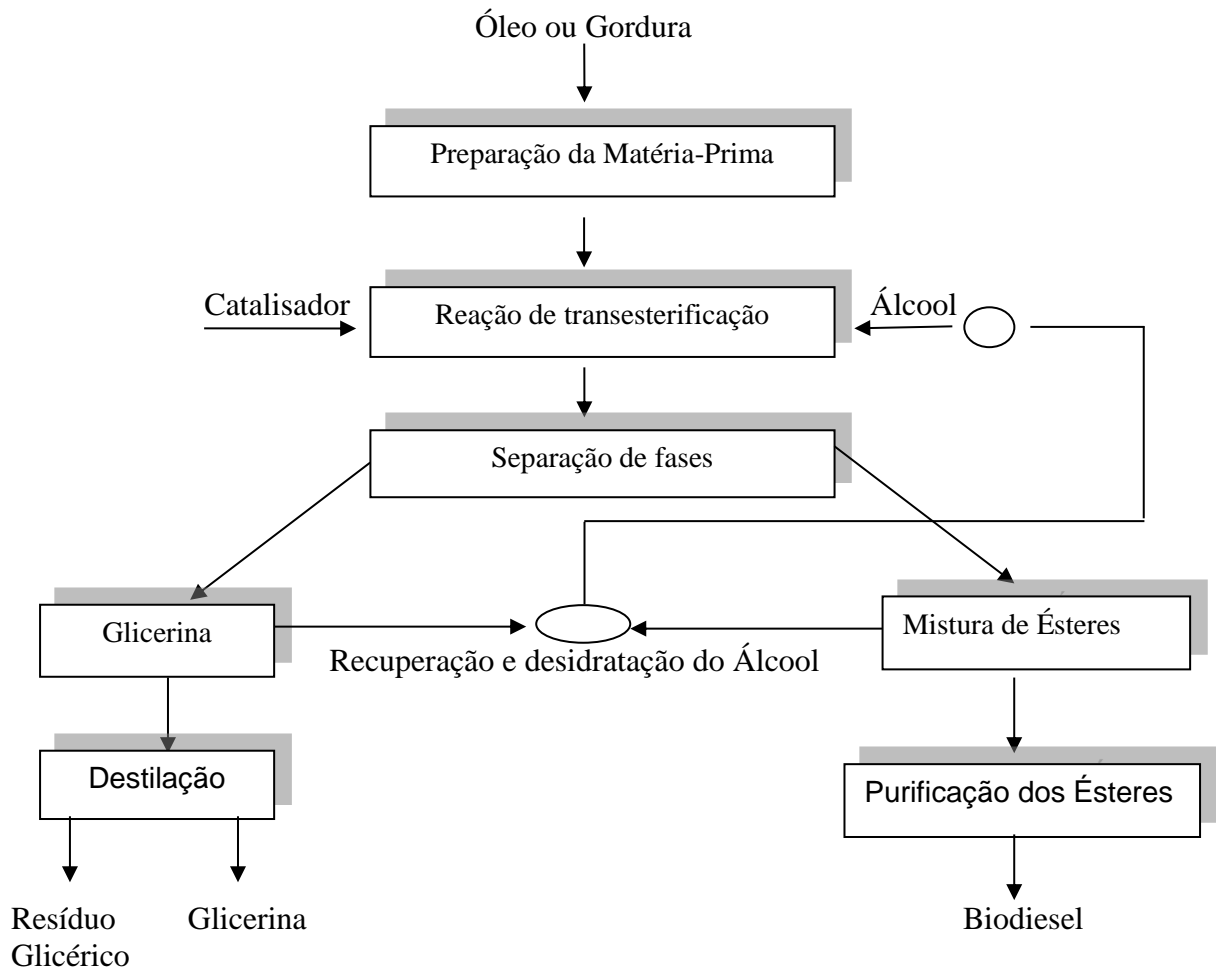


Figura 3 Fluxograma do processo de produção convencional de biodiesel por transesterificação [8].

No final da reação de transesterificação ocorrem duas fases distintas:

- a mais densa é composta por glicerina bruta e excessos de álcool, água, impurezas, inerentes às matérias-primas e catalisador;
- a menos densa é constituída por uma mistura de ésteres contaminados com álcool e impurezas.

A fase inferior (mais densa) é removida por decantação ou centrifugação e a glicerina, poderá posteriormente ser purificada para uso na indústria, por exemplo na farmacêutica. A fase superior é submetida a um processo de destilação com o objetivo de recuperar e reutilizar o álcool.

De seguida os ésteres são purificados, num primeira lavagem através da adição de água quente acidificada, para melhor arrastar os contaminantes ainda presentes e depois apenas com água. Por fim, os ésteres (biodiesel) são desidratados.

O biodiesel para ser comercializado deverá ter as características de acordo com as especificações técnicas estabelecidas na norma EN14214 (vide Anexo C).

O nível de pureza do biodiesel é importante no sentido em que exerce um forte efeito sobre a vida dos motores. As propriedades do biodiesel, nomeadamente a quantidade de (mono, di e tri) glicerídeos presentes, bem como de glicerina livre, sabões, metais, catalisador entre outros podem causar sérios problemas na sua aplicação. [9]

A reação de transesterificação (vide Figura 4) ocorre entre os triglicerídeos que constituem os óleos vegetais ou gorduras animais, e um álcool na presença de um catalisador, para produzir glicerina e ésteres alquílicos de ácidos gordos (usualmente denominados de EMAG- Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos ou EEAG- Ésteres Etílicos de Ácidos Gordos, consoante o álcool usado seja o metanol ou etanol, respetivamente). [8]

Esta reação de transesterificação não é elementar, estando envolvidas três reações sucessivas que decompõem consecutivamente os triglicerídeos em diglicerídeos (com formação de um éster), os diglicerídeos em monoglicerídeos (com formação de outro éster) e os monoglicerídeos em éster e glicerol.

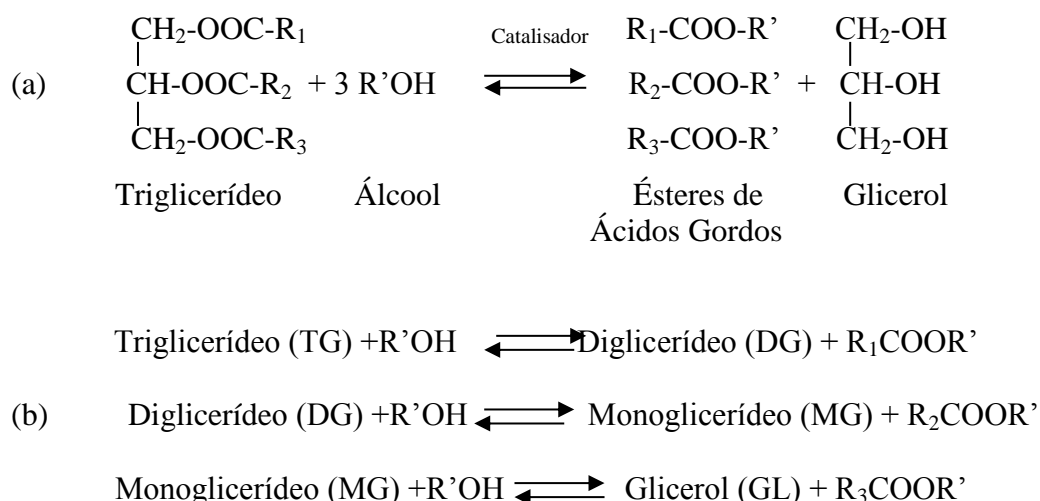


Figura 4 Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (a) Reação global; (b) Reações elementares consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' representam os grupos alquil [8].

O rendimento da reação de transesterificação é influenciado por diversos parâmetros, tais como: o tipo e características da matéria-prima, o tipo/natureza do catalisador, a razão molar álcool/matéria-prima, a razão mássica catalisador/matéria-prima, a temperatura e pureza dos reagentes (principalmente o teor de água), o tempo de reação e o teor de ácidos gordos livres (AGL). [8]

Os ácidos gordos livres podem também ser convertidos a ésteres, na presença de um álcool através de uma reação de esterificação, normalmente catalisada por um ácido. [10]

Na Figura 5 está representada a reação de esterificação de um ácido gordo com um álcool por catálise ácida.

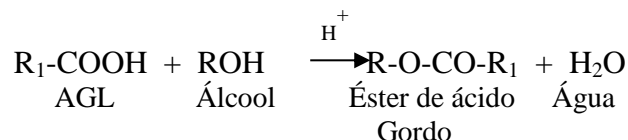


Figura 5 Reação de esterificação por catálise ácida [10].

Os álcoois mais utilizados em ambas as reações, descritas anteriormente, são os de cadeia curta, como o etanol e o metanol, por serem mais reativos. Como este último,

apesar de ser, geralmente de origem não renovável, apresenta menor custo é o mais utilizado industrialmente.

Normalmente, na catálise homogénea alcalina, é usado um excesso de álcool na produção de biodiesel, para maximizar a conversão da reação, visto ser uma reação reversível. No entanto, aumentando a quantidade de álcool para além de um valor ótimo, não vai aumentar o rendimento [11].

Meng et al. (2009) verificaram que a máxima conversão de ésteres é alcançada com razão molar álcool: óleo de 6:1 [12].

Na Tabela 1 apresenta-se as principais vantagens e desvantagens do uso destes dois álcoois [13].

Tabela 1 Principais vantagens e desvantagens da utilização de metanol e etanol na produção de biodiesel [13].

	Metanol	Etanol
Vantagens	Mais reativo	Menos tóxico
	Menor tempo de reação	Origem renovável
	Barato	
Desvantagens	Bastante tóxico	Temperatura mais elevada
	Origem fóssil	Maior razão molar álcool: óleo
	Pouco solúvel no óleo	

Em suma, a natureza do álcool não só influencia a velocidade da reação, mas também o rendimento atingido no final de um certo tempo reacional, bem como a posterior separação das fases biodiesel/glicerina.

2.2 Métodos de produção de biodiesel

Como referido anteriormente, os métodos de produção de biodiesel são: via catalítica (homogénea alcalina, homogénea ácida, heterogénea e enzimática), síntese sob condições supercríticas e o, craqueamento térmico.

2.2.1 Síntese sob condições supercríticas

Com o objetivo de desenvolver um novo processo de metanólise de óleos sem qualquer catalisador, Branco et al. [14] fizeram um estudo fundamental para a produção de biodiesel em metanol supercrítico.

Neste processo, a matéria-prima (óleo) reage com o álcool a alta pressão (45 MPa) e uma temperatura de 350°C, fazendo com que a mistura vaporize, proporcionando homogeneidade. Deste modo, os triglicéridos apolares podem ser solvatados pelo fluido supercrítico, formando um sistema monofásico álcool/óleo.

Como resultado, obtiveram-se ésteres metílicos idênticos aos da catálise alcalina, mas com taxa de conversão maior. A não utilização de catalisadores químicos torna mais fácil a separação dos produtos dessa reação em relação a catálise alcalina ou ácida. Porém apresenta algumas desvantagens, económicas e energéticas devido a utilização de altas temperaturas e pressões, além de grandes quantidades de metanol.[15]

2.2.2 Pirólise (craqueamento térmico)

O craqueamento térmico ou pirólise é a conversão de uma substância em outra por meio do uso de calor, isto é, pelo seu aquecimento, na ausência de oxigénio, a temperaturas superiores a 450°C. Neste processo as cadeias longas de ácidos gordos degradam-se em cadeias curtas, muitas vezes auxiliadas por um catalisador que ajuda a quebrar as ligações químicas, de modo a gerar moléculas menores (vide Figura 6). Catalisadores tipicamente usados na pirólise são o óxido de silício (SiO_2) e o óxido de alumínio (Al_2O_3). O equipamento para pirólise ou craqueamento térmico possui alto custo[15]. Os produtos finais obtidos por esta via são similares quimicamente ao diesel convencional.

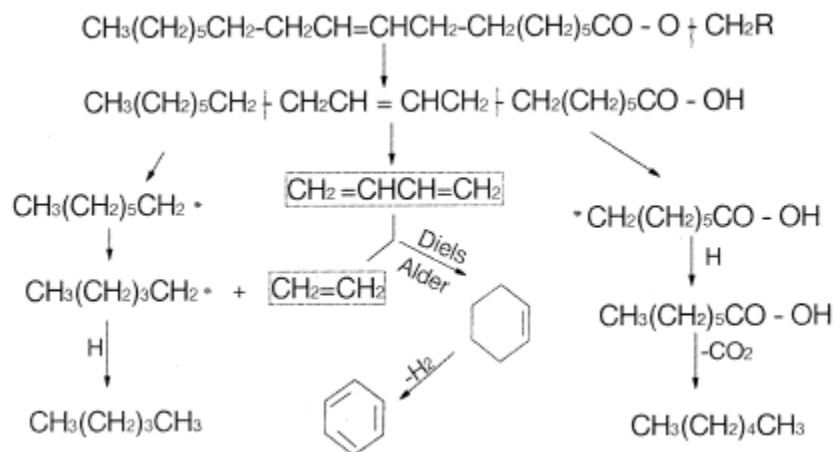


Figura 6 Mecanismo de craqueamento térmico de triglicerídeos[14]

Com este processo consegue-se um rendimento de aproximadamente 60%, produzindo um combustível composto por ésteres de ácidos gordos e frações de alcanos e alenos. [14]

2.2.3 Catálise homogénea

A transesterificação via catálise alcalina é a reação mais usada na produção de biodiesel, sendo a reação 4000 vezes mais rápida do que a catálise ácida. [15] É um processo utilizado quando a quantidade de ácidos gordos livres é baixa, pois demonstra alguma sensibilidade a elevadas percentagens destes compostos, cuja presença promove a ocorrência de reações de saponificação. A principal vantagem deste tipo de catálise é que ela ocorre num tempo relativamente pequeno na presença de uma base forte (NaOH, KOH, etc.). As condições reacionais mais comuns são uma temperatura de 60° C e uma pressão de 1 atm durante cerca de 2 horas que são suficientes para alcançar um bom rendimento. A reação entre o metanol e o hidróxido de sódio é um dos fatores fundamentais na catálise homogénea, forma-se assim metóxido de sódio, que se prepara previamente. Quando existe presença de água no meio reacional poderá formar-se sabão, resultante da reação secundária, a saponificação. O sabão formado pela reação consome o catalisador, reduzindo a eficiência catalítica e aumentando a viscosidade do produto. Para além destas desvantagens existem algumas associadas aos curtos tempos de reação, tais como [15]:

- elevados consumos energéticos na fase de lavagem e purificação;
- recuperação difícil e demorada do metanol;

- dificuldade de remoção do catalisador (normalmente não existe esta etapa no processo industrial).

Na etapa de purificação da mistura de ésteres de ácidos gordos é necessária a utilização de elevada quantidade de água de lavagem quando se usa este tipo de reações, pois esta facilita a transferência do catalisador da fase orgânica para a fase aquosa após reação.

A reação de transesterificação é catalisada por ácidos e bases enquanto a reação de esterificação é unicamente catalisada por ácidos, no entanto a catálise ácida é mais lenta do que a catálise alcalina (aproximadamente 6 vezes inferior). A catálise ácida é a mais usada quando existe uma elevada presença de ácidos gordos livres (AGL) e água, nomeadamente com matérias-primas tais como os OAU (quando muito degradados) e outros óleos virgens cuja natureza é rica em AGL. Os ácidos mais usados são o sulfúrico, o fosfórico e os ácidos sulfónicos orgânicos.

Na transesterificação por catálise ácida, é adicionado em simultâneo a fonte de triglicerídeos, o catalisador ácido e o álcool. As condições mais propícias para a reação ocorrer são à pressão atmosférica e a 60°C. A adição prévia de ácido ao metanol não é necessária já que o metanol não reage com o ácido, sendo normalmente adicionados todos os reagentes em simultâneo.

2.2.4 Catálise heterogénea

A utilização de catalisadores heterogéneos na produção de biodiesel surgiu com vista a minimizar os problemas associados aos catalisadores homogéneos convencionais, principalmente os afetos à sua recuperação para posterior reutilização.

Ao contrário dos catalisadores homogéneos, os catalisadores sólidos (ou heterogéneos), por serem reutilizáveis, poderão levar a menores custos de produção. Além disso alguns deles têm a capacidade de catalisar as duas reações (transesterificação e esterificação) em simultâneo.

Os catalisadores heterogéneos, são facilmente separados do produto final e têm como vantagem a capacidade de gerar produtos de maior qualidade, uma vez que não reagem com os intervenientes da reação. É possível assim recuperar grandes quantidades de produtos, sem ter a necessidade de recorrer a processos de refinação muito caros[10].

Em comparação com a catálise homogénea, os catalisadores sólidos têm vantagens significativas, tais como menor corrosão, menos toxicidade e acarretam menos

problemas ambientais. No entanto, o uso de catalisadores sólidos geralmente requer temperatura de reação elevada, longo tempo de reação e uma pressão relativamente elevada[10].

Exemplos de catalisadores heterogêneos são: CaO, alumina/sílica suportadas, ZnO/I₂, ZrO₂/SO₄²⁻, TiO₂/SO₄²⁻, catalisador derivado de hidratos de carbono, zirconia sulfatada Amberlyst-15.

Alguns estudos na literatura sobre a utilização de catalisadores heterogêneos, básicos e ácidos, indicam que estes catalisadores são capazes de proporcionar uma reação de transesterificação eficiente, com elevada taxa de conversão. Por exemplo, Wenlei e Li nos seus trabalhos, utilizaram como catalisador o iodeto de potássio suportado em alumina. Considerando 8 h de reação e uma razão molar metanol:óleo de 15:1, os autores obtiveram uma conversão de 96 %.[16]

2.2.5 Catálise enzimática

Na catálise enzimática o catalisador pode estar na forma líquida ou suportada/imobilizada. Quando se encontra em estado líquido é muito difícil remover o catalisador. Então a catálise enzimática com o catalisador imobilizado surge como forma de evitar a necessidade de recuperar ou remover o catalisador da reação, bem como a obtenção de biodiesel com maior grau de pureza. Este tipo de catálise promove simultaneamente a reação de esterificação e transesterificação.

