

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARÍA CARLOTA VILLEGAS AGUILAR

**MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
BIODIESEL ETANÓLICO UTILIZANDO LIPASE SOLÚVEL**

São Carlos/SP

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARÍA CARLOTA VILLEGAS AGUILAR

**MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
BIODIESEL ETANÓLICO UTILIZANDO LIPASE SOLÚVEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.

Orientação: Prof. Dr. Marcelo Perecin de Arruda Ribeiro

Co-Orientação: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

São Carlos/SP

2018

Villegas Aguiar, Maria Carlota

MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
BIODIESEL ETANÓLICO UTILIZANDO LIPASE SOLÚVEL / Maria
Carlota Villegas Aguiar. -- 2018.
141 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São
Carlos, São Carlos

Orientador: Marcelo Perecin de Arruda Ribeiro, Roberto de Campos
Giordano

Banca examinadora: Ruy de Sousa Junior, Klicia Araujo Sampaio
Bibliografia

1. Cinética. 2. Transesterificação enzimática. 3. Lipase solúvel. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

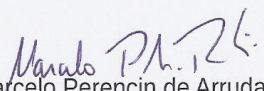
Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

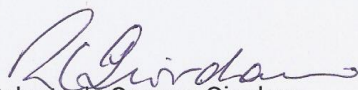
DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

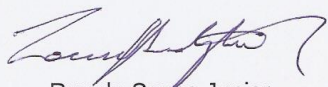
Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARIA CARLOTA VILLEGAS AGUILAR APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE MARÇO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:


Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro
Orientador, UFSCar


Roberto de Campos Giordano
Coorientador, UFSCar


Ruy de Sousa Junior
UFSCar


Klícia Araújo Sampaio
UNICAMP

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Felipe Andrés e Juan Pablo, e aos meus sobrinhos: Carlos Daniel, Daniel Enrique e Julio Enrique!

Aos meus pais, Lirice e Carlos!

Ao meu Tio Ricardo! Você sempre acreditou em mim!

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem da Divina Pastora, pelas bênçãos concedidas e força durante estes dois anos fora da minha casa!

A toda minha família, pelo seu apoio, carinho e incentivo na distância. Em especial a meus filhos, ao Felipe Alfonzo, a meu irmão Carlos e aos meus pais: Lirice e Carlos, pela sua ajuda e compreensão durante todas minhas ausências.

Ao Prof. Marcelo, pela suas orientações e paciência; pelo seu apoio e estímulo para culminar com sucesso esta etapa! Ao Prof. Roberto, pelo seus conselhos e ensinamentos! São grandes Professores!

Aos professores do Programa da Pós-graduação do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, pela contribuição na minha formação, e aos técnicos Thaís, Alyne e Thiago pela sua ajuda.

A Iris, Gabriela, Camila, Katia, Sonia, Marco, Luis, Flavia, Julymar, Angel, Karen, David, Majo e Viviana, pelo sua companhia e amizade. Vocês são minha família do Brasil!

A Margarita, Erick, Thais, Leticia, Marina, Sheyla, Matheus, Laiane, Manu e aos meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Automatização do Processos Bioquímicos e do Laboratório de Tecnologia Enzimática, pela sua amizade, socorros, convívio, conversas.

A minha Universidad de Carabobo, em especial, aos meus colegas do Departamento de Química – FACyT, pelo seu apoio e acompanhamento nestes anos.

À Organização de Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras, através de sua Programa de Aliança para a Educação e a Capacitação (PAEC - OEA - GCUB), pela bolsa concedida por meio do organismo de fomento CAPES.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) - Proc. 2016/10636-8

Muito obrigada!

*“Caminhante seus passos são o caminho e nada mais
Ao caminhar se faz o caminho, e ao olhar para trás
Você vê o caminho que nunca voltará a pisar
Caminhante não tem caminho, faz caminho ao andar”*

Antonio Machado

RESUMO

O estudo da cinética da síntese de biodiesel permite uma melhor compreensão de seu processo de produção. Os modelos cinéticos que têm sido sugeridos para a produção do biodiesel por catálise enzimática são diversos, sendo a maior parte para lipases imobilizadas. Cada lipase tem um mecanismo de reação distinto que depende da fonte da enzima, do solvente e da reação avaliada. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa fundamenta-se no estudo da cinética de lipase solúvel NS-40116, uma formulação líquida da alteração genética de lipase *Thermomyces lanuginosus* na reação de transesterificação de óleo de soja refinado e álcool etílico para o desenvolvimento de um modelo mecanístico que possa descrever seu comportamento catalítico assumindo uma mistura de reação heterogênea. As reações foram realizadas a 35°C e em presença de 10% w/w_{óleo} água. O planejamento das reações foi feito mudando as condições de operação: velocidade de agitação (800-1200 RPM), concentração de enzima (0.5 – 2.0% w/w_{óleo}) e conteúdo do álcool (1.5 – 2.0 eq.). Além disso, foram determinadas a relação entre a velocidade de agitação e a razão volumétrica dos substratos com a área interfacial da emulsão óleo-água-álcool. A lipase solúvel NS-40116 foi caracterizada em função do conteúdo de proteínas (31.454±0.002 mg proteína/ml lipase), atividade hidrolítica (48048±653 LU/ml onde 1 LU é a atividade requerida para produzir 1 µmol/min sob condições padrão) e massa molecular (31 kDa). Obteve-se um biodiesel com uma concentração dos ésteres de 82.55±7.17% a partir de óleo de soja refinado (T= 35°C, 800 RPM, 10% w/w_{óleo} água, 2.0% w/w_{óleo} lipase e 2,0 eq. álcool etílico). Foi observado que o diâmetro da gota da emulsão estudada aumenta com o aumento do volume da fase polar (água-álcool) mas diminui com o aumento da velocidade de agitação, afetando inversamente a área interfacial. Foram estimados os parâmetros cinéticos para o modelo matemático proposto que pode descrever a síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando a lipase solúvel NS-40116.

Palavras chaves: Biodiesel. Cinética. Transesterificação enzimática. Lipase solúvel. Área interfacial.

ABSTRACT

The kinetics study of the synthesis of ethyl biodiesel allows a deeper understanding of the enzymatic process, providing an important tool for process design, optimization and control. Most of the models proposed in the literature for enzymatic biodiesel production use methanol and immobilized lipases. Moreover, depending on the source of the lipase and the reaction medium, the reaction may have a distinct mechanism. In this work we study the biodiesel production by transesterification of refined soybean oil and bioethanol using the soluble lipase NS-40116, a liquid formulation of a genetic modified lipase from *Thermomyces lanuginosus*. The aim of this research is to develop a phenomenological model capable of describing the catalytic behavior of that lipase formulation in this heterogeneous medium. Batch assays were carried out in a bench jacketed glass reactor where several process variables were varied: agitation speed (800-1200 rpm), enzyme concentration (0.5-2.0% w/w_{oil}) and alcohol content (1.5-2.0 equivalent). All assays were carried out at 35°C with 10% w/w_{oil} of water. In addition, the relationship between the agitation speed and the volumetric flow rate of the substrates with the oil-water-alcohol emulsion interface was determined. The soluble lipase NS-40116 was characterized: protein content 31.454 ± 0.002 mg protein/ml lipase, hydrolytic activity 48048 ± 653 LU/ml (1 LU: activity required to produce 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ with standard conditions) and molecular weight 31 kDa. An ethyl biodiesel was obtained from refined soybean oil with a concentration of esters: $82.55 \pm 7.17\%$ (T = 35°C, 800 RPM, 10% w/w_{oil} water, 2.0% w/w_{oil} lipase and 2.0 eq. ethyl alcohol). The average interfacial area was evaluated by measuring droplet diameters distribution in pictures of the emulsion obtained in a microscope. Different agitation speeds and polar/nonpolar volume ratios were used. Results show that the average diameter of the droplets increases when the polar volume increases and decreases with the agitation speed. The kinetic parameters were determined for the mathematical model of the enzymatic synthesis of ethyl biodiesel using the soluble lipase NS-40116.

Keywords: Biodiesel. Kinetics. Enzymatic transesterification. soluble lipase. Interfacial area.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Demanda dos principais derivados de petróleo e biocombustível em 2016 e sua projeção para 2026.....	22
FIGURA 2. Equação química geral da reação catalisada com lipase: Hidrolise (reação direita) e esterificação (reação inversa).....	23
FIGURA 3. Estrutura 3D de lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> na sua forma (a) fechada (inativa) e (b) aberta (ativa).	26
FIGURA 4. Mecanismo da alcoólise catalisada por lipase.	27
FIGURA 5. Atividade cinética em função da concentração do substrato para a esterase e a lipase.....	28
FIGURA 6. Modelo cinético de Vergel-Dehass para a hidrólise catalisada com uma lipase solúvel em um substrato não solúvel.....	29
FIGURA 7. Equação química geral da reação de transesterificação de triglicerídeos.....	33
FIGURA 8. Classificação do processo de transesterificação para a síntese de biodiesel.....	34
FIGURA 9. Etapas do mecanismo da reação de transesterificação para a síntese do biodiesel.	36
FIGURA 10. Equação química geral da esterificação dos ácidos graxos livres.	37
FIGURA 11. Representação gráfica do mecanismo de reação: (a) Michaelis – Menten (b) Ping-Pong Bi Bi.....	40
FIGURA 12. Representação gráfica do passo a passo da reação de transesterificação dos triglicerídeos com mecanismo de Ping-Pong Bi Bi..... Erro! Indicador não definido.	
FIGURA 13. Esquema ilustrativo de dois reatores com mesmo volume total e mesma massa de lipase solúvel.	43
FIGURA 14. Distribuição assumida dos componentes para o modelo cinético da síntese do biodiesel a partir da reação transesterificação utilizando enzima solúvel.	47
FIGURA 15. Esquema ilustrativo do reator usado para os ensaios de batelada.....	63
FIGURA 16. Identificação dos grupos num cromatograma de HPLC obtido da mistura reacional da transesterificação com etanol do óleo de soja (t=30 min).....	67
FIGURA 17. Cromatogramas de HPLC correspondente ao (a) óleo de soja e (b) produto da transesterificação com etanol do óleo de soja (t =1440 min)	68
FIGURA 18. Eletroforese SDS-PAGE das formulações de lipase comercial NS-40116 e <i>Thermomyces lanuginosus</i>	75

FIGURA 19. Estabilidade térmica da lipase NS40116 incubada a 35 °C durante 25 horas ...	76
FIGURA 20. Fotos digitalizadas da emulsão água-álcool-óleo com o software S-Viewer das observações no microscópio Olympus BX50 com o objetivo 4.0x0.13 micros.....	78
FIGURA 21. Distribuição do diâmetro inicial da gota nas amostras para a diferentes condições de operação estabelecidas.....	79
FIGURA 22. Relação linear entre a velocidade de agitação e o diâmetro da gota para as duas vazões volumétricas estudadas nas reações de transesterificação enzimática pela síntese do biodiesel com lipase solúvel.....	80
FIGURA 23. Cromatogramas RP-HPLC obtidos das amostras coletadas na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol com lipase líquida NS-40116.....	82
FIGURA 24. Relação entre os dados obtidos na quantificação dos ésteres (BD) obtidos em GC e HPLC.....	84
FIGURA 25. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos na síntese enzimática de biodiesel etanólico a partir do óleo de soja.....	84
FIGURA 26. Concentração molar (mol/m ³) dos ácidos graxos no óleo de soja refinado e na mistura reacional para cada experimento no tempo de 300 min.	88
FIGURA 27. Concentração molar (mol/m ³) na fase oleosa em função do tempo para a reação de transesterificação do óleo de soja com lipase NS-40116.....	89
FIGURA 28. Dados experimentais obtidos para o reator aberto (traço de ponto) e o reator fechado (traço sólido) nos experimentos 2 e 6	91
FIGURA 29. Variação da velocidade inicial em função do conteúdo de água na reação de transesterificação enzimática de óleo de soja	92
FIGURA 30. Relação entre os volumes da fase polar experimentais e os volumes calculado pelo modelo	94
FIGURA 31. Volume experimental, volume ideal e o volume calculado pelo modelo para a fase polar para diferentes misturas	94
FIGURA 32. Concentração mássica da fase oleosa para a reação de transesterificação enzimática para o experimento TE7A	95
FIGURA 33. Concentração mássica (g/m ³) estimada do etanol e água na fase polar para a reação de transesterificação enzimática com lipase líquida	96
FIGURA 34. Variação estimada da concentração mássica do glicerol na reação de transesterificação enzimática.....	96
FIGURA 35. Variação de volume cada fase durante a reação de transesterificação enzimática de biodiesel (Experimento TE7A).....	97

FIGURA 36. Concentração mássica da fase oleosa para a reação de transesterificação enzimática assumindo os mesmos valores para as constantes das reações intermediárias (Experimento TE8A).....	100
FIGURA 37. Perfil de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante a validação da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando lipase solúvel	101
FIGURA 38. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE1B.....	115
FIGURA 39. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE1B	115
FIGURA 40. Curvas de ajuste para o experimento TE1B.....	116
FIGURA 41. Variação do volume no tempo para o experimento TE1B.....	116
FIGURA 42. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE2B.....	117
FIGURA 43. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE2B	117
FIGURA 44. Curvas de ajuste para o experimento TE2B.....	118
FIGURA 45. Variação do volume no tempo para o experimento TE2B.....	118
FIGURA 46. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE3B.....	119
FIGURA 47. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE3B	119
FIGURA 48. Curvas de ajuste para o experimento TE3B.....	120
FIGURA 49. Variação do volume no tempo para o experimento TE3B.....	120
FIGURA 50. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE4A	121
FIGURA 51. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE4A	121
FIGURA 52. Curvas de ajuste para o experimento TE4A	122
FIGURA 53. Variação do volume no tempo para o experimento TE4A	122
FIGURA 54. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE4B.....	123
FIGURA 55. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE4B	123
FIGURA 56. Curvas de ajuste para o experimento TE4B.....	124

FIGURA 57. Variação do volume no tempo para o experimento TE4B.....	124
FIGURA 58. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE5A	125
FIGURA 59. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE5A	125
FIGURA 60. Curvas de ajuste para o experimento TE5A	126
FIGURA 61. Variação do volume no tempo para o experimento TE5A	126
FIGURA 62. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE5B.....	127
FIGURA 63. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE5B	127
FIGURA 64. Curvas de ajuste para o experimento TE5B.....	128
FIGURA 65. Variação do volume no tempo para o experimento TE5B.....	128
FIGURA 66. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE6A	129
FIGURA 67. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE6A	129
FIGURA 68. Curvas de ajuste para o experimento TE6A	130
FIGURA 69. Variação do volume no tempo para o experimento TE6A	130
FIGURA 70. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE6B.....	131
FIGURA 71. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE6B	131
FIGURA 72. Curvas de ajuste para o experimento TE6B.....	132
FIGURA 73. Variação do volume no tempo para o experimento TE6B.....	132
FIGURA 74. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE7B.....	133
FIGURA 75. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE7B	133
FIGURA 76. Curvas de ajuste para o experimento TE7B.....	134
FIGURA 77. Variação do volume no tempo para o experimento TE7B.....	134
FIGURA 78. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE8A	135

FIGURA 79. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE8A	135
FIGURA 80. Curvas de ajuste para o experimento TE8A	136
FIGURA 81. Variação do volume no tempo para o experimento TE8A	136
FIGURA 82. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE8B.....	137
FIGURA 83. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE8B	137
FIGURA 84. Curvas de ajuste para o experimento TE8B.....	138
FIGURA 85. Variação do volume no tempo para o experimento TE8B.....	138
FIGURA 86. Perfil de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante ajuste preliminar do modelo para experimentos de reações de transesterificação em reator aberto	140
FIGURA 87. Perfil de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante ajuste preliminar do modelo para experimentos de reações de transesterificação em reator fechado	141
FIGURA 88. Perfil de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante ajuste preliminar do modelo para experimentos de reações de hidrólise em reator aberto	142

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Aplicações do uso das lipases como catalisador.....	30
TABELA 2. Principais óleos usados como matéria-prima na produção de biodiesel.....	32
TABELA 3. Comparação entre os processos de transesterificação catalítica para a produção de biodiesel: alcalina, ácida e enzimática.....	35
TABELA 4. Estudos realizados na síntese de biodiesel usando a formulação líquida da alteração genética da <i>Thermomyces lanuginosus</i>	39
TABELA 5. Modelos cinéticos publicados para a síntese de biodiesel usando lipase líquida	45
TABELA 6. Equacionamento para a determinação do número de moles para cada complexo enzima substrato formado durante a sínteses de biodiesel por transesterificação.....	53
TABELA 7. Equacionamento para a determinação do número de moles para o complexo acil-enzima formado durante a sínteses de biodiesel por transesterificação.....	54
TABELA 8. Equações de balanço de massa para reator em batelada dos compostos envolvidos na síntese de biodiesel por transesterificação enzimática com lipases solúveis.....	57
TABELA 9. Volume molar dos componentes usados na determinação do volume de cada fase.....	58
TABELA 10. Constante usadas na equação de Redlich-Kister para as misturas binárias.	58
TABELA 11. Parâmetros cinéticos para ser ajustado no modelo proposto para síntese de biodiesel usando lipase solúvel.....	59
TABELA 12. Condições de operação para os ensaios de transesterificação com etanol do óleo de soja a 35 °C usando a lipase NS-40116.....	64
TABELA 13. Condições de operação dos experimentos de hidrólises de óleo de soja usando a lipase NS-40116 a 35 °C.....	65
TABELA 14. Composição mássica do óleo de soja utilizada para a determinação das massas molares média.....	69
TABELA 15. Massa molar média dos componentes do óleo de soja.....	69
TABELA 16. Condições de operação dos ensaios para a determinação do diâmetro da gota	72
TABELA 17. Diâmetro médio inicial da gota para as condições de operação estabelecidas na reação de transesterificação enzimática pela síntese do biodiesel com lipase solúvel.....	77
TABELA 18. Velocidade inicial, rendimento da reação e conteúdo de ésteres obtidos nas reações de transesterificação com lipases líquidas (água 10 % w/w óleo).....	86

TABELA 19. Densidades a 25 °C e massa molecular das misturas iniciais usadas na mistura reacional para as reações de transesterificação.....	87
TABELA 20. Volumes experimentais usados para a validação do cálculo de volume da fase polar no modelo.....	93
TABELA 21. Parâmetros cinéticos do modelo matemático da síntese enzimática de biodiesel etanólico com a lipase líquida NS-40116.....	98
TABELA 22. Parâmetros cinéticos do modelo matemático da síntese enzimática de biodiesel etanólico com a lipase líquida NS-40116 assumindo que os valores de k são os mesmos nas reações intermédias.....	99
TABELA 23. Tempos de retenção (t_R) determinados para os diferentes picos obtidos na quantificação dos teores de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos por cromatografia líquida em fase reversa.....	114
TABELA 24. Conteúdo de ésteres (g ésteres/g amostra) analisados pela cromatografia líquida e a cromatografia gasosa.....	139
TABELA 25. Parâmetros cinéticos obtidos no ajuste preliminares para o modelo matemático da síntese enzimática de biodiesel etanólico com a lipase líquida NS-40116.....	142

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABIOVE: Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais

ANP: Agência nacional de petróleo, gás natural e biocombustível

V_p : Volume da fase aquosa (polar)

V_{np} : Volume de óleo (fase apolar)

n_i : mol de cada espécie

r_i : taxa da i-ésimo componente (mol/tempo)

r_j : taxa da j-ésima reação (mol/tempo)

k_j : Constante de velocidade da j-ésima reação direita

k_{-j} : Constante de velocidade j-ésima reação inversa.

A_f : área livre na interface

A_e : área ocupada pela enzima na interface

A_T : área interfacial total

d_s : diâmetro da gota.

n_{Af} : quantidade em mol de enzima que pode ser alocada na área interfacial livre.

n_{Ea} : número de moles da enzima livre dissolvida na fase polar.

$\sum n_{Ei}$: moles da enzima ativada absorvida na interface

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
I. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
1.1. Lipases	25
1.1.1. Propriedades das lipases.	25
1.1.1.1. Mecanismo da catalise com lipase.....	26
1.1.1.2. Ativação interfacial da lipase	27
1.2. Aplicações das lipases.	30
1.2.1. Biodiesel	31
1.2.1.1. Óleos usados na produção do biodiesel.....	31
1.2.1.2. Processo de Obtenção de Biodiesel pela transesterificação enzimática	33
1.3. Lipases solúveis	37
1.4. Mecanismo cinético das lipases na síntese por transesterificação de biodiesel.	40
II. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo geral	46
2.2. Objetivos específicos	46
III. MODELO CINÉTICO PROPOSTO.....	47
3.1. Equações de velocidade de reação.....	49
3.2. Determinação da área interfacial	50
3.3. Determinação do número de moles da enzima.....	52
3.4. Determinação das equações de balanço de massa dos substratos e produtos envolvidos na reação de transesterificação com lipases solúveis.....	56
3.5. Determinação das equações do volume para cada fase do sistema	57
3.6. Parâmetros cinéticos do modelo	59
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	60

4.1.	Materiais	60
4.1.1.	Lipase	60
4.1.2.	Reagentes.....	60
4.2.	Caracterização de lipase	60
4.2.1.	Conteúdo de proteínas	60
4.2.2.	Atividade hidrolítica.....	61
4.2.3.	Eletroforese SDS – PAGE para determinação da massa molar da enzima	61
4.2.4.	Estabilidade térmica de lipase	62
4.3.	Obtenção de dados experimentais para o ajuste do modelo cinético proposto para o uso de lipases líquidas na obtenção do biodiesel.....	62
4.3.1.	Reações de batelada.....	62
4.3.1.1.	Transesterificação com etanol do óleo de soja para a síntese dos ésteres etílicos dos ácidos graxos (biodiesel).....	63
4.3.1.2.	Hidrólises do óleo de soja.....	65
4.3.2.	Determinação de ésteres e glicerídeos por cromatografia líquida.....	65
4.3.2.1.	Preparação de amostras para o HPLC	66
4.3.2.2.	Quantificação dos teores de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos	66
4.3.2.3.	Conversão de composição mássica a concentrações molares.	68
4.3.3.	Determinação dos ésteres etílicos dos ácidos graxos por cromatografia de gases	70
4.3.3.1.	Preparação de amostras para a cromatografia gasosa.....	70
4.3.3.2.	Quantificação do teor de ésteres etílicos de ácidos graxos.....	70
4.3.4.	Determinação da concentração dos ácidos graxos livres.....	71
4.3.5.	Determinação do diâmetro da gota.....	71
4.4.	Ajustes dos parâmetros do modelo proposto da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando a lipase solúvel NS-40116	73
V.	RESULTADOS.....	74

5.1.	Caracterização cinética da formulação líquida de lipase.....	74
5.1.1.	Conteúdo de proteína.....	74
5.1.2.	Atividade hidrolítica.....	74
5.1.3.	Determinação da massa molecular por eletroforese SDS-PAGE.....	74
5.1.4.	Estabilidade térmica da lipase NS-40116.....	76
5.2.	Determinação do diâmetro médio inicial da gota.....	76
5.3.	Cinética da transesterificação enzimática do óleo de soja refinado catalisada pela lipase solúvel.....	81
5.3.1.	Ensaio experimentais de transesterificação enzimática de óleo de soja.	81
5.3.1.1.	Quantificação de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).	81
5.3.1.2.	Dados experimentais obtidos na reação de transesterificação do óleo de soja com álcool etílico em presença da lipase NS-40116.	85
5.3.2.	Influência da concentração de enzima na cinética de reação	88
5.3.3.	Influência da velocidade de agitação na cinética de reação	90
5.3.4.	Influência da concentração do álcool	91
5.3.5.	Influência da concentração de água.....	92
5.4.	Avaliação do modelo proposto para a síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando lipase solúvel	93
5.4.1.	Validação da determinação do volume da fase polar	93
5.4.2.	Ajuste do modelo matemático	95
5.4.3.	Validação do modelo	100
VI.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	102
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICE A:	Picos e tempos de retenção determinados por cromatografia líquida com gradiente da fase móvel na fase reversa (RP-HPLC)	114
APÊNDICE B:	Gráficos obtidos a partir dos dados experimentais e durante o ajuste do modelo	115

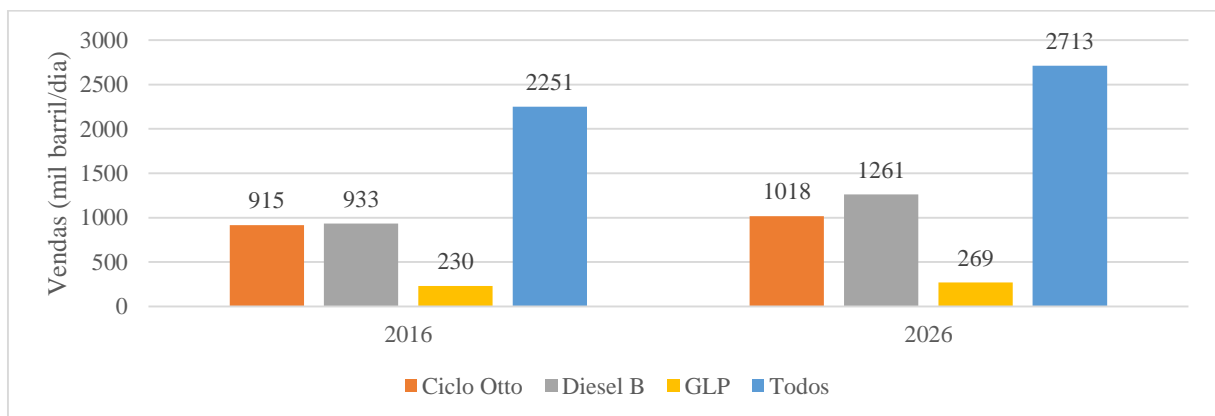
APÊNDICE C: Resultados obtidos na quantificação de etil éster.	139
APÊNDICE D: Ajuste preliminar do modelo usando todos os dados experimentais.....	140

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse na produção de combustíveis alternativos, como o biodiesel, tem aumentado principalmente pelos problemas ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis: poluição e aquecimento global. De acordo com o relatório do Departamento de Energia dos Estados Unidos (maio, 2016), o aumento anual no consumo de energias renováveis está estimado em 2.6% entre os anos 2012 e 2040.

No Brasil, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira por meio do programa nacional de produção e uso de biodiesel de forma sustentável, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional. Em março de 2017, haviam 50 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela agência nacional de petróleo, gás natural e biocombustível (ANP) para operação no país, correspondendo a uma capacidade instalada de 627744 m³/mês e produção de 335069 m³/mês (ANP, 2017). O biodiesel é comercializado misturado ao óleo diesel, e atualmente, seu percentual de mistura obrigatória é de 8%. O Conselho Nacional de Política Energética aprovou seu incremento até 10% a partir de março de 2018. De acordo com o documento “Oportunidades na produção e no abastecimento de combustíveis no Brasil” elaborado pela ANP (2017), espera-se um crescimento acumulado de 20% na demanda dos principais derivados de petróleo e biocombustíveis entre os anos 2016 e 2026 (Fig. 1).

FIGURA 1. Demanda dos principais derivados de petróleo e biocombustível em 2016 e sua projeção para 2026

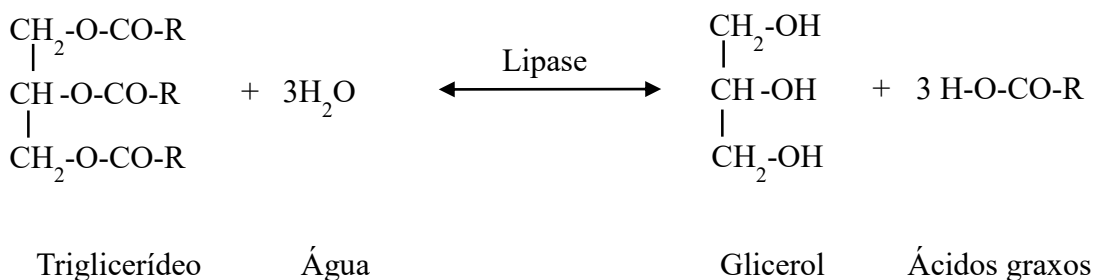


Ciclo Otto: Soma de Gasolina C e Etanol Hidratado, medido em gasolina C equivalente. **Diesel B:** Óleo Diesel + Biodiesel. **Todos:** Inclui Ciclo Otto, Diesel B, GLP, Óleo Combustível e Querosene. Fonte: (ANP, 2017)

O biodiesel, uma mistura de ésteres de monoalquila de ácidos graxos de cadeia longa derivado a partir de fontes renováveis de origem vegetal ou animal, é obtido principalmente através do processo de transesterificação, o que pode ser feito com diferentes catalisadores (ácidos, alcalinos ou enzimáticos) (LEUNG et al, 2009). A produção de biodiesel por transesterificação consiste na reação química de um óleo com um álcool, especialmente metanol ou etanol para se obter um éster de metilo ou etilo, respectivamente. No mercado encontra-se disponível predominantemente o éster metílico, mas a produção do éster etílico surge como uma grande oportunidade. O álcool etílico é menos tóxico que o álcool metílico, além de ser considerado um recurso renovável (POURZOLFAGHAR H. et al, 2016). O uso de álcoois maiores provoca um aumento na massa e no volume do biodiesel. Além disso, álcoois maiores têm solubilidades mais alta nos óleos, sendo mais favorável para reações enzimáticas (NIELSEN P.M. et al, 2008). De acordo com o boletim mensal de etanol da ANP (2017), a capacidade total das plantas produtoras autorizadas de etanol no país é de 216883 m³/dia de produção de etanol hidratado e 117036 m³/dia de produção de etanol anidro. Em relação aos óleos, o Brasil tem uma grande diversidade de matérias-primas disponíveis que podem ser usadas para a produção de biodiesel, tais como mamona, dendê, soja e girassol, entre outros; e a disponibilidade de terras para cultivo, especialmente em regiões menos desenvolvidas (ROVERE, E.L. et al, 2011).

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de atuar como catalisadores na reação direta de hidrólise de triglicérides ou nas reações reversíveis (esterificação, transesterificação) (Fig.2). Elas têm excelente atividade catalítica e estabilidade em meio não-aquoso, além de uma ampla especificidade, enantioselectividade e regioselectividade que permite que sejam utilizadas em várias aplicações, tais como refino e remodelação de óleos vegetais.

FIGURA 2. Equação química geral da reação catalisada com lipase: Hidrólise (reação direita) e esterificação (reação inversa)



O uso das lipases na produção do biodiesel, por transesterificação de óleos vegetais, tem adquirido muita importância porque permitem a conversão em condições mais suaves do que os outros catalisadores. Além disso, permitem utilizar matérias-primas de menor custo, tais como óleos de baixa qualidade ou óleos usados, incluindo óleos e gorduras com níveis elevados de ácidos graxos. Porém, seu uso pode estar limitado por seus longos tempos de reação e altos custos do biocatalisador (LEUNG et al, 2010; NIELSEN et al, 2008). O uso convencional destas enzimas na indústria é na sua forma imobilizada, facilitando sua recuperação e a reutilização. Além disso, a imobilização aumenta sua estabilidade e melhora a produção enzimática de biodiesel. Porém, tanto o suporte de imobilização, como o processo de imobilização, contribui significativamente para os custos do biocatalisador. Nos últimos anos, a incorporação de novas formulações líquidas de lipases aos processos industriais pode representar uma redução dos custos associados ao processo de imobilização (PEDERSEN et al, 2014).

Para otimizar a síntese de biodiesel usando lipase, o estudo de sua cinética proporcionaria uma melhor compreensão de seu processo de produção. Estas reações enzimáticas apresentam alguns problemas que devem ser considerados: ativação interfacial da enzima, inibição da lipase pelo álcool, inativação do catalisador, entre outros. A modelagem de processos é uma ferramenta valiosa que pode ajudar: a direcionar o trabalho experimental, a compreensão do processo e apoiar seu desenvolvimento. Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos vários modelos cinéticos para a transesterificação enzimática de óleos vegetais sendo o mecanismo mais aceito o modelo de Ping Pong Bi Bi. Porém, são poucos os modelos desenvolvidos para formulações líquidas de lipases, onde a ativação interfacial da lipase é parte essencial do mecanismo (PRICE et al, 2014; FIRDAUS et al, 2016). Além disso, cada lipase tem um mecanismo de reação distinto que dependerá da fonte da enzima, do solvente e da reação avaliada.

Esta pesquisa procura desenvolver um modelo mecanístico da cinética da transesterificação com etanol de óleo de soja refinado utilizando a enzima NS-40116 (formulação líquida da alteração genética de lipase *Thermomyces lanuginosus*) que possa descrever a produção enzimática de biodiesel para um sistema reacional heterogêneo. O modelo deve prever a concentração das principais espécies envolvidas na reação, assim como prever a influência de mudanças nas condições do processo: a composição do óleo, razão molar de álcool/óleo, quantidade de enzima inicial e área interfacial da emulsão (velocidade de agitação e quantidade de água).

I. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) são as enzimas de maior uso na indústria, solúveis em água, que podem ser obtidas a partir de microrganismos, plantas ou animais. Estas enzimas catalisam a hidrólise do éster do ácido carboxílico em meio aquoso ou a reação inversa em presença de solventes orgânicos (Fig. 2) (REETZ M., 2002).

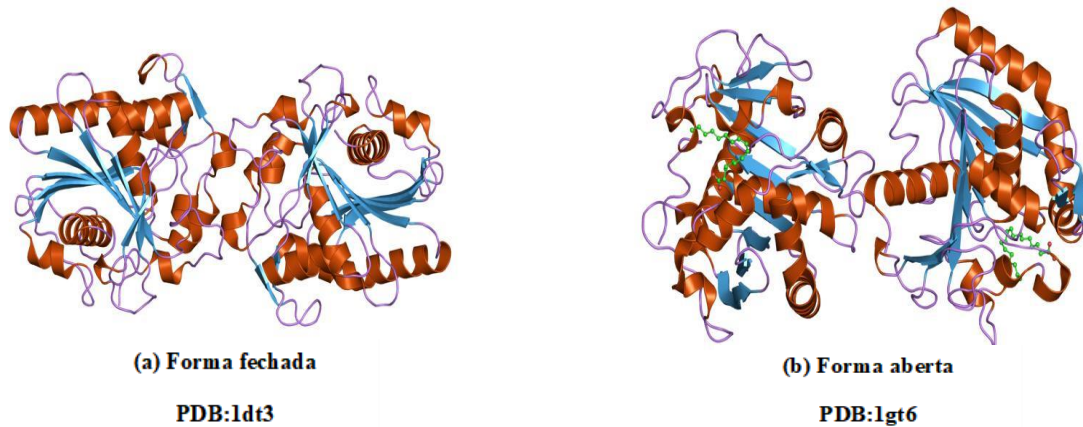
O potencial biotecnológico das lipases se deve principalmente a suas propriedades: estável nos solventes orgânicos, não requerem cofatores, alta especificidade do substrato e elevada seletividade. Isto permite seu uso em uma grande variedade de reações, podendo ser usadas na indústria farmacêutica, química, de detergente, de alimentos ou na produção de energia (JAEGER K. e REETZ M., 1998, REETZ, M., 2002; HASSAM F. et al, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE R., 2010).

1.1.1. Propriedades das lipases.

As lipases são carboxil-esterases que atuam sobre os acilgliceróis de cadeia longa. Estas enzimas possuem uma massa molecular que vai de 19 a 60 kDa (JAEGER K. e REETZ M, 1998).

Estas enzimas contêm uma unidade oligopeptídica helicoidal, que se comporta como uma tampa móvel, ou “lid” (Fig. 3), que restringe o acesso ao sítio ativo, atuando como protetora ou escudo. Durante a interação da lipase com a fase hidrofóbica, a enzima sofre uma modificação onde a cadeia se desloca de tal maneira que expõe o sítio ativo dando o acesso livre para o substrato (JAEGER K. e REETZ M, 1998; FABER K.,2005, REETZ M., 2002).

FIGURA 3. Estrutura 3D de lipase *Thermomyces lanuginosus* na sua forma (a) fechada (inativa) e (b) aberta (ativa).