As enzimas (biocatalisadores) utilizadas como catalisadores podem ser recuperadas quando se encontram na forma imobilizada em suportes de diferentes naturezas (por ex. resinas sintéticas ou polímeros), que lhe confere características de heterogeneidade. Paradoxalmente a utilização de enzimas suportadas promove a redução da velocidade da reação, uma vez que a superfície de contato entre enzima e substrato é menor, obrigando ao uso de excesso de catalisador biológico, o que encarece o processo. A opção seria usar enzimas na forma líquida, pois não existindo o suporte sólido a atividade catalítica não seria reduzida.

Fatores como a natureza e quantidade de enzima, temperatura, quantidade de água e possibilidade de reutilização da enzima devem ser considerados quando se pensa em utilizar a catálise enzimática.

As enzimas podem ser usadas na sua forma livre (em solução) ou imobilizadas em suporte sólido, sendo esta última a forma mais usada por ser mais fácil de separar e reaproveitar.

A presença de água na reação de transesterificação, catalisada por enzimas, é um fator importante. Por um lado a sua presença é indesejável devido à hidrólise dos triglicerídeos, por outro, ela é necessária para interagir com os grupos hidrofílicos, localizados nas superfícies das enzimas, deixando os sítios ativos mais “expostos”. No entanto, o excesso de água pode levantar alguns problemas como promover a hidrólise do triglicerídeo, diminuindo o rendimento da reação [17].

A reação de transesterificação catalisada por enzimas apresenta como principal desvantagem, comparativamente aos catalisadores homogêneos, o facto de requerer um tempo de reação muito longo para atingir o mesmo grau de conversão. Este incremento no tempo de reação deve-se principalmente, ao facto de as enzimas serem proteínas muito sensíveis a determinadas condições, como por exemplo a temperatura e a agitação, sendo por isso proibitiva a solução de incrementar a temperatura (acima de um determinado valor) para acelerar a reação.

A Tabela 2 resume as vantagens e desvantagens do uso da catálise enzimática e do processo mais usado atualmente na indústria, a catálise homogénea alcalina. [14]

Tabela 2 *Comparação entre processo catalítico químico e enzimático [14]*

Processo	Vantagens	Desvantagens
Químico (homogéneo alcalino)	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade - Alto rendimento - Curto tempo de reação 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificuldade de separação do catalisador - Impossibilidade de reutilização do catalisador - Limitações de utilização de álcool hidratado - Obtenção de produtos (biodiesel e glicerol) com menor grau de pureza após a etapa da reação
Enzimático (heterogéneo)	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de separação e reaproveitamento do catalisador suportado - Obtenção de produtos com maior grau de pureza - Possibilidade do uso de álcool hidratado na reação 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo tempo de reação - Custo das enzimas - Baixo rendimento, para o mesmo tempo de reação da catálise homogénea.

Uma das maiores razões de sucesso ou fracasso destes processos está no tipo de catalisador usado.

Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas são muito seletivas e catalisam as reações em condições muito brandas, geralmente em soluções aquosas neutras, a temperatura e pressão próximas da ambiente [18]. Para temperaturas e pressões diferentes, a atividade enzimática diminui, podendo até ocorrer a completa inibição da enzima.

O tipo de álcool a usar na reação também é um fator importante a considerar, uma vez que pode ser tóxico para a enzima. Se a escolha recair sobre o metanol, que se releva ser muito tóxico para a enzima, conduzindo à sua inativação, é necessário proteger o biocatalisador. Atualmente existem duas opções alternativas para minimizar a desativação da enzima pelo metanol à reação (i) presença, no meio reacional, de um solvente orgânico que “proteja” a enzima da toxicidade deste álcool, através do efeito de diluição, e (ii) adição do metanol por estágios, de modo a assegurar baixas concentrações do álcool no meio reacional, e mais concretamente junto da enzima.

A adição de um solvente orgânico ao meio reacional deverá simultaneamente ultrapassar duas limitações: (i) aumentar a solubilidade do óleo e do metanol e (ii) limitar a concentração de metanol que rodeia a enzima (vide Figura 7). O solvente neste

caso deverá funcionar como um agente emulsionante dos dois reagentes (metanol e óleo).[19]

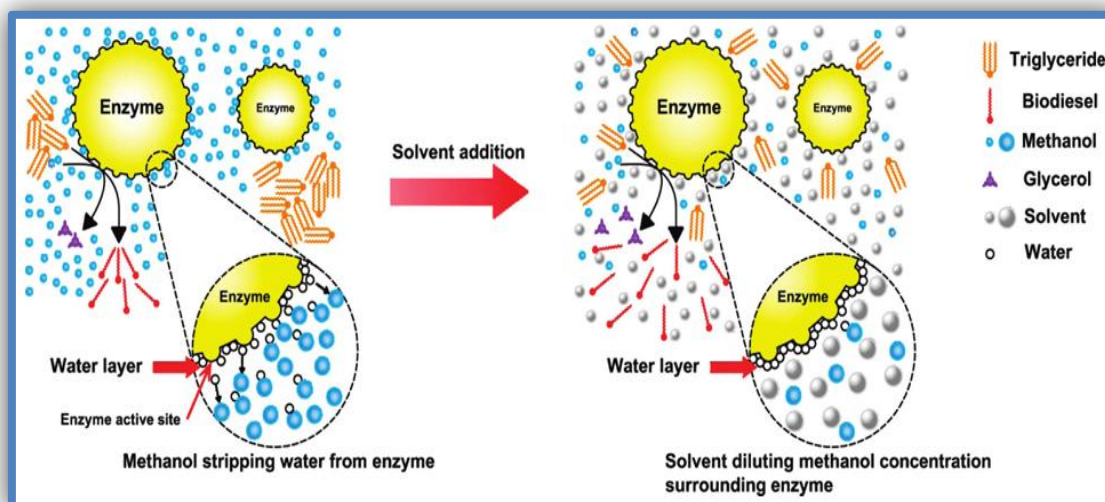


Figura 7 Reação sem e com solvente, onde está patente o efeito do metanol na água, na presença/ausência de solvente [19].

Na produção de biodiesel já foram testados alguns solventes orgânicos, nomeadamente: o n-heptano, o n-hexano, a acetona, o ciclohexano e mais recentemente, e com melhores resultados, o *tert*-butanol.

Segundo Li et al. (2006), quando não se utiliza *tert*-butanol, para a enzima Lipozyme[®]TL IM, a conversão em ésteres metílicos diminui cerca de 10%. Contudo, o rendimento da reação decresce progressivamente quando a razão volumétrica *tert*-butanol:óleo ultrapassa a unidade. Tal facto pode dever-se ao efeito de diluição dos reagentes. [20]

O glicerol é insolúvel no óleo, e facilmente absorvido pelo suporte da enzima imobilizada causando efeitos negativos na atividade desta, bem como na sua estabilidade operacional. Stevenson et al. (1994) propuseram um método para minimizar este problema, a adição de sílica gel à mistura reacional, com o objetivo de absorver gradualmente o glicerol formado à medida que é produzido. [20]

Em suma, na reação de transesterificação com metanol e catalisador enzimático imobilizado, a presença de um solvente pode ser necessária por três motivos: funcionar como agente emulsionante entre os reagentes, impedir que a superfície da enzima

absorva o glicerol formado ao longo da reação e proteger a enzima da toxicidade do álcool.

É ainda de acrescentar que, na catálise enzimática imobilizada não deve ser usada a agitação magnética da mistura reacional, sob risco de desintegração do suporte (da enzima), e assim impedir a sua reutilização.

Na secção seguinte serão apresentadas algumas informações adicionais sobre as enzimas e a sua aplicação na produção de biodiesel, visto serem a família de catalisadores selecionada para ser estudada no presente trabalho.

2.3 Enzimas

As enzimas são um tipo de proteínas presentes, e essenciais, a todos os seres vivos, encontrando-se nos animais, plantas e microrganismos (fungos e bactérias). Atuam como catalisadores biológicos –biocatalisadores- sem sofrer qualquer alteração. Não são consumidas na reação podendo, portanto, continuar a desempenhar funções catalíticas enquanto os reagentes adequados, normalmente chamados de substratos estão disponíveis.

As enzimas são compostas por aminoácidos, por sua vez, cada aminoácido é constituído por um grupo amino (NH_2) e um grupo carboxílico (COOH), ambos ligados ao mesmo átomo de carbono, como ilustra a Figura 8. As diferenças nos aminoácidos (na natureza existem cerca de 20) são determinadas pelas variações do grupo “R”, por vezes chamado de “cadeia lateral”. Esta cadeia, por sua vez, pode conter grupos amino, bem como outros grupos funcionais.

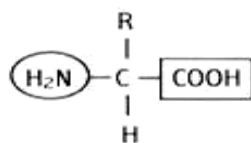


Figura 8 *Fórmula geral do aminoácido [21].*

As lipases (acilhidrolase triacilglicerol, EC 3.1.1.3), são enzimas que fazem parte da família das hidrólases que atuam em ligações de ésteres carboxílicos. O papel fisiológico natural destas enzimas é a hidrólise dos triglicerídeos em diglicerídeos,

monoglicerídeos, ácidos gordos e glicerol, mas também podem catalisar esterificações, alcoólises e transesterificações em meios não aquosos [22].

As características das enzimas como biocatalisadores são as seguintes:[13]

- capacidade de catalisar as reações à temperatura e pressão ambiente numa gama de pH neutro;
- especificidade, estereoespecificidade e regioespecificidade do substrato é estrita bem como a especificidade da reação.

A especificidade do substrato das lipases consiste na capacidade de distinguir características estruturais das cadeias acil, nomeadamente: comprimento, número, posição, configuração de ligações duplas, presença de grupos ramificados e a natureza da fonte de acil (ácido livre, éster alquílico, éster de glicerol, etc.).

A especificidade das lipases usadas na síntese de biodiesel baseia-se na sua regioespecificidade e especificidade em relação ao comprimento da cadeia de hidrocarbonetos do ácido gordo.

Em termos de regioespecificidade, isto é, a posição da ligação éster, as lipases são classificadas em três tipos:[13]

- sn-1,3-específica (hidrolisa a ligação éster na posição R1 ou R3 dos triglicerídeos);
- sn-2-específica (hidrolisa a ligação éster na posição R2 dos triglicerídeos);
- não específica (não faz distinção nas posições das ligações éster a ser separadas).

A regioespecificidade das lipases pode ser afetada por diversos fatores (temperatura, pH, presença de água, etc.) e alguns deles ainda não foram descobertos.

As lipases usadas para a produção de biodiesel têm de possuir uma ampla especificidade e regioespecificidade ao substrato.

O desempenho das enzimas é avaliado através da sua atividade. Uma enzima é classificada de mais ativa, relativamente a outra quando uma menor quantidade é necessária para atingir uma conversão específica. A atividade catalítica, que é uma quantidade cinética, depende do tempo e das condições em que ocorre a reação [23]. A unidade internacional de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que

catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 μmol de produto por minuto, e é designada por “U”.

A estrutura molecular das enzimas, que é essencial para a sua atividade catalítica, está sujeita a ser destruída sob determinadas condições, tais como temperatura elevada, pH elevado ou baixo e presença de determinados solventes orgânicos, ou mesmo em condições favoráveis ao catalisador, tais como, temperatura, pH e presença de água no meio. A taxa a que cada reação enzimática prossegue é dependente de vários fatores; entre os mais importantes está o pH do meio reacional, a temperatura, e a quantidade de substrato disponível para reagir face à quantidade de enzima presente.[23]

As preparações comerciais das enzimas derivam principalmente de fontes microbianas devido ao seu baixo custo de produção e à fácil alteração das propriedades. Tanto as lipases extracelulares como as intracelulares são usadas na síntese de biodiesel, porém a maioria das investigações foram realizadas usando preparações comerciais de lipases extracelulares, imobilizadas em diferentes suportes [24]. Apenas algumas lipases são capazes de realizar a síntese de biodiesel eficazmente, e só algumas delas podem catalisar a reação em ambos os sistemas: com solvente orgânico e sem solvente.

A recuperação de enzimas ativas de misturas reacionais é um outro problema quando são usadas no estado livre, i.e., não imobilizadas. Assim, a sua imobilização, está a atrair a atenção mundial na aplicação prática de bioprocessos. Em geral, os biocatalisadores imobilizados são estáveis e de fácil manuseio em comparação com os seus homólogos livres. Uma das suas vantagens mais importantes é que eles podem ser usados repetidamente a longo prazo [25].

2.3.1 Pré-tratamento e lavagem da enzima

Vários métodos de pré-tratamento para as lipases, livres e imobilizadas, têm sido investigados com vista a melhorar a sua atividade, estereoespecificidade e estabilidade.

O pré-tratamento interfere no desempenho das enzimas imobilizadas, aumentando possivelmente a transferência de massa na camada superficial ou alterando a fase intraparticular, mas também evitando a proximidade com a enzima através da inibição por parte dos álcoois e glicerol [26].

Geralmente, os químicos usados no pré-tratamento das enzimas são classificados em quatro tipos: [13]

- Substratos que aumentam a atividade da enzima em solventes orgânicos envolvendo regularização do seu sítio ativo por impressão molecular;
- Solventes orgânicos que aumentam a atividade total de duas formas:
 - ✓ Eliminando outras proteínas das lipases;
 - ✓ Causando uma mudança configuracional do sítio ativo de “estado fechado” para o “estado aberto”;
- Sais, cuja incorporação com a proteína molecular mantêm a configuração da lipase e evitar mudança do pH ótimo;
- Enzimas lipoprotetoras, cuja ligação com o sítio ativo da lipase, durante a fase de desidratação, o mantêm numa configuração cataliticamente ativa.

O pré-tratamento em solvente orgânico resulta numa mudança de configuração da enzima e alteração na camada de hidratação em seu redor. Durante o pré-tratamento, a camada de hidratação ao redor da enzima é saturada pelo solvente orgânico, deixando a camada de hidratação mais hidrofóbica, o que facilita o transporte das moléculas hidrofóbicas de lípidos para o sítio ativo da lipase.

Na literatura existem diversos métodos de pré-tratamento de enzimas empregues na produção de biodiesel. Segundo Azocar et al. (2011), cada grama de enzima é mergulhada em 10 mL de tert-butanol. Após 1h o solvente é removido e a lipase é mergulhada em óleo durante toda a noite. [27]

O pré-tratamento é uma etapa importante no processo de produção de biodiesel via catálise enzimática para alcançar maiores rendimentos. No entanto, o efeito dos tratamentos e a forma como estes devem ser utilizados com eficiência em operações de larga escala, ainda necessitam de ser estabelecidos.

Para a catálise enzimática ser economicamente viável o catalisador tem de ser reutilizado várias vezes. Um fator que poderá permitir isso é a lavagem da enzima com solvente orgânico quando esta começa a perder atividade.

Os principais componentes da mistura (óleo/biodiesel) são apolares, portanto o uso de um solvente apolar para lavar a lipase imobilizada ajuda a remover a camada de substrato/produto da superfície da enzima, preservando a sua atividade. [28]

Para melhorar o desempenho da lipase imobilizada, em meios de elevada polaridade, como os constituídos por metanol, procede-se à “regeneração” do biocatalisador lavando as partículas sólidas onde se encontra, com álcoois de 3 a 5 cadeias de carbono. [29]

2.3.2 Superatividade de Enzimas

Na última década, o uso de líquidos iónicos à temperatura ambiente ganhou particular importância no campo dos biocatalisadores. Estes líquidos têm sido usados geralmente como substitutos de solventes orgânicos em reações. Em comparação com os solventes orgânicos os líquidos iónicos apresentam uma série de vantagens, incluindo: maior variedade de líquidos, baixa inflamabilidade, condutividade iónica e térmica elevada, boa dissolução, alta estabilidade térmica e química e um elevado potencial eletroquímico.

A superatividade observada induzida pelo líquido iónico deve-se à formação de microestruturas micelares, que criam condições mais propícias à ação catalítica da enzima, permitindo o aumento da sua atividade.

Em muitos casos o uso de enzimas em líquidos iónicos é limitado pela baixa solubilidade, atividade e estabilidade das enzimas. [30]

Investigadores da UA demonstraram que um novo tipo de solvente iónico consegue induzir superatividade em enzimas aumentando até seis vezes a atividade da lipase da *Candida antarctica* (Novozyme[®]435 líquida), uma das enzimas mais utilizadas a nível industrial para melhorar a qualidade de certas gorduras e óleos vegetais em processos industriais. O estudo realizado demonstra que o líquido iónico cloreto de 1-decil-3-metilimidazólio é capaz de aumentar significativamente a atividade da enzima da *Candida antarctica*, de um modo até agora desconhecido. Os resultados demonstram que este solvente é capaz de induzir «superatividade» da enzima, aumentando até várias vezes a sua atividade. O resultado conseguido por esta equipa permitirá reações de esterificação e transesterificação muito mais rápidas e eficientes, podendo tornar economicamente viável o processo enzimático de produção de biodiesel.

2.4 Conclusão

Depois da pesquisa realizada constata-se que apesar de haver inúmeros estudos sobre a produção de biodiesel, esses estudos são escassos no que toca ao uso de enzimas e quando a matéria-prima são os óleos alimentares usados.

Independentemente do tipo de catalisador é possível obter elevadas conversões de triglicérides em ésteres, sendo para tal necessário adaptar as condições operatórias ao tipo de catalisador em causa. Cada família de catalisadores apresenta as suas vantagens e desvantagens.

Na Tabela 3 sumarizam-se as vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores usados na produção de biodiesel.

Tabela 3 Vantagens e desvantagens dos catalisadores usados na produção de biodiesel (adaptado de [8]).

Tipo	Exemplo	Vantagens	Desvantagens
Alcalino Homogéneo	NaOH, KOH	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo Custo; - Maior atividade catalítica - Condições de reação moderadas 	<ul style="list-style-type: none"> - Exigência de baixo teor de AGL; - Condições anidras; - Pode ocorrer saponificação; - Formação de emulsões; - Elevado volume de efluentes provenientes da purificação.
Alcalino Heterogéneo	CaO, CaTiO ₃ , CaZrO ₃ , CaO-CeO ₂ , CaMnO ₃ , Ca ₂ Fe ₂ O ₅ KOH/NaY, Al ₂ O ₃ /KI, Zeólito ETS-10, Alumina/sílica suportadas K ₂ CO ₃	<ul style="list-style-type: none"> - Não corrosivo; - Ambientalmente benigno; - Apresenta menos problemas de remoção; - Fácil separação; - Maior seletividade; - Maior tempo de vida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Exigência de baixo teor de AGL; - Condições anidras; - Elevado volume de efluentes provenientes da purificação; - Exigência de alta proporção molar de álcool:óleo; - Temperatura de reação e pressão elevada; - Elevado custo.
Ácido Homogéneo	H ₂ SO ₄ concentrado	<ul style="list-style-type: none"> - Catalisa simultaneamente a reação de esterificação e a reação de transesterificação; - Evita formação de sabão; - Processo económico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Corrosão de equipamento; - Aumento de resíduos para neutralização, difíceis de tratar; - Maior tempo de reação;
Ácido Heterogéneo	ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ₄ ²⁻ , TiO ₂ /SO ₄ ²⁻ , catalisador derivado de hidratos de carbono, zirconia sulfatada Amberlyst-15	<ul style="list-style-type: none"> - Catalisa simultaneamente a reação de esterificação e a reação de transesterificação; - Reutilizável. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa concentração de ácido; - Baixa microporosidade; - Limitações na difusão; - Custo elevado
Enzimático	Lipase <i>Candida antartica</i> fracção B, Lipase <i>Rhizomucor mieher</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Não ocorre saponificação; - Não poluente; - Catalisador reutilizável; - Biodiesel fácil de purificar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo elevado; - Desnaturação das enzimas.

Os catalisadores heterogéneos e enzimáticos continuam a ser alvo de constante investigação na comunidade científica mundial, de modo a torná-los tão competitivos com os catalisadores homogéneos. As grandes desvantagens deste tipo de catálise residem no custo do catalisador e no tempo de reação necessário.

Por norma, os catalisadores ácidos são usados para converter matérias-primas com alto teor de ácidos gordos livres (AGL) e os enzimáticos não são tolerantes ao metanol, sendo mais usados com etanol. [8]

Como o metanol, o principal álcool usado na reação de transesterificação, é tóxico para a enzima, este problema é contornado com o recurso ao uso de um solvente orgânico ou à adição de metanol por estágios. A principal razão para a adição deste solvente à mistura álcool-óleo consiste em melhorar a solubilidade destes substratos e aumentar a estabilidade operacional da lípase. No entanto, a necessidade de recuperação do solvente pode ser um inconveniente e onerar o processo.

A utilização da catálise enzimática pode ser uma via promissora na produção de biodiesel, especialmente quando se considera o uso de matérias-primas com maior nível de acidez ou teor de água, como é o caso dos OAU.

3 Metodologia experimental

3.1 Introdução

Sobre a produção de biodiesel existe muita informação, incluindo estudos de avaliação do desempenho de catalisadores. Todavia não foi encontrada informação quanto a uso combinado de enzimas e o seu efeito no rendimento na produção de biodiesel.

Recentemente alguns estudos [31] indicam que o uso de sílica embebida no álcool poderá ser uma forma de prevenir a sua toxicidade para as enzimas. Por outro lado, o uso da sílica simples poderá ser fundamental na absorção do glicerol [20], aumentando o rendimento da reação de transesterificação, e simultaneamente facilitar a posterior etapa de purificação da mistura de ésteres de ácidos gordos.

A componente experimental deste trabalho assenta na avaliação do desempenho de catalisadores enzimáticos imobilizados nas reações (transesterificação e esterificação) de síntese do biodiesel a partir de catalisadores enzimáticos imobilizados. Portanto, este trabalho focaliza-se na etapa da reação do processo de produção de biodiesel e não na purificação.

3.2 Ensaio a realizar

No presente trabalho, a amostra de OAU proveio de uma das cantinas da Universidade de Aveiro. Selecionou-se o metanol, por ser mais reativo e as enzimas usadas foram, a Novozyme[®] 435 (*Candida antarctica*), a Lipozyme[®]TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) e a Lipozyme[®]RM IM (*Rhizomucor miehei*), gentilmente cedidas pela Novozyme A/S Denmark. Com o objetivo de minimizar os problemas de toxicidade do álcool para as enzimas, optou-se por o uso de um solvente orgânico hidrofílico, o *tert*-butanol por ser o que apresentou melhores resultados na bibliografia consultada. [27] Na tabela seguinte encontra-se o resumo da bibliografia em que se baseou o estudo deste trabalho.

Tabela 4 *Resumo da principal bibliografia em que se baseou este estudo.*

Catalisador	Matéria-prima	T (°C)	Tempo reacional [h]	Razão mássica catalisador:óleo [%]	Razão molar álcool:óleo	Razão volumétrica solvente:óleo	Agitação [rpm]	Solvente	C _{ésteres} [%]	Referência
Nov 435	OAU	44,5	12	15	3.8:1	0,75	200	<i>t</i> -butanol	-	[27]
Nov 435	Óleo de girassol	45	50	3	4:1	-	150	<i>t</i> -butanol	98	[29]
Nov435	Óleo de colza	35	24	2	4:1	1:1	130	<i>t</i> -butanol	90	[20]
Nov 435	Óleo de canola	45	24	5	3:1	-	300	-	99,9	[31]
Lip RM IM	Óleo de canola	45	24	5	3:1	-	300	-	96,8	[31]
Nov 435	OAU	50	4	10	25:1	-	150	-	89,1	[32]

Testou-se também o efeito, no rendimento da reação, da presença de sílica no meio reacional com a enzima Novozyme[®]435.

Na Tabela 5 encontram-se resumidos todos os ensaios realizados neste trabalho.

Tabela 5 *Resumo de todos os ensaios realizados.*

Ensaio	T _{pré-tratamento} [°C]	Enzima	Comentário
1	Ambiente	Novozyme [®] 435 virgem	Desempenho individual
2	Ambiente	Lipozyme [®] TL IM virgem	Desempenho individual
3	Ambiente	Lipozyme [®] RM IM virgem	Desempenho individual
4	50°C	Novozyme [®] 435 virgem	Desempenho individual
5	50°C	Lipozyme [®] TL IM virgem	Desempenho individual
6	50°C	Lipozyme [®] RM IM virgem	Desempenho individual
7	Ambiente	Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] TL IM	Uso combinado 50/50 (m/m)
8	Ambiente	Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] RM IM	Uso combinado 50/50 (m/m)
9	Ambiente	Lipozyme [®] TL IM/ Lipozyme [®] RM IM	Uso combinado 50/50 (m/m)
10	50°C	Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] TL IM	Uso combinado 50/50 (m/m)
11	-	2º Ciclo Novozyme [®] 435	Reutilização
12	-	3º Ciclo Novozyme [®] 435	Reutilização
13	-	2º Ciclo Lipozyme [®] TL IM	Reutilização
14	50°C	Novozyme [®] 435 com sílica	Captação do glicerol
15	50°C	Novozyme [®] 435com C ₁₀	Aumento de atividade

3.3 Material e métodos

O óleo vegetal virgem que originou o OAU utilizado neste trabalho é maioritariamente de amendoim.

Primeiramente, a componente laboratorial deste trabalho centrou-se na caracterização desta amostra de OAU, a ser utilizada em todos os ensaios.

Os respetivos procedimentos experimentais encontram-se descritos na secção 3.3.1. Neste trabalho, o rendimento da reação foi monitorizado em termos da conversão em ésteres.

Os diversos produtos químicos utilizados foram: hidróxido de sódio em pastilhas (Pronalab), metanol (Sigma-Aldrich), *tert*-butanol (Panreac), álcool isopropílico (José M. Vaz Pereira, S. A.), piridina (Panreac), clotrimetilsilano (Acros Organics), N,O-Bis(trimetilsilano) (Panreac), metil heptadecanoato (Fluka) éter de petróleo (Merck), acetona (destilada) e fenolftaleína (Riedel-de-Haen).

Os dados de segurança dos vários produtos químicos e das enzimas são apresentados no Anexo A.

O destino dado aos resíduos gerados encontra-se sumariado no Anexo B.

3.3.1 Caracterização do OAU

O OAU foi deixado a decantar e usou-se sempre a camada superficial (homogeneizada); não tendo sido necessário filtrá-lo. Posteriormente, procedeu-se à sua caracterização através da determinação dos seguintes parâmetros: viscosidade, densidade, teor de humidade, valor ácido e massa molar. Todos os procedimentos usados na caracterização do OAU, relativos á densidade, viscosidade, massa molar, teor de humidade e valor ácido encontram-se no anexo D.

3.3.3.1 Teor em ésteres

A CG é uma técnica muito usada na determinação de composições de soluções, mesmo quando se trata de concentrações baixas. No presente trabalho a CG-FID permitiu identificar e quantificar os ésteres metílicos. Posteriormente calculou-se a percentagem de ésteres metílicos existentes nas amostras da mistura reacional ao longo do tempo.

A referida determinação foi efetuada num cromatógrafo Varian 3800-CP da Varian Inc., com detetor FID, usando hélio como gás de arraste, com um caudal de 2,0 mL/min e uma coluna capilar Varian CP Select™ Biodiesel for FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) com 30 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme.

Em todas as análises, o programa de temperatura da coluna foi: temperatura inicial do forno de 120°C, rampa de 5°C/min até 250°C e tempo de espera de 1 minuto. A temperatura do injetor e do detetor foi mantida a 250°C. A injeção das amostras foi feita no modo “*split*” com uma razão de 1:20.

Na análise das amostras por CG-FID é necessária a derivatização da amostra por sililação. O objetivo da sililação consiste em interromper a reação no momento em que a amostra é retirada, prevenir a sua degradação ou da própria coluna cromatográfica. A obtenção de derivados sililados elimina a presença dos grupos OH presentes nestas amostras e que são responsáveis pelo seu mau comportamento cromatográfico.

Em suma, uma vez concluída a derivatização das amostras garante-se que, por um lado, a reação é interrompida após as amostragens, e por outro, que os ácidos e álcoois presentes na amostra não são adsorvidos pela coluna do cromatógrafo.

O procedimento de derivatização e de análise na CG seguido foi:

- a. Sililação de 30 µL de amostra, previamente pesada, por adição de 100 µL de piridina, 100 µL de N,O-Bis(trimetilsilano)trifluor acetamida e 50 µL de clorotrimetilsilano. Pesas a amostra com os três reagentes sililantes adicionados;
- b. Digestão em banho de óleo a 70-80°C durante 30 minutos;
- c. Congelamento das amostras, no caso de não serem analisadas nos dois dias seguintes, caso contrário, colocar as amostras no frigorífico;
- d. Preparação da solução de metil heptadecanoato (padrão interno), em n-heptano, com uma concentração de 10 mg/mL;
- e. Adição de 250 µL do padrão interno preparado no passo anterior, a 100 µL de amostra sililada (previamente pesada);
- f. Injeção no cromatógrafo de 0,5 µL da solução preparada no passo anterior;

O uso de um padrão interno de referência é necessário, uma vez que permite a quantificação do cromatograma (i.e. dos picos) obtidos, tendo por base a sua comparação.

O cálculo da concentração em ésteres teve em conta a seguinte expressão (EN 14103:2003):

$$C_{\text{ésteres}} [\%] = \frac{(\sum A_E) - A_{MH}}{A_{MH}} \times \frac{C_{MH} [mg/mL] \times V_{MH} [mL]}{m_{\text{amostra}} [mg]} \quad (13)$$

Em que ΣA_E corresponde ao somatório das áreas ocupadas por cada éster; A_{MH} , C_{MH} e V_{MH} correspondem respetivamente à área do pico, à concentração e ao volume do padrão interno.

3.3.2 Pré-tratamento do OAU

A conversão dos óleos e gorduras em ésteres pressupõe uma preparação da matéria-prima, com o objetivo de criar as melhores condições conducentes a uma taxa de conversão máxima. Quando a matéria-prima foi sujeita a processos potencialmente contaminantes, como fritura de alimentos, por exemplo, é conveniente proceder a um pré-tratamento antes de ser utilizada. Este pré-tratamento visa eliminar as impurezas e os compostos indesejáveis, de modo a que o rendimento do processo seja superior e/ou que o produto obtido apresente melhor qualidade.

No caso da catálise homogénea a matéria-prima deve apresentar um baixo teor de humidade, pelo que deve ser submetida a secagem e deve, ainda apresentar um baixo nível de acidez o que implica a sua neutralização, através de uma lavagem com solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio ou ainda a esterificação com catalisador ácido.

Assim, dependendo do composto a eliminar/reduzir, os óleos vegetais e gorduras animais podem sofrer diversos tipos de tratamento, como sejam a redução de ácidos gordos livres, remoção de gomas e resíduos sólidos, filtração, secagem, branqueamento e desodorização.

No presente trabalho, o OAU utilizado nos diversos ensaios não sofreu qualquer tipo de pré-tratamento; a filtração foi prescindível pois com o repouso da amostra os sólidos suspensos sedimentaram (como referido anteriormente).

Como se terá oportunidade de verificar (vide secções 4.2.3 e 4.2.4), o teor de humidade e o valor ácido da amostra de OAU são, como se verá posteriormente apresentam valores baixos, tendo sido dispensado qualquer tipo de pré-tratamento.

3.3.3 Características das enzimas

A composição das três enzimas - Novozyme[®] 435, Lipozyme[®] RM IM e Lipozyme[®] TL IM - usadas neste trabalho foi fornecida pela Novozyme A/S Denmark. A mesma

empresa facultou os valores de atividade do lote a que pertenciam as enzimas usadas no presente trabalho. Toda esta informação encontra-se compilada na tabela seguinte.

Tabela 6 Composição média e atividade das enzimas.

	Ingrediente	Aprox. %(m/m)	Atividade inicial
Novozyme®435	Resina acrílica	78,8	9.080,0 PLU ¹ /g
	Lipase	21	
	Sorbato de potássio	0,20	
Lipozyme®TL IM	Resina fenólica	79	301,97 IUN ² / g
	Lipase	6	
	Água	10	
	Gelatina de peixe	5	
Lipozyme®RM IM	Suporte de dióxido de silicone	76	450,30 IUN/g
	Lipase	10	
	Água	4	
	Maltodextrina	10	

3.3.4 Reação de transesterificação

O rendimento da reação de transesterificação e esterificação³ depende de diversos fatores, sendo um deles a massa de catalisador. Em relação à quantidade a adicionar ao sistema reacional, esta é dada pela equação seguinte:

$$m_{\text{catalisador}} [\text{g}] = \frac{m_{\text{OAU}} [\text{g}] \times \text{razão mássica de catalisador} [\%]}{100} \quad (14)$$

Visto que a massa de OAU foi determinada diretamente por gravimetria, é fácil determinar o volume utilizado no respetivo ensaio, bastando conhecer a sua densidade.

O conhecimento do volume de OAU torna-se importante quando usado solvente (normalmente expresso em % v/v, em relação ao volume de OAU).

Para se assegurar uma temperatura constante durante cada ensaio, a mistura reacional e o sistema de agitação (orbital) foram colocados numa estufa à temperatura pré-estabelecida de 50 °C. Este valor de temperatura foi selecionado pelo fato de não haver muitos estudos com a mesma.

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

² 1 IUN corresponde à taxa de conversão de 0,01 g de tristearina/L/min/g enzima. É uma unidade de interestificação

³ Por uma questão de simplificação, doravante será usada apenas a terminologia de “reação de transesterificação” em detrimento de “reações de transesterificação e esterificação”; tendo contudo em mente que na catálise enzimática ocorrem ambas as reações, sendo a de transesterificação predominante, face a composição do OAU.

Antes de se dar início à etapa da reação, a(s) enzima(s) foi(foram) pré-tratada(s) seguindo o procedimento o descrito por Laura Azocar [27] . Inicialmente o pré-tratamento usado foi:

- a. Suspender 7,5 g de enzima em *tert*-butanol durante 1 h à temperatura ambiente (no caso, cerca de 20 °C);
- b. Remover o solvente por decantação;
- c. Incubar a enzima em 75 g de OAU (novamente à temperatura ambiente) durante uma noite.

Porém, face aos resultados obtidos com o pré-tratamento anterior, i.e. o rendimento da reação nas primeiras horas era relativamente baixo, optou-se por alterar a temperatura de incubação da enzima quer no solvente quer no OAU, para 50°C. No ensaio com o líquido iónico C₁₀, o pré-tratamento foi realizado com agitação.

Concluído o pré-tratamento da enzima dá-se início à etapa da reação, procedendo-se à adição do álcool e do solvente à mistura de OAU e enzima proveniente da etapa do pré-tratamento.

A Tabela 7 resume as condições experimentais comuns a todos os ensaios realizados.

Tabela 7 Condições operatórias para todos os ensaios.

m_{OAU} [g]	75
% Enzima	10
m_{Enzima} [g]	7,5
Razão molar álcool: óleo	4:1
V_{metanol} [mL]	13,8
Razão volumétrica solvente:OAU %	0,75
Volume <i>tert</i> -butanol [mL]	60
Temperatura [°C]	50
Agitação Orbital [rpm]	200
Tempo de reação [h]	30

Foram feitas amostragens aos 30 minutos e às 1,2,3,5,8,10,12,24,27 e 30 horas para todos os ensaios.

Com o primeiro pré-tratamento fizeram-se os ensaios:

- Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM estudadas individualmente;
- Uso combinado 50/50 (m/m) das enzimas Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM, Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM e Lipozyme[®]TL IM /Lipozyme[®]RM IM;

No segundo pré-tratamento realizaram-se os seguintes ensaios:

- Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM, Lipozyme[®]RM IM estudadas individualmente;
- O uso combinado 50/50 (m/m) das enzimas Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM;
- 2 reutilizações para a enzima Novozyme[®]435;
- 1 reutilização para a enzima Lipozyme[®]TL IM;
- A enzima Novozyme[®]435 com adição de sílica em esferas ao meio reacional;
- A enzima Novozyme[®]435 com o líquido iónico cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio [C₁₀].

Note-se que quando se alterou a temperatura do pré-tratamento das enzimas, e se realizaram mais ensaios, excluiu-se a combinação da Lipozyme[®] RM IM com as restantes duas enzimas em estudo, porque esta tinha apresentado um desempenho manifestamente insatisfatório. Estes resultados poderão ser observados na secção 4.3.2..

O reator usado na realização dos diversos ensaios foi um frasco de vidro roscado de 250 mL da Duran[®]. Tentou-se maximizar a superfície de contacto entre as enzimas e os reagentes. Para que a agitação não afetasse a integridade física das enzimas, recorreu-se a uma placa de agitação orbital colocada dentro da estufa como ilustra a Figura 9.



Figura 9 Esquema experimental usado na reação de transesterificação e esterificação do OAU.