(a) forma fechada PDB 1dt3 (b) forma aberta PDB 1gt6 (Complexada com ácido oleico)
Fonte: Banco de Dados de Proteínas (PDB – Protein Data Bank)

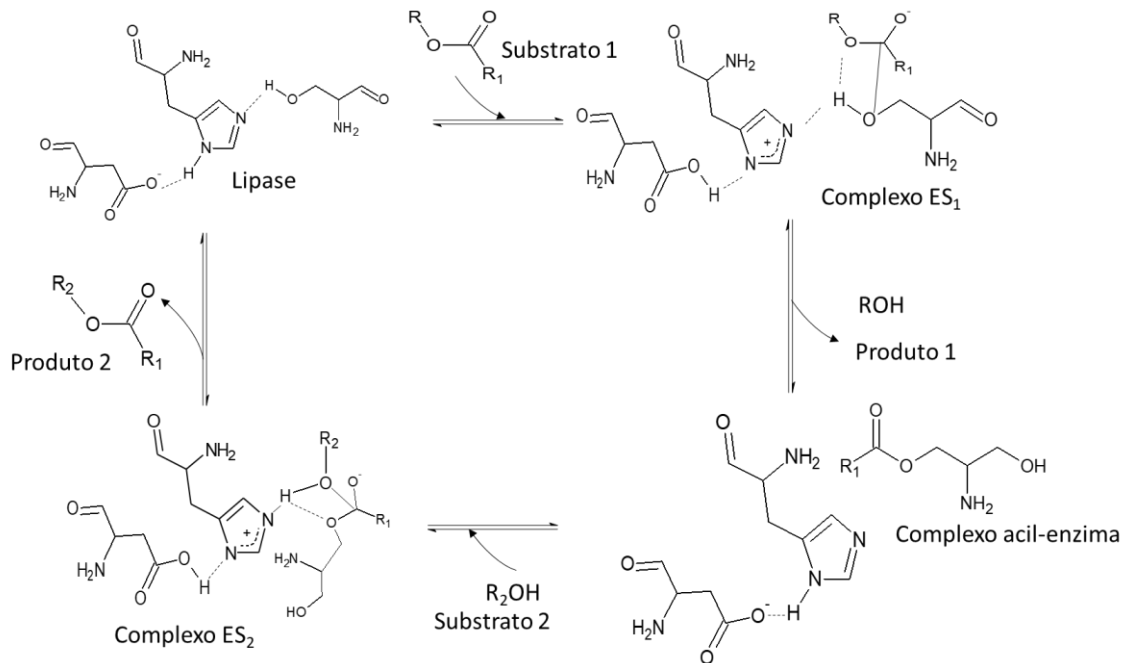
No caso da lipase da *Thermomyces lanuginosus*, é uma proteína de cadeia única de 269 aminoácidos, com massa molecular de 31.700 g/mol e forma aproximadamente esférica, de tamanho de 35Å×45Å×50Å. Sua estrutura consiste de um ponto central com oito trilhos, geralmente folhas betas paralelas, com cinco interligações alfa-helicoidal. A tampa é um circuito de superfície móvel também com ligações alfa-helicoidal. Esta lipase é muito estável, mantém sua atividade em 55-60 °C e com o máximo de atividade no pH em torno de 9 (FERNANDEZ-LAFUENTE R., 2010).

1.1.1.1. Mecanismo da catálise com lipase

O sítio ativo das lipases está formado por uma tríade catalítica, composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido de aspartato ou glutamato (no caso da *Thermomyces* é aspartato). A catálise enzimática começa quando a serina é ativada ao desprotonar-se (Fig. 4), com ajuda dos resíduos: aspartato (de carga negativa) e da histidina (elimina um próton do grupo hidroxilo do sítio ativo SER). Seguidamente, o intermediário acil-enzima é formado com o ataque nucleofílico ao grupo carbonilo do substrato pelo resíduo hidroxilo da serina. O intermediário

tetraédrico é estabilizado pela presença de um bolsão oxiânion, que contribui à estabilização da distribuição das cargas e redução da energia. Finalmente, ocorre a desacilação, controlada pela carga negativa das moléculas na interface, conduzindo à liberação do produto e à regeneração do catalizador (JAEGER K. E REETZ M, 1998; NIELSEN et al, 2008; REIS P et al, 2009).

FIGURA 4. Mecanismo da alcoólise catalisada por lipase.



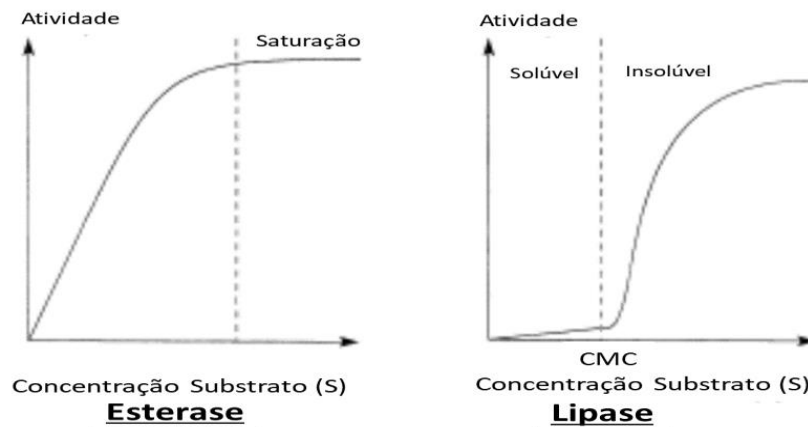
Fonte: adaptado de REIS P. et al. (2009)

1.1.1.2. Ativação interfacial da lipase

As lipases, de mesmo modo que as proteases e as esterases, formam uma ligação de éster carboxílico. No entanto, elas diferem na maneira de interagir com o substrato. Estas enzimas têm a propriedade de ser ativada na interface óleo-água. Este fenômeno é conhecido como ativação interfacial, sendo a principal diferença entre as esterases e as lipases. Como pode ser observado na Figura 5, a atividade da esterase depende da concentração do substrato, enquanto que as lipases não hidrolisam o substrato até alcançar a concentração crítica micelar (CMC), mas depois exibem uma atividade elevada. Isso ocorre pois, na ausência da interface óleo-água, a lipase está na forma inativa, ou seja, o sítio ativo não está exposto devido à parte da mesma molécula que age como uma tampa. Pode-se observar na Figura 5, que a atividade

interfacial é independente da concentração molar do substrato, não obstante, é controlada pela concentração do substrato na interface (FABER K., 2005, REIS P. et al, 2009).

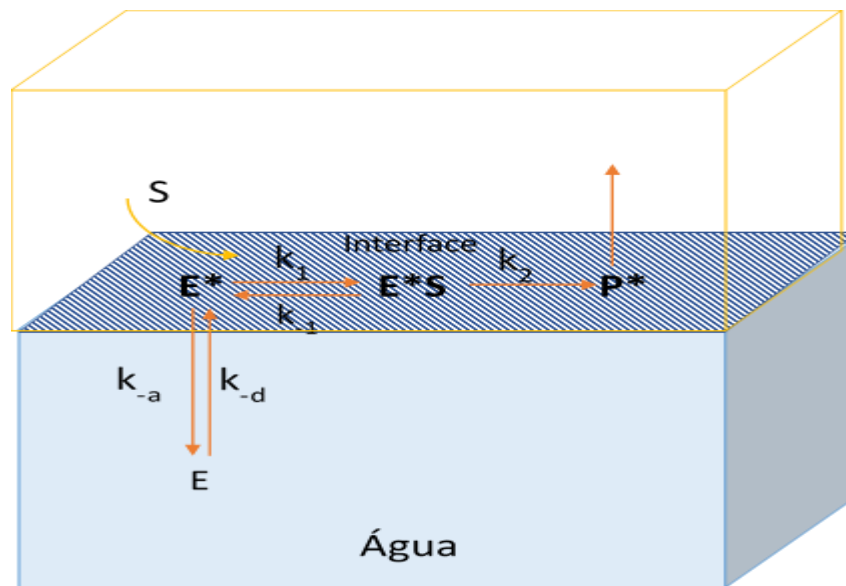
FIGURA 5. Atividade cinética em função da concentração do substrato para a esterase e a lipase.



Fonte: adaptado do FABER K. (2005)

Quando a lipase está em contato com a interface óleo-água, ocorre o reordenamento da sua estrutura molecular que permite a ativação da enzima, onde a lipase muda de sua forma inativa (E_a) à sua forma ativa (E^*), como pode ser observado na Figura 6. Como a reação ocorre na interface, a cinética não pode ser explicada pelo modelo de Michalis-Menten. O modelo de Verger-De Haas (1973) para a hidrólise de substrato de cadeia curta, uma adaptação simples do modelo cinético Michaelis-Menten-Henri, pode ser usado para explicar o fenômeno da ativação interfacial na catálise com lipase. O primeiro passo é a adsorção da enzima solúvel em água (E) na interface que a leva para um estado de energia mais favorável da enzima (E^*). A enzima presente na interface, liga-se com a molécula de substrato (S) formando o complexo enzima-substrato ($E^* S$). Depois de dois processos catalítico dimensional, o produto (P^*) é gerado e solubilizado na fase aquosa (JAEGER K. e REETZ M, 1998, ALOULOU a. et al., 2006, FABER K., 2005, REIS P. et al, 2009)

FIGURA 6. Modelo cinético de Vergel-Dehass para a hidrólise catalisada com uma lipase solúvel em um substrato não solúvel



Fonte: Adaptado de REIS P. et al (2009)

Em geral, os modelos cinéticos têm que levar em consideração os processos envolvidos na interface: reorganização molecular e segregação dos produtos insolúveis, que afetam a composição local e comportamento da interface. O tamanho das gotas e a estabilidade da emulsão são características importantes que caracterizam a área interfacial total. Para aproveitar ao máximo estas enzimas, deve-se determinar como sua atividade depende do microambiente do sistema: concentrações de enzimas e substratos, pH e temperatura. Tanto os reagentes como o catalisador estão distribuídos de forma não uniforme dentro do sistema, de forma que a velocidade da reação é controlada pela composição no microambiente interfacial (MILED N. et al, 2002, REIS P. et al, 2009).

Normalmente, os substratos lipolíticos formam um equilíbrio entre os estados: monomérico, micelar e emulsificado, ressaltando a necessidade de um modelo adequado para o estudo da cinética de lipase. Independente de qual seja o tipo de reação catalisada, a sequência das interações catalíticas envolvendo os substratos, produtos e a lipase é da forma Ping-Pong Bi-Bi.

1.2. Aplicações das lipases

As lipases têm gerado interesse particular na biocatálise, devido ao grande número de reações que podem catalisar (Tabela 1) (PORTER J., 2016). Na verdade, as lipases formam o maior grupo de biocatalisadores, representando 40% das aplicações reportadas (FABER K., 2005). Estas podem ser classificadas em dois grupos, quando catalisam a reação de hidrólise e quando catalisam a reação inversa (sínteses) (HASAN, S., 2005).

TABELA 1. Aplicações do uso das lipases como catalisador.

Como HIDROLASES	
Hidrólise	$R_1COOR_2 + H_2O \rightarrow R_1COOH + R_2OH$
Como SINTETASES (na sínteses)	
Esterificação	$R_1COOH + R_2OH \rightarrow R_1COO R_2 + H_2O$
Transesterificação	
• Acidólise	$R_1COOR_2 + R_3COOH \rightarrow R_1COO H + R_3COO R_2$
• Alcoólise	$R_1COOR_2 + R_3OH \rightarrow R_1COO R_3 + R_2OH$
• Aminólise	$R_1COOR_2 + R_3NH_2 \rightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$
Interesterificação	$R_1COOR_2 + R_3COOR_4 \rightarrow R_1COO R_4 + R_3COO R_2$

Fonte: Adaptado de PORTER, J. (2016)

Como hidrólise a aplicação mais importante da lipase é sua adição na formulação dos detergentes. Quase 30% das vendas das lipases são para esta indústria (JAEGER K.- REETZ M., 1998). Além disso, sua aplicação na indústria de alimentos tem contribuições nas melhorias sensoriais e valores nutricionais aportados pelos triglicerídeos, como no desenvolvimento de sabores artificiais para grande quantidade de produtos. Também são usadas na fabricação da polpa de papel e no tratamento de água residuais.

Como sintetases, as lipases têm sido usadas na química orgânica na catálise da grande variedade de reações quimo, régio e estereoseletivas (JAEGER K.- REETZ M., 1998).

1.2.1. Biodiesel

O biodiesel é uma mistura dos ésteres monoalquila de ácidos graxos de cadeia longa, obtidos a partir da reação entre os óleos ou gorduras, de origem vegetal ou animal, e um álcool, na presença ou não de um catalisador. O biodiesel é um combustível limpo, renovável, minimamente tóxico, considerado como um substituto do diesel convencional. Pode ser utilizado em alguns motores de ignição interna, sem modificação, e ao contrário do diesel convencional não produz enxofre, partículas, poluição atmosférica, emissões de hidrocarbonetos voláteis e sua contribuição do dióxido de carbono é mais baixa, para todo seu ciclo de vida. Também contribui favoravelmente na economia rural sendo um candidato como potencial energético sustentável. Para sua obtenção existem, atualmente disponíveis, quatro métodos: pirólise, diluição direta, micro emulsão e transesterificação (LEUNG D.Y.C. et al, 2010; AL-ZUHAIR S., 2007; ATABANI A.E. et al, 2012).

1.2.1.1. Óleos usados na produção do biodiesel

Para a produção do biodiesel, a seleção do óleo é importante. O biodiesel pode ser obtido a partir de diversas matérias-primas, como: óleos vegetais (comestível e não-comestível), gorduras animais e óleos usados ou residuais. Para sua seleção deve-se considerar o custo e a produção. Além disso, as condições climáticas, a localização geográfica e as políticas agrícolas do país (LEUNG et al, 2010; ATABANI et al, 2012). Na Tabela 2, se apresentam as principais matérias primas usadas na produção de biodiesel.

Nas últimas décadas, a demanda de óleos vegetais comestíveis aumentou. Em primeiro lugar, por seu consumo na indústria de alimentos e em segundo, porque eles são utilizados na produção de biodiesel. A produção de biodiesel a partir destes óleos é muito comum em países como Brasil, Estados Unidos e Argentina, sendo o óleo de soja o mais utilizado. (AVHAD M.R - MARCHETTI J.M, 2015)

TABELA 2. Principais óleos usados como matéria-prima na produção de biodiesel.

Óleos vegetais		Gorduras animais	Outros
Comestível	Não comestível		
Coco	Castor (mamona)	Sebo de carne	Algas
Milho	Semente de algodão	Gorduras de galinha	Óleo de cozinha
Sementes de cânhamo	Jatropha	Gorduras de peixe	Óleo de bagaço
Semente de mostarda	Jojoba	Banha de porco	Stocks de sabão
Oliva	Laranja	Salmão	
Dendê	Linhaça		
Amendoim	Mahua		
Semente de abóbora	Moringa		
Colza ou canola	Neem		
Farelo de arroz	Polonga		
De cártamo	Sementes de borracha		
Semente de gergelim	Sementes de tabaco		
Soja	Tung		
Girassol			

Fonte: Adaptado de AVHAD M.R - MARCHETI J.M. (2015)

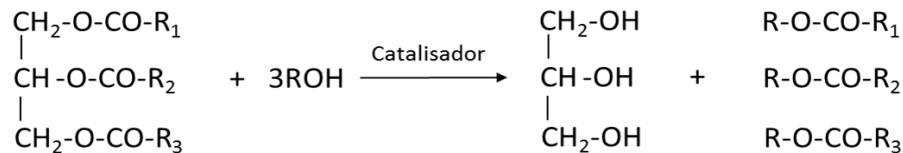
No Brasil, as alternativas para a produção de óleos vegetais são diversas. Isto, é uma vantagem para a estruturação da agroindústria de produção e uso do biodiesel. Por se tratar de um país tropical, com dimensões continentais, o desafio é o aproveitamento das potencialidades regionais. Isso é válido tanto para plantações tradicionais, como a soja, o amendoim, o girassol, a mamona e o dendê, quanto para alternativas novas, como o pinhão manso, o nabo forrageiro, o pequi, o buriti, a macaúba e uma grande variedade de oleaginosas que podem ser exploradas (ROVERE, E.L. et al., 2011).

Setenta por cento (70%) do biodiesel produzido no Brasil é a partir do óleo de soja. A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) estima a produção de óleo de soja em 108,8 milhões de toneladas no período 2017/18.

1.2.1.2. Processo de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática

O biodiesel é tipicamente produzido pela transesterificação de triglicerídeos (óleo) em presença de catalisador. No processo de transesterificação, os óleos vegetais comuns ou gorduras animais, compostos principalmente por triglicerídeos, reagem com o álcool, na presença de um catalisador. Na Figura 7, pode-se observar a equação geral da transesterificação, onde, R_1 , R_2 , R_3 são hidrocarbonetos de cadeia longa, chamadas cadeias de ácidos graxos. Normalmente, estas cadeias podem ser os ácidos graxos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico (LEUNG D. et al, 2009; CESARINI S. et al 2015)

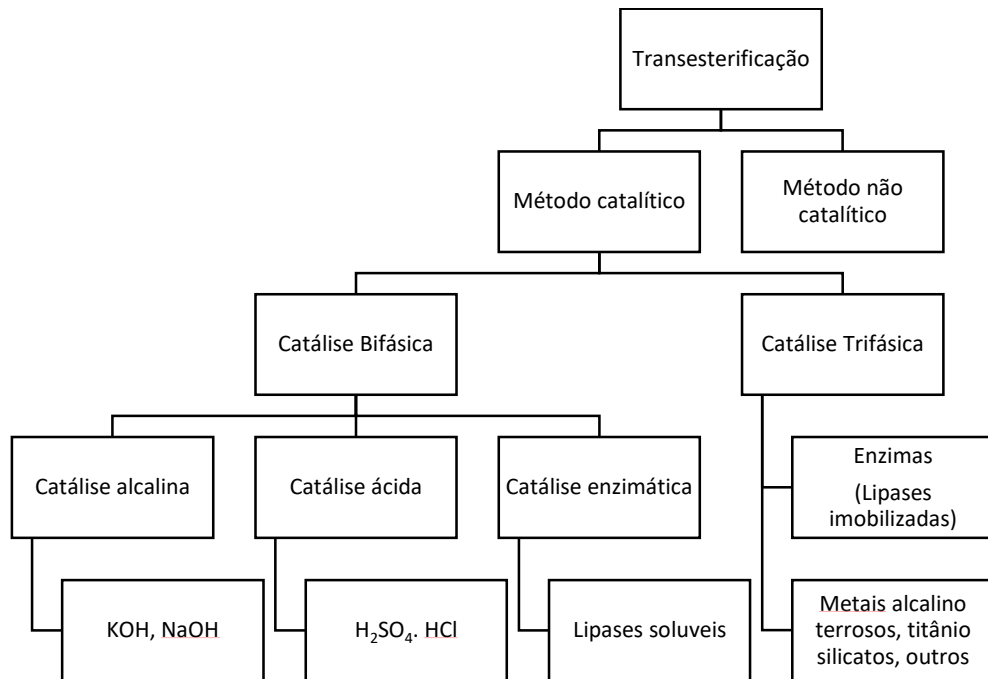
FIGURA 7. Equação química geral da reação de transesterificação de triglicerídeos



A transesterificação é considerada o melhor método para a obtenção do biodiesel devido ao seu baixo custo e simplicidade (ATABANI et al, 2012). Além disso, o subproduto glicerol pode ser queimado ou usado na indústria cosmética como matéria prima. A transesterificação pode ser dividida em dois grupos: catalítica e não catalítica. Os catalisadores usados podem ser: ácido, alcalino ou enzimático. Na Figura 8, mostra-se um diagrama da classificação do processo de transesterificação. A catálise pode ser homogênea (bifásica) ou heterogênea (trifásica). Tradicionalmente, a catálise homogênea incluía os catalisadores ácidos e alcalinos, sendo estes últimos os mais usados; e a catálise heterogênea se referia ao uso de enzimas como catalisadores, livres ou imobilizadas, e o uso de outros catalisadores metálicos de caráter ácido ou alcalino. Atualmente, devido ao interesse gerado pelo uso das enzimas, foram desenvolvidas formulações de lipases solúveis que também podem se considerar como processo de catálise homogênea. A incorporação destas formulações solúveis no processo de transesterificação, deve-se à redução de custo e à possibilidade de realizá-la sem a necessidade de degomagem do

óleo (CESARINI et al, 2015) ou de remover o conteúdo de água. Este último essencial para manter a estrutura tridimensional da enzima.

FIGURA 8. Classificação do processo de transesterificação para a síntese de biodiesel



Fonte: Adaptado de ATABANI et al (2012)

A transesterificação de biodiesel com catalisadores ácidos tem recebido menos atenção, porque é mais lenta que a catálise alcalina. No entanto, o processo catalisado por ácido é menos sensível aos ácidos graxos livres no óleo de alimentação, em comparação com o catalisador alcalino. Por outro lado, a transesterificação com catalisador químico (ácido ou alcalino) tem várias desvantagens, que incluem a necessidade de purificação do glicerol, produto de alta densidade energética, a difícil recuperação do catalisador utilizado e o tratamento da água poluída. Além disso, os ácidos graxos livres presentes no óleo interferem na reação, especialmente para o catalisador, gerando produtos secundários não desejados. Na catálise com lipase, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem precisar de outros processos complexos (LEUNG D. et al, 2009; ATABANI et al, 2012).

A transesterificação enzimática apresenta numerosas vantagens comparando com os outros processos (Tabela 3). A temperatura de reação é muito mais baixa. Além disso, as enzimas têm alta seletividade e especificidade pela transesterificação a partir do substrato e

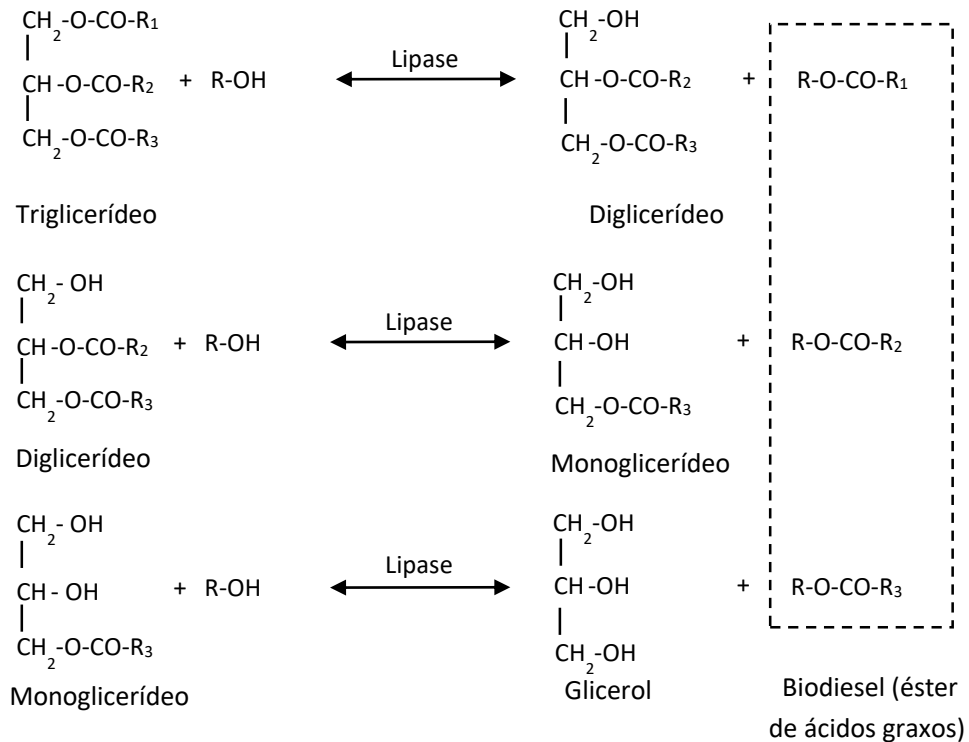
podem esterificar ambos os ligantes do glicerídeo usando baixas relações de álcool-óleo. Consequentemente, a variedade de substrato é mais ampla. A atuação da lipase não é afetada pela presença dos ácidos graxos livres e água, e sua separação do produto é mais fácil. Também permite a redução dos custos associados de recuperação do catalisador, já que é mais fácil recuperar o biocatalisador que os catalisadores químicos.

TABELA 3. Comparação entre os processos de transesterificação catalítica para a produção de biodiesel: alcalina, ácida e enzimática.

Parâmetro	Transesterificação catalítica para a produção do biodiesel		
	Catálise alcalina	Catálise ácida	Catálise enzimática
Temperatura de reação	60 – 70 °C	55 – 80 °C	30 – 40 °C
Presença de ácidos graxos livres no óleo	Saponificação	Ésteres	Formação de metil éster
Presença de água na matéria-prima	Interfere com a reação	Interfere com a reação	Não influem
Rendimento produção de metil éster	Normal	Normal	Alta
Recuperação do glicerol	Difícil	Difícil	Fácil
Purificação do metil éster	Lavagem contínua	Lavagem contínua	Nenhum
Catalisador	KOH ou NaOH	Ácido sulfúrico concentrado	Lipase
Custos de produção do catalisador	Econômico	Econômico	Relativamente caros

Fonte: FUKUDA et al. (2001); LEUNG D.Y.C. et al. (2010); NARWAL, S.K. – GUPTA, R. (2013)

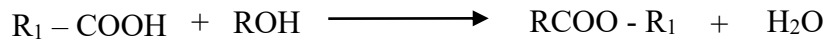
A reação de transesterificação ocorre por etapas, onde o triglicerídeo é convertido para diglicerídeo, monoglicerídeo, e, finalmente, para o glicerol, liberando um mol de éster do ácido graxo em cada etapa (Fig. 9). Ao final da reação, pode-se identificar as duas fases: a fase do biodiesel e a fase do glicerol. A densidade da fase do glicerol é muito maior que a da fase do biodiesel. Além disso, a presença de contaminante nesta fase tende a ser maior que na fase do biodiesel (NARWAL, S.K. – GUPTA, R., 2013)

FIGURA 9. Etapas do mecanismo da reação de transesterificação para a síntese do biodiesel.

Os álcoois mais usados são metanol e etanol, sendo o metanol o preferido por seu baixo custo (LEUNG D. et al, 2009; LEMBRÉ LA ROVERE E. et al, 2011), sendo o Brasil e a Índia uma exceção (NIELSEN P.M. et al, 2008). O metanol possui uma boa reatividade, porém o custo pelo uso dos álcoois mais pesados pode ser compensado pelo aumento em massa (e volume). No caso específico do etanol, o aumento de peso com respeito ao grupo metileno é de 5 % aproximadamente (NIELSEN P.M. et al, 2008, PRICE et al, 2016), além de que, é mais solúvel no óleo e mais compatível com a enzima (FUKUDA et al. (2001); PEDERSEN et al. (2014)). Desse modo, o rendimento da reação de transesterificação com o etanol (e esterificação) é maior que com o metanol (NARWAL, S.K. – GUPTA, R., 2013)

Na catálise enzimática, a presença de água é requerida para garantir a atividade da enzima. Um pequeno incremento no conteúdo de água pode levar a um incremento significativo na produção do biodiesel (NARWAL, S.K. – GUPTA, R., 2013). No entanto, sua presença pode retardar a transesterificação e pode aumentar a hidrólise dos triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, formando ácidos graxos livres (Fig. 2). Os ácidos graxos livres, presentes no óleo inicial ou formados pela presença de água, podem reagir com o álcool para formar éster (biodiesel) pela reação de esterificação (Fig. 10).

FIGURA 10. Equação química geral da esterificação dos ácidos graxos livres.



O rendimento na reação de transesterificação pode ser afetado por diversos fatores: quantidade de álcool, tempo de reação, temperatura de reação, quantidade de catalisador (LEUNG D.Y.C. et al., 2010) e modo de operação do processo (batelada ou batelada alimentada) (NIELSEN P. M. et al., 2016). Uma elevada razão molar álcool/óleo pode garantir uma maior conversão dos glicerídeos aos ésteres num tempo menor de reação (favorece a formação de produtos na reação reversível). Porém, uma quantidade acima da razão ótima pode incrementar os custos de recuperação do álcool. Além disso, pode inibir a enzima diminuindo sua atividade. No caso da temperatura, esta pode diminuir a viscosidade do óleo e, portanto, incrementar a velocidade de reação e reduzir o tempo reacional. Porém, uma temperatura elevada pode inativar a enzima.

1.3.Lipases solúveis

O principal fator limitante para a aplicação de lipase na produção do biodiesel é o custo da enzima. A maioria dos trabalhos reportados na literatura tem-se centrado no uso de lipases imobilizadas. O uso do suporte assim como sua imobilização incrementa seu custo final, porém, costuma aumentar sua atividade sintética e possibilita seu reuso. Recentemente, têm sido desenvolvidas formulações líquidas de lipase, como a Callera trans L (formulação líquida da alteração genética de lipase *Thermomyces lanuginosus*), removendo o custo adicional para o catalisador imobilizado, mantendo alta a atividade sintética e ainda assim possibilitando certo reuso da enzima (NORDBLAND et al, 2014; PEDERSEN et al, 2014; CESARINI S. et al 2015).

As lipases líquidas podem ser produzidas e vendidas a um preço mais baixo e reutilizadas após a recuperação da fase de glicerina. Autores reportam um melhor custo-benefício das lipases líquidas em comparação com as lipases imobilizadas (NIELSEN et al, 2016; ANDRADE et al, 2017; HE et al., 2017). Adicionalmente, algumas das formulações desenvolvidas (Calera trans L) permitem em uma só etapa a degomagem do óleo ao ser usada

com a fosfolipase na produção do biodiesel (CESARINI S. et al 2015; PRICE et al 2015). O uso de água necessária para a degradação da goma não inibe a transesterificação no caso destas lipases, ao contrário, a água é essencial para manter a estrutura tridimensional (ativa) das lipases (NORDBLAND et al, 2014; PEDERSEN et al, 2014; CESARINI S. et al 2015, NIELSEN et al, 2016).

Nos trabalhos reportados do uso de lipase solúvel Callera trans L (mais recentemente conhecida como Eversa Transform® ou NS-40116), os resultados confirmaram que a lipase é altamente ativa para reagir com os triglicerídeos e muito mais lenta para reagir com os diglicerídeos e monoglicerídeos, já que a reação é limitada pela quantidade de álcool (NORDBLAND et al, 2014). Contudo, o rendimento total da reação é muito alto, podendo alcançar até 98% na transesterificação com metanol (NORDBLAND et al, 2014; CESARINI S. et al 2015) e com etanol (PEDERSEN et al, 2014).

Cesarini et al. (2013) testaram a lipase Callera Trans L na reação de transesterificação de óleo de soja não refinado com metanol, obtendo biodiesel com uma concentração de ésteres de 96.3% (24h reação, 35°C, 200 RPM, 3-15% água). A alta taxa de transesterificação e a atividade de esterificação mostrada pela enzima, na presença de água, sugerem que esta lipase é um biocatalisador adequado para uso na indústria de biodiesel pela produção enzimática. Nordblbland et al. (2014) identificaram os parâmetros críticos para a produção do biodiesel catalisada com a mesma enzima líquida a partir do óleo de canola e metanol, recomendando como temperatura de reação 35 °C. Esta lipase demonstrou ser altamente ativa para consumir o triglicerídeo (como substrato) e mais lenta para o diglicerídeo e o monoglicerídeo. A reação é limitada pela quantidade de álcool nas primeiras horas de reação, enquanto o triglicerídeo é consumido. Depois, durante a conversão do diglicerídeo e do monoglicerídeo (o maior tempo), a reação é controlada pela quantidade de enzimas. Pedersen et al (2014) alcançou uma concentração de ésteres de 97.8% com a mesma lipase a partir da transesterificação do óleo de canola com etanol (1.5 eq. álcool¹, 20%w/w água, 1%w/w lipase, 1400 RPM, 24h reação, 35°C).

Na síntese de biodiesel usando as lipases solúveis, a escolha na relação entre as quantidades de enzima, água e álcool é muito importante. Sua velocidade de reação é principalmente dependente do conteúdo de enzimas, assim que, depois de sua carga o sistema

¹ 1 eq. é a quantidade estequiométrica requerida para que os ácidos graxos presente no óleo reajam para formar o biodiesel.

está limitado pela área interfacial disponível. Esta área pode ser incrementada aumentando a velocidade de agitação da mistura (maior requerimento de energia) ou adicionando mais água, o que implica uma redução na capacidade disponível do reator. Porém, o uso de maior quantidade de água pode modificar o comportamento do álcool sobre a lipase, diminuindo os efeitos de inativação e/ou inibição (NORDBLAND et al, 2014; PEDERSEN et al, 2014; NIELSEN et al, 2016). A quantidade de álcool deve ser controlada na reação, em virtude de que a velocidade de formação dos ésteres pode ser limitada por um fornecimento insuficiente do álcool, mas um excesso pode inibir a enzima, além de acelerar sua inativação (AL ZUHAIR et al, 2007; NORDBLAND et al, 2014).

A lipase solúvel não pode ser dissolvida na fase apolar, portanto ela sempre está presente na fase polar e sua atividade está restringida na interface (NORDBLAND et al, 2014). Isso facilita sua separação com a fase do glicerol depois da reação, abrindo a possibilidade de seu reuso ao reciclar a fase polar (NORDBLAND et al, 2014, REMONATTO et al. 2016; ANDRADE et al., 2017).

TABELA 4. Estudos realizados na síntese de biodiesel usando a formulação líquida da alteração genética da *Thermomyces lanuginosus*

Objetivo	Objetivos	Conclusões principais	Referência
Avaliar o desenvolvimento da Lipase	Callera Trans L	96% FAME com óleo cru de soja e metanol (1% lipase, 3-5% água, 200 RPM, 35°C, 24 h) 98% FAEE (1.5 eq. álcool, 20% água) Lubridificador (99% conversão)	Cesarini et al. (2013) Nordblad et al. (2014) Remonatatto et al. (2016) Pedersen et al. (2014) Trivedi et al. (2015)
Scale-up de proposta para síntese de biodiesel com formulações líquidas de lipases	Eversa transform	97% FAME (0.2% Lipase, 3% w/w água, 1.5 eq metanol, FFA < 0.25%)	Nielsen et al. (2016) Price, J. et al. (2016) Remonatatto et al. (2017)
Avaliar factibilidade de reuso da formulações líquidas de lipases	Eversa transform e resinas HT	Perda de atividade para o terceiro ciclo de reuso (Eversa 33.35%)	Andrade et al (2017)
Imobilização da lipase	Lipase TL, CAL A/B, Eversa transform e NS-40116	Altos rendimentos tanto na sua forma livre como imobilizada. Possibilidade de reuso de sua forma livre.	Remonatatto et al. (2017) He et al. (2017)

1.4. Mecanismo cinético das lipases na síntese de biodiesel por transesterificação.

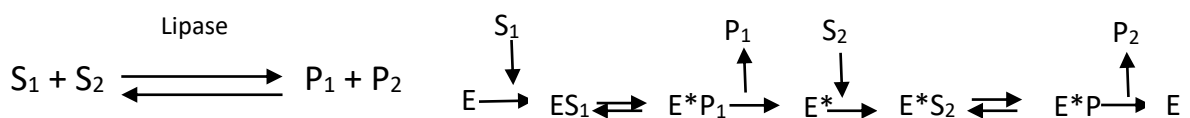
A compreensão do mecanismo das reações permite identificar as condições ideais para o processo de transesterificação enzimática para a produção do biodiesel. A transesterificação enzimática dos triglicerídeos (representada pela equação da Fig. 7) é uma reação reversível cujo mecanismo de reação é formado por uma série de reações sucessivas para a obtenção dos ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e o glicerol (Fig. 9). Este mecanismo de reação tem sido descrito pela maioria dos autores com o modelo cinético Ping Pong com uma inibição competitiva do álcool (AL ZUHAIR et al, 2005; CHEIRSILP et al. 2008; PRICE et al., 2014).

Como foi explicado na seção 1.1.1.2, a reação com lipase ocorre na interface óleo-água, pelo que sua cinética não pode ser descrita com o modelo mais simples de Michaelis-Menten. Este modelo só é válido quando a catálise ocorre em sistema de fase homogênea (JAEGER K. – REETZ M., 1998). O mecanismo mais aceito para as reações catalisadas pelas lipases é o Ping-Pong Bi-Bi. Este estabelece, da mesma forma que o Michaelis-Menten, a formação do complexo acil-enzima pelo ataque nucleofílico da ligação éster do substrato, só que este vai se formando em cada passo. Na maioria dos modelos publicados, a formação deste complexo é desprezada (HERMANSYAH et al, 2007).