Como referido acima, as reações iniciaram-se com a adição da mistura de metanol (volume total usado no ensaio) e solvente ao reator que continha o óleo e a enzima, provenientes do pré-tratamento. As amostras recolhidas foram submetidas a derivatização por sililação e analisadas de imediato por CG, ou quando tal não foi possível, foram preservadas no congelador.

A Figura 10 ilustra as principais etapas envolvidas neste processo.

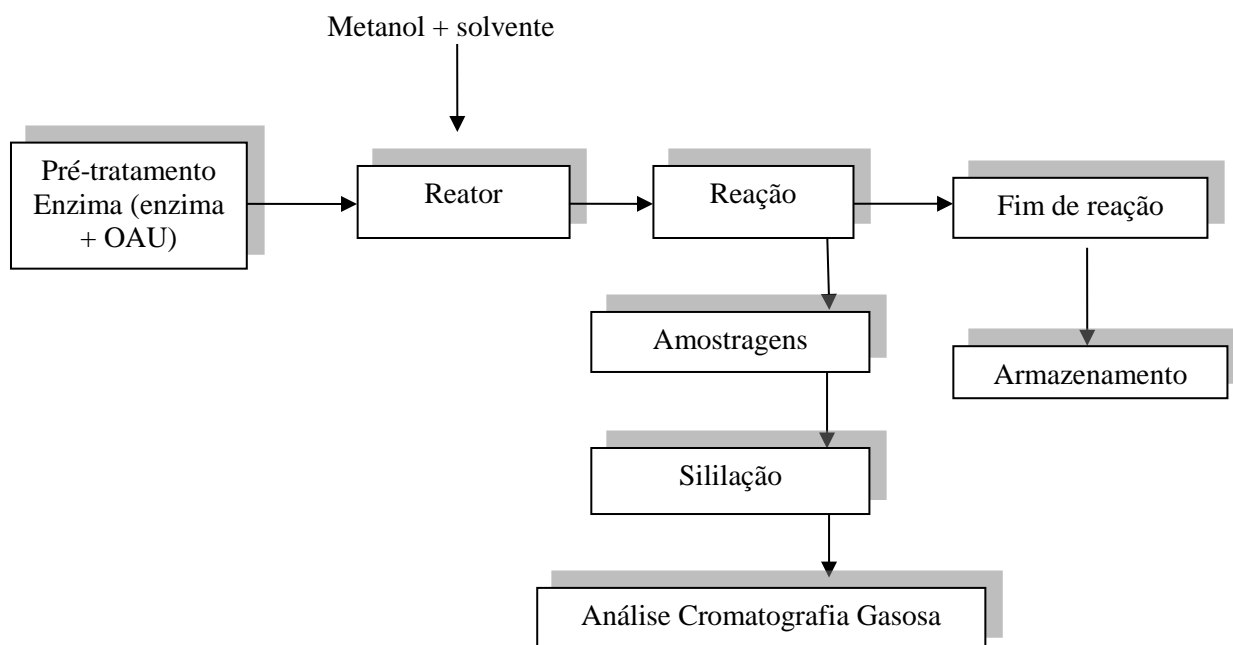


Figura 10 Esquema do procedimento experimental.

No final de todos os ensaios a enzima foi separada da solução por filtração. As enzimas utilizadas nas reutilizações voltaram a ser usadas sem qualquer tratamento, enquanto as restantes foram lavadas com *tert*-butanol e armazenadas.

3.4 Conclusão

Neste capítulo foi apresentada a metodologia de ensaios adotada ao longo do estudo, bem como os diversos ensaios realizados com a pretensão de avaliar:

- O desempenho de várias enzimas individualmente e na forma combinada;
- A perda de atividade Lipozyme[®]TL IM com uma reutilização e da Novozyme[®]435 com duas;
- O efeito da presença de um líquido iónico na atividade da Novozyme[®]435;
- O efeito da sílica no meio reacional em termos do rendimento da reação;
- O efeito da temperatura de incubação (pré-tratamento) das enzimas na evolução temporal do rendimento da reação.

Para minimizar os efeitos tóxicos do metanol sobre as enzimas imobilizadas, foi usado um solvente orgânico: o *tert*-butanol.

As condições operatórias para todos os ensaios foram as seguintes: razão mássica catalisador:OAU=10%, razão molar metanol:OAU=4:1, T=50°C e 200 rpm). Em todos os ensaios foram retiradas amostragens ao longo do tempo, estas foram mais frequentes nos momentos iniciais da reação (onde se previa maiores velocidades de reação), sendo mais espaçadas na parte final (onde a velocidade de reação deve diminuir devido ao consumo dos reagentes).

Previamente à realização dos ensaios foi imprescindível caracterizar o OAU, pois só deste modo se tornou possível assegurar algumas variáveis necessárias à concretização da reação de transesterificação (e esterificação).

4 Resultados e discussão

4.1 Introdução

A componente experimental do presente trabalho iniciou-se pela caracterização da matéria prima, i.e. o OAU (vide secção 4.2), seguindo-se a realização da reação de transesterificação com vista à produção de biodiesel.

Note-se que as enzimas lipases catalisam quer a reação de transesterificação, quer a de esterificação. Os resultados dos vários ensaios realizados para a reação de transesterificação encontram-se na secção 4.3. Por fim, na secção 4.4 são tecidas as principais conclusões desta componente experimental.

4.2 Caracterização do OAU

A matéria-prima (OAU) a usar no presente trabalho foi caracterizada, tendo em conta os seguintes parâmetros: viscosidade, densidade, teor de humidade, valor ácido e massa molar.

4.2.1 Densidade

A densidade do OAU foi determinada usando um densímetro de acordo com o descrito na secção 3.3.1.1. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 8:

Tabela 8 *Densidade do OAU.*

Ensaio	ρ [g/L]@16°C	$\bar{\rho}$ [g/L] @15°C
1	920,0	
2	920,0	920,1
3	920,0	

O valor da densidade média do OAU (920,1 g/L) foi obtido através da Equação 1. Este valor encontra-se na gama de valores determinados por outros autores [33], [34].

4.2.2 Viscosidade

A viscosidade cinemática foi determinada de acordo com o descrito na secção 3.3.1.2. Realizaram-se três ensaios cujos resultados se encontram na Tabela 9:

Tabela 9 Viscosidade cinemática do OAU ($T=40^{\circ}\text{C}$.)

Ensaio	Δt [s]	c [mm^2/s^2]	ν [mm^2/s]
1	468		48,78
2	465	0,10446	48,57
3	467		48,68

O valor médio da viscosidade cinemática da amostra de OAU é de $48,71\text{mm}^2/\text{s} \pm 0,12$. Este valor é da mesma ordem de grandeza dos encontrados na bibliografia (e.g. Laura Azocar [33]).

4.2.3 Teor de Humidade

Seguindo o procedimento exposto na secção 3.3.1.3, determinou-se o teor de humidade ($w_{w,\text{OAU}}$) do OAU pela equação 3.3..

Tabela 10 Teor de humidade do OAU.

Ensaio	$w_{w,\text{OAU}}$ [%]	$w_{w,\text{OAU}}$ [%]
1	0,08583	
2	0,07652	$0,08488 \pm 0,007931$
3	0,09229	

Assim, o OAU apresenta um teor de humidade de aproximadamente 0,08%.

O teor de humidade de um óleo alimentar usado depende das condições de fritura e armazenamento a que foi sujeito. Assim, é expectável que diferentes autores tenham trabalhado com amostras com diferentes teores de água. Como já foi mencionado, o teor de humidade para catálise homogénea é importante ser baixo ($<0,3\%$, segundo Felizardo [2]). Em contrapartida, na catálise enzimática a presença de água pode até ser benéfica no rendimento da reacção.

4.2.4 Valor ácido

O valor ácido, ou índice de acidez, foi determinado pelo método titrimétrico descrito na secção 3.3.1.5. Os resultados obtidos encontram-se na tabela que se segue:

Tabela 11 Valor ácido do OAU.

Ensaio	V_{NaOH} [mL]	Valor ácido [mg KOH/g OAU]
1	0,9	
2	0,8	1,277
3	0,8	

O valor ácido da amostra de OAU é 1,277 mg KOH/g OAU.

Tendo em conta os resultados obtidos por outros autores, tais como Laura Azocar [33] e Leung[35], o valor ácido da amostra de OAU utilizada neste estudo apresenta um valor semelhante. Visto tratar-se de um óleo vegetal que já foi submetido ao processo de fritura, o seu valor ácido é relativamente baixo.

4.2.5 Massa molar

A massa molar do OAU foi determinada de acordo com o exposto na secção 3.3.1.5, sendo esta considerada aproximadamente igual à massa molar da mistura de triglicerídeos.

Tendo por base os dados que constam na bibliografia para o caso do óleo de amendoim, procedeu-se à determinação do perfil em ésteres do OAU. Os resultados obtidos com o auxílio da CG, assim como a massa molecular dos respetivos ésteres encontram-se sumariados na tabela seguinte:

Tabela 12 *Dados necessários à determinação da massa molar do OAU.*

Ácido gordo	Fórmula empírica do éster metílico	M [g/mol]	$w_{i,bs}$ [kg/kg biodiesel bs]
Ácido láurico C12:0	$C_{13}H_{26}O_2$	214	0,0005
Ácido mirístico C14:0	$C_{15}H_{30}O_2$	242	0,0011
Ácido palmítico C16:0	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0,1250
Ácido margárico C17:0	$C_{18}H_{36}O_2$	284	0,0006
Ácido esteárico C18:0	$C_{19}H_{38}O_2$	298	0,0214
Ácido oleico C18:1	$C_{19}H_{36}O_2$	296	0,4976
Ácido linoleico C18:2	$C_{19}H_{34}O_2$	294	0,3387
Ácido α -linoleico C18:3	$C_{19}H_{32}O_2$	292	0,0012
Ácido araquídico C20:0	$C_{21}H_{42}O_2$	326	0,0119
Ácido bénico C22:0	$C_{23}H_{46}O_2$	354	0,0020

Utilizando as Equações 6 a 9 obtém-se a fórmula empírica média para os ésteres metílicos da amostra: $C_{19}H_{35}O_2$.

Estando esta fórmula empírica determinada, é possível calcular a fórmula empírica média dos triglicerídeos do OAU, fazendo uso das Equações 10, 11 e 12. Sendo o resultado obtido $C_{57}H_{101}O_6$, correspondendo uma massa molar de 881 g/mol. Este valor encontra-se dentro da gama típica dos óleos alimentares usados que é possível encontrar na bibliografia consultada [2].

Como se conhece a natureza do óleo vegetal virgem que deu origem à amostra de OAU utilizado neste estudo, foi possível prever qualitativamente o perfil de ácidos gordos, a partir da composição típica média do óleo de amendoim (vide Tabela 13). Para tal assume-se que a composição de um OAU sofre apenas alterações ao nível do teor em ácidos gordos e no grau de (in)saturação, não sendo significativas as alterações ao nível do número de átomos de carbono (tamanho da cadeia).

Tabela 13 Composição típica em ácidos gordos (% m/m) do óleo de amendoim refinado [36].

Óleo de Amendoim	Composição em ácidos gordos (%m/m)											
	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0
a)	0,1	9,5	0,1	-	-	2,2	44,8	32,0	-	1,3	-	1,8
b)	0,1	11,1	0,2	0,1	-	2,4	46,7	32,0	1,3	1,6	2,9	-
c)	0,1	11,1	0,2	0,1	0,1	2,4	46,7	32,0	1,3	1,6	2,9	1,5
d)	0	8,17	0	-	-	1,73	54,15	27,46	0,90	2,42	2,92	1,83
e)	-	9,3-13	-	-	-	1,1-3,6	35,6-58,3	20,9-43,2	0,3-2,4	0,7-3,2	1,8-4,4	0,4-1,9

a) Chapman *et al.*, 1992

b) Stauffer, 1996

c) Brien, 1998

d) Pérez *et al.*, 2010

e) Carrin *et al.*, 2010

Comparando a Tabela 12 e a Tabela 13, constata-se que os teores relativos a cada um dos ácidos gordos são semelhantes no óleo virgem e no usado. Contudo, em relação ao C18:1 e C18:2, no OAU apresentam valores mais próximos entre si, quando comparado com a referência e). Alerta-se para o facto de que estão a ser comparadas amostras de óleo, que apesar de serem ambas de amendoim, não provieram da mesma origem.

4.3 Reação de transesterificação

Com o presente trabalho pretendeu-se otimizar as condições operatórias para a produção de biodiesel por catálise enzimática a partir das enzimas imobilizadas: Novozyme[®] 435, Lipozyme[®] TL IM, Lipozyme[®] RM IM.

Todas as enzimas foram submetidas ao pré-tratamento descrito em 3.3.3. Todas as reações de transesterificação ocorreram em reatores descontínuos fechados, e as

amostras foram retiradas com o auxílio de uma micropipeta para serem sililadas para posterior análise de CG.

A evolução da reação foi monitorizada ao longo do tempo em termos do rendimento em ésteres ($\eta_{\text{ésteres}}$), calculado através da equação:

$$\eta_{\text{ésteres}} [\%] = \frac{m_{\text{mistura reacional}} \times C_{\text{ésteres}} [\%]}{m_{\text{OAU}}} \quad (14)$$

Onde m_{OAU} corresponde à massa de OAU usada na reação de transesterificação, $m_{\text{mistura reacional}}$ representa a massa total da mistura reacional, que pelo princípio da conservação da massa será igual à massa inicial dos reagentes e solvente, e $C_{\text{ésteres}}$ é a concentração em ésteres na mistura reacional.

Na secção 4.3.1 apresentam-se os resultados do desempenho das enzimas individualmente para ambos os pré-tratamentos (temperatura ambiente e 50°C). Na secção 4.3.2 apresentam-se os resultados das reutilizações da Novozyme[®]435 e da Lipozyme[®]TL IM pré-tratadas a 50°C. A secção 4.3.3 será destinada à combinação das enzimas Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM, Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM e Lipozyme[®]TL IM /Lipozyme[®]RM IM pré-tratadas à temperatura ambiente e das enzimas Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM com o pré-tratamento a 50°C. Por fim na secção 4.3.4 e 4.3.5 serão apresentados os resultados da enzima Novozyme[®]435 com a adição de sílica e com o líquido iónico respetivamente.

4.3.1 Uso das enzimas individualmente

Neste capítulo serão apresentados os estudos realizados para as três enzimas individualmente com os dois tipos de pré-tratamento, i.e., pretende-se avaliar a influência da temperatura do pré-tratamento das enzimas na velocidade da reação e no rendimento em ésteres atingido. Todos os ensaios foram submetidos às mesmas condições: temperatura de 50°C, agitação 200 rpm, razão molar álcool:óleo de 4:1, razão volumétrica do solvente 0,75%.

4.3.1.1 Enzimas pré-tratadas à temperatura ambiente

As três enzimas (Novozyme[®]435, Lipozyme[®]TL IM e Lipozyme[®]RM IM), foram submetidas ao pré-tratamento descrito na secção 3.3.3..

A Figura 11 mostra a evolução temporal da conversão em ésteres observada para as referidas enzimas, pré-tratadas à temperatura ambiente.

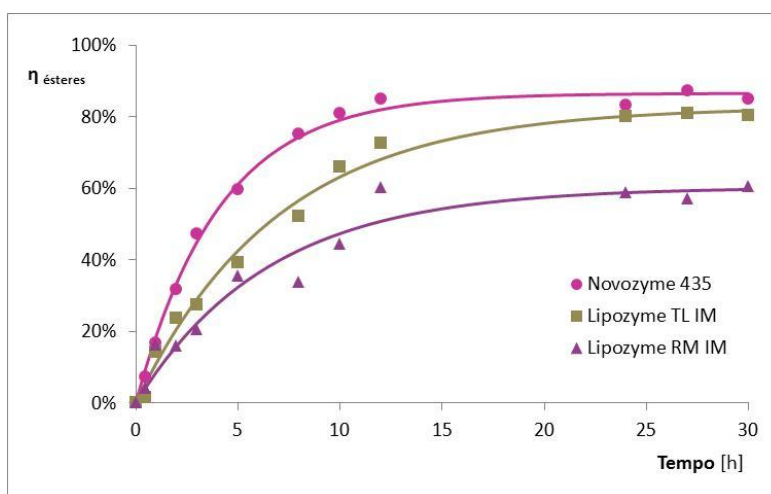


Figura 11 Rendimento em ésteres em função do tempo de reação para as três enzimas pré-tratadas à temperatura ambiente.

Na Novozyme[®] 435, ao fim de 30 minutos de reação a conversão em ésteres foi de 10 %; e ao fim de 5 horas de 61,2 %. O rendimento máximo foi atingido às 26 horas e foi de 86,6 %.

Com a Lipozyme[®] TL IM, ao fim de 30 minutos a conversão foi de apenas 5,8 %, e às 5 horas de 42,6%. Com esta enzima não foi atingido o estado estacionário durante o ensaio, tendo-se registado um rendimento cerca de 82% às 30 horas.

À semelhança da enzima anterior, com a Lipozyme[®] RM IM o estado estacionário também não foi conseguido durante o período estabelecido para o ensaio, tendo-se observado um rendimento máximo de 59,7 %.

Na Tabela 14 estão representados os rendimentos máximos atingidos para as três enzimas nestes ensaios.

Tabela 14 Rendimento máximo atingido pelas enzimas individualmente, quando pré-tratadas à temperatura ambiente.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Novozyme [®] 435	86,6	26
Lipozyme [®] TL IM	81,7	30
Lipozyme [®] RM IM	59,7	30

Em todas as enzimas a velocidade inicial da reação é maior do que em qualquer outro período do ensaio, denotando que as enzimas não passaram por um período de adaptação ao substrato. Facto que se compreende, visto que umas das etapas do pré-tratamento a que as enzimas foram submetidas, consistiu na incubação com o substrato.

Quer em termos de velocidade inicial, quer no rendimento máximo conseguido nas 30 h do ensaio, o desempenho das três enzimas obedece à mesma ordem, sendo: Novozyme[®]435 > Lipozyme[®]TL IM > Lipozyme[®]RM IM.

Apesar de se conhecer o valor das atividades iniciais das enzimas (vide Tabela 6), facultadas pela Novozyme A/S Denmark, não é possível relacionar esses valores com os comportamentos exibidos pelas referidas enzimas, porque se tratam de unidades de atividade distintas.

A unidade de atividade da Novozyme[®]435 baseia-se na síntese do éster propilaurato (PLU), sendo determinada a partir do rendimento da reação do ácido láurico com o 1-propanol, ou seja de uma reação de transesterificação.