FIGURA 11. Representação gráfica do mecanismo de reação: (a) Michaelis – Menten (b) Ping-Pong Bi Bi



(a) Mecanismo de reação Michaelis – Menten



(b) Mecanismo de reação Ping – Pong Bi Bi

Si: substrato, **Pi:** produto e **E:** enzima

Como pode-se observar na Figura 11b, no mecanismo de reação Ping-Pong Bi Bi, o primeiro substrato forma o primeiro complexo (ping) com a enzima gerando o primeiro produto (Bi). A enzima forma logo o complexo com o segundo substrato (pong) para gerar o segundo produto (Bi). Na presença das lipases, estas reações ocorrem todas na interface, desta forma devesse considerar primeiramente o modelo de Vergel-Dehass (Fig. 6) para a ativação interfacial da enzima.

Como a reação com lipase ocorre na interface óleo-água, deve-se considerar a diferença das concentrações dos substratos, produtos e enzima no interior das fases e na interface (HERMANSYAH et al, 2007, AL-ZUHAIL et al, 2007; PRICE et al, 2014). Geralmente, as concentrações da enzima na interface assumem-se proporcional a sua concentração no interior da fase aquosa, mas para altas concentrações de lipase isto não é aplicável (AL-ZUHAIL et al, 2003; AL-ZUHAIL et al, 2004; HERMANSYAH et al, 2007). Para altas concentrações da enzima, Al Zuhair et al (2004) confirmaram, com seu modelo para a hidrólise enzimática, uma relação não linear entre a enzima dissolvida (E) e a enzima ativada na interface (E^*). Portanto, ele incluiu o modelo de adsorção de Langmuir. Além disso, ressaltou a importância de não exceder a concentração crítica da enzima que poderia saturar a interface. No caso de cada substrato e cada produto a relação pode ser considerada linear porque seu tamanho molecular na interface é muito menor que o de lipase.

Existem na literatura duas abordagens para a síntese enzimática de biodiesel. Na primeira, a síntese ocorre em etapas consecutivas: hidrólise do triglicerídeo e esterificação. Inicialmente, os triglicerídeos são hidrolisados para formar os ácidos graxos para logo ser esterificados e formar o éster (AL-ZUHAIL et al, 2005, LV et al, 2009). Na segunda, a síntese ocorre diretamente pela alcoólise do triglicerídeos (transesterificação) (AL-ZUHAIL et al, 2007; CHEIRSILP et al, 2008). Neste caso, para garantir a eficiência da catálise enzimática deve-se usar um excesso do álcool. Porém, os modelos cinéticos reportados para a síntese enzimática de biodiesel consideram a inibição competitiva pelo álcool (JANSSEN H.G. et al, 2006; ZHOU D. et al, 2001; AL ZUHAIR et al, 2005, FEDOSOV et al, 2012; PRICE et al, 2014).

Os primeiros modelos foram desenvolvidos a partir dos modelos propostos para a esterificação de ácidos graxos. Como o mecanismo proposto por Al Zuhair et al (2007), onde a velocidade inicial pode ser descrita pela equação 1 considerando inibição pelo álcool e o substrato (pela liberação dos ácidos graxos) e em ausência de qualquer inibição do produto. K_S e K_A são as constantes de dissociação para o substrato (S) e o álcool (A), respectivamente, e K_{IS} e K_{IA} são as constantes de inibição para o substrato e o álcool, respectivamente.

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{IA}}{[A]} \left(1 + \frac{[S]}{K_S}\right) + \frac{K_{IS}}{[S]} \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)} \quad (1)$$

Na literatura, existem poucos modelos onde estão envolvidas todas as reações e suas reversibilidades simultaneamente (CHEIRSILP et al, 2008; FEDOSOV et al, 2013; PRICE et al, 2014). A análise da velocidade de reação a partir das equações de velocidade de reação implica na determinação de um grande número de parâmetros cinéticos devido à grande variedade de reagentes envolvidos e à inibição da enzima. Fedosov et al. (2013) propuseram um modelo global de blocos separados, onde as reações parciais incluem um número limitado de compostos, as equações de velocidade são menos complexas e, portanto, a análise mais confiável. Além disso, eles usam uma forma truncada do mecanismo de Ping-Pong de lipase reduzindo a um sistema menos complexo.

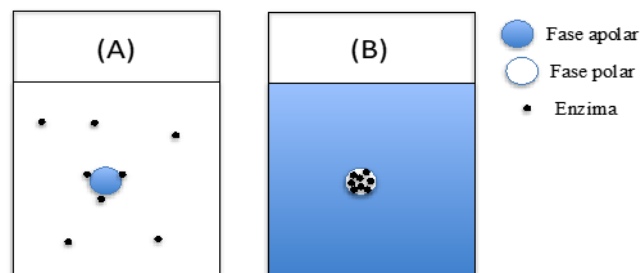
Os modelos propostos para a transesterificação enzimática são muitos, porém, a grande maioria tem sido desenvolvida para lipases imobilizadas, por conseguinte, não descrevem o comportamento da lipase na interface. Lv et al (2009) estudaram a reações de transesterificação com uma lipase solúvel, NS81006, e determinaram que a produção de biodiesel pode ser catalisada efetivamente no sistema bifásico óleo-água com uma taxa de reação muito mais rápida que a lipase imobilizada. Eles propuseram que a transesterificação procede em quatro etapas: três etapas de hidrólise para gerar os ácidos graxos livres, e uma quarta etapa para transformar os ácidos graxos em ésteres. No entanto, o modelo não permite a avaliação das mudanças na concentração da enzima e da área da interface óleo-água

Price et al (2014) desenvolveram um modelo mecanístico para a produção de lipase com formulação líquida de lipase. Eles formularam o modelo assumindo o mecanismo Ping-Pong

Bi-Bi, inibição competitiva pelo álcool, mesmas concentrações do substrato, produto e enzima na fase como na interface, reversibilidade de reações e mistura homogênea (densidade constante). O modelo só é aplicável para baixas concentrações do álcool e não considerou a área de contato na interface da mistura óleo-água. Firdaus et al (2016) retomam a abordagem de modelagem por bloco de reação (FEDOSOV et al, 2012) para desenvolver um modelo para a reação de transesterificação enzimática com a lipase líquida *Thermomyces lanuginosus*, onde, além das hipóteses comuns são estudados outros efeitos como alteração da superfície e a variação nas solubilidades dos produtos. Uma grande limitação desses modelos é que a concentração de cada componente para o cálculo da taxa de reação é calculada em função do volume total da mistura reacional (somatória das duas fases). Porém, desconsiderando efeitos difusivos e sendo que a enzima ativa está na interface, ou seja, em contato com ambas as fases igualmente, a taxa de reação (em mol/tempo) catalisada por essa enzima (ativa) deve depender da concentração do substrato apolar (óleo) na fase apolar e da concentração do substrato polar (álcool) na fase polar, não sendo função direta do volume de cada fase em separado. A relação entre os volumes polar e apolar afeta sim a velocidade global de reação, porém está relacionada à extensão da área interfacial o que afeta a quantidade ativa de enzima na interface.

Outra inconsistência proveniente dessa mesma hipótese é que o modelo considera que uma massa de enzima num reator com baixo volume de fase apolar e alto volume de fase polar tem a mesma atividade (quantidade de enzima ativa no reator) que essa mesma massa de enzima num reator com alto volume de fase apolar e baixo volume de fase polar. Vide Figura 12. Essa questão na formulação dos modelos cinéticos é o aspecto central tratado no modelo proposto nesta dissertação.

FIGURA 12. Esquema ilustrativo de dois reatores com mesmo volume total e mesma massa de lipase solúvel.



Relação entre volumes polar/apolar: (A) 12/0,2; (B) 0,2/12.

Para os modelos presentes na literatura, os dois sistemas ilustrados na Figura 13 teriam a mesma quantidade de enzima na interface.

Na Tabela 5, pode-se ver os modelos propostos na literatura para a síntese de biodiesel com lipases líquidas. Todos os modelos propostos foram feitos para a transesterificação de óleos vegetais com metanol. Porém, cada lipase tem um mecanismo de reação distinto que dependerá da fonte da enzima, do solvente usado e da reação avaliada.

TABELA 5. Modelos cinéticos publicados para a síntese de biodiesel usando lipase líquida

Lipase	Objetivo	Conclusões principais	Referência
NS-81006 (<i>Aspergillus niger</i>)	Estudar o mecanismo de reação da metanólise de triglicérideo de óleo de soja para a produção do biodiesel	O modelo descreve a cinética da metanólise em passos: hidrólise de triglicerídeos e esterificação dos ácidos graxos	Ly, D. et al (2009)
Callera trans L	Desenvolver um modelo mecanístico para descrever a transesterificação enzimática do óleo de canola com metanol através do mecanismo Ping Pong Bi-Bi.	<ul style="list-style-type: none"> - O modelo descreve os efeitos sob o processo ao mudar as condições: composições de óleo, álcool, água e enzima. - Filtro Kalman Estático Contínuo-Discreto (estimador de estado) - Modelar o processo industrial (CSTR) a partir dos dados da planta piloto de transesterificação de óleo e com o reator de batelada (NS-40116) 	Price et al. (2014) Price, J. et al (2015) Price, J. et al (2016)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> solúvel	Desenvolver um modelo cinético para a transesterificação com metanol de triglicerídeos que descreve os efeitos da redistribuição dos reagentes entre as fases.	O modelo pode estimar o comportamento dos componentes de reação à exceção dos ácidos graxos livres. Considera a alteração de superfície e a solubilidade de um reativo por outro.	Firdaus, M. et al (2016)

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a cinética da síntese de biodiesel por meio da transesterificação de óleo de soja com etanol utilizando a lipase solúvel NS40116, formulação líquida da alteração genética da lipase *Thermomyces lanuginosus*, como catalisador, para desenvolver o modelo que possa descrever a produção enzimática de biodiesel.

2.2. Objetivos específicos

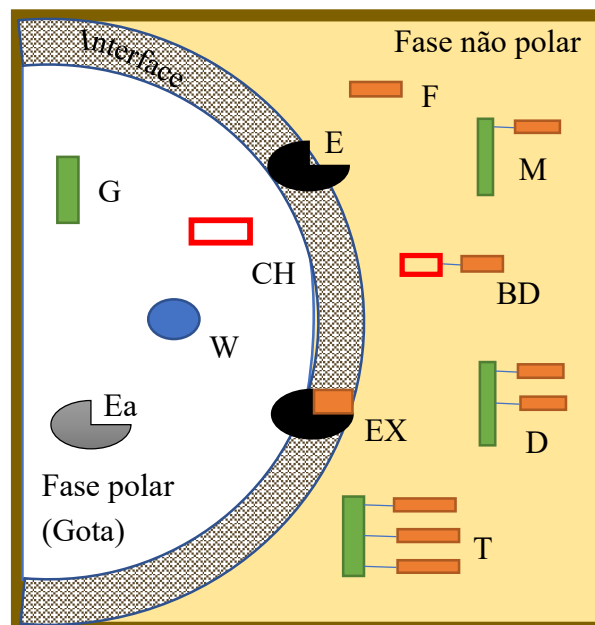
1. Caracterizar a formulação líquida de lipase NS-40116 (formulação líquida da alteração da lipase *Thermomyces lanuginosus*)
2. Avaliar o diâmetro de bolha médio do sistema óleo – álcool – água para as diferentes condições estabelecidas.
3. Desenvolver um modelo matemático que descreva o comportamento cinético de lipase solúvel NS40116, formulação líquida da alteração da lipase *Thermomyces lanuginosus*, na produção de biodiesel por transesterificação enzimática que não recaia nas mesmas inconsistências apresentadas nos modelos propostos na literatura.
4. Avaliar a influência das variáveis: velocidade de agitação, concentração de lipase, concentração de substrato na reação de transesterificação enzimática de óleo de soja.

III. MODELO CINÉTICO PROPOSTO

Com a intenção de representar a cinética da síntese de biodiesel por transesterificação enzimática com lipases solúveis, foi proposto um modelo mecanístico para a etanólise de óleo de soja com etanol. O modelo poderia ser usado para simular o desempenho do processo para uma ampla gama de condições e otimizar a síntese de biodiesel a partir do óleo de soja e etanol.

A mistura reacional para a transesterificação enzimática é complexa devido à quantidade de componentes envolvidos: os triglicerídeos (T) que reajam para formar os diglicerídeos (D), seguindo aos monoglicerídeos (M) e finalmente o glicerol (G), enquanto que, os ésteres etílicos dos ácidos graxos (BD) e os ácido graxos livres (F) estão se formando simultaneamente. Para o modelo, na Figura 13, assume-se partição completa entre os componentes em cada fase durante a reação de transesterificação com lipase solúvel. A emulsão é estabilizada pela agitação mecânica durante a reação. A fase contínua e a fase dispersa são a fase não polar e a fase polar, respectivamente.

FIGURA 13. Distribuição assumida dos componentes para o modelo cinético da síntese do biodiesel a partir da reação de transesterificação utilizando enzima solúvel.



Fase polar: (CH) álcool, (G) glicerol, (W) água e (E_a) enzima livre. **Fase não polar:** (T) triglicerídeos, (D) diglicerídeos, (M) monoglicerídeos, ésteres etílicos dos ácidos graxos (BD) e ácidos graxos livres (F). **Interface:** Enzima ativada (E) e complexo ácil-enzima (EX).

Em parte, o modelo se baseia em hipóteses de acordo a mecanismos cinéticos propostos anteriores:

1. A reação prossegue através do modelo cinético de Ping-Pong Bi-Bi (AL ZUHAIR S. et al, 2007; FEDOSOV S.N. et al., 2012; PRICE J. M. et al, 2014, FIRDAUS M.Y. et al., 2016).
2. A enzima deve primeiramente ser adsorvida na interface (PRICE J. M. et al, 2014).
3. Todos os passos da reação são reversíveis (CHEIRSILP et al, 2008; FEDOSOV S.N. et al., 2012; PRICE J. M. et al, 2014, FIRDAUS M.Y. et al., 2016).
4. A inibição do álcool é competitiva (AL ZUHAIR et al, 2007, FEDOSOV S.N. et al., 2012; PRICE J. M. et al, 2014).
5. A transferência de massa até a interface é instantânea, portanto as concentrações do substrato e dos produtos na interface como nas fases é a mesma (transferência de massa instantânea) (PRICE J. M. et al, 2014, FIRDAUS M.Y. et al., 2016).
6. A migração do grupo acil é desprezada (CHEIRSILP et al, 2008; FEDOSOV S.N. et al., 2012; PRICE J. M. et al, 2014).

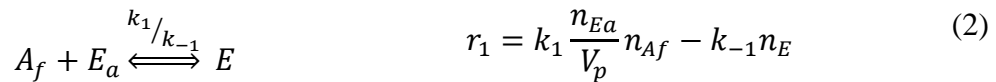
Porém, em contraste com as hipóteses adotadas anteriormente, assume-se neste trabalho que:

7. A mistura do reator é heterogênea, e os componentes solúveis em uma fase são totalmente insolúveis na outra fase. Apesar das mudanças na mistura reacional poderem modificar a solubilidade dos reagentes, afetando as interações com a lipase, essas mudanças serão desprezadas (FIRDAUS M.Y. et al., 2016).
8. O volume total e o volume de cada fase variam com o tempo de reação. A concentração de cada componente está definida como a razão entre a quantidade molar e o volume da fase do componente. De forma que, o modelo considera as mudanças no volume de cada fase ao longo do tempo de reação, diferindo do modelo de Price et al. (2014) onde as concentrações dependem do volume total do sistema e não considera mudanças da densidade ao longo do tempo de reação.

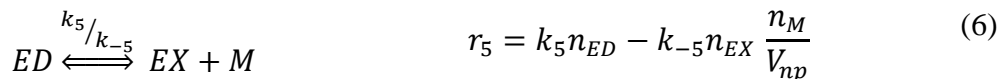
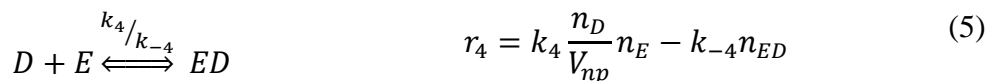
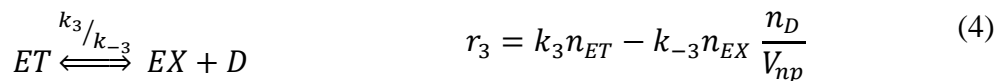
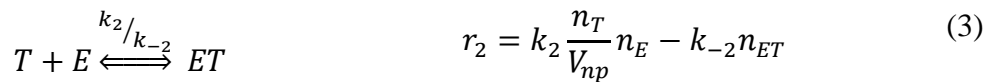
3.1. Equações de velocidade de reação

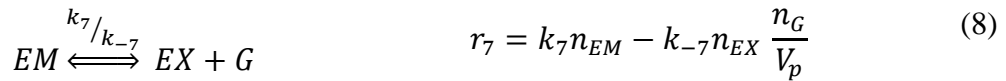
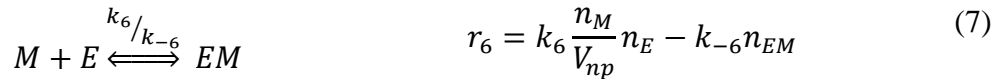
As reações químicas envolvidas na transesterificação enzimática são exibidas, junto à sua equação de velocidade. Em todas as equações da velocidade de reação, no modelo, é considerado que V_p = Volume da fase aquosa (polar), V_{np} = Volume de óleo (fase apolar), n_i = moles de cada espécie, r_i = taxa do i-ésimo componente (mol/tempo), r_j = taxa da j-ésima reação (mol/tempo), k_j = constante de velocidade da j-ésima reação direita e k_{-j} = Constante de velocidade j-ésima reação inversa.

A primeira equação corresponde à ativação interfacial da enzima, ou seja, nesta primeira etapa ocorre a adsorção na interface da enzima livre dissolvida inicialmente na fase polar. Observe abaixo que n_{Af} representa o número de moles de enzimas que teoricamente poderiam ser colocadas na superfície livre da interface (Vide seção 3.2). Na Equação 2, estabelece-se a relação entre a quantidade de enzima livre (n_{Ea}) dissolvida na fase polar (V_W), a área livre na interface (n_{Af}) e o número de enzimas ativas na interface (n_E)

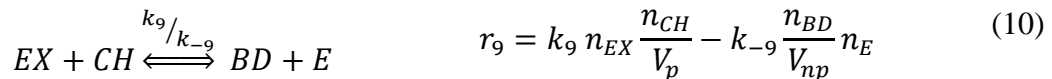
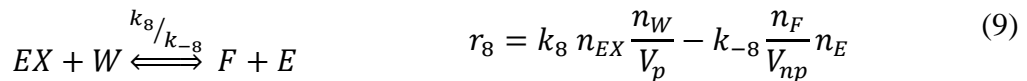


As equações que seguem, pode-se observar que correspondem às reações entre os substratos (T, D e M) e a enzima ativada para formar o complexo enzima-substrato (Eq. 3, 5 e 7). Para então formar o complexo acil-enzima (EX) e gerar o primeiro produto (D, M e G) (Eq. 4, 6 e 8). Estas reações seguem o mecanismo cinético Ping Pong Bi Bi e são os passos intermediários da reação de transesterificação.

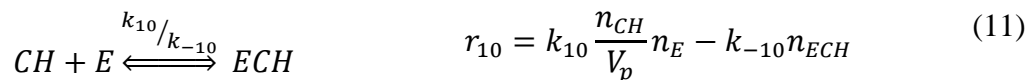




Finalmente, o complexo acil-enzima reage com o álcool ou água para formar os ésteres etílicos dos ácidos graxos (biodiesel) (Eq. 9) ou ácidos graxos livres (Eq.10), regenerando a enzima ativada na interface (Mecanismo Ping Pong Bi-Bi). O uso de lipase solúvel requer a adição de água para sua ativação, levando à geração de ácidos graxos livres em uma reação de hidrólise indesejada (Eq. 9).



A produção dos ésteres na transesterificação está relacionada com a concentração do álcool no sistema, sendo limitada pela adição em excesso deste, mas o álcool pode prejudicar a formação do complexo enzima-substrato (AL ZUHAIR et al, 2005) ou pode também acelerar a inativação da enzima (AL ZUHAIR et al, 2007). Por isso, a inibição da enzima pelo álcool é considerada no modelo (Eq. 11).



3.2.Determinação da área interfacial

A mistura reacional inicial da reação da transesterificação está formada pela emulsão água-álcool-óleo. Onde, a fase dispersa é uma mistura de água e álcool (fase polar) e a fase continua é o óleo (fase não polar). A área interfacial total do sistema pode ser definida como a

área total de contato entre a duas fases, ou seja, a somatória das áreas de todas as gotas que formam a fase dispersa.

$$A_T = N \times \pi \times d_s^2 \quad (12)$$

Onde, A_T é a área interfacial total, N é o número de gotas e d_s é o diâmetro médio da gota.

Para o modelo proposto, a área interfacial total está definida em função da fase que tiver menor volume. No caso específico da transesterificação, a fase que tem menor volume é a fase polar (fase dispersa). Na Equação 13, d_s é o diâmetro de Sauter da bolha da fase que tiver menor volume.

$$A_T = \frac{6}{d_s} \min(V_{np}, V_p) \quad (13)$$

A área livre na interface para ser ocupada pela enzima livre está definida como a diferença entre a área total e área ocupada pela enzima em todas suas formas.

$$A_f = A_T - A_e \sum n_{Ei} \quad (14)$$

Onde, A_f é a área livre na interface, A_e é a área ocupada pela enzima na interface, tendo o valor de $2.98 \times 10^7 \text{ m}^2/\text{mol}$, o qual corresponde à área interfacial requerida para adsorver 1 mol de enzima na interface (PRICE et al., 2014). O n_{Ei} é o número de enzimas na interface em todas as suas formas. Assume-se que a enzima em todas as suas formas ocupa a mesma área na interface.

Então, a quantidade de enzima que pode ser adsorvida na interface para sua ativação pode-se definir como a razão entre a área livre na interface e a área ocupada pela enzima (PRICE et al., 2014).

$$n_{Af} = \frac{A_f}{A_e} = \frac{A_T}{A_e} - \sum n_{Ei} \quad (15)$$

Onde, n_{Af} é a quantidade em mol de enzima que pode teoricamente ser alocada na área interfacial livre.

3.3.Determinação do número de moles da enzima

Para relacionar a quantidade total de enzimas (mensurável) com suas diferentes formas em meio reacional (não mensurável), é necessário realizar o balanço de massa para enzimas totais do sistema.

$$n_{Eo} = n_{Ea} + \sum n_{Ei} \quad (16)$$

Onde n_{Eo} é o número de moles de enzima adicionado à reação (desconsiderando qualquer inativação enzimática) e n_{Ea} é o número de moles da enzima livre dissolvida na fase polar. $\sum n_{Ei}$ é a somatória do número de moles da enzima ativada adsorvida na interface, complexada ou não.

$$\sum n_{Ei} = n_E + n_{ET} + n_{ED} + n_{EM} + n_{EX} + n_{ECH} \quad (17)$$

Para determinar o número de moles de cada um dos complexos formados com a enzima durante a reação de transesterificação, foi assumido o modelo pseudo-estacionário. Ou seja, a velocidade de formação do complexo é a mesma que a velocidade de consumo do complexo. Nas Tabelas 6 e 7 estão os equacionamentos para cada um dos complexos enzima-substrato e ácil-complexo respectivamente.

TABELA 6. Equacionamento para a determinação do número de moles para cada complexo enzima substrato formado durante a sínteses de biodiesel por transesterificação

I. <u>Complexo enzima-triglicerídeos</u>	
$r_{ET} = r_2 - r_3 = 0$	$k_2 \frac{n_T}{V_O} n_E - k_{-2} n_{ET} = k_3 n_{ET} - k_{-3} n_{EX} \frac{n_D}{V_O}$ $n_{ET} = \frac{k_2 C_T n_E + k_{-3} n_{EX} C_D}{k_{-2} + k_3}$ $n_{ET} = K_{mT} C_T n_E + K'_{mT} C_D n_{EX} \quad (18)$
II. <u>Complexo enzima-diglicerídeos</u>	
$r_{ED} = r_4 - r_5 = 0$	$k_4 \frac{n_D}{V_O} n_E - k_{-4} n_{ED} = k_5 n_{ED} - k_{-5} n_{EX} \frac{n_M}{V_O}$ $n_{ED} = \frac{k_4 C_D n_E + k_{-5} n_{EX} C_M}{k_{-4} + k_5}$ $n_{ED} = K_{mD} C_D n_E + K'_{mD} C_M n_{EX} \quad (19)$
III. <u>Complexo enzima-monoglicerídeos</u>	
$r_{EM} = r_6 - r_7 = 0$	$k_6 \frac{n_M}{V_O} n_E - k_{-6} n_{EM} = k_7 n_{EM} - k_{-7} n_{EX} \frac{n_G}{V_W}$ $n_{EM} = \frac{k_6 C_M n_E + k_{-7} n_{EX} C_G}{k_{-6} + k_7}$ $n_{EM} = K_{mM} C_M n_E + K'_{mM} C_G n_{EX} \quad (20)$
IV. <u>Complexo enzima-álcool</u>	
$r_{ECH} = r_{10} = 0$	$k_{10} \frac{n_{CH}}{V_W} n_E = k_{-10} n_{ECH}$ $C_{CH} = \frac{n_{CH}}{V_W} = \frac{k_{-10} n_{ECH}}{k_{10} n_E}$ $n_{ECH} = K_{CH} C_{CH} n_E \quad (21)$

C é a concentração molar em fase polar e C é a concentração molar em fase não polar

TABELA 7. Equacionamento para a determinação do número de moles para o complexo acil-enzima formado durante a sínteses de biodiesel por transesterificação

I. Complexo acil-enzima	
$r_{EX} = r_3 + r_5 + r_7 - (r_8 + r_9) = 0$	$\begin{aligned} & (k_3 n_{ET} - k_{-3} n_{EX} C_D) + (k_5 n_{ED} - k_{-5} n_{EX} C_M) \\ & + (k_7 n_{EM} - k_{-7} n_{EX} C_G) \\ & = (k_8 n_{EX} C_W - k_{-8} C_F n_E) \\ & + (k_9 n_{EX} C_{CH} - k_{-9} C_{BD} n_E) \end{aligned}$
	$n_{EX} = \frac{(k_3 K_{mT} C_T + k_5 K_{mD} C_D + k_7 K_{mM} C_M + k_{-8} C_F + k_{-9} C_{BD}) n_E}{(k_{-3} - k_3 K'_{mT}) C_D + (k_{-5} - k_5 K'_{mD}) C_M + (k_{-7} - k_7 K'_{mM}) C_G + k_8 C_W + k_9 C_{CH}}$
Onde	
	$k_{-3} - k_3 K'_{mT} = k_{-3} - k_3 \left(\frac{k_{-3}}{k_{-2} + k_3} \right) = \frac{k_{-3} k_{-2} + k_{-3} k_3 - k_3 k_{-3}}{k_{-2} + k_3} = \frac{k_{-3} k_{-2}}{k_{-2} + k_3}$ $k_{-3} - k_3 K'_{mT} = k_{-2} K'_{mT}$
	$n_{EX} = \frac{(k_3 K_{mT} C_T + k_5 K_{mD} C_D + k_7 K_{mM} C_M + k_{-8} C_F + k_{-9} C_{BD}) n_E}{k_{-2} K'_{mT} C_D + k_{-4} K'_{mD} C_M + k_{-6} K'_{mM} C_G + k_8 C_W + k_9 C_{CH}}$
	$\gamma = \frac{(k_3 K_{mT} C_T + k_5 K_{mD} C_D + k_7 K_{mM} C_M + k_{-8} C_F + k_{-9} C_{BD})}{k_{-2} K'_{mT} C_D + k_{-4} K'_{mD} C_M + k_{-6} K'_{mM} C_G + k_8 C_W + k_9 C_{CH}} \quad (22)$
	$n_{EX} = \gamma n_E \quad (23)$

* C é a concentração molar em fase polar e C é a concentração molar em fase não polar

Substituindo a equação de número de moles para cada complexo (Eq. 18, 19, 20, 21 e 23) na Equação 17, e rearranjando

$$\sum n_{Ei} = \alpha n_E \quad (24)$$

Onde,

$$\alpha = (1 + K_{mT} C_T + (K'_{mT} \gamma + K_{mD}) C_D + (K'_{mD} \gamma + K_{mM}) C_M + K'_{mM} C_G \gamma + \gamma + K_{CH} C_{CH})$$

Para determinar o número de moles da enzima ativada, deve-se considerar que

$$r_{Ea} = -r_1 = 0$$

Portanto,

$$k_1 \frac{n_{Ea}}{V_W} n_{Af} = k_{-1} n_E \quad \rightarrow \quad \frac{n_{Ea}}{V_W} = \frac{k_{-1}}{k_1} \frac{n_E}{n_{Af}} \quad \rightarrow \quad n_{Ea} = K_1 \frac{n_E}{n_{Af}} V_W \quad (25)$$

Substituindo as Equações 24 e 25 na Equação 16, pode-se determinar a equação para quantificar o número de moles da enzima (n_E)

$$n_E = \frac{n_{Eo}}{\frac{K_1 V_W}{n_{Af}} + \alpha} \quad (26)$$

Como a quantidade de enzima que pode estar contido na área interfacial livre (n_{Af}), de acordo com a Equação 15, é dependente do número de moles de enzima (n_E), rearranjando a equação 15:

$$n_{Af} = \frac{A_T}{A_e} - \sum n_{Ei} = A_{T/e} - \alpha n_E \quad (27)$$

Onde, $A_{T/e}$ é uma função do diâmetro médio das gotas, do volume da fase com menor volume e da área ocupada pela enzima na interface

$$A_{T/e} = \frac{A_T}{A_e}$$

Dessa forma, substituindo na Equação 26.

$$n_E = \frac{n_{Eo}}{\frac{K_1 V_W}{A_{T/e} - \alpha n_E} + \alpha} \quad \rightarrow \quad n_{Eo} = \frac{K_1 V_W n_E}{A_{T/e} - \alpha n_E} + \alpha n_E$$

Reordenando

$$(\alpha n_E)^2 - \left[(n_{Eo} + A_{T/e})\alpha + K_1 V_W \right] n_E + n_{Eo} A_{T/e} = 0$$

Finalmente,

$$n_E = \frac{\left[(n_{Eo} + A_{T/e})\alpha + K_1 V_W \right] \pm \sqrt{\left[(n_{Eo} + A_{T/e})\alpha + K_1 V_W \right]^2 - 4\alpha^2 n_{Eo} A_{T/e}}}{2\alpha^2} \quad (28)$$

Se a enzima não tivesse afinidade pela interface, a primeira reação de adsorção da enzima para sua ativação estaria voltada totalmente para a esquerda e não haveria enzima na interface.

$$k_1 \ll k_{-1} (K_1 \rightarrow \infty) \Rightarrow n_E \rightarrow 0$$

Como α é independente de K_1 .

$$\lim_{K_1 \rightarrow \infty} n_E = \frac{K_1 V_W \pm \sqrt{[K_1 V_W]^2}}{2\alpha^2} = \frac{K_1 V_W \pm K_1 V_W}{2\alpha^2} = 0$$

Ou seja, só é possível o sinal negativo antes da raiz e, então, a Eq. 29 pode ser usada para determinar o número de moles da enzima na interface

$$n_E = \frac{\left[(n_{Eo} + A_{T/e})\alpha + K_1 V_W \right] - \sqrt{\left[(n_{Eo} + A_{T/e})\alpha + K_1 V_W \right]^2 - 4\alpha^2 n_{Eo} A_{T/e}}}{2\alpha^2} \quad (29)$$

3.4.Determinação das equações de balanço de massa dos substratos e produtos envolvidos na reação de transesterificação com lipases solúveis

Na Tabela 8, o balanço de massa expresso em mol, de cada componente, está descrito para o reator em batelada.

TABELA 8. Equações de balanço de massa para reator em batelada dos compostos envolvidos na síntese de biodiesel por transesterificação enzimática com lipases solúveis

Biodiesel	$\frac{dn_{BD}}{dt} = \frac{dV_O C_{BD}}{dt} = (k_9 \gamma C_{CH} - k_{-9} C_{BD}) n_E$	(30)
Glicerol	$\frac{dn_G}{dt} = \frac{dV_W C_G}{dt} = [k_7 K_{mM} C_M + (k_7 K'_{mM} - k_{-7}) \gamma C_G] n_E$	(31)
Triglicerídeos	$\frac{dn_T}{dt} = \frac{dV_O C_T}{dt} = [k_{-2} K'_{mT} C_D \gamma + (k_{-2} K_{mT} - k_2) C_T] n_E$	(32)
Diglicerídeos	$\frac{dn_D}{dt} = [k_{-4} K'_{mD} C_M \gamma + (k_{-4} K_{mD} - k_4 + (k_3 K'_{mT} - k_{-3}) \gamma) C_D + k_3 K_{mT} C_T] n_E$	(33)
Monoglicerídeos	$\frac{dn_M}{dt} = [(k_5 K'_{mD} - k_{-5}) \gamma + k_{-6} K_{mM} - k_6] C_M + k_5 K_{mD} C_D + k_{-6} K'_{mM} C_G \gamma] n_E$	(34)
Ácidos graxos livres	$\frac{dn_F}{dt} = [k_8 \gamma C_W - k_{-8} C_F] n_E$	(35)
Álcool etílico	$\frac{dn_{CH}}{dt} = [k_{-9} C_{BD} - k_9 \gamma C_{CH}] n_E$	(36)
Água	$\frac{dn_W}{dt} = [k_{-8} C_F - k_8 \gamma C_W] n_E$	(37)

* C é a concentração molar em fase polar e C é a concentração molar em fase não polar

3.5. Determinação das equações do volume para cada fase do sistema

Durante a síntese do biodiesel por transesterificação enzimática, a composição da mistura reacional modifica gerando mudanças na composição, massa e densidade de cada fase, e, portanto, nos volumes de cada fase (FIRDAUS, MY. et al, 2016).

Para determinar o volume de cada fase, assumiu-se a fase apolar como uma solução ideal e a fase polar, como solução não ideal. Sendo n_i , o número de moles do componente i e v_i , o volume molar do componente i (Tabela 9), o volume de solução ideal é:

$$V^{id} = \sum n_i v_i \quad (38)$$

Assim, o volume da fase não polar (V_{np}) e polar (V_p) podem ser calculadas como abaixo:

$$V_{np} = V_{np}^{id} = n_T v_T + n_D v_D + n_M v_M + n_F v_F + n_{BD} v_{BD} \quad (39)$$

$$V_p = V_p^{id} + V_p^{exc} = n_W v_W + n_{CH} v_{CH} + n_G v_G + V_p^{exc} \quad (40)$$

TABELA 9. Volume molar dos componentes usados na determinação do volume de cada fase

Fase polar		Fase não polar	
Composto	v_i (mol/m ³)	Composto	v_i (mol/m ³)
Água	1.82×10^{-5}	Ácidos graxos	3.16×10^{-4}
Glicerol	7.30×10^{-5}	Triglicerídeos	9.73×10^{-4}
Álcool etílico	5.83×10^{-5}	Diglicerídeos	6.88×10^{-4}
		Monoglicerídeos	3.95×10^{-4}
		Ésteres de ácidos graxos (Biodiesel)	3.47×10^{-4}

Na fase polar, que contém álcool etílico, água e glicerol, o ajuste do volume é realizado usando o volume molar em excesso, aplicando a equação de Redlich-Kister para misturas binárias (SANDLE S., 2006) .

$$V^{exc} = x_1 x_2 \sum_{i=0}^n a_i (x_1 - x_2)^i \quad (41)$$

Onde, x_i é a fração molar do componente i e a_i é a constante. Os valores usados de a_i podem se observar na tabela 10.

TABELA 10. Constante usadas na equação de Redlich-Kister para as misturas binárias.