Por sua vez, as atividades da Lipozyme[®]TL IM e da Lipozyme[®]RM IM, expressas em IUN, correspondem a reação(ões) de interesterificação, i.e., conversão de ésteres noutro tipo de ésteres. Assim, não se trata de uma unidade de atividade que interesse para este trabalho.

Segundo fonte da empresa Novozymes, estes valores de atividade são determinados em função do uso final (comercial) das enzimas.

É ainda de notar que a Lipozyme[®]RM IM foi a enzima que se revelou mais difícil de trabalhar, porque algumas amostras continham partículas sólidas, sendo mais difícil assim de analisar na CG.

As amostras recolhidas nestes ensaios, apresentados na Figura 11, foram caracterizados por CG dois meses após a realização do trabalho experimental. Após derivatização as amostras foram congeladas.

4.3.1.2 Enzimas pré-tratadas a 50°C

Com o intuito de aumentar a velocidade da reação de conversão de triglicerídeos em ésteres, testou-se o pré-tratamento das mesmas enzimas da secção 4.3.1.2 a uma temperatura superior, i.e., à temperatura pré-estabelecida para todos os ensaios: 50°C.

Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 12.

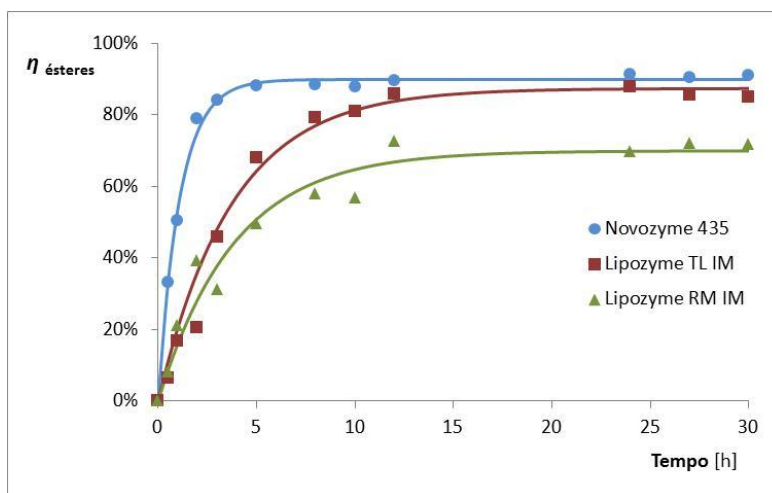


Figura 12 *Rendimento em ésteres em função do tempo de reação para as três enzimas pré-tratadas a 50°C.*

A Novozyme[®] 435 ao fim de 30 minutos converteu 33 % de triglicerídeos em ésteres e às 8 horas 89,9%, correspondendo este ao valor máximo obtido neste ensaio.

Apesar da Lipozyme[®] TL IM apresentar rendimento máximo 87,4%, este valor só foi atingido ao fim de 27 horas, daí ser menos competitiva a nível industrial. Aos 30 minutos esta enzima consegue uma conversão de 10,9% e às 5 horas 64,7%.

Mais uma vez a Lipozyme[®] RM IM foi aquela que apresentou conversões menores. Ao fim de 30 minutos o rendimento foi de 8,5% e às 5 horas 50,8%. O rendimento máximo para esta enzima foi de aproximadamente 70% ao final de 24,5 horas.

A Tabela 15 mostra os rendimentos máximos e o tempo de reação respetivo para as 3 enzimas.

Tabela 15 *Rendimento máximo atingido para as 3 enzimas com pré-tratamento a 50°C.*

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
Novozyme [®] 435	89,9	8
Lipozyme [®] TL IM	87,4	27
Lipozyme [®] RM IM	69,9	24,5

Das três enzimas estudadas a Novozyme[®] 435 foi a que teve melhor desempenho, uma vez que a velocidade de reação foi muito superior às outras duas. A Lipozyme[®] TL IM apresenta um rendimento máximo muito próximo do conseguido pela Novozyme[®] 435. Todavia, o tempo necessário para conseguir esse mesmo rendimento é cerca de 3,4

vezes superior, tornando assim a Lipozyme[®]TL IM menos competitiva a nível industrial, quando comparada outra enzima.

A enzima Lipozyme[®]RM IM foi a que apresentou conversões e velocidades de reação inferiores em todo o período do ensaio.

4.3.1.3 Comparação dos pré-tratamentos das enzimas: influência no rendimento da reação

O objetivo do pré-tratamento nas enzimas é o de aumentar o tamanho destas (em alguns estudos referido como o efeito “swelling”) aumentando assim a superfície de contato com o substrato, e facilitando o acesso das moléculas ao seu interior. No entanto, visivelmente esse fator só se verifica na Novozyme[®] 435.

Nesta secção será comparada e avaliada a influência da temperatura a que se processa o pré-tratamento das enzimas, no rendimento da reação de produção de biodiesel. Esta comparação é feita enzima a enzima.

Novozyme[®] 435

A Figura 13 ilustra a evolução temporal do rendimento em ésteres conseguida pela Novozyme[®] 435, pré-tratada à temperatura ambiente e a 50°C.

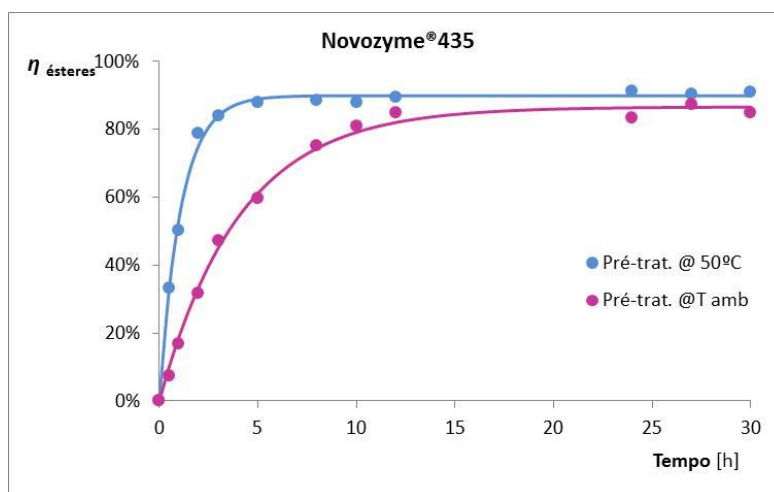


Figura 13 Influência da temperatura de pré-tratamento da Novozyme[®] 435 no rendimento em ésteres.

Apesar dos rendimentos máximos atingidos não estarem muito distantes, com a enzima pré-tratada à temperatura ambiente, na fase inicial, a velocidade da reação foi inferior à incubada a 50° C. Essa é uma tendência que se mantém ao longo de todo o tempo em

que decorreram os ensaios. Enquanto com a enzima pré-tratada a 50°C aos trinta minutos de reação já haviam sido convertidos 32,8% do óleo em ésteres, para a enzima pré-tratada à temperatura ambiente essa conversão é apenas de 10%. Até se atingir o estado estacionário, a velocidade da reação é sempre superior na enzima pré-tratada a 50°C, o que significa que a temperatura de pré-tratamento não tem só influência na velocidade inicial da reação.

O estado estacionário é atingido mais rapidamente com a maior temperatura de pré-tratamento, sendo 3,25 vezes superior comparativamente à outra temperatura.

Na Tabela 16 estão representadas as conversões máximas para esta enzima.

Tabela 16 *Influência da temperatura de pré-tratamento da Novozyme® 435 no rendimento máximo atingido e no tempo necessário para tal.*

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
Novozyme® 435 (50°C)	89,9	8
Novozyme® 435 (Temp. Ambiente)	86,6	26

Em suma, com o pré-tratamento efetuado a 50°C a Novozyme® 435 tem melhor desempenho, conseguindo maiores conversões em menor tempo.

Lipozyme® TL IM

A influência da temperatura de pré-tratamento na Lipozyme® TL IM, no rendimento em ésteres é ilustrada na Figura 14.

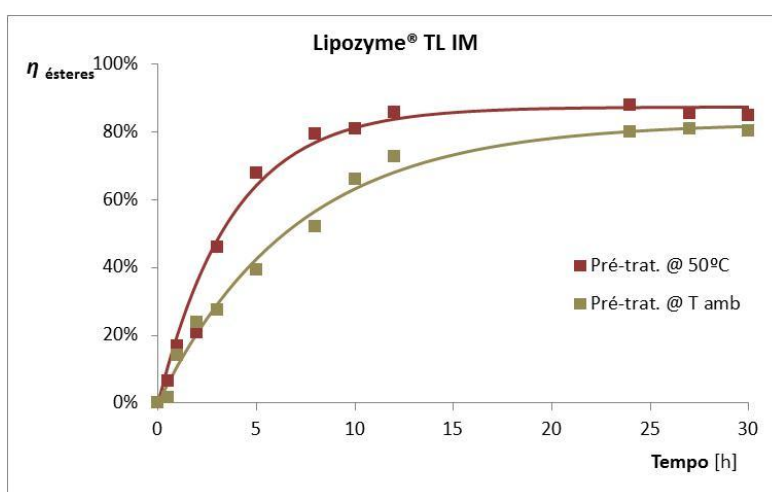


Figura 14 *Influência, no rendimento da reação de transesterificação, da temperatura do pré-tratamento da enzima Lipozyme® TL IM.*

Observando a Figura 14, verifica-se que às 5 horas a enzima já havia convertido 64,3% de óleo em ésteres, enquanto na enzima incubada à temperatura ambiente essa conversão foi de 32,4%. Esta tendência manteve-se ao longo de toda a reação.

Também para esta enzima verifica-se que a temperatura do pré-tratamento não influencia apenas a velocidade inicial da reação, mas as velocidades durante todo o ensaio. Observa-se ainda que, quando o pré-tratamento é efetuado à temperatura menor, o estado estacionário não é atingido até às 30h em que decorreram os ensaios de transesterificação.

Na tabela 17 estão representados os rendimentos máximos para esta enzima.

Tabela 17 Rendimentos máximos, e respetivo tempo em que são atingidos, conseguidos na reação de transesterificação catalisada pela enzima *Lipozyme[®]TL IM*.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
Lipozyme [®] TL IM (50°C)	87,4	27
Lipozyme [®] TL IM (Temp. Ambiente)	81,7	30

Verifica-se a mesma tendência da enzima anterior, a Lipozyme[®]TL IM também conseguiu melhor desempenho quando foi pré-tratada a 50°C.

Lipozyme[®]RM IM

A enzima foi testada com os dois pré-tratamentos usados. Na Figura 15 ilustra-se a influência da temperatura de pré-tratamento da Lipozyme[®]RM IM desempenho desta enzima na reação de transesterificação do OAU.

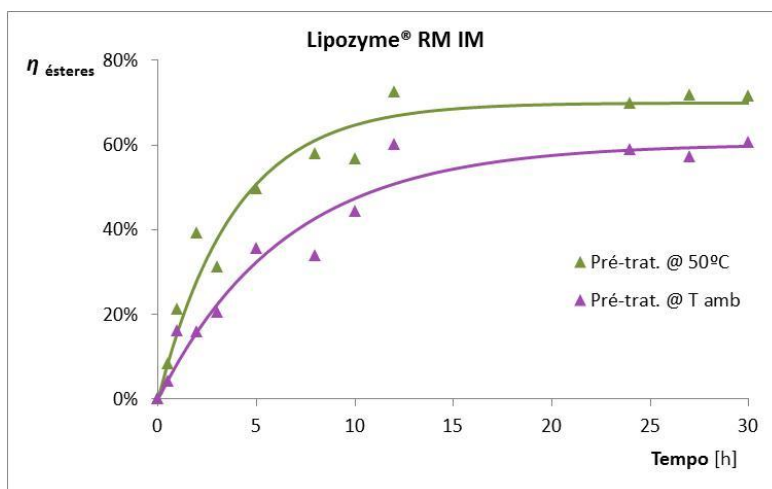


Figura 15 *Influência da temperatura de pré-tratamento da enzima Lipozyme[®]RM IM, no rendimento em ésteres.*

A temperatura a que decorre o pré-tratamento da Lipozyme[®]RM IM tem uma influência muito semelhante ao observado nas enzimas apresentadas anteriormente.

Na Tabela 18, estão representados os valores dos rendimentos máximos para a enzima Lipozyme[®]RM IM.

Tabela 18 *Rendimentos máximos, e respetivo tempo em que são atingidos, conseguidos na catálise da reação de transesterificação pela Lipozyme[®]RM IM.*

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
Lipozyme [®] RM IM (50°C)	69,9	24,5
Lipozyme [®] RM IM (Temp. Ambiente)	59,7	30

Todas as enzimas testadas tiveram melhor desempenho na reação de transesterificação (quer em termos de velocidade de reação, quer em rendimento máximo) quando são pré-tratadas a 50°C, comparativamente à temperatura ambiente. Sendo de realçar que a Novozyme[®]435 revelou uma maior influência ao nível da velocidade da reação.

4.3.2 Combinação de enzimas

Para além do estudo da catálise por enzimas isoladamente, testou-se também o estudo combinado das três enzimas. Todas as combinações de enzimas efetuadas foram numa proporção 50/50 (m/m), e todos os ensaios realizados obedeceram às mesmas condições operatórias dos ensaios anteriores, nomeadamente: temperatura de 50 °C, agitação 200 rpm, razão molar álcool:óleo de 4:1 e razão volumétrica do solvente:óleo 0,75%.

4.3.2.1 Enzimas pré-tratadas à temperatura ambiente

Para o pré-tratamento à temperatura ambiente fizeram-se as seguintes combinações das três enzimas: Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM, Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM e Lipozyme[®]TL IM/ Lipozyme[®]RM IM.

Note-se que, quando estes ensaios foram realizados ainda não tinha sido testado o pré-tratamento das enzimas a 50 °C, sendo desconhecido por isso o seu efeito positivo na velocidade e no rendimento da reação de transesterificação.

A Figura 16 ilustra o desempenho das enzimas Novozyme[®]435 e Lipozyme[®]TL isoladas e combinadas, em termos do rendimento em ésteres.

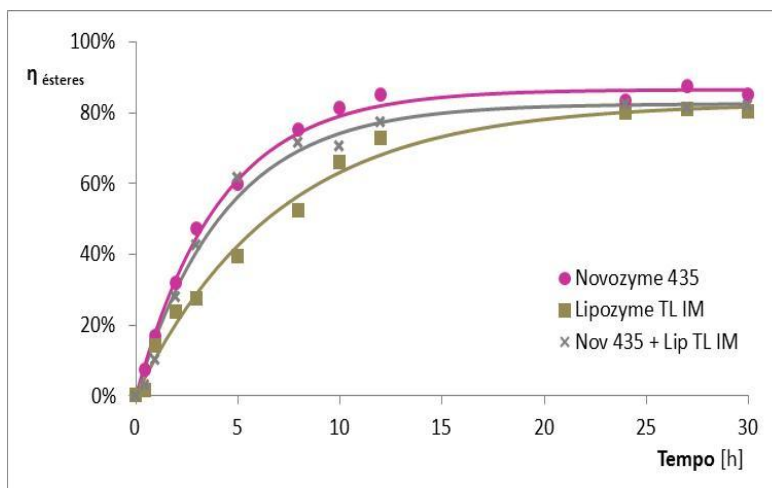


Figura 16 Comparação do desempenho individual das enzimas *Novozyme*[®] 435 e *Lipozyme*[®] TL IM com a sua combinação *Novozyme*[®] 435/ *Lipozyme*[®] TL IM.

Pela observação da Figura 16 verifica-se que a combinação das duas enzimas *Novozyme*[®] 435/*Lipozyme*[®] TL IM, comparativamente à aplicação individual da *Novozyme*[®] 435, não se traduz numa mais-valia quer para a velocidade da reação quer para o rendimento máximo em ésteres. As curvas relativas a estes dois ensaios são similares, apresentando uma velocidade inicial muito próxima, mas posteriormente a relativa à combinação das enzimas apresenta uma diminuição mais acentuada da velocidade à medida que a reação progride.

Dependendo do valor comercial da *Lipozyme*[®] TL IM, esta combinação pode ser interessante, i.e., no caso de ser mais barata que a *Novozyme*[®] 435, a combinação destas enzimas poderá constituir uma alternativa economicamente viável, quando comparada com a sua aplicação individual.

Na tabela seguinte está representado o rendimento máximo para esta combinação de enzimas.

Tabela 19 Rendimento máximo para a combinação de enzimas *Novozyme*[®] 435/ *Lipozyme*[®] TL IM pré-tratadas à temperatura ambiente.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
<i>Novozyme</i> [®] 435	86,6	26
<i>Lipozyme</i> [®] TL IM	81,7	30
<i>Novozyme</i> [®] 435/ <i>Lipozyme</i> [®] TL IM (50/50,m/m)	82,5	28,5

O mesmo estudo foi efetuado para a combinação das enzimas Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM. A Figura 17 ilustra os resultados combinação obtidos desta nova combinação.

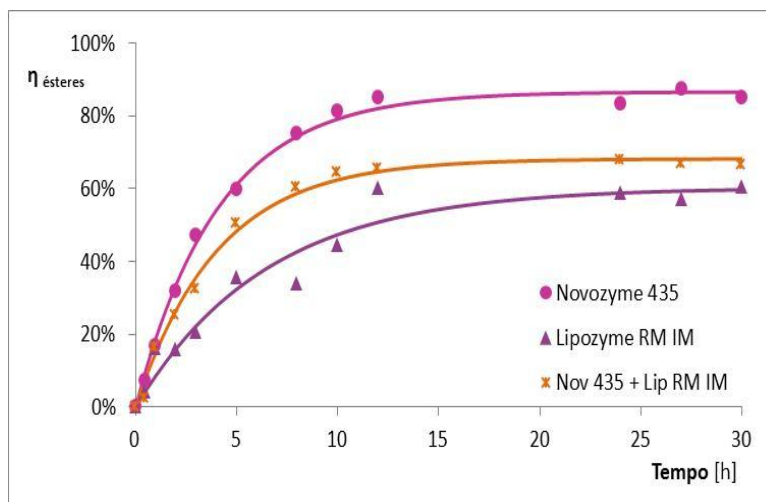


Figura 17 Comparação do desempenho individual das enzimas Novozyme[®]435 e Lipozyme[®]RM IM com a sua combinação Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM.

A mesma tendência da combinação anterior se verifica com estas enzimas. A enzima Novozyme[®]435 tem melhor desempenho quando usada isoladamente, comparativamente ao uso combinado com a Lipozyme[®]RM IM. Às 5 horas a combinação Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM havia convertido 48,4% em ésteres, inferior à Novozyme[®]435 que consegue 61,2% e superior à enzima Lipozyme[®]RM IM que foi de 32,4%. A tabela seguinte sumaria o rendimento máximo atingido para esta combinação de enzimas.

Tabela 20 Rendimento máximo atingido para a combinação Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]RM IM.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Novozyme [®] 435	86,6	26
Lipozyme [®] RM IM	59,7	30
Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] RM IM (50/50,m/m)	68,2	28,5

Testou-se também a combinação Lipozyme[®]TL IM/ Lipozyme[®]RM IM, e a figura seguinte mostra a conversão de óleo em ésteres ao longo da reação.

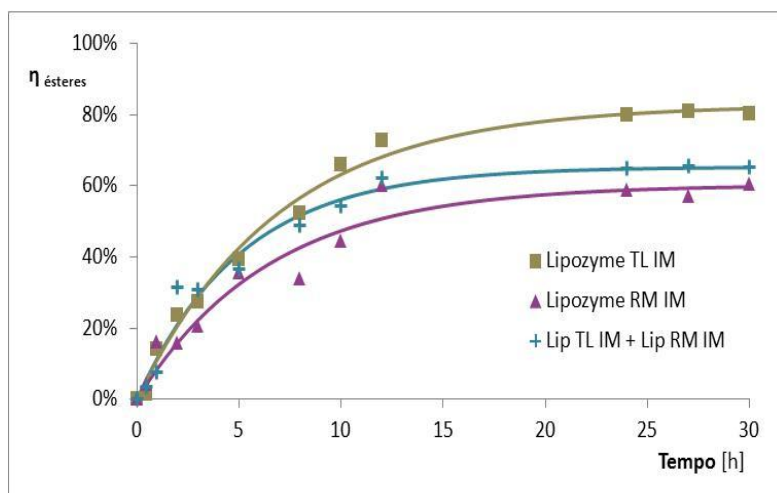


Figura 18 Comparação do desempenho individual das enzimas Lipozyme[®]TL IM e Lipozyme[®]RM IM com a sua combinação Lipozyme[®]TL IM/ Lipozyme[®]RM IM.

A enzima Lipozyme[®]RM IM foi a enzima mais difícil durante todo o trabalho, uma vez que as amostras continham partículas sólidas em suspensão, no entanto isso não acontece nas combinações. A combinação Lipozyme[®]TL IM/ Lipozyme[®]RM IM manteve a mesma tendência. Com esta combinação às 8 horas de reação a conversão foi de 51,8%, valor inferior ao obtido pela enzima Lipozyme[®]TL IM usada isoladamente e superior à enzima Lipozyme[®]RM IM. No entanto, nesta combinação durante as três primeiras horas de reação, a conversão em ésteres foi igual à Lipozyme[®]TL IM usada isoladamente. Esta tendência não se verificou no tempo restante de reação.

Na Tabela 21 está representado o valor do rendimento máximo para a combinação Lipozyme[®]TL IM/ Lipozyme[®]RM IM.

Tabela 21 Rendimento máximo para a combinação Lipozyme[®]TL IM/ Lipozyme[®]RM IM.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Lipozyme [®] TL IM	81,7	26
Lipozyme [®] RM IM	59,7	30
Lipozyme [®] TL IM/ Lipozyme [®] RM IM (50/50,m/m)	65,2	30

De todas as combinações estudadas, a combinação com melhor desempenho foi Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM, no entanto com esta combinação a conversão em ésteres é menor quando a enzima Novozyme[®]435 foi usada isoladamente.

4.3.2.2 Enzimas pré-tratadas a 50°C

Para o pré-tratamento em que a enzima foi incubada a 50°C, fez-se apenas o estudo da combinação das enzimas Novozyme[®]435/Lipozyme[®]TL IM, por ter sido o que teve melhor desempenho no estudo apresentado na secção anterior. A Figura 19 mostra os resultados obtidos neste estudo.

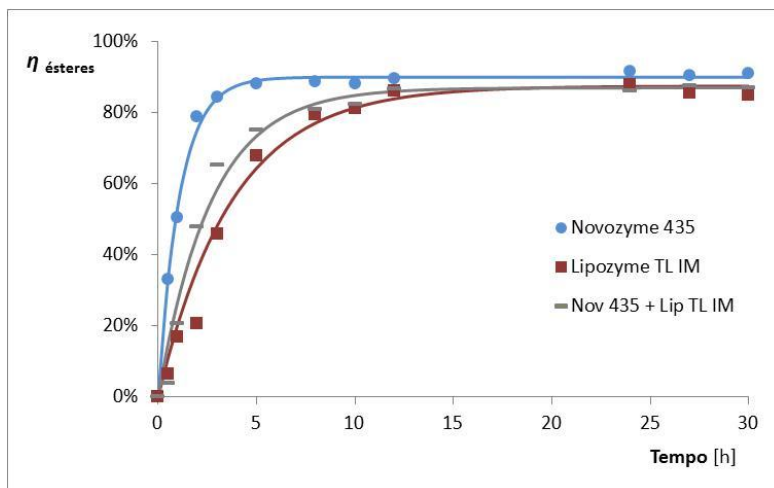


Figura 19 Estudo combinado das enzimas Lipozyme[®]TL IM e Novozyme[®]435 com pré-tratamento a 50°C.

Ao fim de 3 horas com esta combinação de enzimas a conversão atingida foi de 58,4% muito inferior à obtida com a enzima Novozyme[®]435 usada isoladamente, que permite obter uma conversão de 84%.

Na Tabela 22 resumem-se os valores do rendimento máximo atingido e do tempo necessário para tal.

Tabela 22 Rendimento máximo para a combinação de enzimas Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM pré-tratadas a 50°C.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
Novozyme [®] 435	89,9	8
Lipozyme [®] TL IM	87,4	24
Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] TL IM (50/50, m/m)	86,9	19,5

A velocidade de reação com a combinação de enzimas é inferior ao caso em que a Novozyme[®]435 é usada isoladamente e ligeiramente superior à Lipozyme[®]TL IM.

4.3.2.3 Influência da temperatura de pré-tratamento no uso combinado Novozyme[®] 435/Lipozyme[®] TL IM

A influência da temperatura do pré-tratamento do uso combinado de enzimas só poderá ser analisada para o caso Novozyme[®]435/ Lipozyme[®]TL IM, porque foi a única combinação testada com ambos os pré-tratamentos. A figura seguinte mostra os resultados obtidos neste estudo.

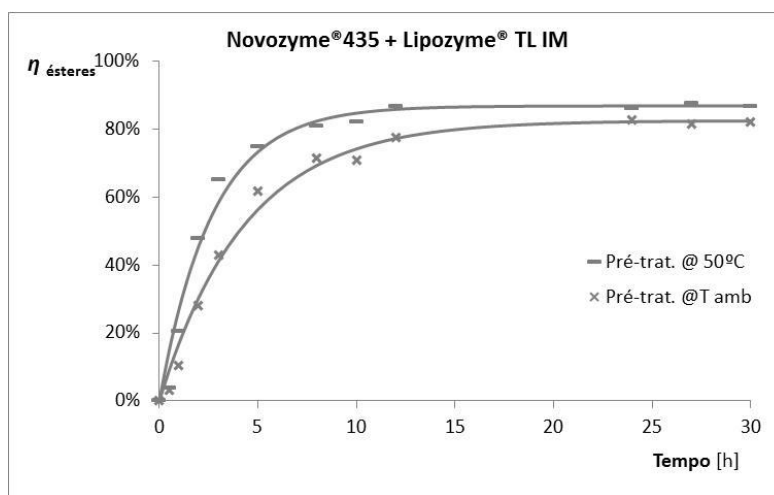


Figura 20 Comparação entre a temperatura dos pré-tratamentos do uso combinado das enzimas Novozyme[®] 435/Lipozyme[®] TL IM.

Observando a figura anterior verifica-se a tendência dos restantes ensaios, também na combinação de enzimas, em que as enzimas combinadas são pré-tratadas a 50°C conseguem ser maiores rendimentos e maiores velocidades de reação.

Na Tabela 23 estão representados os valores dos rendimentos máximos para a combinação Novozyme[®] 435/ Lipozyme[®] TL IM nos dois pré-tratamentos.

Tabela 23 Rendimentos máximos para o uso combinado Novozyme[®] 435/ Lipozyme[®] TL IM.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] TL IM (50°C)	86,9	19,5
Novozyme [®] 435/ Lipozyme [®] TL IM (Temp. Ambiente)	82,5	28,5

Apesar de não ter sido encontrada bibliografia sobre o estudo combinado de enzimas, resolveu-se testar o uso combinado das três enzimas estudadas. Todos os ensaios foram testados com duas enzimas numa proporção 50/50 (m/m). Como verificado

anteriormente, quando a enzima é pré-tratada a 50 °C tem melhor desempenho que na incubação à temperatura ambiente. Em comparação com a enzima Novozyme[®]435 usada isoladamente, a velocidade da reação e o rendimento máximo para a combinação, quer à temperatura ambiente, quer a 50°C foi inferior nos instantes iniciais da reação.

4.3.3 Reutilização de enzimas

No presente trabalho também se avaliou a perda de atividade das enzimas, em reutilizações sucessivas. Fizeram-se duas reutilizações da enzima Novozyme[®]435 e apenas uma para a enzima Lipozyme[®]TL IM.

Entre as reutilizações, a enzima foi filtrada dos ensaios anteriores, sendo colocada num recipiente novo, evitando perdas de massa e sem se proceder a lavagens. As condições foram as mesmas dos outros ensaios: temperatura de 50°C, agitação 200 rpm, razão molar álcool:óleo de 4:1, razão volumétrica do solvente:OAU 0,75%.

Neste estudo, as enzimas foram pré-tratadas a 50°C, antes da primeira utilização apenas. Na secção 4.3.3.1 apresentam-se os resultados obtidos para a enzima Novozyme[®]435 e na secção 4.3.3.2 para a enzima Lipozyme[®]TL IM.

4.3.3.1 Novozyme[®]435

Com a enzima Novozyme[®]435 fizeram-se 2 reutilizações. A figura seguinte representa os resultados obtidos na primeira utilização (1º ciclo) e duas reutilizações seguintes (2º e 3º ciclo, respetivamente).

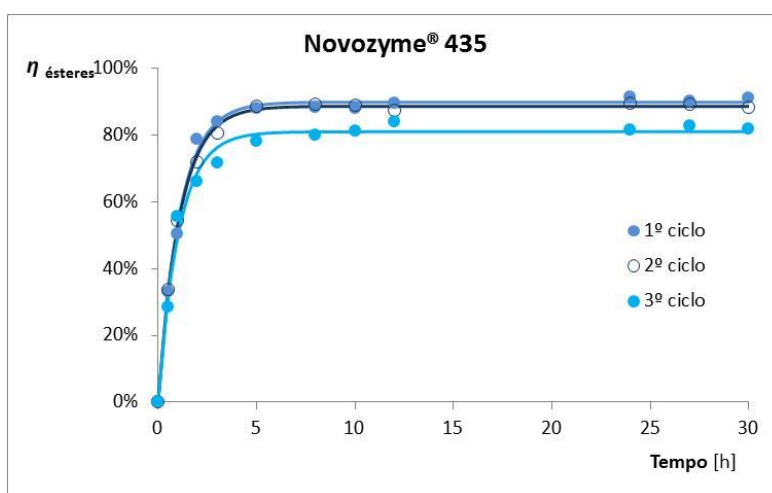


Figura 21 Conversão em ésteres para a 1ª e 2ª reutilização da enzima Novozyme[®]435.

Na primeira reutilização ao fim de 30 minutos de reação, atingiu-se um rendimento de 33,6% e ao fim de uma hora de 54,5% sendo estes valores superiores ao da enzima usada pela primeira vez, que tem rendimentos de 33,2% e 50,3% respetivamente. A partir deste momento da reação e em comparação com a enzima usada pela primeira vez, a velocidade de reação diminui e os rendimentos obtidos foram sempre ligeiramente inferiores, sendo o rendimento máximo atingido às 8 horas de 88,7%. Em suma, poder-se-á dizer que a enzima não diminui o seu desempenho, quer em termos de velocidade de reação, quer no rendimento em ésteres, do primeiro para o segundo ciclo de utilização.

No terceiro ciclo ao fim de 30 minutos já se observa uma diminuição da conversão, e o rendimento foi de 28,5%, a mesma tendência se observou ao fim de uma hora e durante toda a reação, sendo que o rendimento máximo foi de 80,2% ao fim de 5 horas.

Na Tabela 24 estão representados os rendimentos máximos para a enzima usada pela primeira vez e as duas reutilizações seguintes.

Tabela 24 Rendimento máximo atingido nas reutilizações da enzima *Novozyme*[®] 435.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Novozyme [®] 435	89,9	8
Novozyme [®] 435 (2º ciclo)	88,7	8,5
Novozyme [®] 435 (3º ciclo)	81,1	9

Para a enzima *Novozyme*[®] 435 a perda de atividade é notória ao fim de duas reutilizações, uma vez que os rendimentos foram sempre inferiores em relação às outras duas. A nível industrial este é um fator importante, uma vez que para a catálise enzimática ser monetariamente competitiva, as enzimas têm de ser reutilizadas diversas vezes. Segundo Bárbara Oliveira [13], este fator pode ser contornado com uma lavagem da enzima. Neste trabalho isso não foi feito.

4.3.3.2 *Lipozyme*[®] TL IM

Testou-se a *Lipozyme*[®] TL IM, em apenas uma reutilização. Na figura seguinte estão representados os resultados da conversão em ésteres, para os dois ciclos de utilização desta enzima.

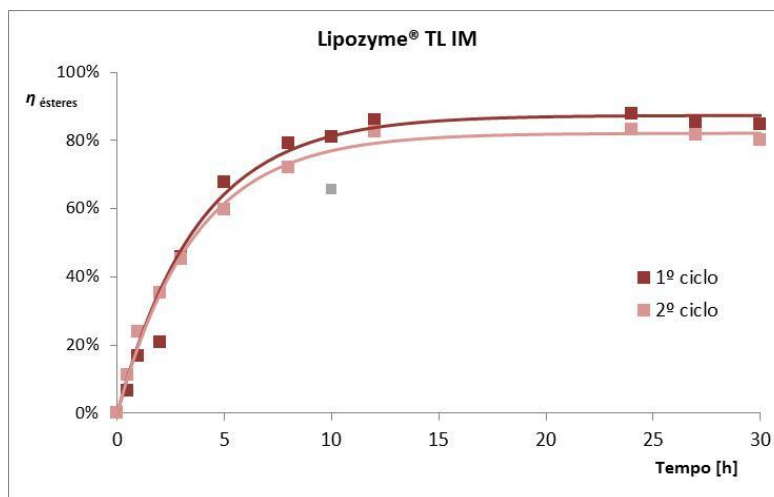


Figura 22 Influência da reutilização da Lipozyme® TL IM.

Na reutilização da enzima Lipozyme® TL IM as conversões foram iguais nas duas horas iniciais, em relação à enzima usada pela primeira vez. Ao fim deste tempo, as conversões começaram a ser inferiores na reutilização da enzima, i.e., no 2º ciclo.

O valor indicado a cinza foi ignorado no traçar do gráfico, por se encontrar muito díspar dos restantes. Este valor poderá dever-se a alguns erros, como por exemplo uma má derivatização da amostra, erros de pesagem, problemas na CG, etc.

Na Tabela 25 encontram-se os rendimentos máximos quer para a Lipozyme® TL IM e sua reutilização

Tabela 25 Rendimento máximo atingido na 1ª reutilização da enzima Lipozyme® TL IM.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Lipozyme® TL IM	87,4	24
Lipozyme® TL IM (1º ciclo)	82,2	20

Na reutilização, apesar da conversão máxima ser atingida às 20 horas, o seu valor é bastante inferior ao da enzima usada pela primeira vez. Como não se fez mais nenhuma reutilização, não existem dados suficientes para ser testar a perda de atividade.

4.3.4 Novozyme[®] 435 com adição de sílica

O glicerol é insolúvel no óleo, e facilmente absorvido pelo suporte da enzima imobilizada causando efeitos negativos na atividade desta, bem como na sua estabilidade operacional. Lilin Li [20] propuseram um método para minimizar este problema, nomeadamente, a adição de sílica gel à mistura reacional, com o objetivo de absorver gradualmente o glicerol formado à medida que é produzido.

Neste ensaio pretendeu-se testar a capacidade de adsorção do glicerol por parte da sílica, a fim de se produzir um biodiesel mais puro. Ao meio reacional foram adicionados 20 g de sílica em esferas de 1,5 mm de diâmetro e sem indicador. A sílica foi adicionada no início da reação antes da adição do álcool e do solvente.

A enzima foi pré-tratada a quente. As restantes condições operatórias foram as mesmas dos outros ensaios.

A Figura 23 representa a conversão de triglicerídeos em ésteres com o recurso à enzima Novozyme[®] 435 e adição de sílica.

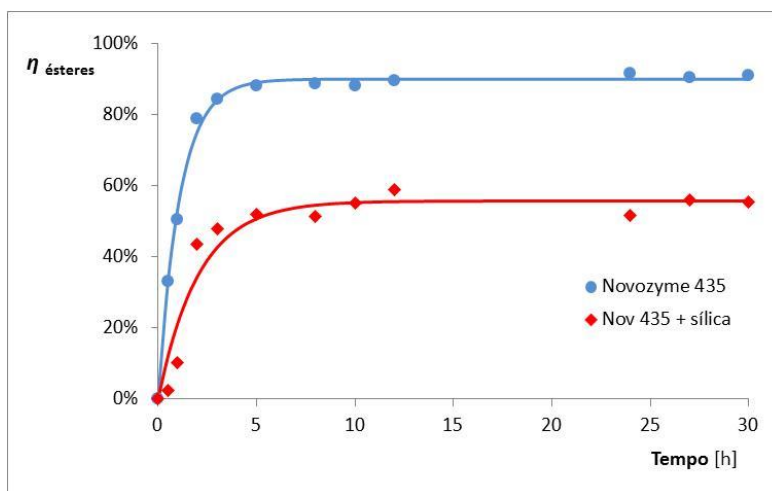


Figura 23 Influência da adição de sílica ao meio reacional com Novozyme[®] 435.