Mistura	a_0	a_1	a_2	a_3
Etanol – água	-4.2373	1.0571	-0.8951	0
Glicerol – água	-1.4506	0.8771	-0.3428	0
Etanol - glicerol	-4.4656	1.4642	-0.1230	0.3820

Primeiro o cálculo é realizado para cada mistura binária separadamente, isto é, álcool etílico-água, glicerol-água e glicerol-álcool etílico. Logo depois, o volume em excesso é a

somatória do volume em excesso para cada um dos sistemas binários separados pelo número total de moles dos componentes da fase polar (n_t) (REDLICH O.-KISTER A.T., 1948).

$$V_{123}^{exc} = n_t v_{123}^{exc} = n_t (v_{12}^{exc} + v_{13}^{exc} + v_{23}^{exc}) \quad (42)$$

3.6. Parâmetros cinéticos do modelo

O número inicial de parâmetros cinéticos do modelo são vinte (20). Como as constantes das reações direta e a inversa da adsorção da enzima e da inibição pelo álcool são dependentes, o número de parâmetros a serem ajustados é dezoito (18).

TABELA 11. Parâmetros cinéticos para serem ajustados no modelo proposto para síntese de biodiesel usando lipase solúvel

Parâmetro cinético	Unidade
$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$	$\frac{mol}{m^3}$
k_2, k_{-2}	$\frac{m^3}{mol * min}; \frac{1}{min}$
k_3, k_{-3}	$\frac{1}{min}; \frac{m^3}{mol * min}$
k_4, k_{-4}	$\frac{m^3}{mol * min}; \frac{1}{min}$
k_5, k_{-5}	$\frac{1}{min}; \frac{m^3}{mol * min}$
k_6, k_{-6}	$\frac{m^3}{mol * min}; \frac{1}{min}$
k_7, k_{-7}	$\frac{1}{min}; \frac{m^3}{mol * min}$
k_8, k_{-8}	$\frac{m^3}{mol * min}; \frac{m^3}{mol * min}$
k_9, k_{-9}	$\frac{m^3}{mol * min}; \frac{m^3}{mol * min}$
$K_{CH} = \frac{k_{10}}{k_{-10}}$	$\frac{m^3}{mol}$

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Lipase

A lipase utilizada foi a lipase comercial NS-40116. Esta lipase é uma formulação líquida modificada geneticamente da lipase *Thermomyces lanuginosus*, usada especialmente na obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel). Na literatura, também pode ser referida como Callera trans L ou Eversa transform. A lipase foi doada pela empresa Novozymes – Brasil.

4.1.2. Reagentes

O óleo de soja refinado (Liza®) foi adquirido no comércio local e o álcool etílico (99.5 %) foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil).

Albumina sérica bovina (BSA), *Coomassie blue brilliant G-250*, tributirina e heptadecanoato de metila foram adquiridos de Sigma-Aldrich. Acetonitrila e heptano foram adquiridos de Honeywell. Hexano, 2-propanol e hidróxido de potássio foram adquiridos de Panreac. Fenolftaleína PA foi adquirida de Qhemis. Fosfato de sódio bibásico e fosfato de sódio monobásico foram adquiridos da Synth.

4.2. Caracterização de lipase

4.2.1. Conteúdo de proteínas

A quantificação de proteínas na formulação líquida de lipase foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se o reagente azul brilhante de Coomassie. Este corante muda de coloração castanho escuro a azul depois da ligação com a proteína, e sua absorvância pode ser medida com o espectrofotômetro em 595 nm. Na

elaboração da curva de calibração (Eq. 43) foi utilizado como padrão a albumina sérica bovina, em diferentes concentrações.

$$C_p = 1.6297 A + 0.0293 \quad (43)$$

Onde, C_p é a concentração da proteína (M/ml) e A é a absorvância.

Uma amostra de 25 μ L da diluição da lipase em solução de tampão fosfato (5 mM pH 7.0) foi misturada com 1 mL do reagente de Bradford. Depois de 5 min, a medida foi realizada. A diluição foi feita para garantir que o valor da absorvância medido estivesse entre 0.2 e 0.8.

4.2.2. Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica de lipase foi determinada mediante o método da hidrólise da tributirina de acordo com a metodologia proposta por Beisson et al. (2000). Este método baseia-se na hidrólise de uma mistura de tributirina (1.5 mL), solução tampão de fosfato de sódio (pH 7.3 100 mM) (6 mL) e água destilada (16.5 mL). A mistura reacional é mantida sob agitação mecânica em reator encamisado a 37 °C durante 2 min. Depois deste tempo, a solução enzimática (0.1 mL) é adicionada e o ácido butírico liberado é titulado com solução de hidróxido de potássio (20 Mm) em titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça). Uma unidade de tributirina (TBU) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido butírico por minuto sob as condições avaliadas, de acordo com o que é apresentado na Equação 44.

$$Atividade \left(\frac{U_{TBU}}{ml} \right) = \frac{q \times M}{E} \quad (44)$$

Onde, q é a vazão volumétrica (L/min) da solução de KOH para manter o pH da reação constante, M é a concentração molar da solução de hidróxido de potássio (mol/L) e E é a quantidade de enzima usada no ensaio (mL de solução enzimática).

4.2.3. Eletroforese SDS – PAGE para determinação da massa molar da enzima

A eletroforese SDS-PAGE, para a formulação líquida de lipase NS – 40116 e a lipase comercial *Thermomyces lanuginosus*, foi realizada seguindo o método descrito de Laemmli

(1970), na unidade de eletroforese MiniProtean (Bio-Rad.). A poliacrilamida foi utilizada como gel de separação 12% (m/v) e gel de empilhamento de 4% (m/v).

As lipases foram desnaturadas por aquecimento na presença de SDS e β -mercaptoetanol. O gel foi corado com solução corante azul de Coomassie 0.25% (m/m) e descorados com uma solução 50% de água destilada, 43% de metanol e 7% de ácido acético. O padrão de alta e baixa massa molar utilizado foi Bio-Rad (10-250 k Da).

4.2.4. Estabilidade térmica de lipase

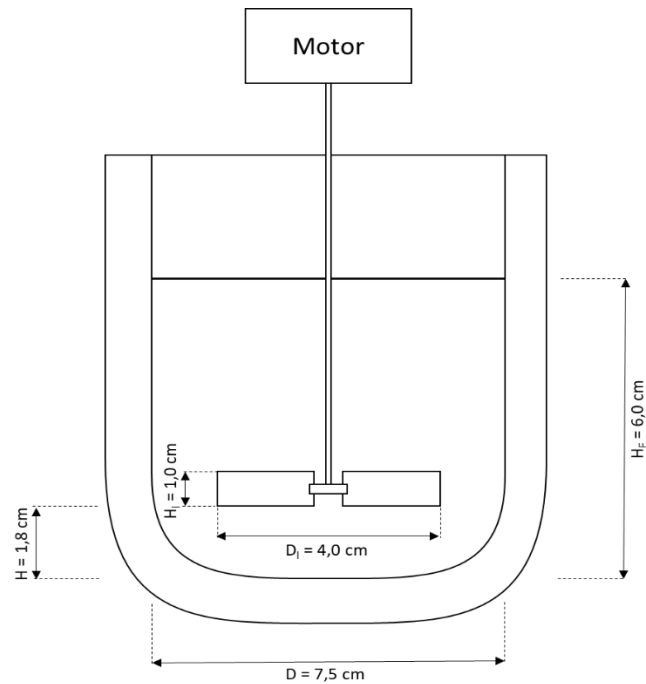
Uma amostra de lipase NS-40116 foi diluída em solução tampão de fosfato de sódio (5 mM pH 7.0). Logo depois da homogeneização, esta foi incubada à temperatura de reação 35°C. Amostras foram coletadas após 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 9 h, 23 h, 24 h, 25 h. Para cada amostra foi determinada sua atividade hidrolítica pelo método da hidrólise da tributirina já descrito.

4.3. Obtenção de dados experimentais para o ajuste do modelo cinético proposto para o uso de lipases líquidas na obtenção do biodiesel

4.3.1. Reações em batelada

Os ensaios em bateladas para reações de transesterificação com etanol e hidrólises do óleo de soja foram realizados em reator de vidro encamisado com uma capacidade de 200 mL e o diâmetro interno de 5.5 cm. A mistura foi realizada sob agitação mecânica com um impelidor de duas pás retas (4 cm de diâmetro e 1 cm de altura) e a velocidade de agitação estabelecida segundo o experimento (tabela 12). Para todos os experimentos, a temperatura no reator foi 35°C, controlada com banho de água (Banho Ultratermostato Nova Ética), de acordo com a condições de trabalho recomendada na literatura para a lipase (NORDBLAND et al., 2014; PEDERSEN et al., 2014). Na Fig. 14, pode-se observar um esquema ilustrativo do reator usado para os ensaios em batelada.

FIGURA 14. Esquema ilustrativo do reator usado para os ensaios em batelada



4.3.1.1. Transesterificação com etanol do óleo de soja para a síntese dos ésteres etílicos dos ácidos graxos (biodiesel)

As reações de transesterificação foram realizadas em reator de vidro encamisados de 200 ml de acordo ao esquema da Fig. 14.

Em todos os ensaios foram usados 75 g de óleo de soja misturados com quantidades específicas de álcool, água e lipase de acordo com as condições do trabalho estabelecidas para o experimento. A quantidade de álcool usada foi definida em unidade equivalente (eq), onde um equivalente é a quantidade estequiométrica requerida para que os ácidos graxos presentes no óleo reajam para formar o biodiesel (PRICE et al., 2014). A quantidade de água e de lipase foram estabelecidas em porcentagem em massa relativa à quantidade de óleo de soja usada. A quantidade de lipase contribui como quantidade de água adicionada.

Foram planejados doze experimentos com diferentes condições de operação, como pode-se ver na Tabela 12: oito experimentos para a obtenção dos parâmetros cinéticos e quatro para a validação do modelo proposto. As condições foram estabelecidas de acordo com os

resultados reportados por Nordbland et al. (2014) e Pedersen et al. (2014) usando a lipase Callera trans L na síntese de biodiesel por transesterificação de óleo de canola com álcool metílico e álcool etílico, respectivamente.

TABELA 12. Condições de operação para os ensaios de transesterificação do óleo de soja com etanol, a 35 °C usando a lipase NS-40116.

Experimento	Álcool (eq.)	Água (% w/w _{óleo})	Lipase (% w/w _{óleo})	Velocidade de agitação (RPM)	
Obtenção de parâmetros cinéticos	1	1.5	10.0	1.0	800
	2	1.5	10.0	2.0	800
	3	1.5	10.0	0.5	1200
	4	1.5	10.0	2.0	1200
	5	2.0	10.0	0.5	800
	6	2.0	10.0	2.0	800
	7	2.0	10.0	0.5	1200
	8	2.0	10.0	1.0	1200
Validação do modelo proposto	9	1.5	10.0	1.0	1200
	10	1.5	2.0	1.0	1200
	11	1.5	20.0	1.0	1200
	12	1.5	5.0	1.0	1200

1 eq. = um equivalente é a quantidade estequiométrica requerida para que os ácidos graxos presente no óleo reajam para formar o biodiesel.

As reações foram acompanhadas por até 25 horas. Amostras de 0.5 ml foram recolhidas em tempos estabelecidos. Cada amostra foi centrifugada a 14500 RPM a 5°C por 5 min para garantir a separação das duas fases. A fase não polar foi tratada para sua análise cromatográfica. A lipase foi separada com a fase polar e descartada.

4.3.1.2. Hidrólises do óleo de soja

As reações de hidrólise do óleo de soja foram realizadas no mesmo reator de vidro encamisado de 200 ml (Fig.15), e mantendo as mesmas condições de temperatura (35°C) e agitação mecânica usadas nas reações de transesterificação (800 e 1200 RPM). Foram planejados quatro experimentos com as condições estabelecidas na Tabela 13. Nestes experimentos a quantidade de lipase ficou fixa em 1.0% w/w_{óleo}. A quantidade de água foi usada nas condições presentes nas reações de transesterificação (10% w/w_{óleo}) e o equivalente ao volume total ocupado pela fase polar nas reações de transesterificação (60% w/w_{óleo}).

TABELA 13. Condições de operação dos experimentos de hidrólises de óleo de soja usando a lipase NS-40116 a 35°C

Experimento	Água (% w/w _{óleo})	Lipase (% w/w _{óleo})	Velocidade de agitação (RPM)
1	10.0	1.0	800
2	60.0	1.0	800
3	10.0	1.0	1200
4	60.0	1.0	1200

As reações foram acompanhadas por 24 horas. Amostras de 0.5 ml foram recolhidas em tempos estabelecidos. Cada amostra foi centrifugada a 14500 RPM por 5 min para garantir a separação das duas fases. A fase não polar foi tratada para as análises seguintes. Os dados foram usados para obtenção dos parâmetros cinéticos.

4.3.2. Determinação de ésteres e glicerídeos por cromatografia líquida

O conteúdo de triglicerídeos (T), diglicerídeos (D), monoglicerídeos (M) e ésteres etílico dos ácidos graxos (BD) presentes na fase apolar foi analisado com uma adaptação da

metodologia proposta por Holčapek et al (1999) para cromatografia líquida com gradiente da fase móvel na fase reversa (Gradient elution reversed - phase high performance liquid chromatography RP-HPLC). O equipamento do HPLC (Waters E 2695) está equipado com uma coluna Ascentis Express C-18 (10cm × 46mm × 2.7µm) (Supelco), com sistema gerador de gradiente e um detector UV.

Para todos os experimentos, o volume de injeção usado foi de 20 µl e a vazão de fluxo foi de 1 mL/min. A temperatura da coluna ficou constante em 40°C. A região de detecção usada com o UV foi a 205 nm.

No gradiente da fase móvel, foram usados três reservatórios: o A contendo água, B contendo acetonitrila e o C contendo solução de 2-propanol-hexano (5:4 v/v). Foi usado um gradiente ternário de 40 min: 30%A + 70%B em 0 min, 100%B em 10 min, 50%B + 50%C em 20 min e continuada da eluição isocrática por 5 min.

4.3.2.1. Preparação de amostras para o HPLC

A amostra (0.5 ml tomada da mistura reacional no reator) foi centrifugada a 14500 RPM por 5 min para separar as duas fases (polar e não polar). Depois, 50 µl da fase não polar (fase oleosa) foram pesados e diluídos em 500 µl de solução de 2-propanol-hexano (5:4 v/v). Uma amostra de 10 µl desta diluição foi dissolvida novamente com 1490 µl do solvente. Esta diluição foi filtrada com filtro micropore de 0.20 µm.

4.3.2.2. Quantificação dos teores de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos

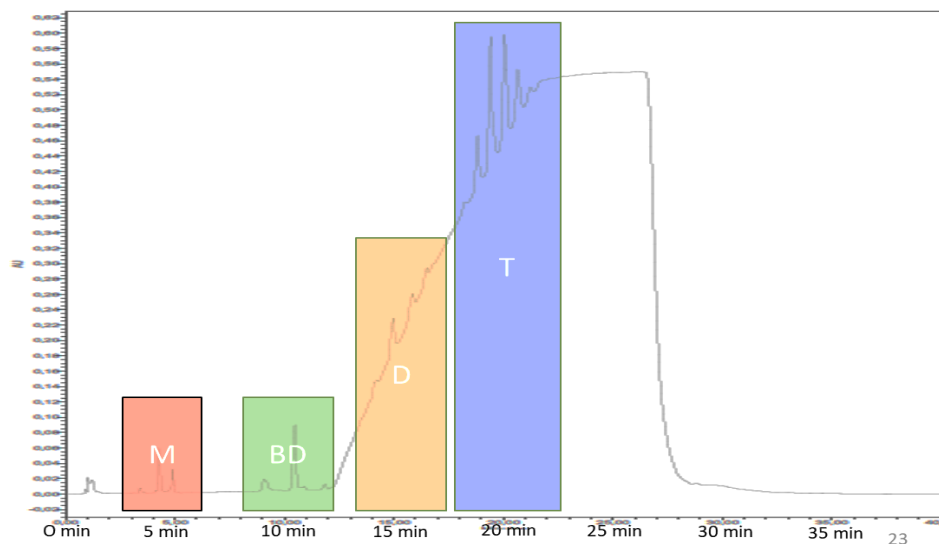
A quantificação do teor de cada grupo de componente (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos) foi feita calculando a composição percentual relativa para cada grupo de acordo com a Equação 45 e, além disso, assumindo esta composição percentual equivalente à razão mássica entre o grupo e a amostra total.

$$x_{grupo} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{\sum A_{grupo}}{\sum A_{total}} \times 100 \quad (45)$$

Onde, x_{grupo} é a fração mássica de cada grupo na amostra total, $\sum A_{grupo}$ é a soma das áreas de todos os picos correspondente ao grupo e $\sum A_{total}$ é a soma das áreas de todos os picos.

Cada grupo tem um intervalo de tempo de retenção específico (Apêndice A): os monoglicerídeos e ácidos graxos (M e F) entre 3 e 8 min, os ésteres etílicos de ácidos graxos (BD) entre 9 e 12 min, os diglicerídeos (D) entre 13 e 17 min e os triglicerídeos (T) entre 18 e 22 min aproximadamente. Na figura 16, pode-se observar, um cromatograma obtido durante os ensaios para o ajuste da metodologia do HPLC, os quatro grupos identificados.

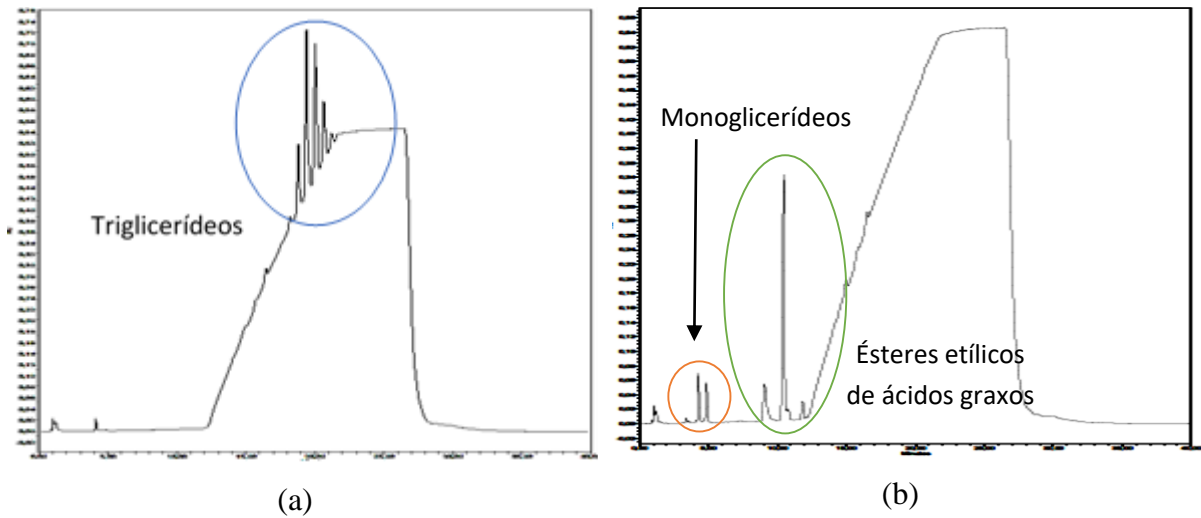
FIGURA 15. Identificação dos grupos num cromatograma de HPLC obtido da mistura reacional da transesterificação com etanol do óleo de soja ($t=30$ min).



Grupos: M=Monoglicerídeos e ácidos graxos, BD=Ésteres etílicos de ácidos graxos, D=Diglicerídeos, T=Triglicerídeos.

Na Figura 16, podem ser observados os cromatogramas correspondentes ao óleo de soja refinado e ao produto da reação de transesterificação de óleo de soja com etanol transcorrido um tempo de reação de 1440 min (24h). Na Figura 16(a), o óleo, pode ser observado principalmente triglicerídeos (azul). Na figura 16(b) pode ser identificado a presença de monoglicerídeos (laranja) e ésteres etílicos de ácidos graxos (verde).

FIGURA 16. Cromatogramas de HPLC correspondente ao (a) óleo de soja e (b) produto da transesterificação com etanol do óleo de soja (para $t = 1440$ min).



Por outro lado, o rendimento a partir dos dados obtidos do cromatograma do HPLC foi calculado com a Equação 46.

$$\text{Rendimento} = \frac{C_{BD}}{(C_F + C_M + C_{BD} + 2 \times C_D + 3 \times C_T)} \times 100 \quad (46)$$

Onde C é concentração molar do componente na amostra da fase apolar.

4.3.2.3. Conversão de composição mássica a concentrações molares.

De acordo com o modelo proposto, as concentrações de entrada dos dados experimentais devem estar em concentrações molares, especificamente em unidades de mol/m^3 . Assim, os dados obtidos a partir do HPLC devem ser convertidos a esta unidade de concentração.

Para isso, foi adaptada a metodologia usada por Komers et al. (2001) para determinar as massas moleculares médias de cada grupo de componente. Na Tabela 14, pode-se observar a composição mássica do óleo de soja em função dos ácidos graxos presentes.

TABELA 14. Composição mássica do óleo de soja utilizada para a determinação das massas molares média.

Ácidos graxos saturados		Ácidos graxos insaturados		
Ácido palmítico (C _{16:0})	Ácido esteárico (C _{18:0})	Ácido oleico (C _{18:1})	Ácido linoleico (C _{18:2})	Ácido linolênico (C _{18:3})
10.0	5.0	23.0	51.0	7.0

De acordo com a sua composição, pode-se admitir que o óleo de soja é um triacilglicerol composto principalmente por 4 ácidos graxos: ácido oleico (C_{18:1}, MM = 282.45 g/mol), ácido linoleico (C_{18:2}, MM = 280.45 g/mol), ácido linolênico (C_{18:3}, MM = 278.42 g/mol) e ácido palmítico (C_{16:0}, MM = 256.42 g/mol). Assumindo-se que todos os isômeros de triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos tem a mesma reatividade, a massa molecular média dos ácidos graxos (F) presente no óleo de soja pode ser calculada de acordo com a Equação 47.

$$\overline{MM} (F) = \frac{\sum_{i=0}^n (x_i \times MM_i)}{(\sum_{i=0}^n x_i)} \quad (47)$$

Onde \overline{MM} é a massa molar média dos ácidos graxos do óleo de soja, x_i é a fração mássica de cada ácido graxo contida no óleo e MM_i é a massa molecular de cada ácido graxo. A partir desta massa molar média foram calculados os valores respectivos para os outros componentes do sistema. Na Tabela 15, pode-se observar as massas molares médias calculadas para cada componente presente no óleo de soja.

TABELA 15. Massa molar média calculada dos componentes do óleo de soja.

Grupo	Massa molar média (g/mol)
Ácidos graxos livres	278.16
Triglicerídeos	872.50
Diglicerídeos	612.41
Monoglicerídeos	352.25
Ésteres etílicos do ácido graxo	306.16

4.3.3. Determinação dos ésteres etílicos dos ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os ésteres etílicos dos ácidos graxos produzidos ao final das reações de transesterificação foram quantificados por cromatografia gasosa, usando as condições estabelecidas pela norma EN-14103, do Comitê Europeu pela Padronizações. Neste caso, o equipamento (Agilent Technologies 7890A GC) está equipado com injetor automático e detector de ionização de chama (FID – 250 °C). A coluna usada foi HP – Innowax (30m × 0,320mm × 0.25µm), termostaticada em 230 °C.

O volume de injeção foi de 1 µL. O gás de arraste foi nitrogênio com uma vazão de 400 mL/min. A análise tem uma duração de 25 min, através da qual, a temperatura da coluna muda da seguinte forma: 150 °C por 2 min, seguido de um incremento de temperatura (10 °C/min) até 180 °C, permanecendo por 3 min. Para logo incrementar a temperatura (10 °C/min) até 230 °C, e permanecendo por mais 7 min. A temperatura do detector e do injetor é 250 °C,

4.3.3.1. Preparação de amostras para a cromatografia gasosa

Uma amostra de 1 mL aproximadamente, tomada da mistura reacional no reator no tempo final da reação de transesterificação, foi lavada com água quente (aproximadamente duas vezes sua quantidade), e seguidamente, centrifugada a 14500 RPM por 5 min. A fase oleosa foi separada, lavada e centrifugada de novo. A amostra lavada foi seca na estufa por 24 h. Uma amostra de 50 mg foi pesada e dissolvida em 1 mL de solução heptadecanoato de metila/heptano (10 mg/mL). O heptadecanoato de metila (C₁₇) é usado como padrão interno para quantificação.

4.3.3.2. Quantificação do teor de ésteres etílicos de ácidos graxos

A partir do cromatograma gerado foi calculada a porcentagem de conversão em ésteres da reação de transesterificação, com a Equação 48.

$$\% \text{ teor de ésteres} = \frac{(\sum A) - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{m_a} \times 100 \quad (48)$$

Onde, $\sum A$ é a soma das áreas de todos os picos de ésteres presentes com cadeias carbônicas entre C₁₄ e C₂₄, A_{PI} é a área do pico do padrão interno heptadecanoato de metila (C₁₇), C_{PI} é a concentração da dissolução do padrão interno heptadecanoato de metila/heptano (~10 mg/mL), V_{PI} é o volume da dissolução do padrão interno heptadecanoato de metila/heptano (1 mL) e m_a é a massa da amostra pesada (mg).

4.3.4. Determinação da concentração dos ácidos graxos livres

A determinação dos ácidos graxos livres foi realizada por titulação de acordo com a metodologia modificada do método oficial AOCS Ca 5a-40 (AOCS - American Oil Chemists Society) proposta por Rukunudin I.H, et al. (1998). No tempo estabelecido, a amostra de 0,5 a 1 mL foi recolhida do reator, pesada e transferida para um béquer. Foram adicionados 10 mL de álcool etílico previamente neutralizado, para inativar a lipase e solubilizar os ácidos graxos livres. A mistura foi titulada com solução padronizada de KOH na presença do indicador de fenolftaleína (718 Stat Titrino Metrohm). A concentração dos ácidos graxos livres foi calculada a partir da relação para uma titulação ácido-base do volume gasto de KOH (mL), a concentração de KOH (mol/L) e o volume da amostra usado (mL).

4.3.5. Determinação do diâmetro da gota

Para a determinação do diâmetro de gota foi usado o método microscópico usado por Al Zuhair et al. (2004) com algumas adaptações. O reator usado, o mesmo usado nas reações de batelada (Fig. 14), tem uma capacidade de 200 ml. Pela agitação, foi usado um impelidor de pás retas conectado a um agitador mecânico (Agitador AM-20 (50 – 2200 RPM)). A temperatura no reator foi controlada a 35 °C mediante banho térmico com água.

A mistura usada para os experimentos foi composta por óleo de soja refinado (fase não polar), água destilada e álcool etílico (99.5 %) (fase polar) em quantidades equivalentes às usadas nas reações de transesterificação. A quantidade de óleo ficou constante em cada experimento, mudando o volume da fase polar e a velocidade de agitação. Na Tabela 16 estão resumidas as condições dos experimentos realizados.

TABELA 16. Condições de operação dos ensaios para a determinação do diâmetro da gota

Experimento	Massa óleo de soja refinado (g)	Água (% w/w óleo)	Álcool etílico (eq.) ¹	Velocidade de agitação (RPM)
1				500
2	75	10 %	1.5	800
3				1200
4				500
5	75	10 %	2.0	800
6				1200

¹eq. um equivalente é a quantidade estequiométrica requerida para que os ácidos graxos presentes no óleo reajam para formar o biodiesel.

Para cada experimento, as duas fases foram misturadas por 5 min sob condições de reação estabelecida. Depois deste tempo, uma amostra de 100 µL foi observada no microscópio (Olympus BX50). Com ajuda do software S-Viewer e com a objetivo 4.0×0.13, foram tomadas entre 20 e 30 fotos para cada amostra. Cada experimento foi realizado em duplicata.

Posteriormente, cada foto foi analisada com ajuda do software ImageJ para a quantificação e determinação do diâmetro das gotas. Posteriormente, a distribuição do diâmetro de gota e o diâmetro médio para cada condição foi determinado mediante o uso do software OriginPlus 9.0.

4.4. Ajustes dos parâmetros do modelo proposto da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando a lipase solúvel NS-40116

Para o ajuste dos parâmetros da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando a lipase solúvel NS-40116 foi usado o programa Matlab®, com a função LSQNONLIN para a resolução de problemas por mínimos-quadrados não-linear (ajuste de curvas). Os dados experimentais podem ser introduzidos em concentração mássica ou molar.

V. RESULTADOS

5.1. Caracterização cinética da formulação líquida de lipase

5.1.1. Conteúdo de proteína

O conteúdo de proteínas da formulação líquida de lipase, identificada como NS – 40116, usada para o estudo cinético, é 31.454 ± 0.002 mg proteína/mL lipase. Este parâmetro é importante na determinação do número de moles de lipase usados em cada reação. Remonato, D. (2017) caracterizou a lipase Eversa® Transform, formulação líquida de lipase desenvolvida por Novozymes, quantificando o conteúdo de proteínas de 29,9 mg proteína/mL lipase. Esta lipase também é reportada como a lipase Callera Trans L (Nielsen et al, 2016).

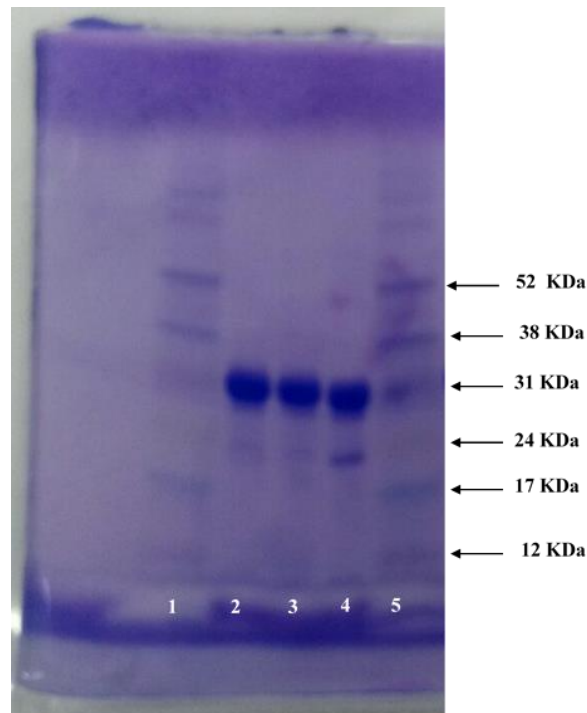
5.1.2. Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da formulação líquida da lipase foi determinada pela taxa de hidrólise de tributirina, composto de cadeia curta. A atividade hidrolítica obtida para a lipase foi de 48048 ± 654 LU/mL (1527.6 ± 20.8 LU/mg proteína), onde 1 LU é a atividade requerida para produzir 1 μ mol/min de ácido butírico sob condições padrão (pH 7.5; 0.2 M substrato) (Martinelle et al, 1995).

5.1.3. Determinação da massa molecular por eletroforese SDS-PAGE

A formulação líquida de lipase NS – 40116 foi submetida a SDS – Eletroforese, junto com uma formulação comercial de lipase *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich). A canaletas 1 e 5 continham o marcador de massa molecular em kDa, as canaletas 2 e 3 continham a formulação líquida de lipase (NS – 40116) e a canaleta 4 continha a formulação comercial *Thermomyces lanuginosus*.

FIGURA 17. Eletroforese SDS-PAGE das formulações de lipase comercial NS-40116 e *Thermomyces lanuginosus*.



Canaletas: (1) e (5) marcador de massa molecular em kDa, (2) e (3) formulação líquida de lipase NS – 40116, (4) formulação comercial *Thermomyces lanuginosus*.

Na figura 17 pode-se observar que a formulação NS-40116 tem só uma banda próxima à banda do indicador de 31 kDa. Ao comparar esta formulação de lipase com a lipase *Thermomyces lanuginosus*(Tl), pode-se inferir que as duas formulações contém uma proteína proveniente do mesmo microrganismo, embora possam não ser idênticas. Pode haver alguma modificação genética, ou a concentração de proteínas pode mudar. No caso de lipase NS-40116, ela é comercializada como uma modificação de lipase *Thermomyces*. Além disso, o fato de só ter uma banda permite descartar que a formulação seja uma mistura de proteínas.

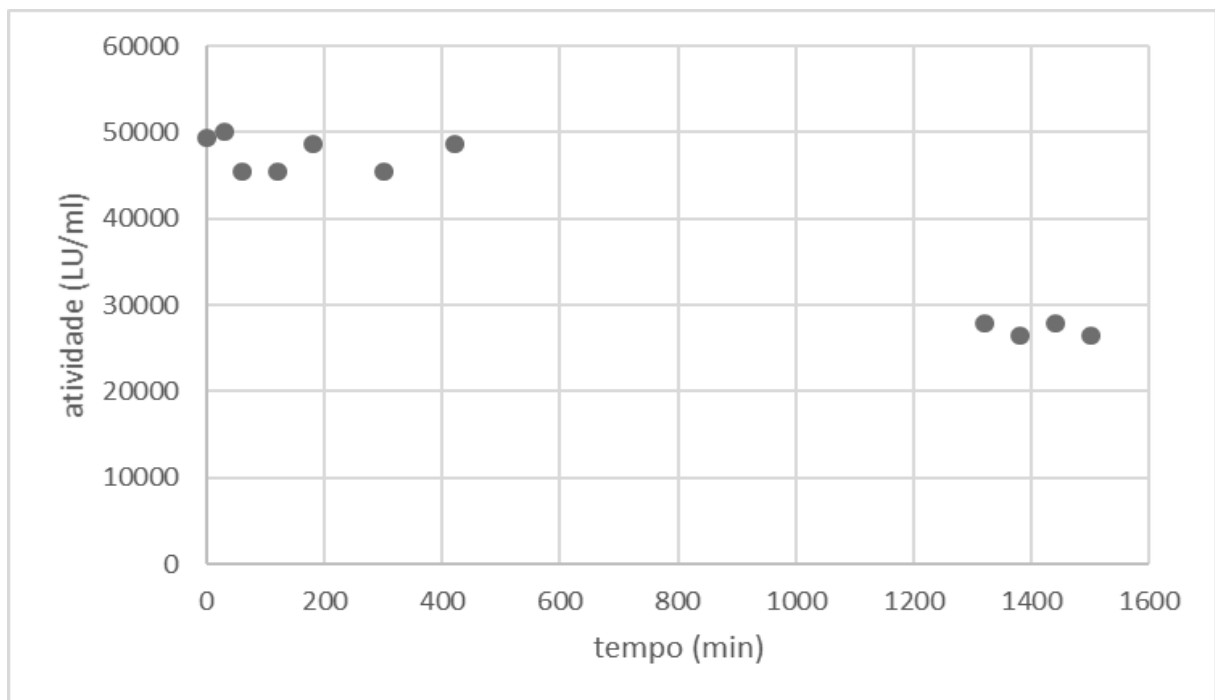
Com respeito à massa molecular, as duas formulações comerciais (NS-40116 e Tl) têm uma massa molecular próxima a 31 kDa. Fernández-Lafuente (2009) reporta que a massa molecular da *Thermomyces lanuginosus* é 31700 g/mol, coincidindo com o valor obtido na eletroforese (1 Da=1 g/mol).

5.1.4. Estabilidade térmica da lipase NS-40116

A estabilidade térmica da lipase NS-40116 foi avaliada durante 25 horas, logo depois de ser incubada a 35 °C. Na literatura, esta temperatura é a recomendada para trabalhar com esta lipase (CESARINI et al., 2013; NORDBLAND et al., 2014; PEDERSEN et al., 2014).

Na figura 18, pode-se observar que a atividade hidrolítica da lipase permanece estável nas primeiras 8 horas, diminuindo sua atividade nas últimas horas da reação. Portanto, para o modelo só foram considerados os dados das primeiras 5 horas (300 min).

FIGURA 18. Estabilidade térmica da lipase NS40116 incubada a 35 °C durante 25 horas



5.2. Determinação do diâmetro médio inicial da gota

A diâmetro médio inicial da gota foi determinado para as condições estabelecidas para a reação de transesterificação: 1.5 eq. ou 2.0 eq. de álcool etílico; 10% w/w_{óleo} de água; 500, 800 ou 1200 RPM à temperatura constante de 35 °C (Tabela 16). Para cada condição de operação, foi determinado o diâmetro médio da gota aos 5 min e aos 10 min de mistura. Para cada condição foi realizada uma análise estatística.