Ao fim de 30 minutos de reação a conversão em ésteres foi de apenas 2,4%, valor muito inferior à Novozyme[®] 435 usada isoladamente. Na presença da sílica o rendimento estabiliza ao fim de 10 horas, mas em valores muito inferiores ao da enzima usada isoladamente. A velocidade da reação é muito menor nas 5 horas iniciais no ensaio com adição de sílica.

A Tabela 26 representa o rendimento máximo da enzima usada isoladamente e com sílica.

Tabela 26 *Influência da adição de sílica ao meio reacional com Novozyme[®]435.*

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}$ [%]	Tempo [h]
Novozyme [®] 435	89,9	8
Novozyme [®] 435com sílica	55,7	16,5

O rendimento máximo desta reação foi de 55,7 % e foi atingido às 16,5 horas. A diminuição da velocidade da reação e do rendimento em ésteres, dever-se-á ao facto da sílica ter adsorvido o metanol, não o libertando novamente para o meio reacional, tendo este reagente sido o limitante.

4.3.5 Novozyme[®]435 com cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio [C₁₀]

Ventura et al. (2012) verificaram que o uso do líquido iónico cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio incrementa a atividade da lipase B *Candida antarctica* em 6 vezes. Trata-se de uma enzima não imobilizada. Na literatura não foram encontrados estudos da aplicação deste líquido com a enzima imobilizada. Assim, no presente trabalho decidiu-se testar o efeito do C₁₀ na atividade da enzima Novozyme[®]435.

Neste ensaio a enzima foi pré-tratada a 50°C. O líquido iónico foi adicionado, antes da adição do óleo, ou seja, este líquido ficou em contacto com a enzima durante todo o tempo do pré-tratamento, e com agitação de 200 rpm para homogeneizar a mistura (este foi o único ensaio em que a enzima foi incubada com agitação).

Foi adicionado ao meio reacional 1,9 g de cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio (C₁₀), ou seja, uma proporção de 2,5:100 (C₁₀:óleo).

As restantes condições operatórias foram as mesmas dos outros ensaios: temperatura 50°C, razão molar álcool:óleo de 4:1, razão volumétrica do solvente 0,75%.

Como referido na secção 2.3.2, os líquidos iónicos são geralmente adicionados ao meio, como substituto do solvente orgânico (*tert*-butanol), no entanto, como neste caso o solvente é usado para prevenir a toxicidade da enzima por parte do metanol, o *tert*-butanol foi mantido.

Na Figura 24 está representada a conversão em ésteres do óleo, com a enzima Novozyme[®]435 e adição ao meio de cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio.

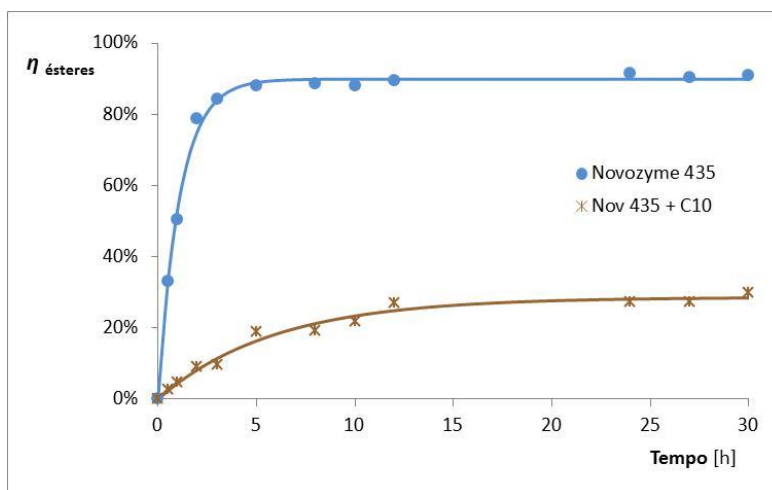


Figura 24 Influência do líquido iônico C_{10} na atividade da Novozyme® 435.

Com a enzima usada isoladamente ao fim de 30 minutos a conversão em ésteres é de 33%, enquanto com adição de C_{10} é de apenas 3%. Esta tendência mantém-se ao longo de toda a reação. A diminuição da velocidade de reação é evidente. Sabe-se que se o líquido iônico não formar micelas na reação, por falta de água no meio reacional, além de não aumentar a sua atividade, torna-se tóxico para a enzima. Deverá ter sido esse o fator preponderante neste caso. No OAU o teor de humidade é baixo, relativamente a outros OAU (vide secção 4.2.3.). Na Tabela 27 encontram-se o rendimento máximo para a enzima Novozyme® 435, usada isoladamente e com esta mesma usada com Cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio (C_{10}).

Tabela 27 Influência do líquido iônico na atividade da Novozyme® 435.

Enzima	$\eta_{\text{máximo}}[\%]$	Tempo [h]
Novozyme® 435	89,9	8
Novozyme® 435com C_{10}	28,4	16,5

A conversão em ésteres diminuiu substancialmente, e foi atingido muitas horas depois.

4.4 Conclusões

Com este trabalho, pretendeu-se produzir biodiesel, com o recurso à catálise enzimática. Este trabalho baseou-se exclusivamente na etapa da reação de transesterificação, não se tendo realizado nenhuma de purificação. As enzimas escolhidas foram: Novozyme® 435, Lipozyme® TL IM, Lipozyme® RM IM.

Todas estas enzimas foram testadas individualmente com dois pré-tratamentos distintos: um em que a enzima é incubada à temperatura ambiente, e outro em que a enzima é incubada à temperatura da reação (50°C). Com ambos os pré-tratamento verificou-se o

efeito “swelling” na enzima Novozyme[®]435, não se verificando o mesmo nas outras duas. Com este efeito pretende-se aumentar a superfície de contato entre a enzima e o substrato, uma vez que o suporte da enzima fica maior. De todos os ensaios realizados para as enzimas isoladamente, o que teve maiores conversões em ésteres foi o da Novozyme[®]435 pré-tratada a 50°C, em que se conseguiu conversão máxima de aproximadamente 90%.

Em todos os ensaios a velocidade de reação é superior nos instantes iniciais, o que revela que as enzimas não careceram de um período de adaptação ao substrato.

Um fator importante, para tornar a catálise enzimática competitiva à escala industrial é a reutilização das enzimas. A enzima Novozyme[®]435 praticamente não perde atividade na primeira reutilização, tornando-se evidente alguma perda na 2^a reutilização. Testou-se também uma reutilização para a enzima Lipozyme[®]TL IM, no entanto nesta enzima nota-se a perda de atividade ao fim de apenas uma reutilização. A reutilização da Lipozyme[®]RM IM não foi testada, uma vez que esta enzima quando usada pela primeira vez não teve um desempenho satisfatório, quando comparada com as restantes duas.

Foram também testadas o uso das enzimas combinadas numa proporção 50/50 (m/m). No entanto, para o pré-tratamento a 50°C testou-se apenas a mistura Novozyme[®]435/Lipozyme[®]TL IM, por ter sido a que teve melhor desempenho com o pré-tratamento à temperatura ambiente. O estudo das enzimas combinadas com ambos os pré-tratamentos mostraram-se infrutíferos, uma vez que com a enzima Novozyme[®]435 usada isoladamente, e para o pré-tratamento a 50°C a conversão em ésteres é superior.

Por fim, fizeram-se mais dois estudos, um com adição de sílica ao meio reacional, a fim verificar a capacidade desta de adsorver o glicerol formado na reação de transesterificação, produzindo assim um biodiesel mais puro, e aumentando o rendimento da reação, bem como o da adição à reação de um líquido iónico- Cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio- para se testar o aumento de atividade das enzimas imobilizadas. Ambos os estudos, não tiveram resultados satisfatórios, no primeiro caso a sílica deverá absorver o metanol não o libertando novamente para o meio reacional, diminuindo assim a conversão em ésteres e no segundo caso, o líquido iónico foi incapaz de formar estruturas micelares no meio reacional, e não só não aumentou a atividade da enzima, como a inibiu.

Depois da realização de todo o trabalho experimental pode concluir-se que a enzima Novozyme[®]435 é a melhor aposta para rivalizar com a catálise homogénea a nível industrial. Com esta enzima conseguiram-se conversões em ésteres de 79% ao fim de 2 horas, e de 89,9% ao fim de 8 horas.

5 Considerações finais

5.1 Introdução

O sucesso da produção de biodiesel é condicionado por diversas variáveis, como a natureza da matéria-prima e do catalisador e as condições operacionais sob as quais se desenvolve a reação de transesterificação. Neste trabalho a matéria-prima utilizada foi um óleo alimentar usado. A reação processou-se na presença de catalisadores enzimáticos.

As principais conclusões da realização deste trabalho são apresentadas na secção 5.2, estando a secção seguinte reservada à apresentação de algumas sugestões para futuros trabalhos.

5.2 Conclusões gerais

Este trabalho consistiu no estudo da produção de biodiesel por catálise enzimática a partir de três enzimas, a Novozyme[®] 435, Lipozyme[®] TL IM e a Lipozyme[®] RM IM.

Usaram-se dois pré-tratamentos, um em que a enzima foi incubada à temperatura ambiente, e outro em que foi incubada a 50°C. O pré-tratamento adequado foi o da enzima pré-tratada à temperatura da reação, i.e., a 50°C. A realização do pré-tratamento na enzima virgem demonstrou-se ser muito importante na maior conversão em ésteres alcançado para a enzima Novozyme[®]435. Em anos anteriores usaram-se as enzimas virgens, sem pré-tratamento e as conversões em ésteres foram muito inferiores (Amorim, 2009). Durante o pré-tratamento ocorre o efeito “swelling” nesta enzima, fazendo assim aumentar de tamanho o seu suporte, tornando a superfície de contato entre enzima e substrato maior. Nas outras enzimas este efeito não se verificou, e tal deve-se à natureza do seu suporte. Mais a conversão em ésteres nestas enzimas foi muito inferior.

Para além das três enzimas estudadas isoladamente, testou-se o uso destas em usos combinados numa proporção 50/50 (m/m), com o pré-tratamento à temperatura ambiente. No entanto, para o pré-tratamento a 50°C testou-se apenas a combinação Novozyme[®]435/Lipozyme[®]TL IM, por ter sido a que teve melhor desempenho com o primeiro pré-tratamento. Este último, de todo o uso de enzimas combinadas, foi o que teve melhor desempenho, mas inferior à enzima Novozyme[®]435 usada isoladamente.

Fizeram-se ainda mais dois estudos com a enzima Novozyme[®]435, com a adição de sílica ao meio reacional a fim de se produzir um biodiesel mais puro e aumentar o rendimento da reação de transesterificação, e com a adição de Cloreto de 1-decil-3 metilimidazolio, para se testar o aumento de atividade da enzima. Em ambos os estudos as conversões em ésteres são muito inferiores aos da enzima isolada.

A enzima Novozyme[®] 435 usada isoladamente foi a opção mais eficiente, uma vez que a velocidade da reação nas primeiras 8 horas foi muito superior que nos outros ensaios e o rendimento máximo atingido maior.

5.3 Sugestões para trabalhos futuros

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

- Fazer o estudo em reator contínuo;
- Melhorar a estrutura experimental, para não ter de se abrir o reator;
- Investigar outros métodos de pré-tratamento da enzima;
- Numa ótica de aplicação industrial, estudar o procedimento em leito fixo, de forma a eliminar a necessidade de filtração da enzima da mistura final;
- Investigação de condições operatórias que visem a redução do tempo reacional, com vista a tornar a catálise enzimática atrativa a nível industrial;

Seria também interessante otimizar as condições operatórias das enzimas Lipozyme[®] TL IM e da Lipozyme[®] RM IM, deste modo estas teriam de ser sujeita a um estudo mais alargado no que diz respeito ao seu suporte, a fim de se encontrar um pré-tratamento adequado.

Com vista a alcançar condições operatórias competitivas com as da catálise homogénea seria interessante continuar a estudo com a enzima Novozyme[®]435 com diferentes temperaturas de reação, agitação e razão volumétrica de solvente.

Daqui se conclui que a temática dos biocombustíveis possui ainda vasta informação a ser explorada.

Referências

1. DGEG. *Direção-geral de Energia e Geologia*. [cited 2012 fevereiro]; Available from: www.dgeg.pt.
2. Felizardo, P.M.G., *Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Fritura*. . Relatório de Estágio para obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Química. Instituto Superior Técnico. Lisboa. Outubro de 2003, 2003.
3. Maurício, S.S.S., *A produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados*, 2008: Universidade de Aveiro.
4. *Biocombustíveis e sustentabilidade: Oportunidades nacionais 2011-2020* [cited 2012 abril]; Available from: www.ineg.pt.
5. Hall, C.a., *Riegel's handbook of industrial chemistry*1992.
6. Rodrigues, S., *Óleos alimentares usados - ponto de situação deste fluxo de resíduo a nível nacional*. . Universidade Nova de Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2006.
7. *Rudolph Diesel*. [cited 2011 novembro]; Available from: www.inventors.about.com.
8. Moser, B., *Biodiesel production, properties and feedstocks*. Springer, 2009: p. 229-266.
9. Refaat, A.A., *Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil*. International Journal of Environmental Science and Technology, 2010. **7**(1): p. 183-213.
10. Zhang, J.H., et al., *Biodiesel production from vegetable oil using heterogenous acid and alkali catalyst*. Fuel, 2010. **89**(10): p. 2939-2944.
11. Antczak, M.S., Kubiak, A., Antczak, T. and Bielecki, S. , *Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process*. 2009: p. 185-1194.
12. Meng, X.M., Chen, G. Y. and Wang, Y. H. , *Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test*. Fuel Processing Technology, 2009. **89**(9): p. 851- 857.
13. Oliveira, B.S., *Eficiência de uma lipase na transesterificação de óleo alimentar usado*. . Universidade de Aveiro, 2010.
14. Branco, A.N., D.; Colpani,G. , *Biodiesel*. Universidade Federal de Santa Catarina, centro tecnológico (CTC), 2007: p. 12pp.
15. Salvador, A.R., C.; Maso, L.; Palharez, S. , *Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática*. Universidade Federal de Santa Catarina, centro tecnológico (CTC), 2009: p. 27pp.
16. Wenlei X, Li H., *Alumina-supported Potassium Iodide as a Heterogeneous Catalyst for Biodiesel Production from Soybean Oil*. Journal of Molecular Catalysis, 2006. **255**: p. 1-9.
17. Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. and Solinas, V., *Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis*. Journal of Biotechnology, 2005. **119**: p. 291-299.
18. Neve, A.L., Lucarini, A.C., Melo, M.A.A., Barros, R.M. and Ferreira, L.F.P, *Estudo do efeito da microgravidade na cinética das enzimas lipase e invertase*. 2006.
19. Fu, B.Y.a.V., P. T. , *Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel*. Energy & Fuels, 2009. **23**(8): p. 4105-4111.
20. Li, L.L., *Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2006. **43**(1-4): p. 58-62.
21. Mathewson, P.R., *Enzymes*1998.

22. Caballero, V., Bautista, F. M., Campelo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., Romero, A.A., *Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil*. *Process Biochemistry*, 2009. **44**(3): p. 334-342.
23. Uhlig, H., *Industrial enzymes and their applications* 1998: New York: John Wiley.
24. Yang, H., Chien, S., Lo, M., Lan, J. C., Lu, W., Ku, Y. , *Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing*. *Atmospheric Environment* 2007. **41**: p. 7232-7240.
25. Aehle, W., *Enzymes in industry : production and applications*. 2004.
26. Fjerbaek, L., K.V. Christensen, and B. Norddahl, *A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009. **102**(5): p. 1298-1315.
27. Azocar, L., *Lipase-catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2011. **112**(6): p. 583-9.
28. Rodrigues, R.C., Volpato, G., Wada, K. and Ayub, M. A. Z. , *Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2008. **85**(10): p. 925-930.
29. Ognjanovic, N., Bezbradica, D. and Knezevic-Jugovic, Z. , *Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability*. *Bioresource Technology*, 2009. **100**(21): p. 5146-5154.
30. Ventura, S.P.M., *Ionic liquids microemulsions: the key to Candida antarctica lipase B superactivity*. *Green Chemistry*, 2012. **14**(6): p. 1620-1625.
31. Myunggu Lee, J.L., Dohoon Lee, Jaehoon Cho, Sangyong Kim, Chulhwan Park, *Improvement of enzymatic biodiesel production by controlled substrate feeding using silica gel in solvent free system*. Elsevier, 2011. **49**: p. 402-406.
32. Maceiras, R., *Enzyme deactivation during biodiesel production*. *Chemical Engineering Journal*, 2009. **166**(1): p. 358-361.
33. Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H. J. and Navia, R. , *Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010. **88**(3): p. 621-636.
34. Leung, D.Y.C., X. Wu, and M.K.H. Leung, *A review on biodiesel production using catalyzed transesterification*. *Applied Energy*, 2010. **87**(4): p. 1083-1095.
35. Leung, D.Y.C., Wu, X. and Leung, M. K. H. , *A review on biodiesel production using catalyzed transesterification*. *Applied Energy*, 2009.
36. Amorim, A.L.S., *Biodiesel a partir de óleo alimentar usado: estudo de catalisadores*. Universidade de Aveiro, 2009.

Legislação

Decreto-Lei n.º 178/2006, de 5 de Setembro

Decreto-Lei n.º 267/2009, de 29 de Setembro

Decreto-Lei n.º 62/2006, de 21 de Março

Portaria n.º 209/2004, de 3 de Março

EN 14214 – Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-
Requirements and test methods

ISO 3675:1998

Anexos

Anexo A – Dados de segurança de reagentes e catalisador

Tabela A.1 Dados de segurança da acetona (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Acetona
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Irritante para os olhos e pele. Exposições repetidas ou prolongadas podem provocar irritação cutânea e dermatite, devido às propriedades desengordurantes do produto.
Manuseamento:	Manter o recipiente bem fechado. Tomar as precauções necessárias para evitar descargas de eletricidade estática. Usar apenas em áreas providas de ventilação apropriada. Não respirar vapores ou spray. Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuários. Não deitar os resíduos no esgoto.
Medidas de proteção individuais:	Luvas e óculos de proteção, equipamento respiratório adequado (quando a ventilação for insuficiente) e avental quimicamente resistente.
Medidas de combate a incêndios:	Extinguir preferencialmente com produto químico seco, espuma, camada de dióxido de carbono.