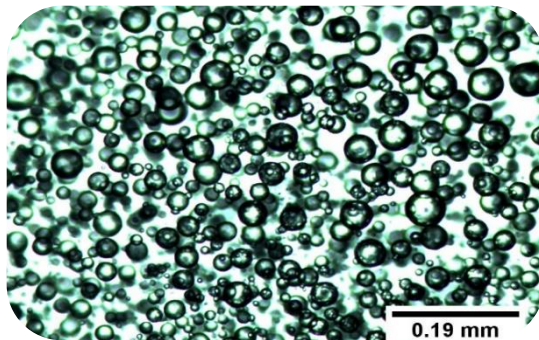
Na Tabela 17, pode-se observar os resultados obtidos para cada experimento. Os experimentos foram feitos a temperatura e composição constantes, pelo que a mudança no diâmetro da gota só pode ser associada à razão entre o volume da fase polar e o volume da fase não polar. Mantida a razão entre volumes, pode-se observar que o diâmetro da gota vai decrescendo à proporção que a velocidade de agitação vai aumentando. Lembrando que a área interfacial é inversamente proporcional ao diâmetro da gota, isso corresponde a um aumento da área interfacial específica. Mantendo constante a velocidade de agitação e aumentando o volume da fase polar, pode-se observar um aumento no diâmetro da gota, diminuindo a área interfacial.

TABELA 17. Diâmetro médio inicial da gota para as condições de operação estabelecidas na reação de transesterificação enzimática para síntese do biodiesel com lipase solúvel.

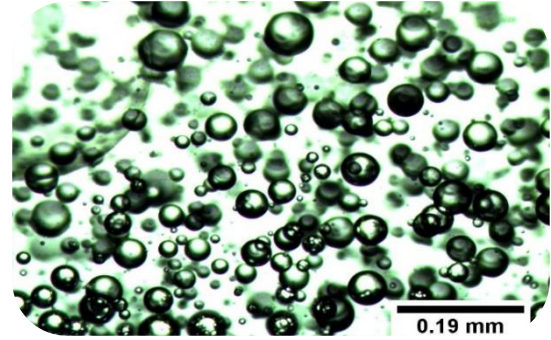
Experimento	Volume fase não polar (mL)	Volume fase polar (mL)	Velocidade de agitação (RPM)	Diâmetro médio (μm)	Desvio Padrão (μm)
1			507 ± 5	32.14	0.47
2	84 ± 1	31 ± 1	807 ± 5	22.72	1.61
3			1200 ± 5	16.47	1.08
4			505 ± 5	46.50	8.05
5	85 ± 1	38 ± 1	812 ± 5	34.10	10.16
6			1202 ± 5	21.77	1.77

As mudanças na área interfacial ficam claras na Figura 19. Observe-se como nas figuras 19(a), (b) e (c), para uma fase polar fixa de 1.5 eq. de álcool etílico mais 10% w/w_{óleo} de água, que o diâmetro de cada gota vai decrescendo com o aumento da velocidade de agitação. Isso também implica um aumento do número de gotas e, portanto, uma maior área interfacial. Ao comparar as fotos da primeira coluna com as fotos da segunda coluna, ao aumentar o volume da fase polar, o diâmetro das gotas também aumenta, assim como o número destas. O diâmetro de gotas é inversamente proporcional a área interfacial, não obstante o incremento do número de gotas favorece-a.

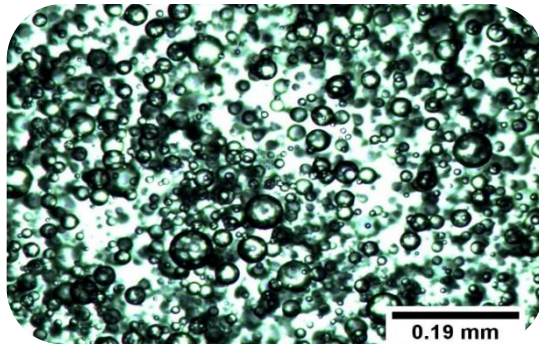
FIGURA 19. Fotos digitalizadas da emulsão água-álcool-óleo com o software S-Viewer das observações no microscópio Olympus BX50 com o objetivo 4.0x0.13 micros.



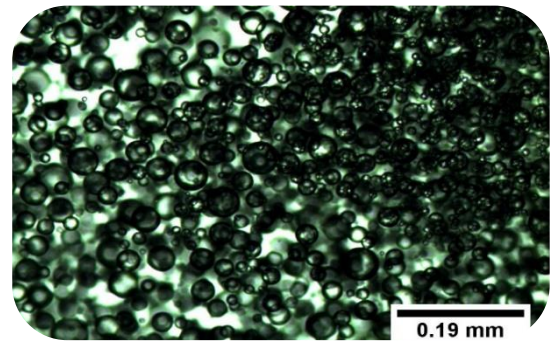
(a) 500 RPM 1.5 eq. Álcool



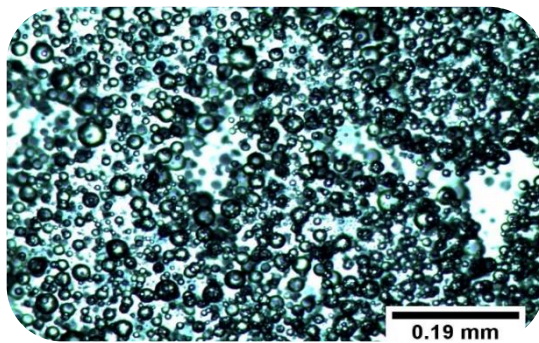
(d) 500 RPM 2.0 eq. Álcool



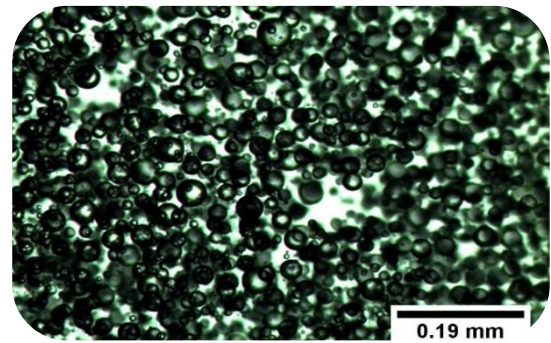
(b) 800 RPM 1.5 eq. Álcool



(e) 800 RPM 2.0 eq. Álcool



(c) 1200 RPM 1.5 eq. Álcool

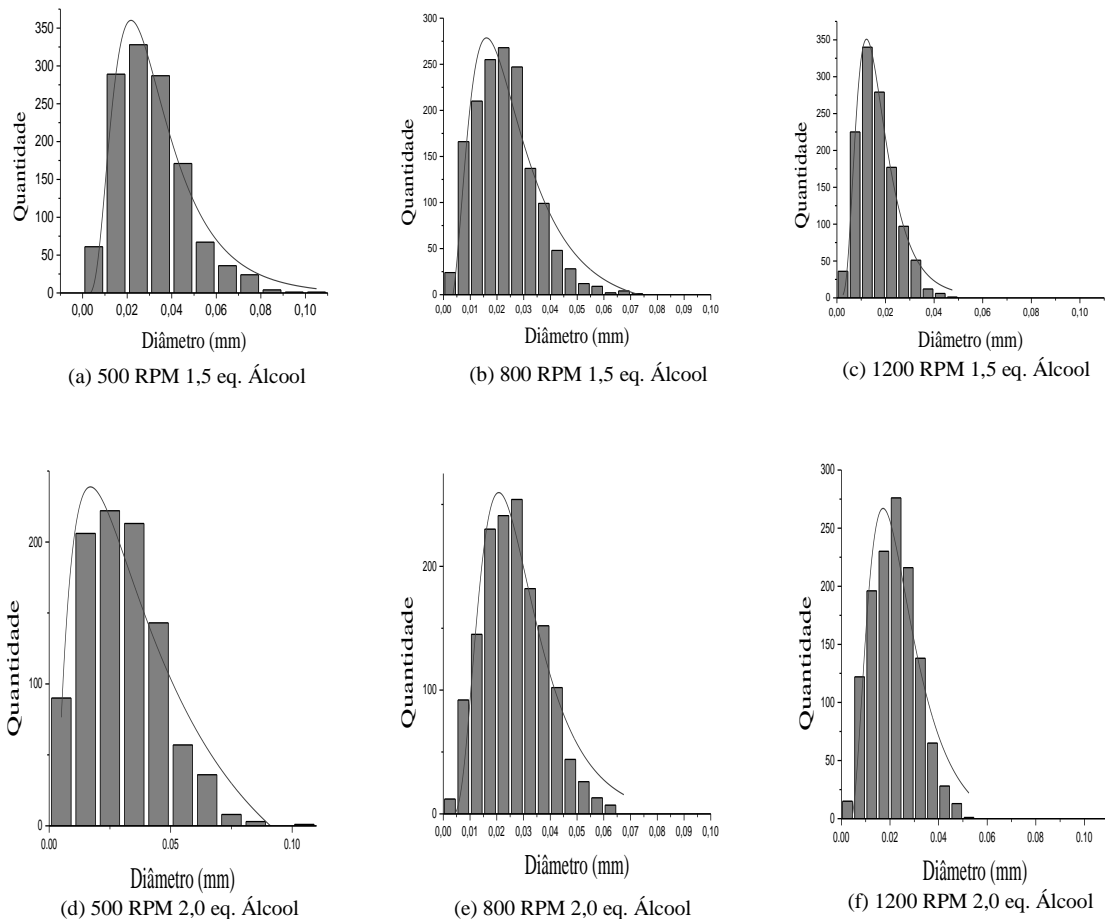


(f) 1200 RPM 2.0 eq. Álcool

Na Figura 20, pode-se verificar que as emulsões produzidas por agitação mecânica têm uma distribuição quase normal (SALAGER J.L, 1999). Nas Figuras 20(a) e 20(d), pode-se observar que a distribuição do diâmetro da gota é maior. Quando a velocidade de agitação aumenta, os diâmetros das gotas tendem a ser menores, aumentando a viscosidade da emulsão. Portanto, a distribuição do diâmetro da gota parece mais estável (Fig, 20(c) e 20(e)). Embora essa afirmação não possa ser assegurada, já que para gotas com diâmetros muito pequenos o método tradicional que foi usado não é o mais recomendado (ZHOU G. – KRESTA S.M, 1998)

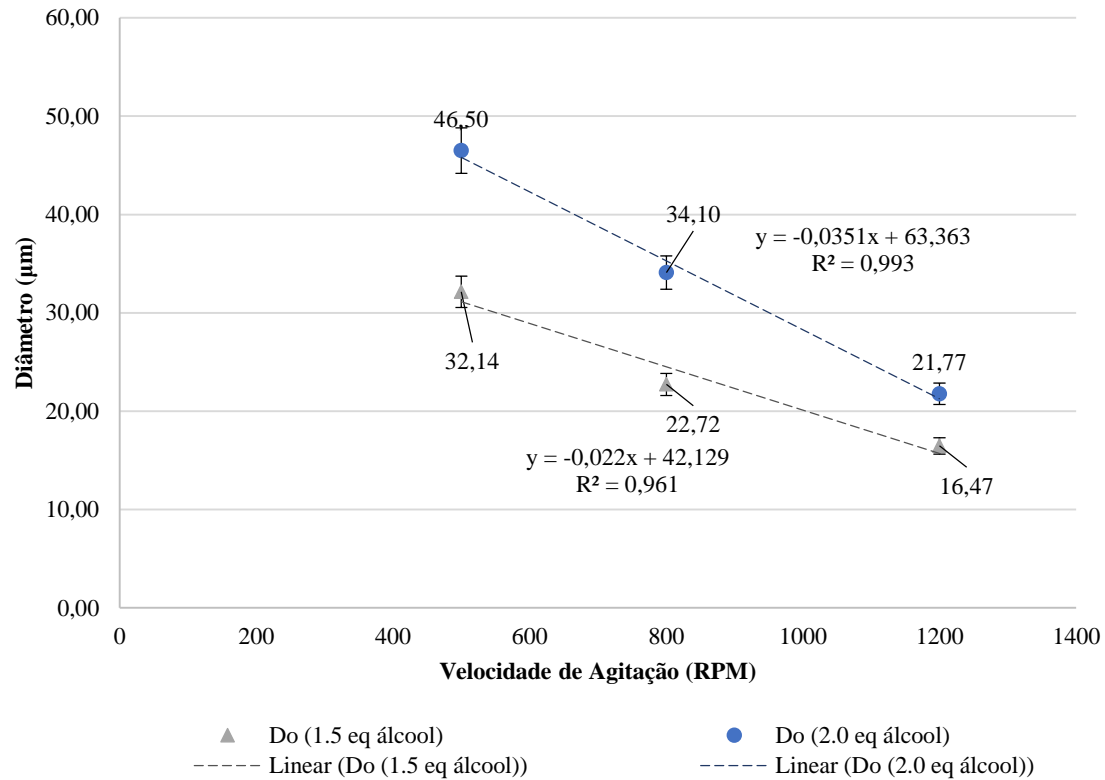
e considerando que, a única medida realmente absoluta da estabilidade de uma emulsão é a variação no número de gotas em função do tempo (SALAGER J.L, 1999).

FIGURA 20. Distribuição do diâmetro inicial da gota nas amostras para a diferentes condições de operação estabelecidas.



Na figura 21, pode-se observar que a relação entre o diâmetro e a velocidade de agitação é uma relação aproximadamente linear. Além disso, que as inclinações não são as mesmas e que a diferença do diâmetro médio da gota para as diferentes razões volumétricas é mais reduzida conforme aumenta a velocidade de agitação.

FIGURA 21. Relação linear entre a velocidade de agitação e o diâmetro da gota para as duas vazões volumétricas estudadas nas reações de transesterificação enzimática pela síntese do biodiesel com lipase solúvel.



Para aproveitar ao máximo a lipase, assim como determinar seu melhor desempenho, é preciso conhecer como sua atividade depende do microambiente onde se envolve, já que sua atividade interfacial pode ser afetada pela qualidade da interface. A atividade interfacial é dependente da composição geral do microambiente interfacial (concentração de substratos e enzima, temperatura, força iônica, pH), podem também depender da cinética de difusão como da partição dos substratos, produtos e inibidores presentes na mistura reacional. Esta mistura muda com o tempo de reação e com a presença da enzima, gerando também modificações na área interfacial que pelos métodos tradicionais não podem ser observadas. O monoglicerídeo e o diglicerídeo tem propriedades emulsificantes, de forma que, à medida que eles vão se formando, também modificam a tensão interfacial da mistura e, portanto, o diâmetro da gota.

5.3. Cinética da transesterificação enzimática do óleo de soja refinado catalisada pela lipase solúvel

O uso de lipase NS-40116 (conhecida também como Callera trans 1 ou Eversa Transform) na transesterificação enzimática para a produção de biodiesel tem sido estudada na literatura. Norbland et al. (2014) identificaram os parâmetros críticos na metanólise do óleo de canola, enquanto que Pedersen et al. (2014) trabalharam na etanólise do óleo de canola. De maneira que os experimentos de transesterificação de óleo de soja foram realizados de acordo às condições estabelecidas nesses trabalhos. Para entender melhor os resultados, estes foram agrupados para revisar os efeitos das principais condições de operação.

5.3.1. Ensaios experimentais de transesterificação enzimática de óleo de soja.

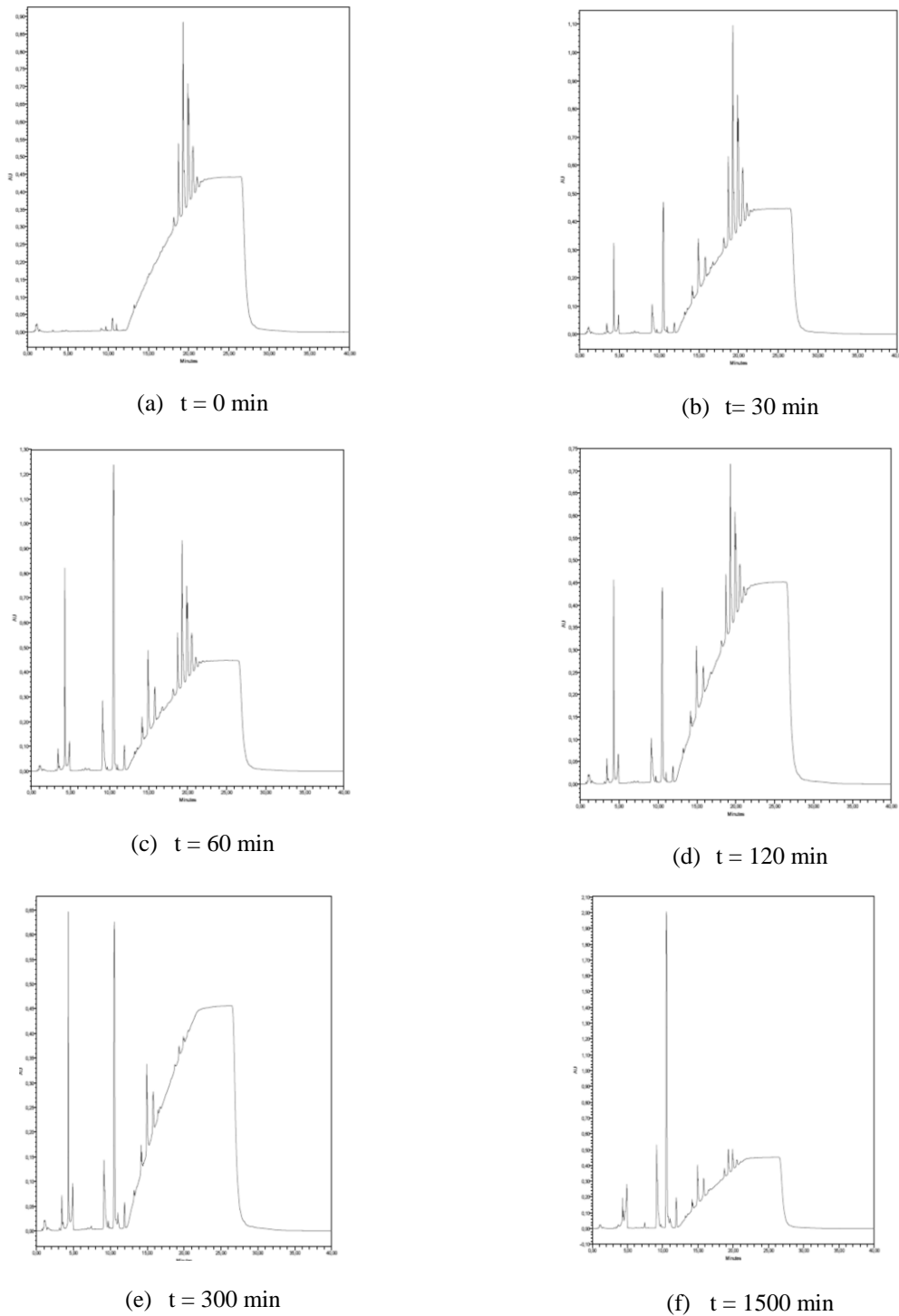
Os resultados foram obtidos pela quantificação de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos via cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). As concentrações dos ácidos graxos foram obtidas por titulação ácido-base. No caso da fase polar, a quantidade gerada é muito pequena para sua análise química, sendo estimada sua composição por balanços de massa.

5.3.1.1. Quantificação de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Para a quantificação do triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos foi adaptado o método proposto por Holčapek et al (1999) de cromatografia líquida - fase reversa (RP-HPLC), obtendo-se uma boa separação dos quatro grupos.

Na Figura 22 podem ser observados os cromatogramas das amostras coletadas em diferentes tempos da reação durante a reação de transesterificação de óleo de soja com álcool etílico em presença de lipase solúvel, obtidos durante os testes iniciais do método.

FIGURA 22. Cromatogramas RP-HPLC obtidos das amostras coletadas na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol com lipase líquida NS-40116



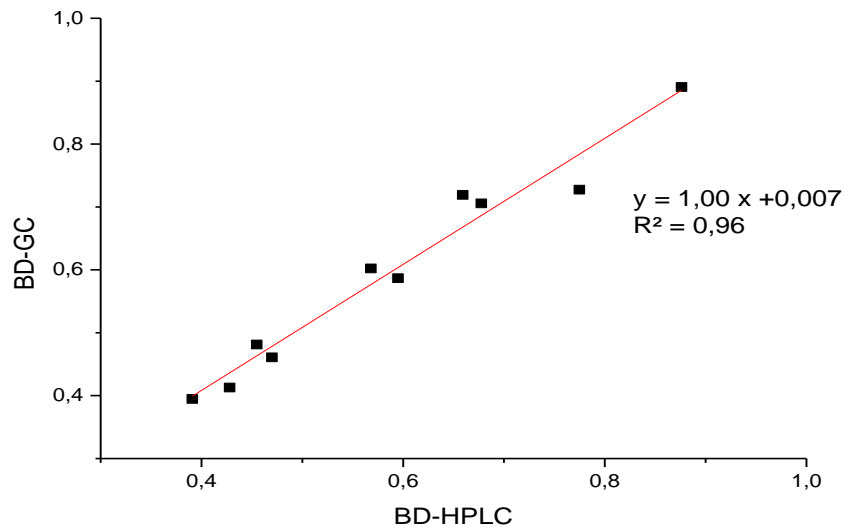
Condições de operação: álcool etílico 1.5 eq., água 10% w/w_{óleo}, lipase 1% w/w_{óleo}, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 RPM

Pode-se notar os quatros grupos bem separados e saindo na seguinte ordem: monoglicerídeos (M), ésteres etílicos do ácido graxo (BD), diglicerídeos (D) e triglicerídeos (T). No primeiro cromatograma (Fig. 22(a)) para $t=0$ min, pode-se observar principalmente os triglicerídeos presentes, e nas outras figuras como estes vão diminuindo até praticamente desaparecer. No caso do monoglicerídeos, são o primeiro grupo de picos a aparecer com tempo de retenção entre os 3 e 7 min aproximadamente. Eles aparecem a partir do cromatograma correspondente a $t=30$ min (Fig. 22(b)), aumentando sua presença e alcançando um máximo para logo começar a diminuir. Os diglicerídeos apresentam o mesmo comportamento, que aparecem ao princípio do gradiente no terceiro grupo. Por outro lado, os ésteres se apresentam na figura 22(b) e sua concentração vai crescendo até o final da reação.

Para fazer a identificação dos diferentes grupos, e frente à impossibilidade de disponibilizar de todos os padrões, foram analisados no HPLC amostras do solvente 2-propanol:hexano 5:4% v/v, de glicerol, de ácido oleico, óleo de soja refinado e azeite de oliva, além disso, também foram analisados os padrões 1,3-dioleína, éster de etil linoleato, éster de etil oleato, trilinoleato, trilinoleína e amostras da mistura reacional da reação de transesterificação e hidrolise. Isto para identificar os picos e os tempos de retenção (Apêndice A) para os monoglicerídeos, ésteres de etila dos ácidos graxos, diglicerídeos e triglicerídeos dos principais ácidos graxos presente no óleo: oleico ($C_{18:1}$), linoleico ($C_{18:2}$) e linoleico ($C_{18:3}$).

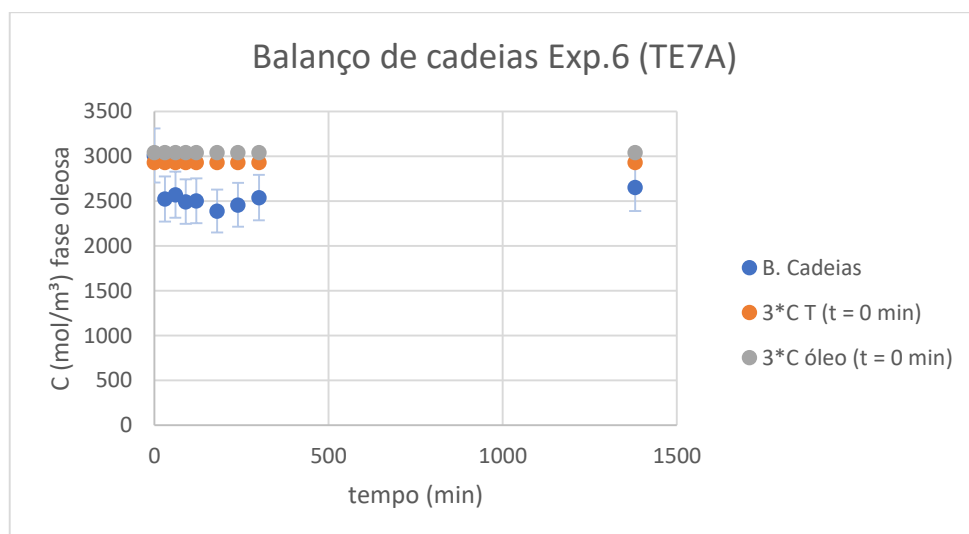
Com o fim de verificar os resultados obtidos no HPLC, amostras para um tempo específico e sob as mesmas condições foram analisadas tanto pela cromatografia gasosa quanto pela cromatografia líquida, com o propósito de quantificar o conteúdo de ésteres etílicos dos ácidos graxos. (Apêndice C). Na Figura 23, mostra-se a relação entre os dados obtidos na quantificação dos ésteres (BD) obtidos em GC e HPLC. A linha vermelha representa o ajuste linear.

FIGURA 23. Relação entre os dados obtidos na quantificação dos ésteres (BD) obtidos em GC e HPLC



Como pode ser observado, o resultado para o conteúdo de ésteres não varia muito entre os dois métodos. A desvantagem da cromatografia gasosa é que a presença dos glicerídeos afeta a coluna do equipamento, portanto, não pode ser usada para analisar os ésteres durante o tempo de reação.

FIGURA 24. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos na síntese enzimática de biodiesel etanólico a partir do óleo de soja.



Condições de operação: Álcool 2.0 eq., lipase 2% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C, reator aberto

Na figura 24, pode-se observar o balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos da transesterificação enzimática de óleo de soja com álcool etílico. O ponto cinza é a concentração inicial, assumindo que o óleo de soja alimentado está composto só por triglicerídeos. O ponto laranja representa a concentração inicial calculada a partir da concentração inicial de triglicerídeos ($t = 0$ min). O ponto azul representa o balanço das cadeias para cada tempo determinado a partir dos dados experimentais, e que apresenta uma diferença de aproximadamente 15% dos dados de entradas. Um comportamento que é similar para todos os experimentos (Gráficos no Apêndice B).

Isto ocorre pois para se fazer a quantificação foi assumida uma mesma absorvidade mássica para todos os componentes que possuem cadeias de ácido graxo (T, D, M, B, F). Isso se baseia na hipótese de que a maior absorção no UV se refere às duplas ligações das cadeias não saturadas e à ligação dupla no grupo carbonila da cadeia. Contudo existe uma diferença na quantidade média de duplas ligações por massa de componente entre os diferentes compostos. Além disso, outras ligações características de cada componente acabam afetando a absorvidade mássica média da substância, aumentando o desvio em relação à hipótese utilizada. Essa diferença pode ser o maior responsável pela falta de ajuste do modelo e será melhor estudada pelo grupo em trabalhos futuros.

5.3.1.2. Dados experimentais obtidos na reação de transesterificação do óleo de soja com álcool etílico em presença da lipase NS-40116.

Para a obtenção dos dados experimentais, para o ajuste do modelo proposto da cinética da síntese de biodiesel por transesterificação com lipase solúvel, foram realizados oito experimentos. Na Tabela 18, pode-se observar os principais resultados para cada experimento com as condições sob as quais foram realizados. No Apêndice B, os dados experimentais completos utilizados para o ajuste do modelo podem ser observados.

TABELA 18. Velocidade inicial, rendimento da reação e conteúdo de ésteres obtidos nas reações de transesterificação com lipases líquidas (água 10%_{w/w} óleo)

Exp.	Álcool (eq.)	Lipase (% w/w _{óleo})	Velocidade de agitação (RPM)	Velocidade inicial (mol _{BD} /min)	% Rendimento t = 300 min	Conteúdo de ésteres t = 1380 min (g _{BD} /g _{amostra})
1	1.5	1.0	800	13.46±1.85	34.54±11.46	56.45±13.39
2	1.5	2.0	800	15.56±0.68	45.55±5.47	58.53±2.45
3	1.5	0.5	1200	8.75±0.65	34.82±0.57	49.01±8.77
4	1.5	2.0	1200	14.19±0.86	36.26±11.18	51.93±9.4
5	2.0	0.5	800	1.76±0.11	11.19±8.78	48.65±15.33
6	2.0	2.0	800	7.21±0.66	39.31±2.17	82.55±7.17
7	2.0	0.5	1200	4.10±0.54	20.79±2.58	63.83±5.55
8	2.0	1.0	1200	5.12±0.22	28.91±19.81	45.55±7.72

De acordo com os resultados apresentados na tabela 18, os experimentos 2 e 5 apresentam a mais alta e a mais baixa velocidade inicial de reação, respectivamente. A mistura reacional da transesterificação é complexa e vai mudando suas propriedades com o tempo da reação. Por exemplo, no início da reação a fase polar localiza-se na parte superior do reator (e do tubo de amostra após a centrifugação) e a fase não polar no fundo. O comportamento é consistente com as densidades dos compostos envolvidos na mistura reacional ao início (Tabela 19). Experimentalmente, as mudanças podem ser evidenciadas logo ao centrifugar as amostras coletadas e as fases trocaram de lugar. No experimento 2, a mudança ocorreu depois de 30 min de início da reação, enquanto que no experimento 5 foi depois dos 300 min. No caso do glicerol, sua densidade a 20 °C é 1.2613 g/ml e a massa molecular é 92.09 g/mol.

TABELA 19. Densidades a 25 °C e massa molecular das misturas iniciais usadas na mistura reacional para as reações de transesterificação.

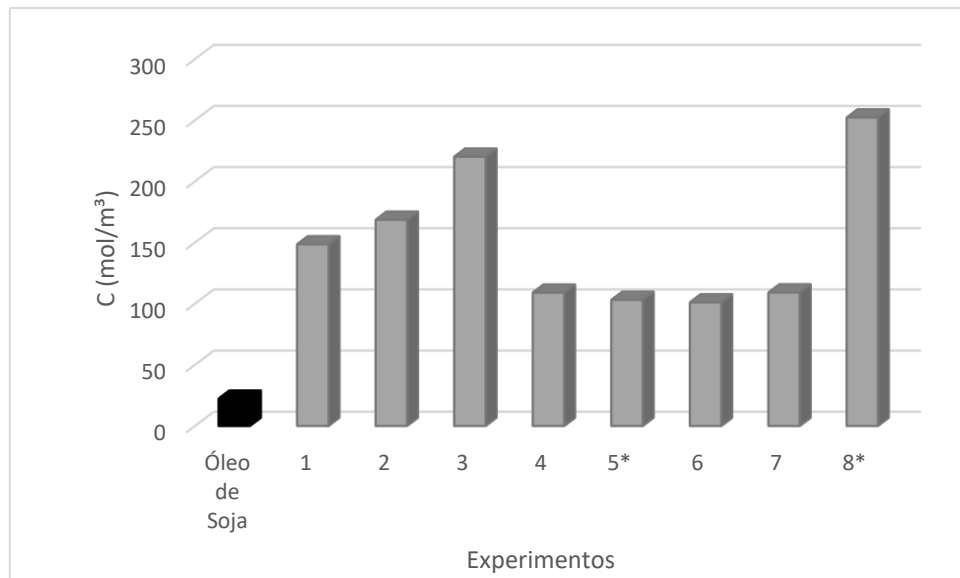
Espécies	Densidade (g/ml)	Massa molecular (g/mol)
Óleo de Soja Refinado	0.896 ± 0.036	874.8*
Álcool etílico (99.5%)	0.769 ± 0.027	46.06
Água destilada	1.004 ± 0.012	18.02

*Avelar (2009) massa molecular reportada para o óleo de soja Liza®

Por outro lado, comparando o rendimento da reação (300 min) e o conteúdo dos ésteres (1380 min), pode-se observar que o rendimento mais alto de reação foi encontrado com quantidades de álcool de 1,5 eq. (50% em excesso), enquanto que, a maior concentração de ésteres foi alcançada com quantidades de álcool de 2,0 eq. (100% excesso). A eficiência da catálise enzimática com lipase está associada com a dissolução completa dos substratos entre eles (AL ZUHAIR et al, 2007).

Com respeito aos ácidos graxos livres, na Figura 25 observa-se a concentração molar (mol/m^3) dos ácidos graxos no óleo de soja refinado e na mistura reacional para cada experimento no tempo de 300 min. Comparado com a concentração dos ácidos graxos no óleo inicial, conclui-se que a hidrólise não pode ser desprezada. Isso, se deve à alta quantidade de água, mas a redução na concentração de água pode impactar negativamente na atividade da lipase (NORDBLAND et al 2014, PEDERSEN et al., 2014). Ao comparar os experimentos 2 e 6 (Tabela 18), que tiveram melhores resultados com respeito à produção dos ésteres e cujas condições só são diferentes na quantidade do álcool, pode-se observar que o experimento 2 tem a maior quantidade dos ácidos graxos livres. Neste experimento a quantidade do álcool é mais baixa, e ainda que a velocidade inicial de reação e seu rendimento aos 300 min sejam mais alto a concentração dos ésteres ao final foi menor. O experimento 5, tem a velocidade inicial mais baixa e a concentração dos ácidos graxos é similar a outros experimentos só que para um tempo maior.

FIGURA 25. Concentração molar (mol/m^3) dos ácidos graxos no óleo de soja refinado e na mistura reacional para cada experimento no tempo de 300 min.



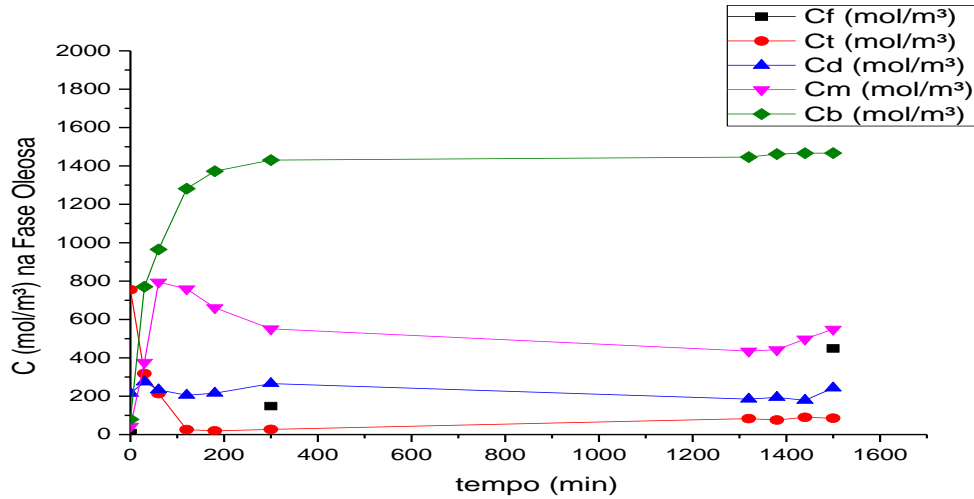
* tempo = 540 min

5.3.2. Influência da concentração de enzima na cinética de reação

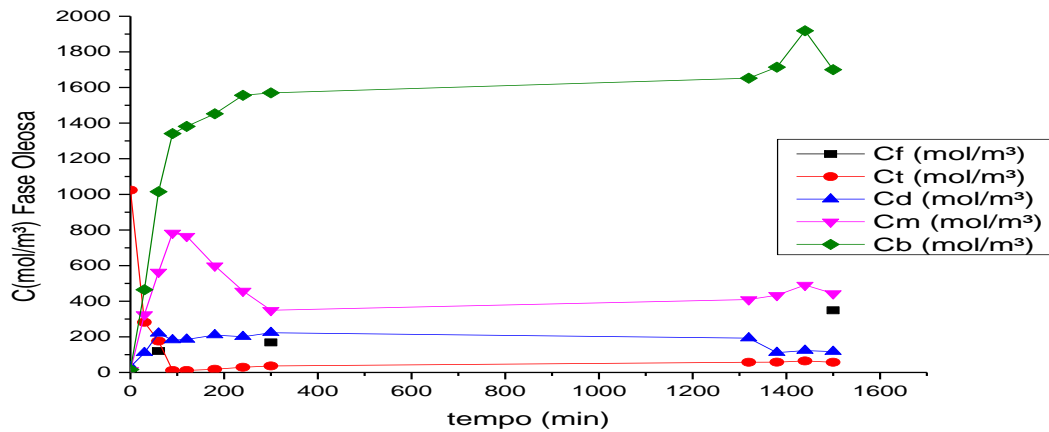
De acordo com Pedersen et al. (2014), um incremento na velocidade de reação é observado quando se incrementa a concentração de enzimas. Eles estudaram a influência da concentração de enzima para três cargas (0.5 % w/w, 1.0 % w/w e 2.0 % w/w) a 1400 RPM com impelidor de turbina Rushton e em 0.20% w/w de água. Observando-se os resultados da Tabela 18, e comparando os experimentos em duplas (1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8), pode-se confirmar que à medida que se incrementa a concentração de enzima, a velocidade da reação é mais alta.

A Figura 26 apresentam o perfil de concentração em função do tempo para os experimentos 1 e 2, onde as condições de operação são as mesmas a exceção da concentração de lipase. Pode-se observar que para um mesmo tempo a concentração dos ésteres é mais alta para a concentração maior da enzima (2.0 % w/w) (Fig. 26 (b)).

FIGURA 26. Concentração molar (mol/m^3) na fase oleosa em função do tempo para a reação de transesterificação do óleo de soja com lipase NS-40116



(a) lipase 1,0 % w/w óleo



(b) lipase 2,0 % w/w óleo

Condições de operação: 1,5 eq do álcool, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C.

Cf = Concentração de ácidos graxos, Ct = Concentração de triglicerídeos, Cd = Concentração de diglicerídeos, Cm = Concentração de monoglicerídeos (mas ácidos graxos) e Cb = Concentração de ésteres (biodiesel)

Não obstante, para maximizar o uso de lipase é preciso considerar outros aspectos. Observa-se a mesma concentração de lipase (2,0% w/w_{óleo}) sob diferentes condições: experimentos 2, 4 e 6. O diâmetro inicial da gota para estes experimentos foi 22.72 μm , 16.47 μm e 21.77 μm respectivamente. Note-se na Tabela 18, que as concentrações de ésteres nos experimentos 2 e 4 são próximas, apesar da área interfacial no experimento 4 ser maior (Eq. 13). Desse modo, a área interfacial livre disponível no experimento 2 é menor (vide Eq. 14). O experimento 6 tem a maior concentração dos ésteres ao final da reação e tem uma área livre similar ao experimento 2. De modo que, a baixa velocidade de reação no início do experimento 6 pode ser consequência de pouca disponibilidade de área interfacial livre (por saturação), já que a alta quantidade da fase polar e baixa rotação levam ao diâmetro da gota a dobrar em relação ao experimento 4. Outros fatores como a inibição pela alta concentração do álcool podem contribuir também para a baixa velocidade da reação inicial (PEDERSEN A. T. et al, 2014). Nestes experimentos, pode-se demonstrar que a influência de lipase na cinética da reação de transesterificação com lipase líquida está ligada com a área interfacial.

5.3.3. Influência da velocidade de agitação na cinética de reação

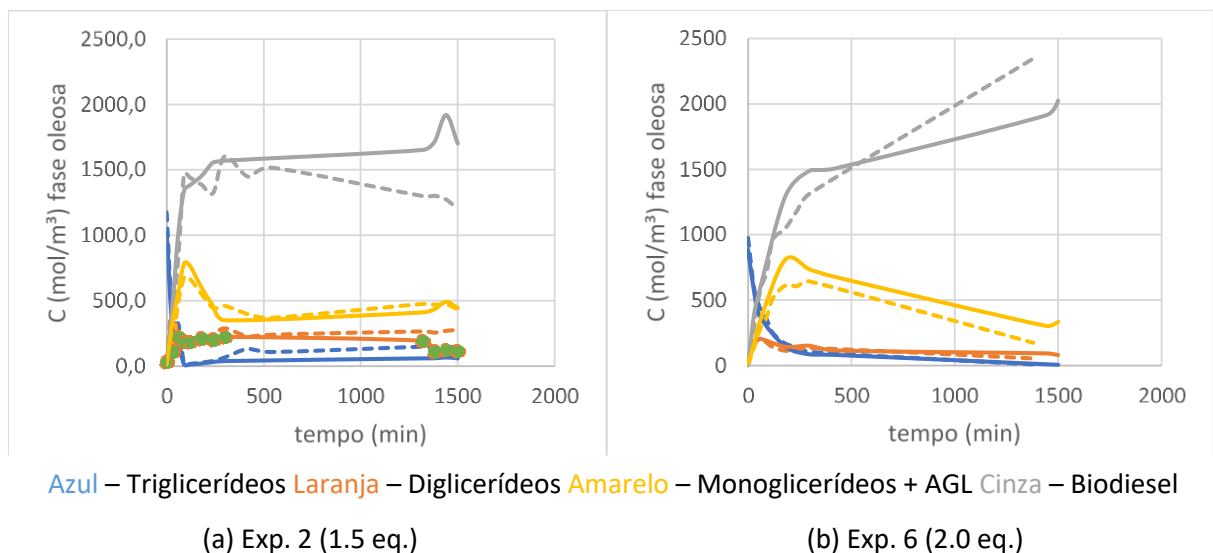
Na reação de transesterificação, a velocidade de agitação está associada com a área interfacial. Um aumento na velocidade de agitação gera um decréscimo no tamanho da gota e, portanto, um aumento na área interfacial (Fig. 21).

Para determinar sua influência, devem ser analisados em duplas os experimentos 2 e 4 e 5 e 7 (Tabela 18). Nestes experimentos pode-se confirmar, novamente, a relação entre a velocidade de agitação e a concentração de enzima. Para a dupla dos experimentos 5 e 7 com baixa concentração de enzima, com o aumento da velocidade de agitação e, por conseguinte, da área interfacial, o rendimento da reação de transesterificação e o conteúdo de ésteres melhorou. Contudo, para os experimentos 2 e 4, onde a concentração da enzima é muito mais alta, o rendimento da reação de transesterificação diminuiu com o aumento da área interfacial. A área interfacial livre vai depender da área ocupada pela enzima em todas suas formas (Eq. 14).

5.3.4. Influência da concentração do álcool

O rendimento da reação de transesterificação depende da concentração do álcool, neste caso álcool etílico. A formação dos ésteres está limitada pela adição insuficiente do álcool. Pode-se comparar os resultados obtidos de concentração dos ésteres ao final da reação nos experimentos 2 e 6 (Tabela 18). A diferença entre os dois experimentos é a quantidade do álcool alimentada. De fato, na Figura 27(b) pode-se observar que a reação ainda não terminou e pode seguir reagindo até o álcool se esgotar.

FIGURA 27. Dados experimentais obtidos para o reator aberto (traço de ponto) e o reator fechado (traço sólido) nos experimentos 2 e 6



Condições de operação: Lipase 2% w/w óleo, água 10%, 800 RPM, 35 °C

O problema das concentrações altas do álcool é que pode ocasionar a inibição da enzima. Isso poderia ser a causa para que os experimentos com 2.0 eq. de álcool (100% em excesso) tenham a velocidade inicial de reação baixa (exp. 5 – 8). Além disso, o álcool pode desnaturar a enzima. Porém, o etanol é menos agressivo para a lipase que o metanol (FERNANDEZ et al, 2009).

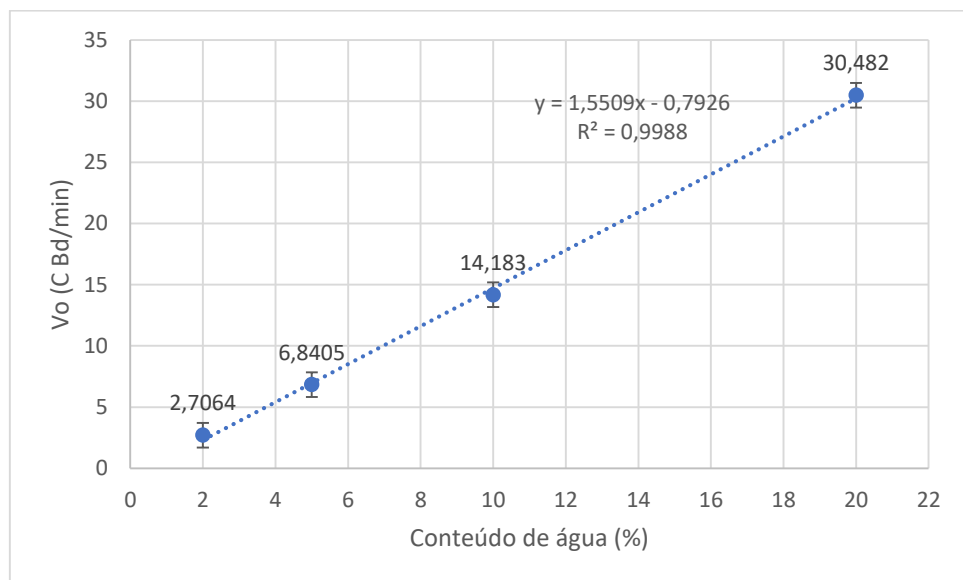
O álcool, também, assiste a solubilidade dos substratos e dos produtos, influenciando nas interações das ligações com a enzima e favorecendo à alcoólise sobre a hidrólise. A

presença do álcool afeta a reatividade do monoglicerídeo e o glicerol, melhorando sua solubilidade na fase polar e fase apolar respectivamente (FIRDAUS et al, 2016). O álcool também favorece a solubilidade dos ácidos graxos, incrementando sua atividade na interface (esterificação).

5.3.5. Influência da concentração de água

A presença de água, na reação de transesterificação para a síntese de biodiesel com lipase solúvel, é fundamental para a ativação de lipase (FIRDAUS et al, 2016). Na Figura 28, pode-se verificar a variação da velocidade inicial de reação em função do conteúdo de água. A água, além de solubilizar a lipase, garante a formação da interface entre o óleo e a água. No primeiro experimento (2% água), a água adicionada está constituída pela lipase e o conteúdo da água no álcool (99,5% de pureza). A desvantagem é que a presença de água favorece a hidrólise do óleo, gerando ácidos graxos (Fig. 25) (NIELSEN P.M. et al, 2016).

FIGURA 28. Variação da velocidade inicial em função do conteúdo de água na reação de transesterificação enzimática de óleo de soja



Condições de operação: 1.5 eq. álcool, lipase 1% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C

5.4. Avaliação do modelo proposto para a síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando lipase solúvel

Para a avaliação do modelo proposto para a síntese enzimática de biodiesel etanólico a partir do óleo de soja utilizando lipase solúvel NS-40116 foram realizadas preliminarmente corridas do modelo com todos os dados experimentais obtidos. Para o ajuste do modelo foram descartados os dados dos experimentos cujo balanço de cadeias apresentam erros acima de 20% (TE1A, TE2A e TE3A). No caso das hidrólises, também estes dados não foram usados para o ajuste. O método usado para a quantificação por HPLC não permite determinar o conteúdo dos ácidos graxos gerados. No Apêndice D, pode-se ver as curvas para um ajuste preliminar com todos os experimentos.

5.4.1. Validação da determinação do volume da fase polar

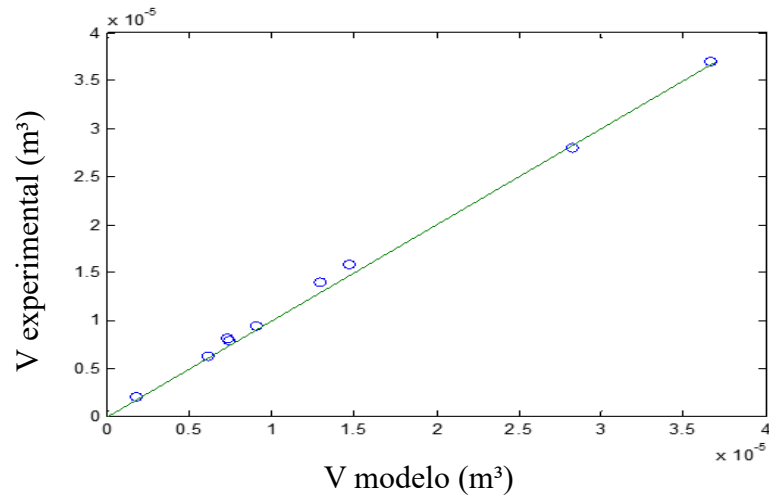
Para validar a determinação do volume da fase polar (Eq. 40), foi comparado o volume reportado pelo modelo com o volume experimental de uma mistura feita a 35 °C. Na Tabela 20, pode-se observar os dados experimentais para as diferentes misturas.

TABELA 20. Volumes experimentais usados para a validação do cálculo de volume da fase polar no modelo

Mistura	Massa (g±0,01)			Moles			Volume (mL)
	Etanol	Glicerol	Água	Etanol	Glicerol	Água	
1	4.6	9.25	1.81	0.10	0.10	0.10	15.8±0.1
2	0	9.26	1.8	0.00	0.10	0.10	9.4±0.1
3	4.6	9.25	0	0.10	0.10	0.00	14.0±0.1
4	4.6	0	1.8	0.10	0.00	0.10	7.9±0.1
5	0	9.25	0	0.00	0.10	0.00	8.1±0.1
6	4.83	0	0	0.11	0.00	0.00	6.3±0.1
7	0	0	1.8	0.00	0.00	0.10	2.1±0.1
8	18.01	0	6.11	0.39	0.00	0.34	28 ±1
9	23.82	0	7.3	0.52	0.00	0.41	37±1

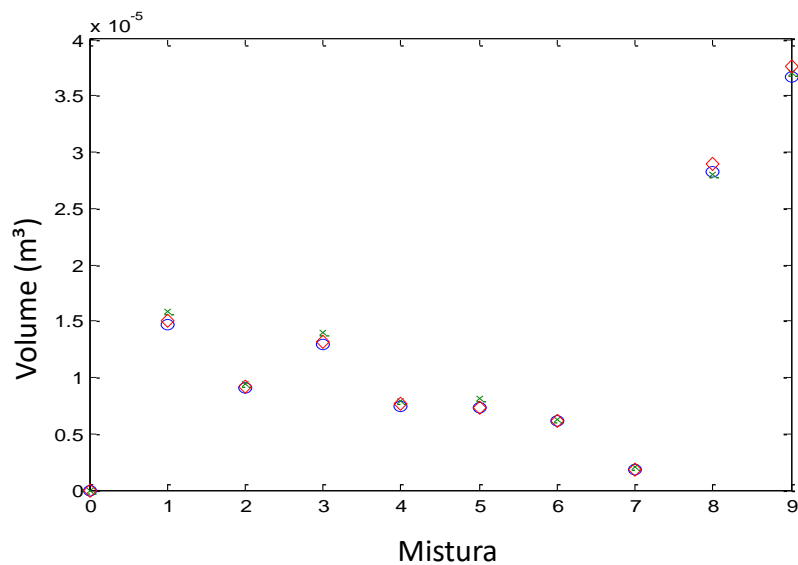
Na figura 29, pode-se observar a relação entre os volumes da fase polar obtidos experimentalmente e os volumes calculados pelo modelo. A relação entre os volumes é linear.

FIGURA 29. Relação entre os volumes da fase polar experimentais e os volumes calculados pelo modelo



Na figura 30, pode-se observar o volume experimental, ideal e do modelo para cada mistura. Concluindo que, o cálculo do volume para a fase polar do modelo é confiável.

FIGURA 30. Volume experimental, volume ideal e o volume calculado pelo modelo para a fase polar para diferentes misturas

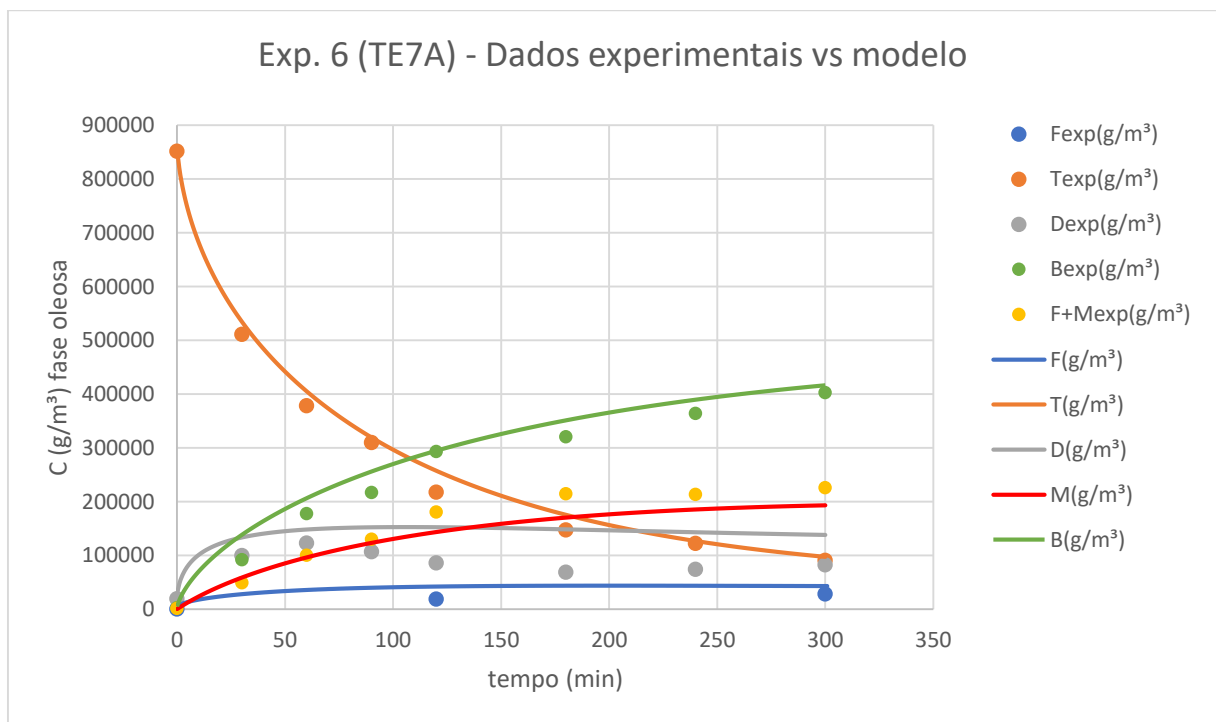


Legenda: (o) Volume do modelo (x) Volume experimental (◇) Volume ideal

5.4.2. Ajuste do modelo matemático

O modelo foi ajustado com os dados das primeiras 5 horas, considerando os resultados obtidos para a estabilidade da lipase. Os dados foram usados em concentração mássica. Na Figura 31, pode-se ver o perfil de concentração mássica, para o experimento 6 (TE7A). É importante ressaltar que para o ajuste só foram usados os dados experimentais da concentração mássica de triglicerídeos, diglicerídeos, etil ésteres (biodiesel) e a mistura de monoglicerídeos e os ácidos graxos. Os dados experimentais dos ácidos graxos não foram usados no ajuste, e no gráfico pode se observar como a curva dos ácidos graxos gerada pelo modelo coincide com os dados experimentais. No Apêndice B estão as curvas para cada experimento.

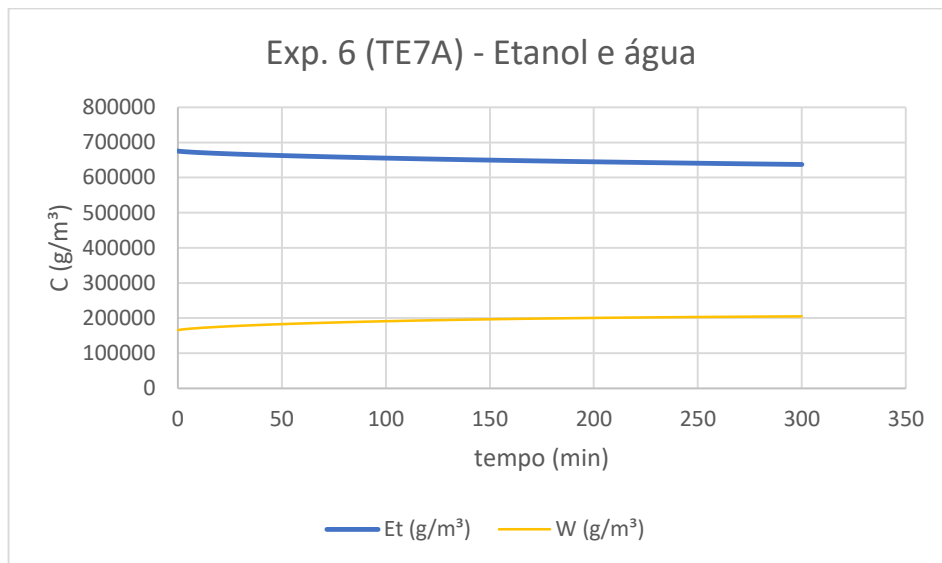
FIGURA 31. Concentração mássica da fase oleosa para a reação de transesterificação enzimática para o experimento 6 (TE7A)



Condições de operação: Álcool 2,0 eq., lipase 2,0 % w/w óleo, água 10 % w/w óleo, 800 RPM, 35 °C

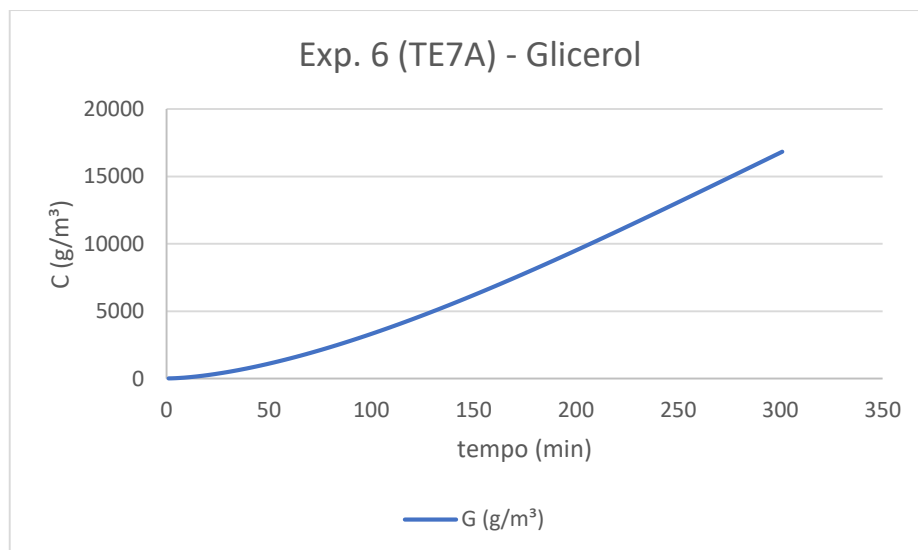
A partir do modelo é possível estimar o perfil de concentração da fase apolar. Experimentalmente, não foi possível determinar o perfil de concentração da fase polar. Nas Figuras 32 e 33 podem-se observar estas curvas para o experimento 6 (TE7A).

FIGURA 32. Concentração mássica (g/m^3) estimada do etanol e água na fase polar para a reação de transesterificação enzimática com lipase líquida



Condições de operação: Álcool 2,0 eq., lipase 2,0 % w/w óleo, água 10 % w/w óleo, 800 RPM, 35 °C

FIGURA 33. Variação estimada da concentração mássica do glicerol na reação de transesterificação enzimática

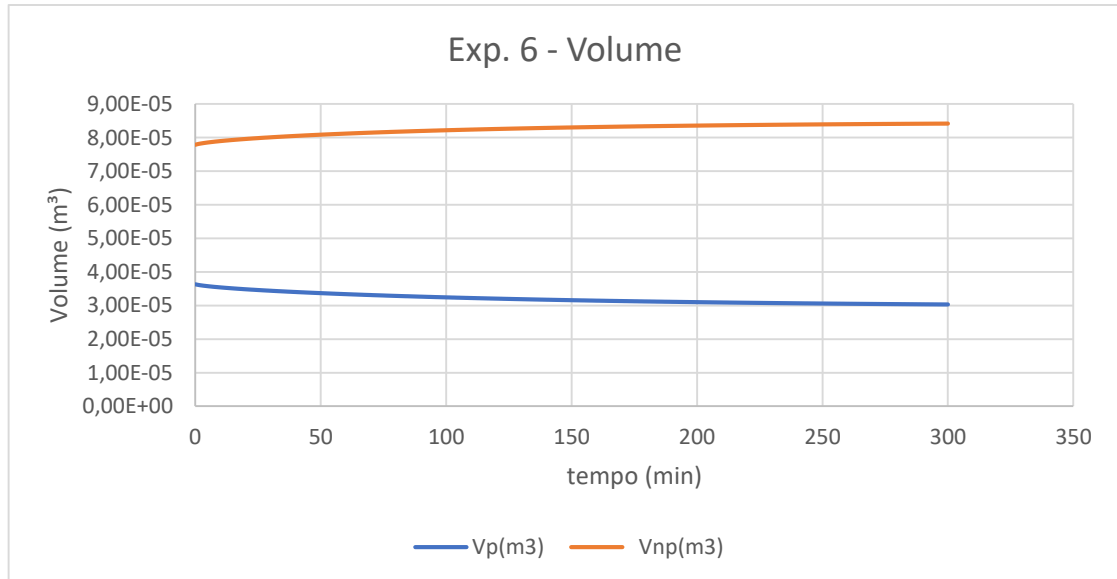


Condições de operação: Álcool 2,0 eq., lipase 2,0 % w/w óleo, água 10 % w/w óleo, 800 RPM, 35 °C

O modelo baseia-se na variação do volume de cada fase no tempo. O perfil da variação do volume de cada fase ao longo do tempo pode ser determinado (Figura 34). Para o

experimento 6, o volume inicial à temperatura ambiente da fase polar e da fase não polar foi $2.9 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ e $8.5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$, respectivamente.

FIGURA 34. Variação de volume cada fase durante a reação de transesterificação enzimática de biodiesel (Experimento 6)



Condições de operação: Álcool 2,0 eq., lipase 2,0 % w/w óleo, água 10 % w/w óleo, 800 RPM, 35 °C

O ajuste foi realizado usando a ferramenta do programa Matlab® LSQNONLIN para a resolução de problemas por mínimos-quadrados não-linear. Os parâmetros cinéticos obtidos com o modelo para a resposta da função objetivo mais baixa (1.14814×10^{12}) estão reportados na Tabela 21.

TABELA 21. Parâmetros cinéticos do modelo matemático da síntese enzimática de biodiesel etanólico com a lipase líquida NS-40116

Parâmetro	Depois do ajuste
$K_1 \left(\frac{mol}{m^3}\right)$	1.2125×10^{-02}
$k_2 \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$8.2587 \times 10^{+01}$
$k_{-2} \left(\frac{m^3}{min}\right)$	$1.0289 \times 10^{+03}$
$k_3 \left(\frac{m^3}{min}\right)$	$1.0274 \times 10^{+06}$
$k_{-3} \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$7.3091 \times 10^{+05}$
$k_4 \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$1.1282 \times 10^{+03}$
$k_{-4} \left(\frac{m^3}{min}\right)$	$2.2372 \times 10^{+04}$
$k_5 \left(\frac{m^3}{min}\right)$	$6.2899 \times 10^{+03}$
$k_{-5} \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$3.5147 \times 10^{+03}$
$k_6 \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$3.1269 \times 10^{+03}$
$k_{-6} \left(\frac{m^3}{min}\right)$	$7.2374 \times 10^{+07}$
$k_7 \left(\frac{m^3}{min}\right)$	$1.2439 \times 10^{+05}$
$k_{-7} \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$9.9092 \times 10^{+01}$
$k_8 \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$4.3992 \times 10^{+01}$
$k_{-8} \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$1.1167 \times 10^{+02}$
$k_9 \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$1.1596 \times 10^{+02}$
$k_{-9} \left(\frac{m^3}{mol \cdot min}\right)$	$3.2364 \times 10^{+01}$
$K_{10} \left(\frac{m^3}{mol}\right)$	3.0050×10^{-07}

De forma a minimizar o número de parâmetros a ajustar, foi feito um ajuste assumindo que as constantes de velocidade dos passos intermédios da reação de transesterificação têm o mesmo valor. Quer dizer que,

$$k_2 = k_4 = k_6 \quad (49)$$

$$k_{-2} = k_{-4} = k_{-6} \quad (50)$$

$$k_3 = k_5 = k_7 \quad (51)$$

$$k_{-3} = k_{-5} = k_{-7} \quad (52)$$

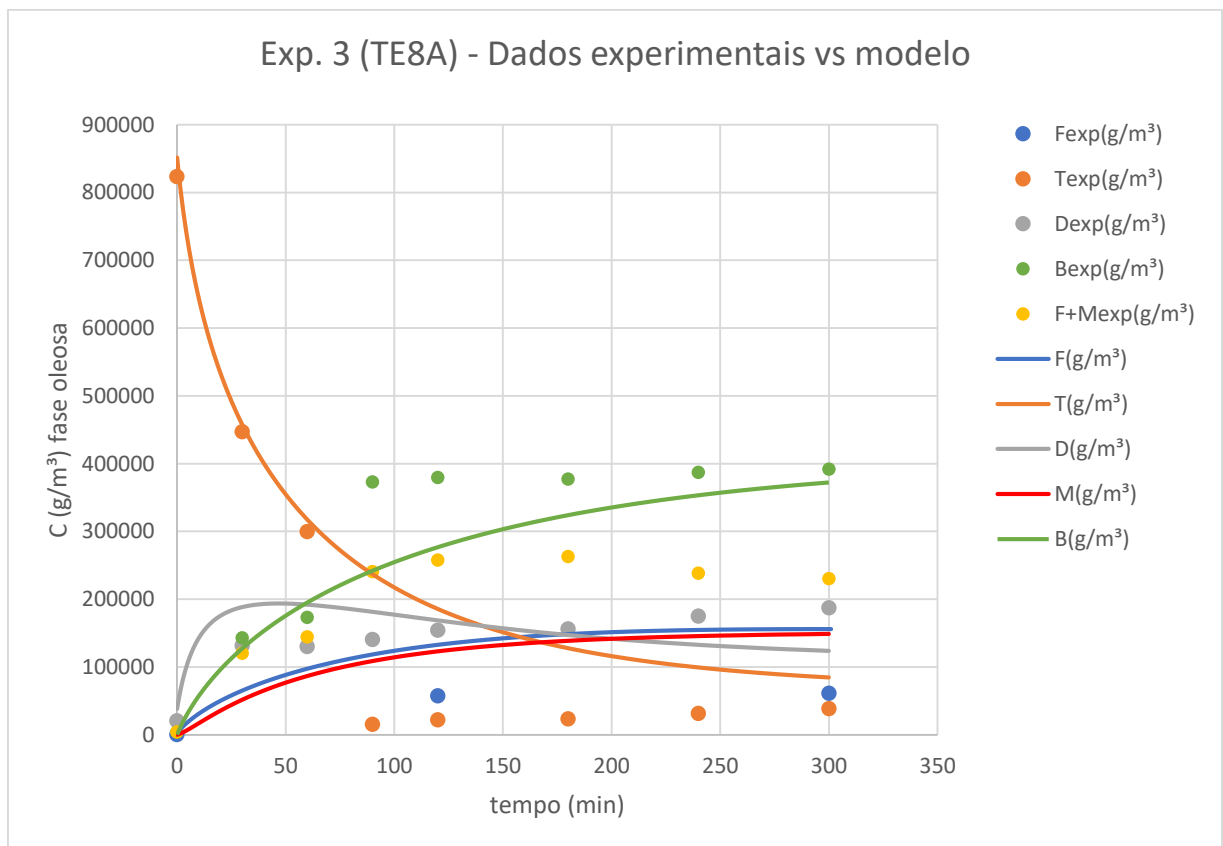
Desse modo, os parâmetros cinéticos obtidos estão reportados na Tabela 22. A resposta da função objetivo foi 1.30066×10^{12} (local mínimo possível).

TABELA 22. Parâmetros cinéticos do modelo matemático da síntese enzimática de biodiesel etanólico com a lipase líquida NS-40116 assumindo que os valores de k são os mesmos nas reações intermédias.

Parâmetro	Depois do ajuste
$K_1 \left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right)$	$2.13 \times 10^{+02}$
$k_2 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	$2.79 \times 10^{+03}$
$k_{-2} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	$1.86 \times 10^{+05}$
$k_3 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	$3.89 \times 10^{+04}$
$k_{-3} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	$1.13 \times 10^{+04}$
$k_8 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	$1.94 \times 10^{+01}$
$k_{-8} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	$1.74 \times 10^{+01}$
$k_9 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	$4.31 \times 10^{+01}$
$k_{-9} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	$8.41 \times 10^{+00}$
$K_{10} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol}} \right)$	1.36×10^{-07}

Na figura 35, pode-se observar o novo ajuste assumindo que as constantes cinéticas dos passos intermediários são as mesmas. Embora, o ajuste não apresente uma melhoria com respeito ao ajuste anterior, os resultados do modelo simplificado tendem a estimar uma concentração ainda maior de diglicerídeos e dos ácidos graxos que o experimental.

FIGURA 35. Concentração mássica da fase oleosa para a reação de transesterificação enzimática assumindo os mesmos valores para as constantes das reações intermediárias (Experimento 3 (TE8A)).

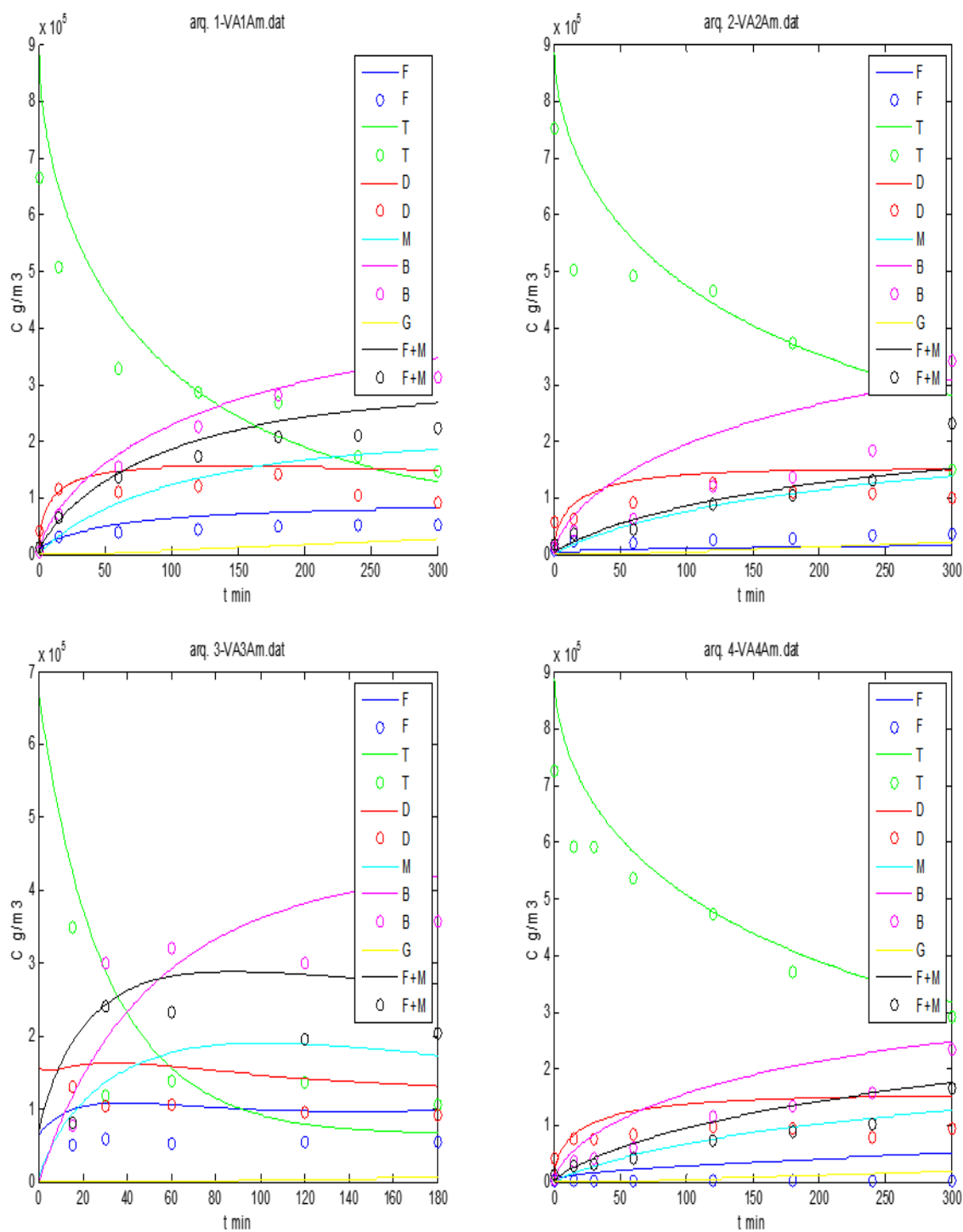


Condições de operação: Álcool 1.5 eq., lipase 0.5 % w/w óleo, água 10 % w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C

5.4.3. Validação do modelo

Para validar o modelo, foram usados os dados de quatro experimentos. Estes experimentos foram realizados mantidas as condições de conteúdo de álcool, concentração de enzima, velocidade de agitação e temperatura. O conteúdo de água foi mudado para cada experimento. Na Figura 36, podem ser observadas as curvas obtidas durante a validação.