Tabela A.2 Dados de segurança da clorotrimetilsilano (Merck, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Clorotrimetilsilano
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Reage violentamente em contacto com a água. Provoca queimaduras graves. Irritante para as vias respiratórias.
Manuseamento:	Evitar o contacto com a substância. Não inalar os vapores/aerossóis. Garantir a ventilação com ar fresco em recintos fechados. Tomar medidas contra cargas eletrostáticas. Conservar hermeticamente fechado, em local bem ventilado e afastado de fontes de ignição e de calor.
Medidas de proteção individuais:	Necessária proteção respiratória, no caso de formação de vapores/aerossóis. Luvas de proteção, óculos de segurança e bata.
Medidas de combate a incêndios:	CO ₂ , pó.

Tabela A.3 Dados de segurança do éter de petróleo (Merck, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Éter de Petróleo
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Nocivo: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação.
Manuseamento:	Tomar medidas contra cargas eletrostáticas. trabalhar com chaminé. Não inalar a substância. Evitar a formação de vapores/aerossóis. Manter afastado de fontes de ignição. Conservar hermeticamente fechado, em local bem ventilado.
Medidas de proteção individuais:	Luvas de proteção, óculos de segurança e proteção respiratória.
Medidas de combate a incêndios:	Espuma, CO ₂ , pó.

Tabela A.4 Dados de segurança do metanol (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Metanol
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Tóxico por inalação e ingestão. Exposições repetidas ou prolongadas podem provocar irritação cutânea e dermatite, devido às propriedades desengordurantes do produto.
Manuseamento:	Utilizar apenas em áreas bem arejadas. Não respirar vapores ou sprays. Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Tomar as precauções necessárias para evitar descargas de eletricidade estática. Manter hermeticamente fechado, em local seco, fresco e bem arejado.
Medidas de proteção individuais:	Óculos de segurança, bata, luvas de proteção e máscara no caso de formação de aerossóis.
Medidas de combate a incêndios:	CO ₂ , produto químico seco, espuma, waterspray.

Tabela A.5 Dados de segurança do metil heptadecanoato (Fluka, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Metil heptadecanoato
Identificação dos perigos:	Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a Diretiva 67/548/CEE.
Manuseamento:	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado
Medidas de proteção individuais:	Não é necessária proteção respiratória. Para um contacto prologado ou repetitivo pôr luvas de proteção. Óculos de segurança.
Medidas de combate a incêndios:	Extinguir preferencialmente com produto químico seco, espuma, camada de dióxido de carbono.

Tabela A.6 Dados de segurança da N,O-Bis (trimetilsilil)Trifluoracetamida (Panreac, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	N,O-Bis (trimetilsilil)Trifluoracetamida
Identificação dos perigos:	Inflamável.
Manuseamento:	Evitar a formação de cargas eletrostáticas. Armazenar em recipientes bem fechados, em local fresco e afastado de substâncias inflamáveis, fontes de ignição e calor, à temperatura ambiente.
Medidas de proteção individuais:	Em caso de formação de vapores/aerossóis usar equipamento respiratório adequado, luvas de proteção, óculos de segurança e bata.
Medidas de combate a incêndios:	CO ₂ , espuma, pó seco.

Tabela A.7 Dados de segurança da piridina (Lab-Scan, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Piridina
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Nocivo por inalação, contacto com a pele e por ingestão. Os vapores são inflamáveis, irritante para os olhos e sistema respiratório.
Manuseamento:	Usar apenas em áreas providas de ventilação apropriada. Não respirar vapores ou spray. Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Guardar longe de chamas, superfícies aquecidas e fontes de ignição. Tomar medidas de precaução contra descargas estáticas.
Medidas de proteção individuais:	Luvas resistentes a solventes, óculos de proteção, bata e proteção respiratória, no caso de ventilação insuficiente.
Medidas de combate a incêndios:	CO ₂ , produto químico seco, espuma, areia.

Tabela A.8 Dados de segurança do *tert*-butanol (Sigma-Aldrich, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	<i>tert</i> -butanol
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Nocivo por inalação.
Manuseamento:	Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição. Tomar medidas para impedir a formação de eletricidade estática. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.
Medidas de proteção individuais:	Luvas de proteção, óculos de segurança e proteção respiratória.
Medidas de combate a incêndios:	Espuma de álcool, pó seco, CO ₂ .

Tabela A.9 Dados de segurança do álcool isopropílico (José M. Vaz Pereira, ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	<i>Álcool isopropílico</i>
Identificação dos perigos:	Facilmente inflamável. Irritante para os olhos. Pode provocar sonolência e vertigens, por inalação de vapores.
Manuseamento:	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição. Tomar medidas para impedir a formação de eletricidade estática. Guardar o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado
Medidas de proteção individuais:	Óculos e máscara de segurança, luvas de proteção e bata.
Medidas de combate a incêndios:	Espuma resistente a álcool ou água em spray para pequenos focos. Extintor de CO, pó químico seco, areia ou terra. Não usar jacto de água direto.

Tabela A.10 Dados de segurança da Novozyme[®] 435 (Novozymes France S.A., ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Novozyme[®] 435
Identificação dos perigos:	Nocivo. Pode causar sensibilidade por inalação. Ligeiramente irritante para a pele e olhos.
Manuseamento:	Assegurar ventilação adequada. Evitar a formação de poeiras.
Medidas de proteção individuais:	Óculos de segurança com anteparos laterais, luvas de proteção e roupa com mangas compridas. No caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado.
Medidas de combate a incêndios:	Água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou CO ₂ .

Tabela A.11 Dados de segurança da Lipozyme[®] RM IM (Novozymes France S.A., ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Lipozyme[®] RM IM
Identificação dos perigos:	Pode causar sensibilidade por inalação. Ligeiramente irritante para a pele e olhos após contato prolongado.
Manuseamento:	Assegurar ventilação adequada. Evitar a formação de poeiras.
Medidas de proteção individuais:	Óculos de segurança com anteparos laterais, luvas de proteção e roupa com mangas compridas. No caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado.
Medidas de combate a incêndios:	Água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou CO ₂ .

Tabela A.12 Dados de segurança da Lipozyme[®] TL IM (Novozymes France S.A., ficha de dados de segurança do produto).

Nome do produto:	Lipozyme[®] TL IM
Identificação dos perigos:	Pode causar sensibilidade por inalação. Ligeiramente irritante para a pele e olhos após contato prolongado.
Manuseamento:	Assegurar ventilação adequada. Evitar a formação de poeiras.
Medidas de proteção individuais:	Óculos de segurança com anteparos laterais, luvas de proteção e roupa com mangas compridas. No caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado.
Medidas de combate a incêndios:	Água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou CO ₂ .

Anexo B – Destino dos resíduos produzidos neste estudo

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

Tabela B.1 Resíduos gerados neste estudo e respetivo destino

Resíduo	Destino
Enzimas	Armazenamento para posterior reutilização.
Glicerina	Armazenamento em recipiente com vista a posterior valorização.
Resíduos indiferenciados	Encaminhamento para tratamento juntamente com os restantes resíduos produzidos pelo Departamento de Ambiente e Ordenamento.
Solventes/ metanol recuperado	Armazenamento e reutilização em trabalhos posteriores.

Anexo C – Parâmetros da EN 14214

Tabela C1 – Especificações aplicáveis ao biodiesel (EN 14214)

Propriedade	Unidades	Limites		
		Mínimo		Máximo
Ésteres	% (m/m)	96,5		-
Densidade a 15° C	g/ml	0,86		0,9
Viscosidade a 40° C	mm ² /s	3,5		5
Ponto de Inflamação	°C	120		-
Enxofre	mg/kg	-		10
Resíduo carbonoso	% (m/m)			0,3
Numero Cetano		51		-
Cinzas sulfatadas	% (m/m)	-		0,02
Água	% (m/m)	-		0,05
Contaminação total	mg/kg	-		24
Corrosão do cobre (3h a 50°C)	Classificação		Classe 1	
Estabilidade de Oxidação	Horas	6		-
Índice de acidez	mg KOH/g	-		0,5
Índice de Iodo		-		120
Metiléster do ácido Linoleico	% (m/m)	-		12
Metilésteres polinsaturados (>= 4 ligações dupla)	% (m/m)	-		1
Metanol	% (m/m)	-		0,2
Monoglicéridos	% (m/m)	-		0,8
Diglicéridos	% (m/m)	-		0,2
Triglicéridos	% (m/m)	-		0,2
Glicerina livre	% (m/m)	-		0,02
Glicerina total	% (m/m)	-		0,25
Metais alcalinos (Na, K)	mg/kg	-		5
Fósforo	mg/kg	-		10

Anexo D– Procedimentos experimental para a caracterização do OAU

1. Densidade

A densidade é a relação entre a massa de uma substância e o volume que esta ocupa, a uma determinada temperatura.

A densidade do OAU foi determinada usando um densímetro “Precision”, sem termómetro acoplado, com um comprimento de 280 mm, sendo a gama de medida compreendida entre 0,700 g/cm³ e 1,000 g/cm³ e graduação de 0,005 g/cm³.

O procedimento adotado (norma ISO 3675:1998) foi o seguinte:

- a. Transferir uma porção de amostra para um cilindro (por exemplo uma proveta de 100 mL ou 250 mL) sem grande agitação, para evitar a formação de bolhas de ar;
- b. Colocar a proveta com a amostra numa posição vertical, num local sem correntes de ar e onde a temperatura não varie mais do que 2°C durante o ensaio;
- c. Agitar a amostra com um termómetro para homogeneizar a mistura. Registrar a temperatura e remover o termómetro;
- d. Introduzir o densímetro sem tocar nas paredes do cilindro;
- e. Deixar o densímetro atingir o equilíbrio. Mergulhar o densímetro 1 ou 2 milímetros e deixar alcançar de novo o equilíbrio;
- f. Ler e registar o valor lido na escala do densímetro;
- g. Retirar o densímetro e agitar novamente a amostra com o termómetro, para verificar se houve variação da temperatura entre o início e o fim do ensaio;
- h. Lavar o densímetro e o termómetro com éter de petróleo e posteriormente com acetona;
- i. Efetuar mais duas medições.

Como o densímetro usado nas determinações estava calibrado a 20°C, a correção da temperatura faz-se através da seguinte equação (ISO 3675:1998(E)):

$$\rho_{15^{\circ}\text{C}} = \frac{\rho_{T(^{\circ}\text{C})}}{1 - 23 \times 10^{-6}(T - 15) - 2 \times 10^{-8}(T - 15)^2} \quad (1)$$

Onde ρ representa a densidade e T a temperatura (em °C) à qual foi efectuada a medição.

2. Viscosidade

A viscosidade cinemática caracteriza-se pela resistência de escoamento de um fluído, sob a ação da gravidade.

A viscosidade mede-se por meio de viscosímetros, aparelhos em que geralmente se determina o tempo que um certo volume de líquido leva a escoar-se através de um orifício de pequeno diâmetro.

Utilizou-se um viscosímetro “Cannon-Fenske” para fluidos transparentes com comprimento total de 250 mm. A gama de aplicação do viscosímetro na caracterização do OAU foi : $20 - 100 \text{ mm}^2/\text{s} \pm 0,35\%$, com uma constante $c = 0,10446 @40^\circ\text{C}$. Este viscosímetro satisfaz os requisitos das normas ASTM D445, ASTM D446, IP 71, ISO 3104 e ISO 3105.

O procedimento desenvolvido foi o seguinte (baseado na norma ISO 3104):

- a. Ajustar e manter a temperatura do banho termoeestático para 40°C ;
- b. Lavar o viscosímetro várias vezes com éter de petróleo, sendo a última lavagem com acetona;
- c. Secar o viscosímetro, fazendo passar uma corrente de ar quente durante cerca de 2 minutos;
- d. Encher o bolbo do viscosímetro e esperar que este atinja a temperatura do banho;
- e. Com o auxílio de uma pompete elevar o fluído acima da 1ª marca (superior);
- f. Retirar o pompete e deixar que o fluído flua livremente. Cronometrar o tempo do escoamento, i. e., o tempo que decorre desde o instante em que fluído passa a 1ª marca até ao instante em que este atinge a 2ª marca (inferior);
- g. Registrar o tempo decorrido;
- h. Repetir o ensaio por mais duas vezes.

A viscosidade cinemática (mm^2/s) é calculada através da seguinte equação:

$$\nu = c \times t \quad (2)$$

Sendo c a constante do viscosímetro (mm^2/s) e t o tempo de escoamento em segundos.

3. Teor de humidade

O teor de humidade do OAU é importante ser conhecido porque, quando a reação de transesterificação decorre na presença de um catalisador alcalino (*e. g.* NaOH ou KOH), a presença de água promove uma reação concorrente, a saponificação;

Este parâmetro foi determinado por coulometria através do método de titulação de Karl Fischer segundo a norma ISO 12937:2003. O coulômetro usado foi o 831 Karl Fisher coulometer da Metrohm.

Uma toma de massa conhecida de óleo é injetada na célula de reação do coulômetro, na qual o iodo é gerado no ânodo para a reação de Karl Fischer. Quando toda a água for titulada, o excesso de iodo é detetado pelo aparelho e a titulação termina. A quantidade de água é determinada com base na estequiometria de reação: uma mole de iodo reage com uma mole de água, sendo a quantidade de água proporcional à corrente total integrada de acordo com a Lei de Faraday. Todo este processo é feito automaticamente pelo equipamento, à exceção da introdução da massa de amostra. O procedimento experimental é:

- a. Ligar o aparelho e deixar condicionar, ligando também a agitação da célula de reação;
- b. Recolher uma toma de 1 mL de OAU;
- c. Limpar a seringa e a agulha e pesar a seringa;
- d. Carregar na tecla START do aparelho e injetar a amostra;
- e. Pesar a seringa vazia;
- f. Registrar o valor do aparelho de Karl Fischer.

O equipamento devolve o valor de água na toma de ensaio injetada na célula de reação. A fração mássica de água, expressa em percentagem, ou seja, a percentagem de água no OAU, é obtida utilizando a equação seguinte:

$$W = \frac{m_2}{m_1 \times 10^4} \quad (3)$$

Onde W é a fração mássica em água, m_1 é a massa da toma (em g) e m_2 a massa de água indicada pelo titulador (em μg).

4. Valor ácido

O valor ácido corresponde à percentagem de ácidos gordos livres (AGL) presentes numa amostra. O seu valor é dado pela massa de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os AGL, contidos em um grama de amostra e é determinado através de um método titrimétrico.

O objetivo da determinação do valor ácido do OAU reside na informação sobre o seu grau de deterioração. Um elevado índice de acidez indica que o óleo ou gordura sofreu quebras na sua cadeia lipídica.

O procedimento adotado foi:

- Dissolver 2 mL de OAU em 20 mL de álcool isopropílico, aquecendo ligeiramente;
- Titular com solução aquosa de NaOH 0,1% (m/m), usando fenolftaleína como indicador, até a cor carmim permanecer durante pelo menos 15 segundos;
- Registar o volume de titulante gasto.

O valor ácido do biodiesel ou do OAU determina-se através da seguinte fórmula:

$$\text{Valor ácido} \left[\frac{\text{mg KOH}}{\text{g amostra}} \right] = \frac{V_{\text{NaOH gasto}} [\text{mL}] \times C_{\text{NaOH}} [\%]}{\rho_{\text{amostra}} [\text{g/L}]} \times 1.4 \times 10^4 \quad (4)$$

5. Massa molar

O OAU é constituído essencialmente por mono, di e triglicerídeos e AGL. No presente trabalho considera-se que todos os glicerídeos se encontram sob a forma de triglicerídeos.

Para determinar a massa molar do OAU procedeu-se a uma reação de transesterificação por catálise homogénea alcalina (razão mássica NaOH:OAU=1,1%, razão molar metanol:OAU=7:1 e T=65°C) e posterior purificação do biodiesel (separação da glicerina, lavagem e secagem), bem como a sua caracterização por cromatografia gasosa (CG), de forma a identificar e quantificar os ésteres formados.

Uma vez identificados os ésteres presentes no biodiesel e a respetiva fração mássica, procedeu-se à determinação da sua fórmula empírica média. Assim, calculou-se a fração mássica dos elementos j, correspondentes a C (carbono), H (hidrogénio) e O (oxigénio) através da seguinte expressão:

$$w_{j,bs} \left[\frac{\text{kg elemento } j}{\text{kg OAU}} \right] = \frac{\sum (w_{i,bs} \times w_{ji})}{\sum w_{i,bs}} \quad (5)$$

Onde $w_{i,bs}$ representa a fração mássica (em base seca – bs) de cada um dos ésteres detetados por CG e w_{ji} representa a fração mássica do elemento j em cada um dos ésteres, sendo dada por:

$$w_{ji} \left[\frac{\text{kg elemento } j}{\text{kg éster } i} \right] = \frac{n^{\circ} \text{ de átomos do elemento } j \times M_j}{M_i} \quad (6)$$

Sendo M a massa molar. Deste modo, a fórmula empírica geral da mistura de ésteres é dada por $C_x H_y O_z$, onde:

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

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

$$z = \frac{\left(\frac{W_{O,bs}}{16} \right)}{\text{mínimo} \left(\frac{W_{C,bs}}{12}; \frac{W_{H,bs}}{1}; \frac{W_{O,bs}}{16} \right)} \times 2 \quad (9)$$

Com a fórmula empírica média dos ésteres é possível determinar a fórmula empírica dos triglicerídeos, sabendo que são necessários três ésteres e um glicerol para formar um triglicerídeo.

Para tal, retira-se a cada éster um grupo metilo (CH_3), porque a reação de transesterificação decorreu na presença de metanol e adiciona-se a cadeia correspondente ao glicerol. Deste procedimento resultam as equações 10,11 e 12, sendo a fórmula empírica média dos triglicerídeos dado por $C_{xx} H_{yy} O_{zz}$, onde:

$$xx = (3 \times x) \quad (10)$$

$$yy = (3 \times y) - 4 \quad (11)$$

$$zz = (3 \times z) \quad (12)$$

Como referido anteriormente, o OAU além de conter triglicerídeos é também constituído por AGL. Para determinar a sua massa molar com maior rigor seria necessário proceder à identificação dos AGL por cromatografia. Contudo, neste trabalho, uma vez que o valor ácido não é elevado, não se determinou a massa molar dos ácidos gordos livres tendo-se que a massa molar média do OAU é igual à massa molar dos triglicerídeos.