FIGURA 36. Perfis de concentração mássica da fase oleosa obtidos durante a validação da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando lipase solúvel



Condições de operação: Álcool 1,5 eq., lipase 1,0 % w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C

VA1A: água 10 % w/w óleo; VA2A: água 2 % w/w óleo;

VA3A: água 20 % w/w óleo; VA4A: água 5 % w/w óleo,

VI. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

1. A lipase solúvel NS-40116 tem um conteúdo de proteínas: $31,454 \pm 0,002$ mg proteína/ml lipase), uma atividade hidrolítica 48048 ± 653 LU/ml e uma massa molecular de 31 kDa.
2. O biodiesel etanólico com maior conteúdo de ésteres $82,55 \pm 7,17\%$ a partir do óleo de soja refinado obteve-se a partir das seguintes condições de operações: 2,0 eq. álcool etílico, água 10 % w/w_{óleo}, lipase 2,0% w/w_{óleo}, 800 RPM e 35 °C.
3. O diâmetro inicial da gota da mistura álcool-água-óleo aumenta para um maior volume da fase polar (água-álcool), mas diminui para maiores velocidades de agitação, afetando inversamente a área interfacial.
4. A presença de água, na reação de transesterificação para a síntese de biodiesel com lipase solúvel, é fundamental para a ativação de lipase afetando sua velocidade inicial e o rendimento da reação.
5. A cinética da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando a lipase solúvel NS-40116 depende do conteúdo de enzima, conteúdo de álcool, conteúdo de água e velocidade de agitação.
6. A mistura reacional da reação de transesterificação é um sistema dinâmico cujas propriedades e volume mudam durante a reação, afetando a área interfacial da emulsão.
7. O modelo proposto se ajustou aos dados experimentais e foram determinados os parâmetros cinéticos.
8. Sugere-se estudar a estabilidade operacional da lipase NS-40116 sob as condições de operação estudadas para a transesterificação.
9. Deve-se validar a metodologia de quantificação dos ésteres e glicerídeos por cromatografia líquida.
10. Sugere-se testar o modelo em outras reações (esterificação e hidrólise) para obter um melhor ajuste de seus parâmetros. Além disso, o validar para outros substratos e lipases líquidas.

11. Recomenda-se estudar as mudanças na área interfacial considerando outras razões de volume e velocidades de agitação, além disso, o efeito da presença de outras espécies envolvidas que podem afetar a tensão interfacial da mistura (lipase, ácidos graxos, monoglicerídeos).
12. Deve-se estudar a cinética para lipase imobilizada, de forma que, o modelo possa se adaptar para descrever a catálise para problemas enzimáticos trifásicos.
13. Sugere-se estudar o efeito das interações de outras espécies envolvidas (ex. glicerol, ácidos graxos, monoglicerídeos e álcool) na síntese de reações catalisadas por lipases.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIOVE. Estatística mensal. Novembro, 2017. Disponível em: http://www.abiove.org.br/site/FILES/Portugues/07112017-161705-07_11_2017_-_nota_estatisticas_complexo_soja.pdf. Acesso em dezembro, 2017
2. ALOULOU A. et al Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2006, 1761, 995 – 1013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198106001922>
3. AL-ZUHAIR, S et al. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, 2003, 38, 1155-1163. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202002790>
4. AL-ZUHAIR, S et al. Investigation of the specific interfacial area of a palm oil–water system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Wiley Online Library, 2004, 79, 706-710. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-012-1116-z>
5. AL-ZUHAIR, S et al. 2004. High enzyme concentration model for the kinetics of hydrolysis of oils by lipase. **The Chemical Engineering Journal**, 2004, 103, 7-11. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/233882676_High_enzyme_concentration_model_for_the_kinetics_of_hydrolysis_of_oils_by_lipase
6. AL-ZUHAIR, S. Production of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils: A Kinetics Study. **Biotechnology Progress**, American Chemical Society, 2005, 21, 1442-1448. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp050195k/full>

7. AL-ZUHAIR, S. et al. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, 2007, 42, 951 – 960. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511307000694>
8. AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, John Wiley & Sons, Ltd., 2007, 1, 57-66. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.2>
9. ANDRADE, Débora França. Caracterização de biodiesel através da separação dos constituintes por cromatografia líquida. Tese Doutorado, 2011, UFRJ/EQ
10. ANP. **Boletim mensal do biodiesel: março 2017**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/boletins-anp/2386-boletim-mensal-do-biodiesel> Acesso em maio, 2017
11. ANP. **Boletim mensal do etanol: fevereiro. 2017**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/boletins-anp/2385-boletim-do-etanol> Acesso em maio, 2017
12. ANP. **Oportunidades na Produção e no Abastecimento de Combustíveis no Brasil: março. 2017**. Brasília, 2017. Disponível em: http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/Livreto_Oportunidades_na_Producao_e_no_Abastecimento_v3.pdf. Acesso em dezembro, 2017
13. ATABANI et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2012, 16, 2070 – 2093. Abril 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112000044>
14. AVHAD, M. - MARCHETTI, J. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2015, 50, 696 – 718. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115004979>

15. BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**. 2000, v. 102, n. 2, p. 133-153 Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200002\)102:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO;2-X)
16. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976, v. 72, p. 248-54. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
17. BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Plano Nacional de Energia 2030** / Ministério de Minas e Energia; colaboração Empresa de Pesquisa Energética. Combustíveis Líquidos. 12 v. 2007. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/10584/1139260/10.+Combust%C3%ADveis+L%C3%ADquidos+%28PDF%29/9d5d14ce-9acf-46a3-8f0f-c440f904fdf8?version=1.1>
Acesso em novembro, 2016
18. BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Plano Nacional de Energia 2030** / Ministério de Minas e Energia; colaboração Empresa de Pesquisa Energética. Biomassa. 12 v. 2007. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/10584/1139260/08.+Biomassa+%28PDF%29/0a02b482-db1a-4dbe-9388-baadbc168ae7?version=1.1> Acesso em novembro, 2016
19. BRASIL. Departamento de combustíveis renováveis. Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal do Combustíveis Renováveis**. Edição 102. Agosto, 2016 Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/1138769/1732805/Boletim+DCR+n%C2%BA+102+agosto+de+2016.pdf/7d4133ca-eab8-4c39-a12d-83343fe08b7c> Acesso em novembro, 2016
20. BUESO, F. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production and quality with *Jatropha curcas* oil: exploring its potential for Central America. **J. Biol Eng, Springer Science mathplus Business Média**, 2015, 9, Julio, 2015. Disponível em: <https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-015-0009-9>.

21. CSERNICA, S. N. – HSU, J. T. Simple and Efficient Method for the Analysis of Transesterification Reaction Mixtures for Biodiesel Production by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. **Energy & Fuels**, 2010, 24, 6131-6141. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef1009082>
22. CESARINI et al. Exploring a new, soluble lipase for FAMES\production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, 2013, 48, 484 – 487. Fevereiro 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511313000408>>
23. CESARINI et al. Moving towards a Competitive Fully Enzymatic Biodiesel Process. **Sustainability**, 2015, 7, 7884, Juno 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2071-1050/7/6/7884/htm>>
24. CHEIRSILP, B. et al. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, 2008, 42, 261 – 269. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X08002465>. Acesso em: novembro, 2016
25. CHRISTOPHER, L. P. et al. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, 2014, 119, 497 – 520, Janeiro 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261914000361>.
26. FABER, K. BIOTRANSFORMATIONS IN ORGANIC CHEMISTRY. A textbook. 5^a ed. Springer, Germany, 2004. p. 12-21 e 94-123
27. FEDOSOV et al. Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase Candida antarctica lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2013, 85, 86, 156 – 168. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117712002639>

28. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010, 62, 197 – 212, novembro, 2009. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117709002914
29. FIRDAUS, M. Y. et al. Development of kinetic model for biodiesel production using liquid lipase as a biocatalyst, esterification step. **Biochemical Engineering Journal**, 2016, 105, Part A, 52 – 61, setembro, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X15300486>
30. FIRDAUS, M. Y. et al. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016, 133, 55 – 64, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117716301345>
31. FUKUDA et al. Biodiesel fuel production by transesterification of oils **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2001, 92, 405 – 416 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172301802887>
32. GONZALEZ-BACERIO, J. et al. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción superior interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, scieloco, 2010, 12, 113 – 140, setembro, 2009. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012334752010000100013&nrm=iso
33. GULDHE, A. et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2015, 41, 1447 – 1464, setembro, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114008089>
34. HASAN, S. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39, 235 – 25. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905004606>

35. HERMANSYAH et al. Rigorous kinetic model considering positional specificity of lipase for enzymatic stepwise hydrolysis of triolein in biphasic oil--water system **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2010, 33, 787-796. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-009-0400-3>
36. HOLČAPEK, M et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, 1999, 858, 13 – 31. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967399007906>
37. JAEGER, K. – REETZ M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 1998, 16, 396 – 403. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779998011950>
38. JAEGER, K. et al. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 2002, 13, 390 – 397. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166902003415>
39. JANSSEN, H.G. et al. An improved method for sn-2 position analysis of triacylglycerols in edible oils and fats based on immobilised lipase D (Rhizopus delemar) **Journal of Chromatography A**, 2006, 1112, 141 – 147 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305022971>
40. KOMERS, K. et al. Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH. 3. Analysis of composition of actual reaction mixture. 2001 **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 103: 363–371. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1438-9312\(200106\)103:6%3C363::AID-EJLT363%3E3.0.CO;2-3/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1438-9312(200106)103:6%3C363::AID-EJLT363%3E3.0.CO;2-3/abstract)
41. LAEMMLI, B. U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 1970 v. 227, n. 5259, p. 680-685. Disponivel em: <http://www.nature.com/articles/227680a0>

42. LEUNG et al. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, 2010, 87, 1083 – 1095. Juno 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261909004346>
43. LV, D. et al. Mechanism study on NS-81006-mediated methanolysis of triglyceride in oil/water biphasic system. **Process biochemistry**, 2010, 45, 446-450. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511309003407>
44. MALCATA, F. et al. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 1992, 14, 426 - 446 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299290135B>
45. MARTINELLE, M et al. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, 1995, 1258, 272 – 276. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527609500131U>
46. MILED N. et al. Interfacial catalysis by lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11, 165 - 171 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117700000412>
47. NARWAL, S. K. – GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, 2013, 35, 479-490. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-012-1116-z>
48. NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2016, 93, 905-910, mayo 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11746-016-2843-4>.
49. NORDBLAD, M. et al. Identification of critical parameters in liquid enzyme-catalyzed biodiesel production. **Biotechnol. Bioeng.**, 111: 2446–2453, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.25305/abstract>.

50. PEDERSEN, A. T. et al. Batch production of BD-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014, 105, 89 - 94, Abril 2014 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714001040>.
51. PORTER, J. et al. Directed evolution of enzymes for industrial Biocatalysis. **ChemBioChem**, 2016, 17, 197-203. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201500280/abstract>.
52. POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2016, 61, 245 – 257. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116002835>
53. PRICE, J. et al. Mechanistic modeling of biodiesel production using a liquid lipase formulation. **Biotechnology Progress**, 2014, 30, 1277-1290, setembro, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btpr.1985/full> >. Acesso em: setembro, 2016.
54. PRICE, J. et al. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnol. Bioeng.**, 113: 1719–1728, fevereiro 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.25936/full>
55. REDLICH O. - KISTER A.T. Algebraic Representation of Thermodynamic Properties and the Classification of Solutions. **Industrial & Engineering Chemistry**, 1948, 40, 345-348. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50458a036>
56. REMONATTO, D. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, 2016 12 4, 254 -262. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ind.2016.0002>.
57. REMONATTO, Daniela. Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases eversa transform e eversa transform 2,0. (2017) Tese Doutorado UFSC/ EA

58. REETZ, M. Lipases as practical biocatalysts. **Current opinion in Chemical Biology**, 2002, 6, 145 – 150, april 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593102002971>>.
59. REIS P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2009, 147-148, 237 – 250. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868608001000?via%3Dihub>
60. ROVERE, E.L. et al. Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil. **World Development**, 2011, 39, 1026 – 1036, Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305750X11000611>>.
61. RUKUNUDIN, I. H et al. A modified method for determining free fatty acids from small soybean oil sample sizes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1998, 75, 563-568 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0066-z>
62. SALAGER, J. L. Formulaci3n, Composici3n y Fabricaci3n de Emulsiones para obtener las Propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. Propiedades de las emulsiones y su medici3n. 1999. Laboratorio FIRP. Universidad de Los Andes. Venezuela.
63. SANDLER, Stanley I. Chemical, Biochemical and Engineering Thermodynamics. 2006 Fourth Edition. John Wiley & Sons. Inc. United States of America.
64. SANTORI, G. et al. Quantitation of Compounds in Biodiesel Mixtures with Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Energy & Fuels** 2009, 23, 3783–3789. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ef900140r#citing>
65. SCHULZ, A. Enzyme kinetics. From diastase to multy-enzyme systems. 2003 CambriDe University Press.
66. SILVA, Felipe de Almeida. Estudo da produ33o de biodiesel utilizando etanol e 3leo de soja ou de maca3ba, catalisada por lipase de mamona e de Thermomyces lanuginosus. (2016) Disserta33o de Mestrado. UFSCAR/PPGEQ.

67. U. S. Energy Information Administration (EIA). U.S. Department of Energy. **The International Energy Outlook 2016. With Projections to 2040.** Mayo 2016. Disponível em: [http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484\(2016\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484(2016).pdf) Acesso em: novembro, 2016
68. TRIVEDI, J. et al. Clean synthesis of biolubricant range esters using novel liquid lipase enzyme in solvent free médium. SpringerPlus, 2015, 4, 165, Marzo 2015. Disponível em: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-015-0937-3>
69. TSAI, S. - CHANG, C. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of lipids in biphasic organic—aqueous systems. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, John Wiley & Sons, Ltd., 1993, 57, 147-154. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.280570209>
70. ZHOU D. et al. Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing Caproic Acid by Lipase-Catalyzed Acidolysis: Optimization by Response Surface Methodology **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2001, 49, 5771-5777. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0103020>
71. ZHOU, G. - KRESTA, S. M. Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank **Chemical Engineering Science**, 1998, 53, 2063 – 2079 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250997004387>

APÊNDICE A: Picos e tempos de retenção determinados por cromatografia líquida com gradiente da fase móvel na fase reversa (RP-HPLC)

TABELA 23. Tempos de retenção (t_R) determinados para os diferentes picos obtidos na quantificação dos teores de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ésteres etílicos dos ácidos graxos por cromatografia líquida em fase reversa

Nome	Símbolo	MM _m (g/mol)	NLD	t _R (min)	dp
Monolinolenina	1-Ln + 2-Ln	352.3	3	4.148	0.084
Monolinoleína	1-L+2-L	354.3	2	4.818	0.100
Monooleína	1-O+	356.3	1	5.407	0.066
Éster etílico do ácido linolênico	EtLn	306.2	3	9.091	0.022
Éster etílico do ácido linoléico	EtL	308.2	2	10.491	0.026
Éster etílico do ácido oléico	EtO	310.3	1	11.868	0.028
Dilinenina	1,2-LnLn+1,3-LnLn	612.5	6	13.517	0.022
Linoleoil-linoleoil-glicerol	1,2-LLn+1,3-LLn**	614.5	5	14.114	0.026
Dilinooleína***	1,2-LL+1,3-LL***	616.5	4	14.472	0.012
Oleoil-linoleoil-glicerol***	1,2-OLn+1,2-OLn***	616.5	4	14.901	0.015
Oleoil-linoleoil-glicerol	1,2-OL+1,3-OL**	618.5	3	15.600	0.057
Dioleína	1,2-OO+1,3-OO	620.5	2	16.453	0.013
Trilinenina	LnLnLn	872.7	9	18.160	0.015
Dilinooleoil-linoleoil-glicerol	LLnLn	874.7	8	18.743	0.005
Dilinooleoil-linoleoil-glicerol	LLLn	876.7	7	19.316	0.007
Dilinooleoil-oleoil-glicerol	OLnLn	876.7	7	19.316	0.007
Trilinooleína	LLL	878.7	6	19.912	0.007
Oleoil-linoleoil-linoleoil-glicerol	OLLn	878.7	6	19.912	0.007
Dilinooleoil-oleoil-glicerol	OLL	880.8	5	20.542	0.028
Dioleoil-linoleoil-glicerol	OOLn	880.8	5	20.546	0.007
Dioleoil-linoleoil-glicerol	OOL	882.8	4	20.712	0.007
Trioleína*	OOO*	884.8	3	21.008	0.052
Dioleoil-gadoleoil-glicerol	OOG		3	21.480	0.010

*tempo de retenção (t_R) para o padrão da trioleína

NLD: número de ligações duplas

Equipamento HPLC (Waters E 2695): coluna Ascentis Express C-18 (10cmx46mmx2.7 μ m) (Supelco), detector UV e sistema gerador de gradiente.

Condições de operação: temperatura coluna 40 °C, região de detecção UV 205 nm

Gradiente: água (A), acetonitrila (B) e solução de 2-propanol-hexano (5:4%v/v) (C). Gradiente: 30%A + 70%B no 0 min, 100%B no 10 min, 50%B + 50%C no 20 min e continuar com eluição isocrática pelos últimos 5 min.

APÊNDICE B: Gráficos obtidos a partir dos dados experimentais e durante o ajuste do modelo

B.1 Experimento TE1B

(Álcool 1.5 eq., lipase 2% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C)

FIGURA 37. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE1B

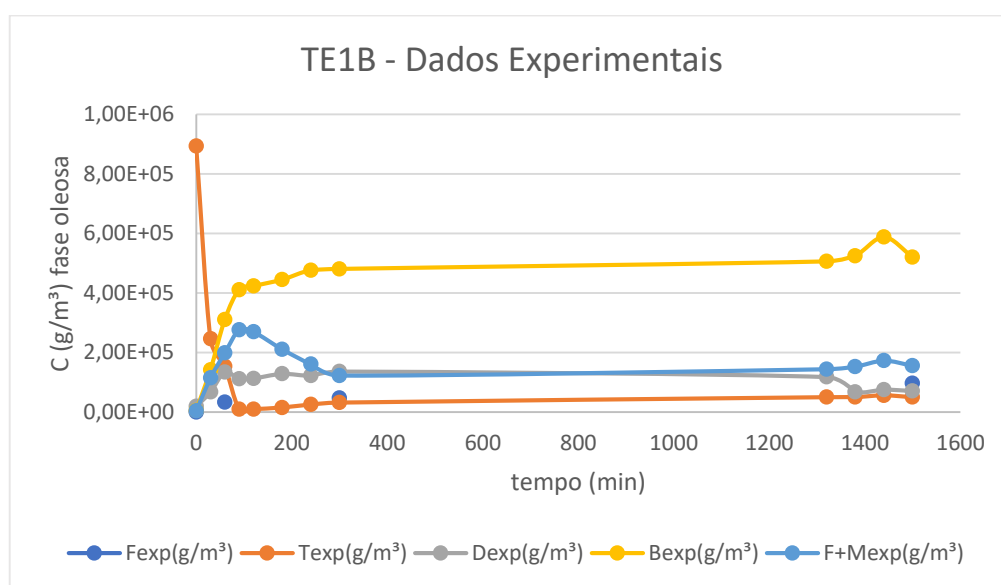


FIGURA 38. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE1B

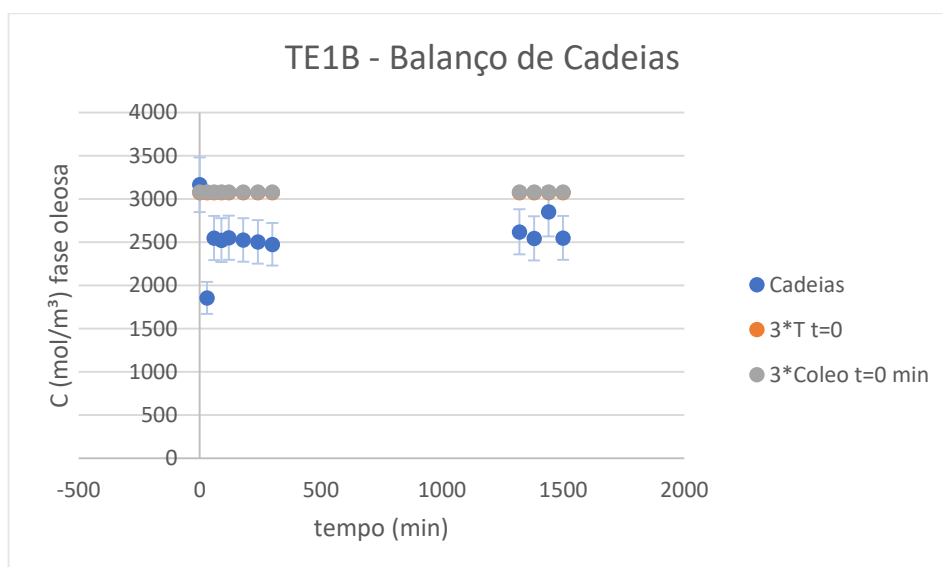


FIGURA 39. Curvas de ajuste para o experimento TE1B

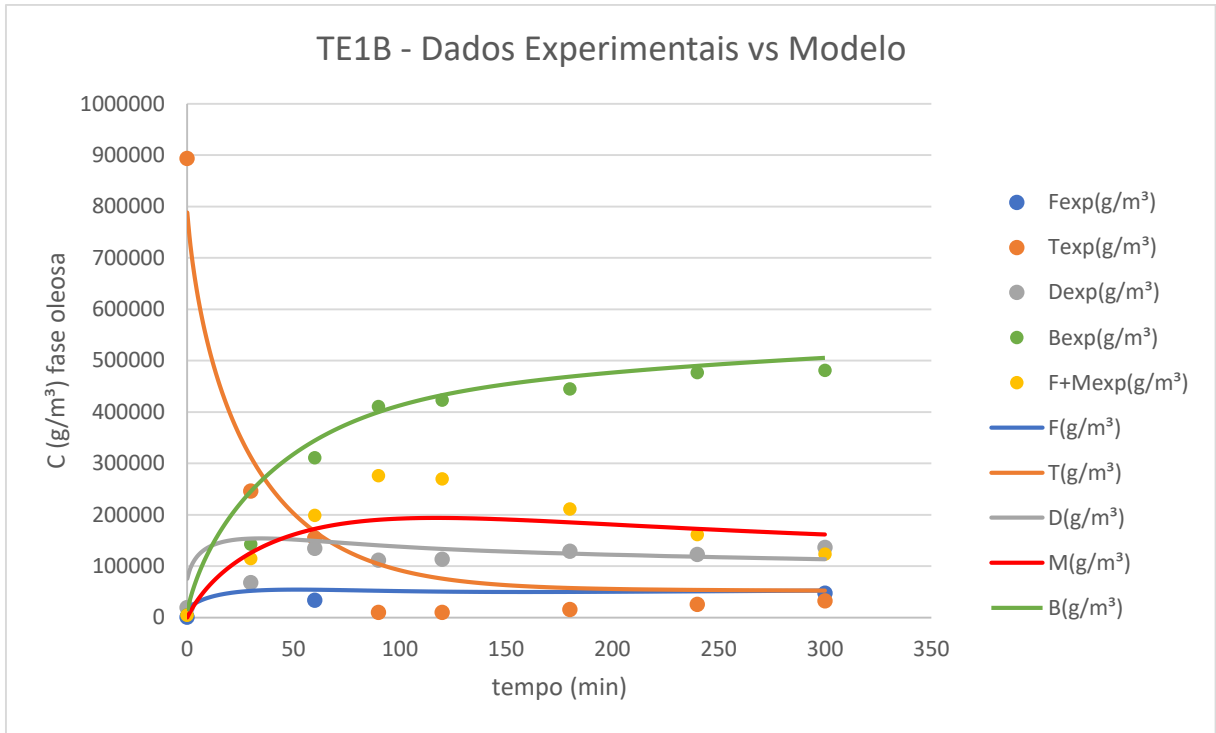
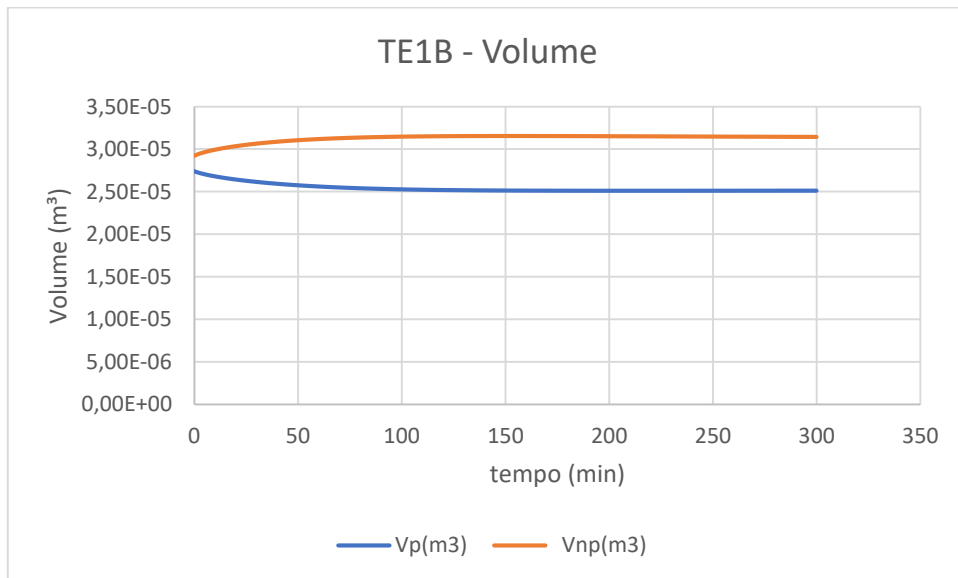


FIGURA 40. Variação do volume no tempo para o experimento TE1B



B.2 Experimento TE2B

(Álcool 2.0 eq., lipase 2% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C)

FIGURA 41. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE2B

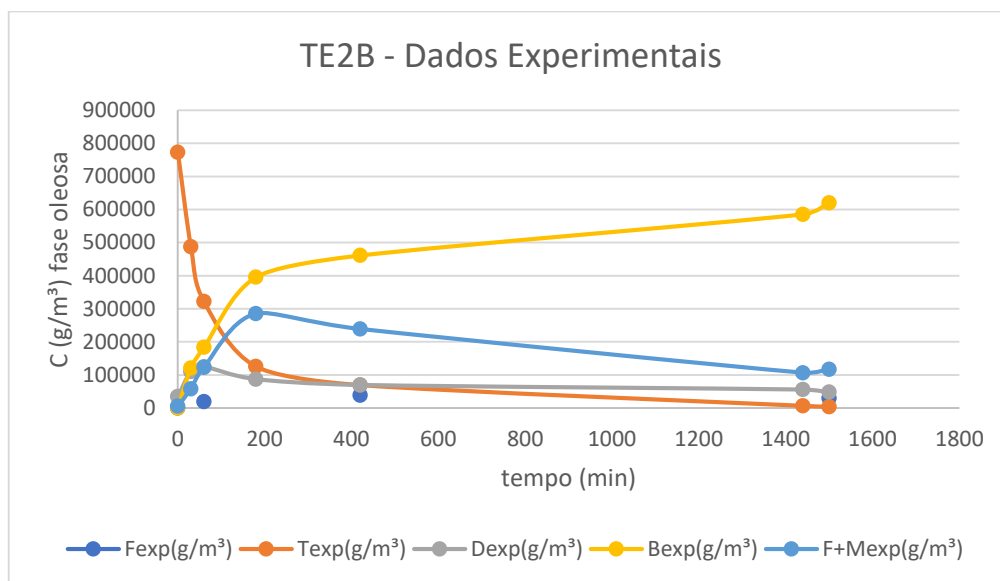


FIGURA 42. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE2B

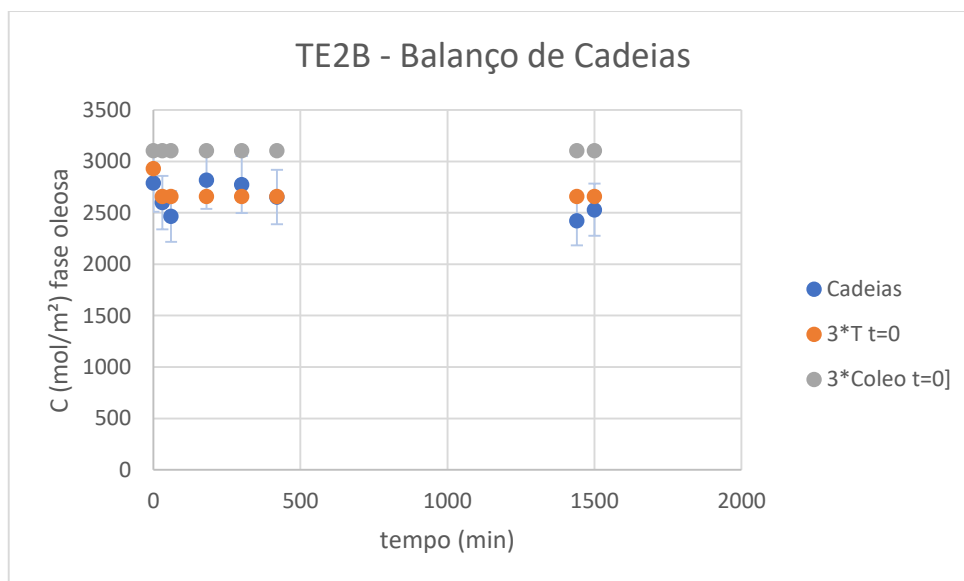


FIGURA 43. Curvas de ajuste para o experimento TE2B

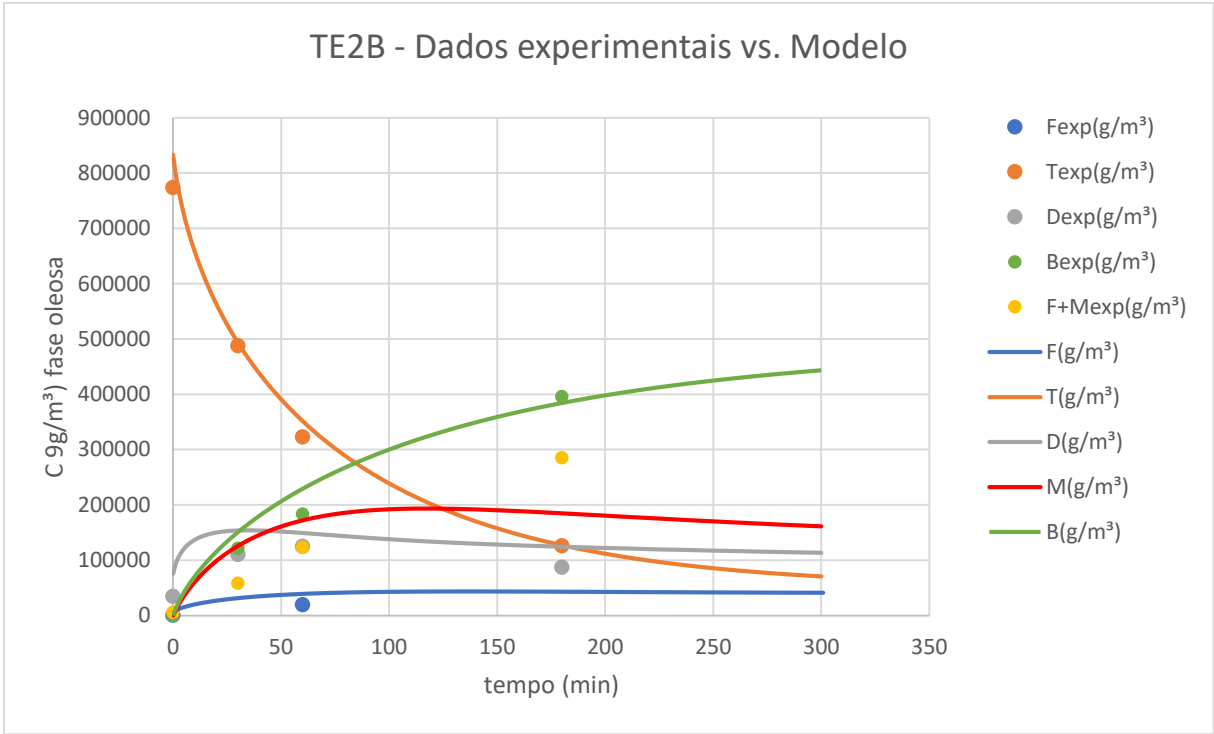
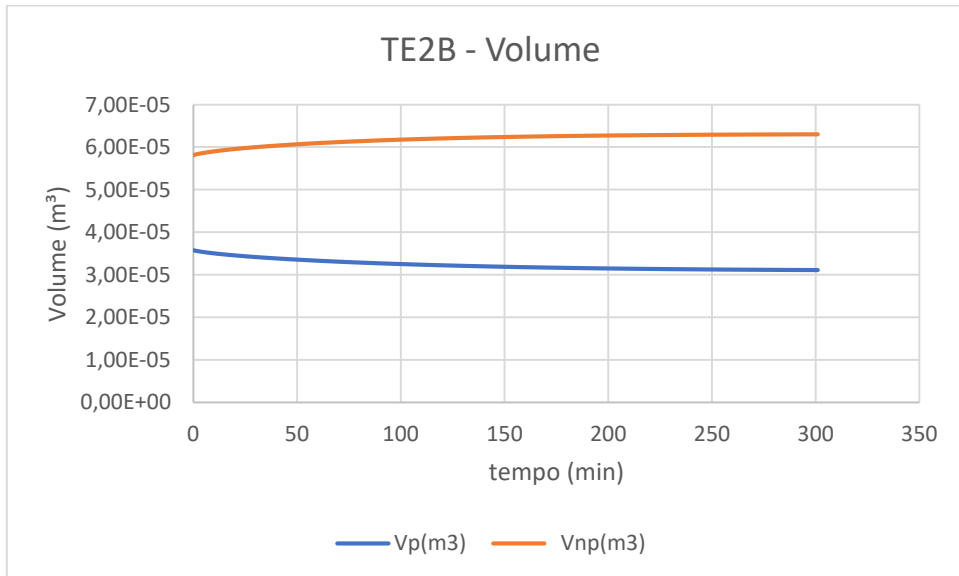


FIGURA 44. Variação do volume no tempo para o experimento TE2B



B.3 Experimento TE3B

(Álcool 2.0 eq., lipase 0.5% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C)

FIGURA 45. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE3B

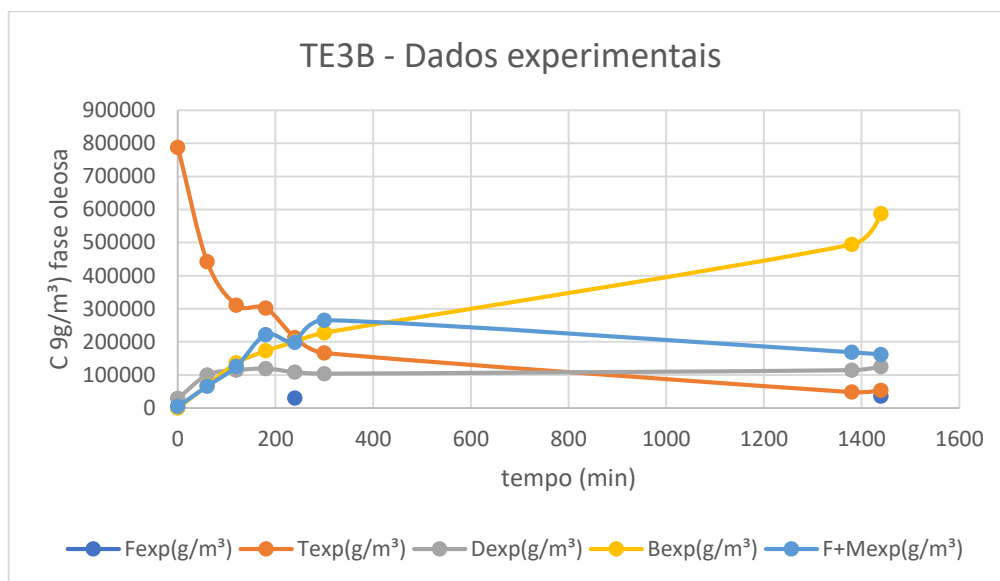


FIGURA 46. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE3B

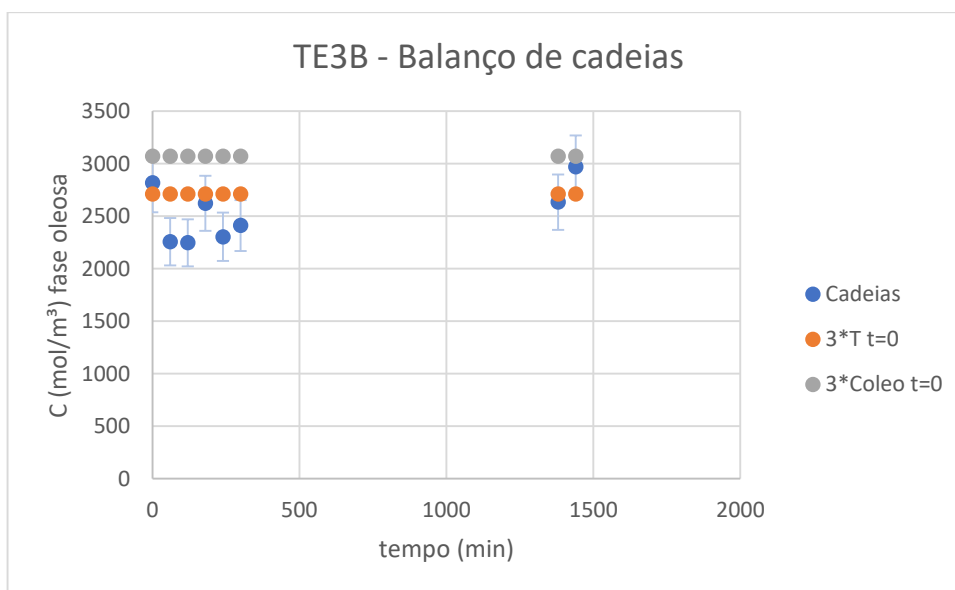


FIGURA 47. Curvas de ajuste para o experimento TE3B

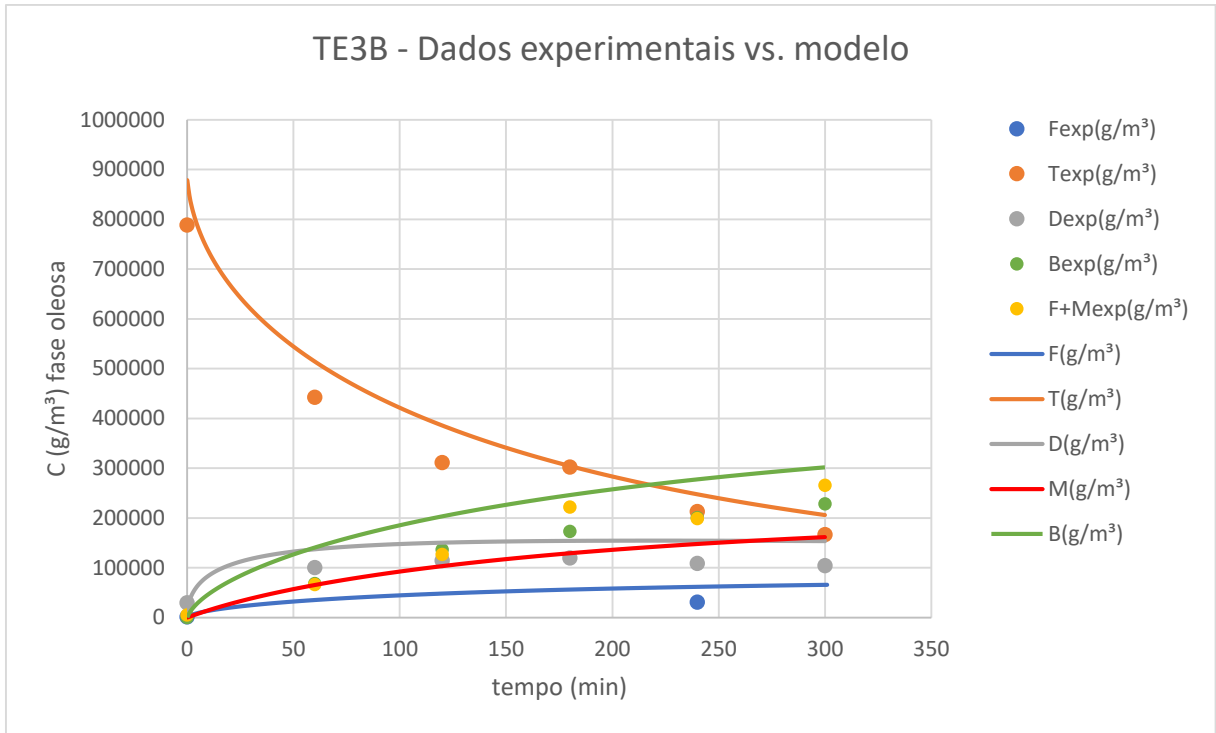
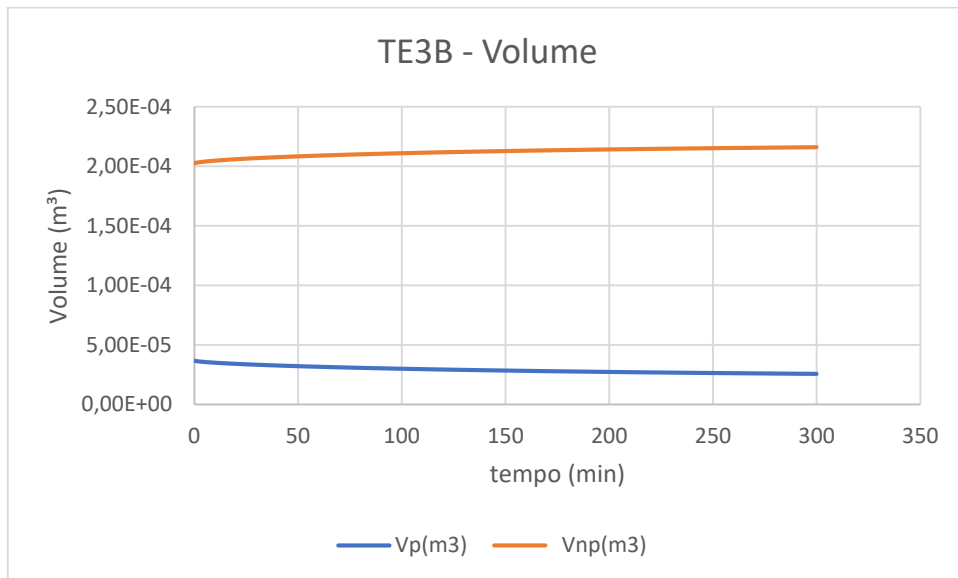


FIGURA 48. Variação do volume no tempo para o experimento TE3B



B.4 Experimento TE4A

(Álcool 2.0 eq., lipase 0.5% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C)

FIGURA 49. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE4A

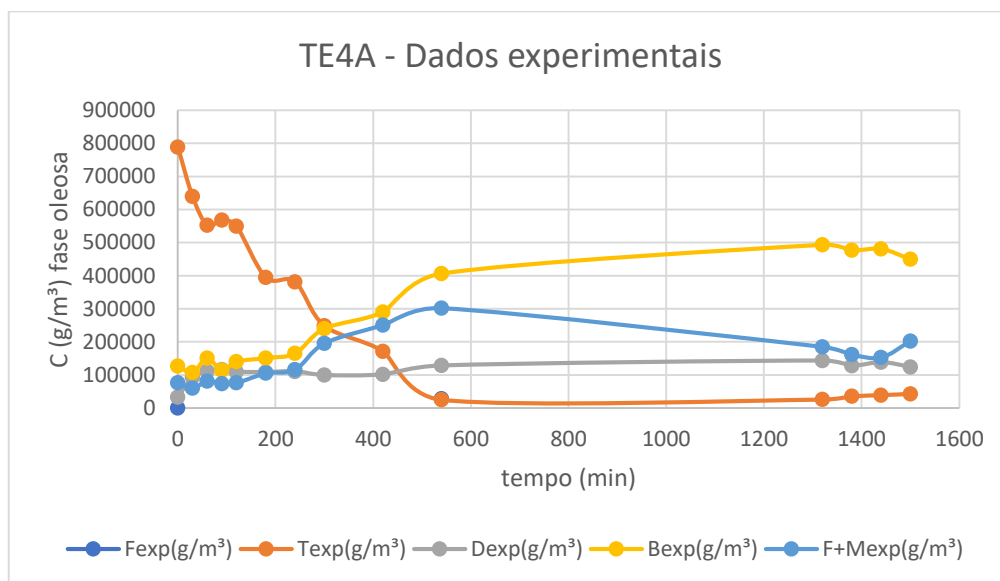


FIGURA 50. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE4A

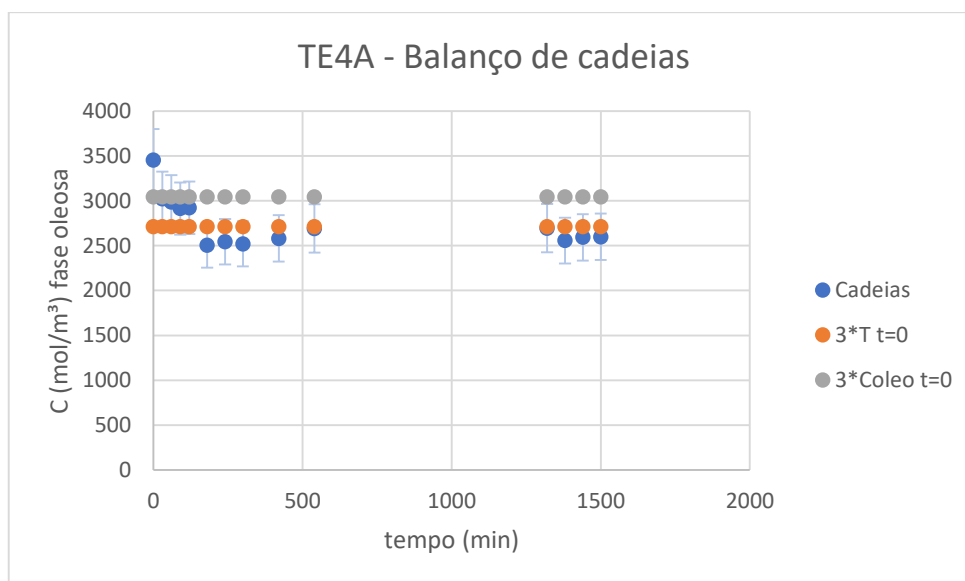
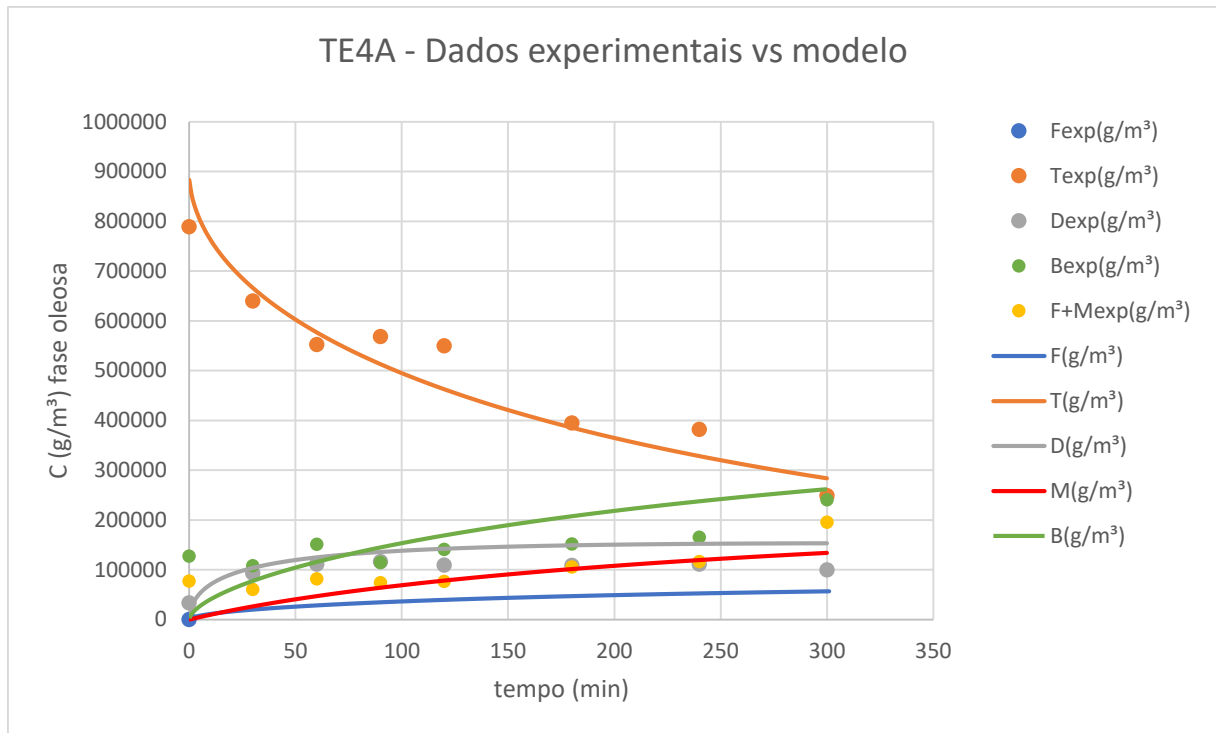
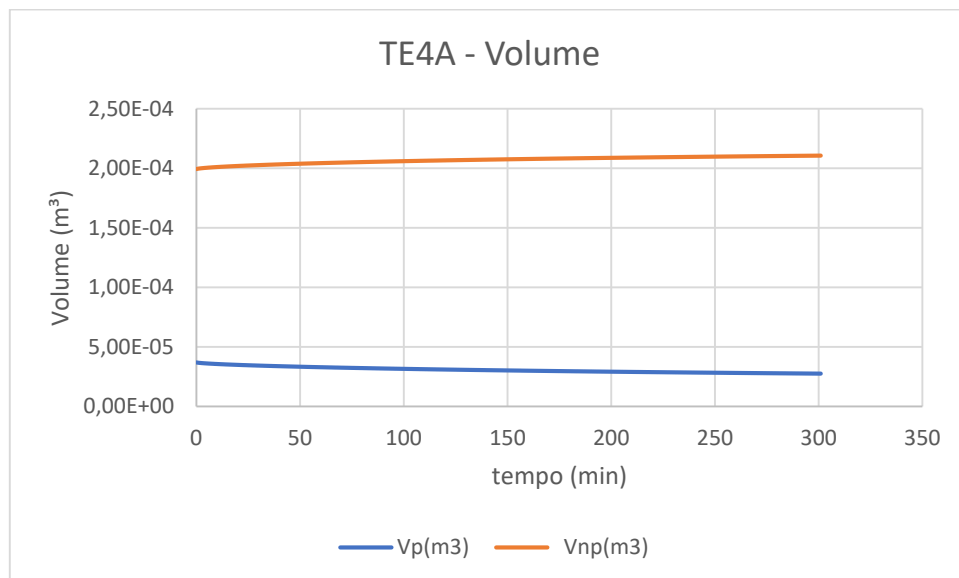


FIGURA 51. Curvas de ajuste para o experimento TE4A**FIGURA 52.** Variação do volume no tempo para o experimento TE4A

B.5 Experimento TE4B

(Álcool 1.5 eq., lipase 0,5% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C)

FIGURA 53. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE4B

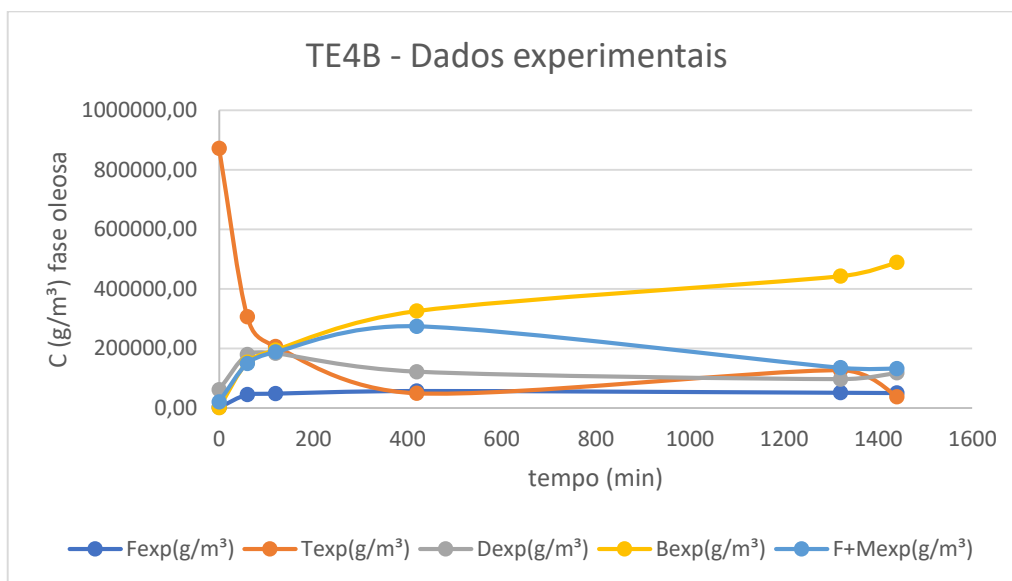


FIGURA 54. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE4B

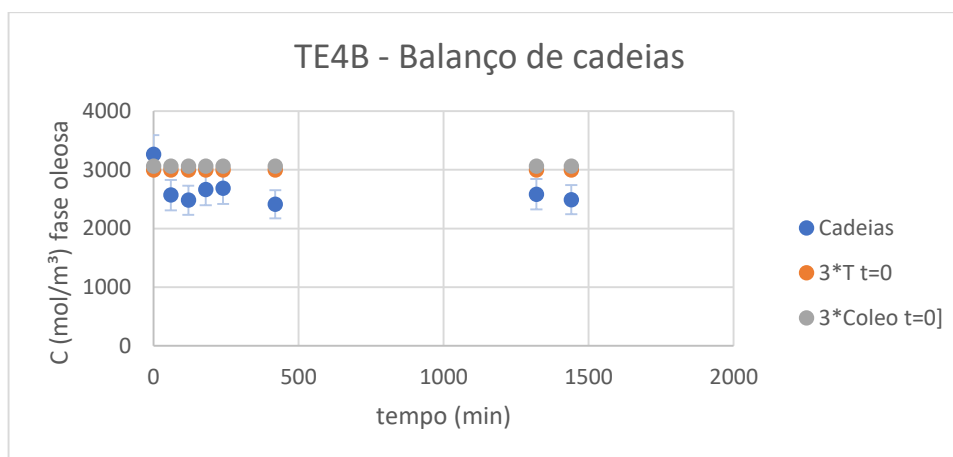


FIGURA 55. Curvas de ajuste para o experimento TE4B

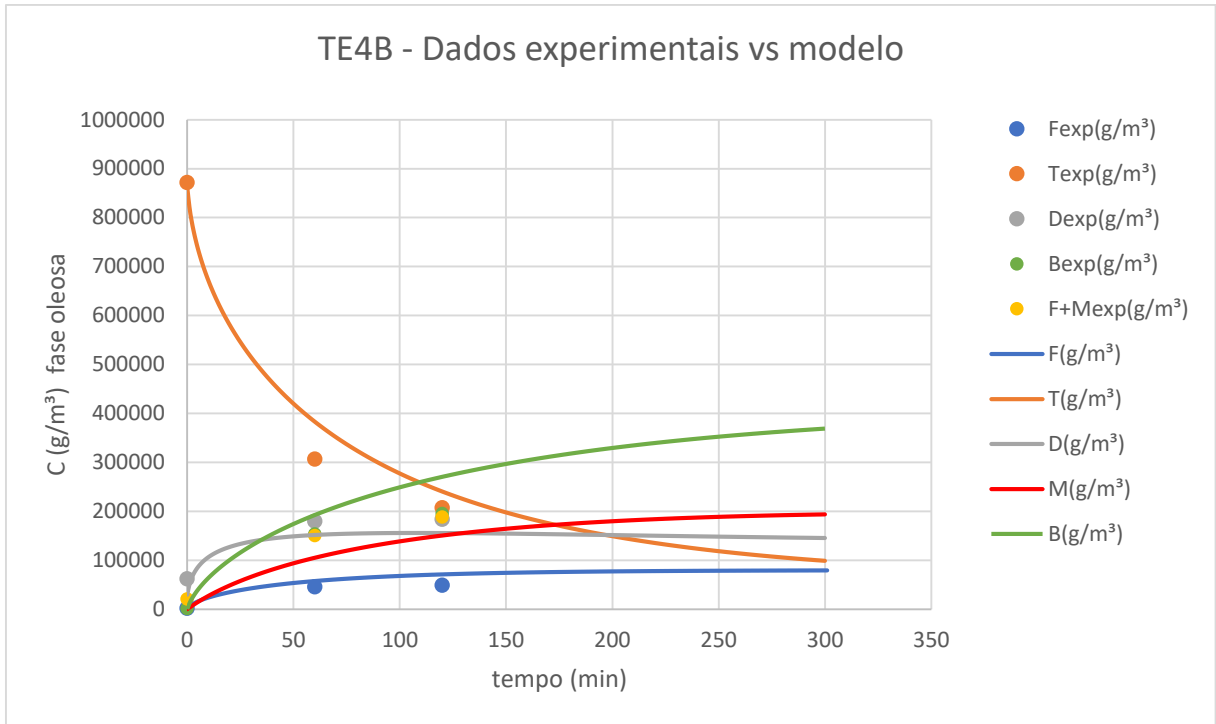
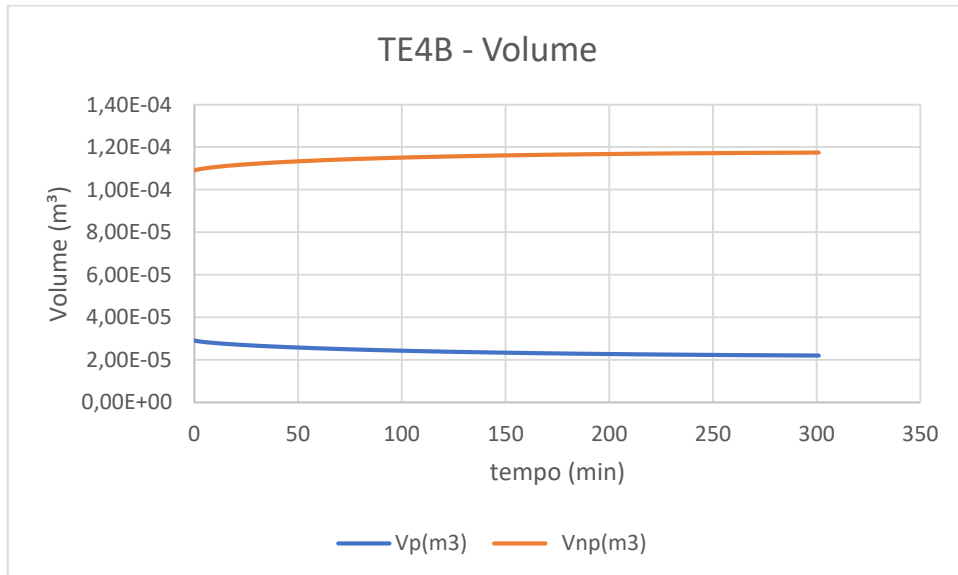


FIGURA 56. Variação do volume no tempo para o experimento TE4B



B.6 Experimento TE5A

(Álcool 1.5 eq., lipase 2.0% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C)

FIGURA 57. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE5A

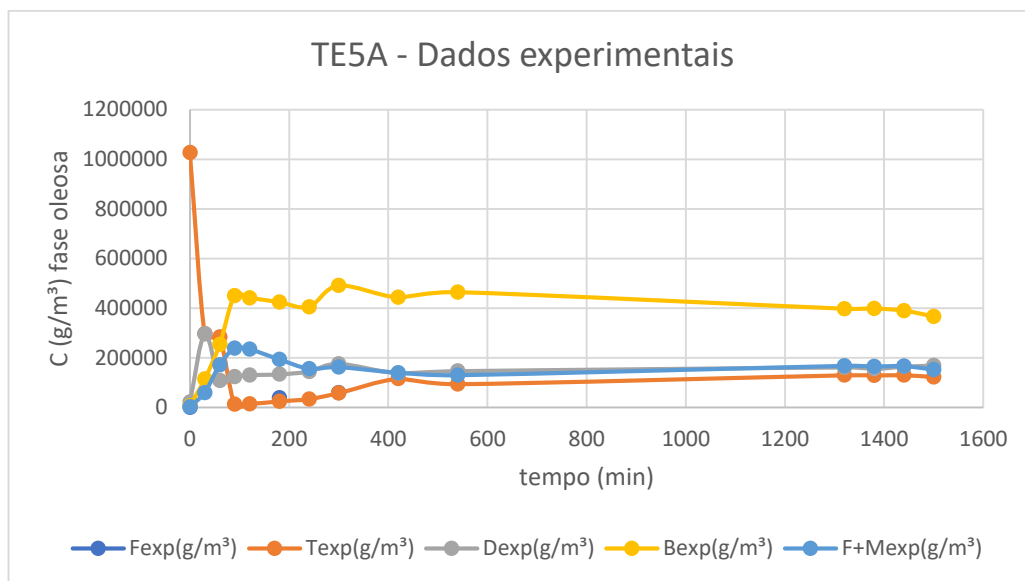


FIGURA 58. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE5A

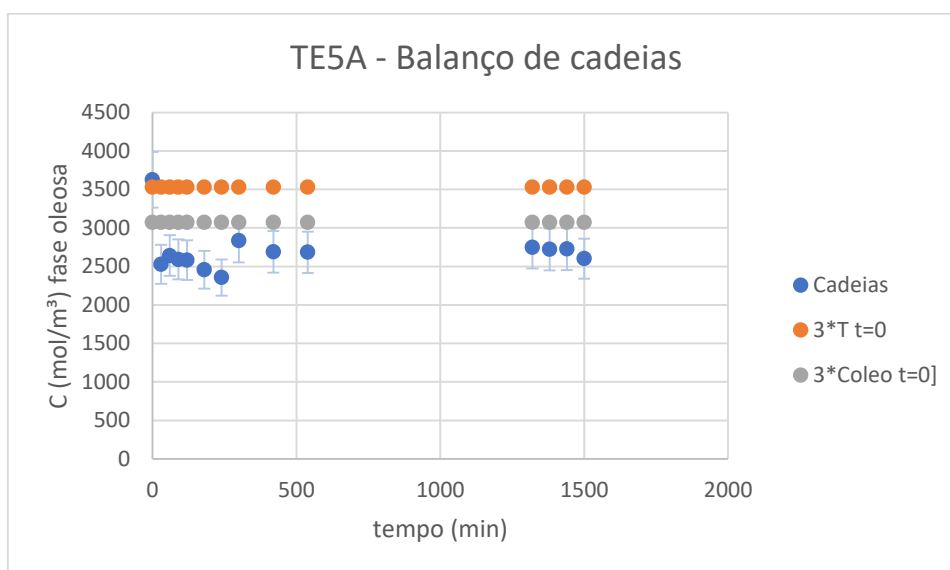


FIGURA 59. Curvas de ajuste para o experimento TE5A

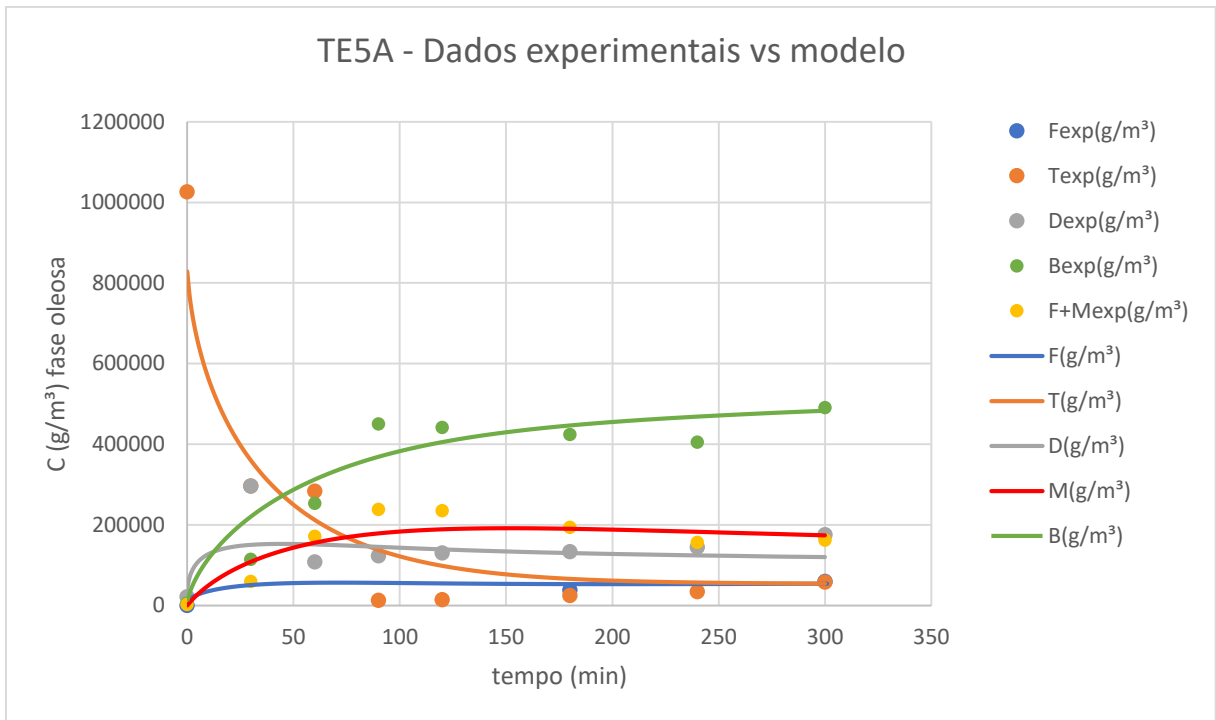
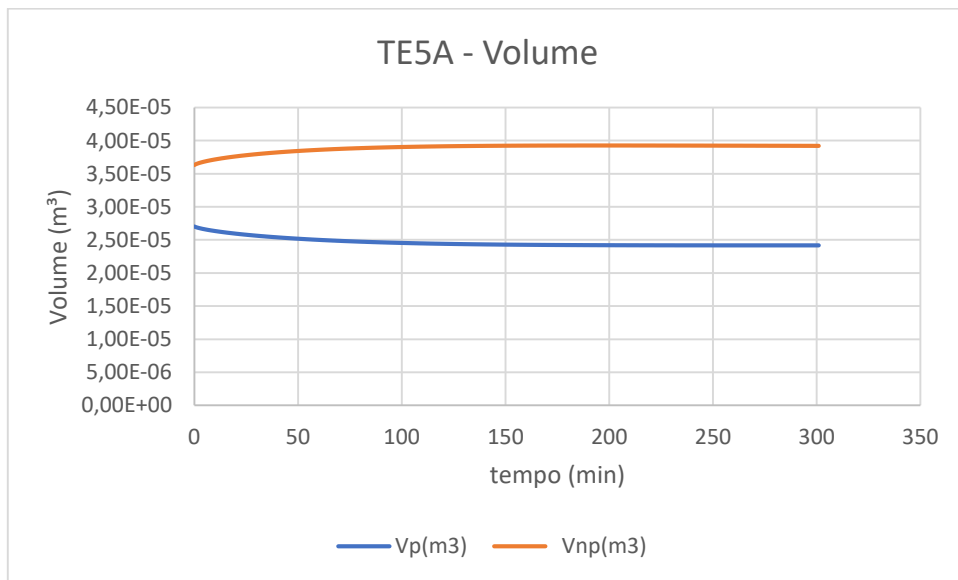


FIGURA 60. Variação do volume no tempo para o experimento TE5A



B.7 Experimento TE5B

(Álcool 1.5 eq., lipase 2,0% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C)

FIGURA 61. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE5B

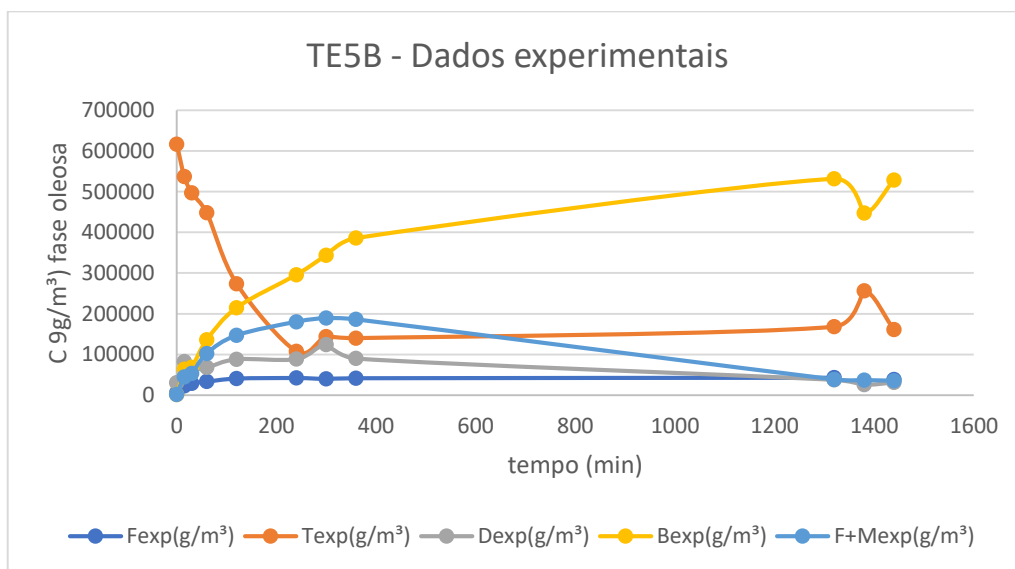


FIGURA 62. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE5B

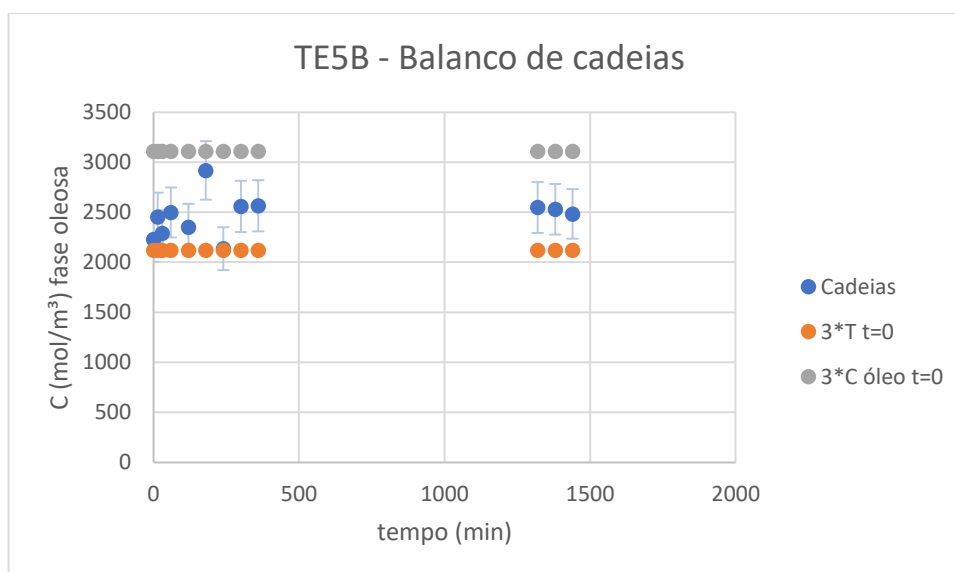


FIGURA 63. Curvas de ajuste para o experimento TE5B

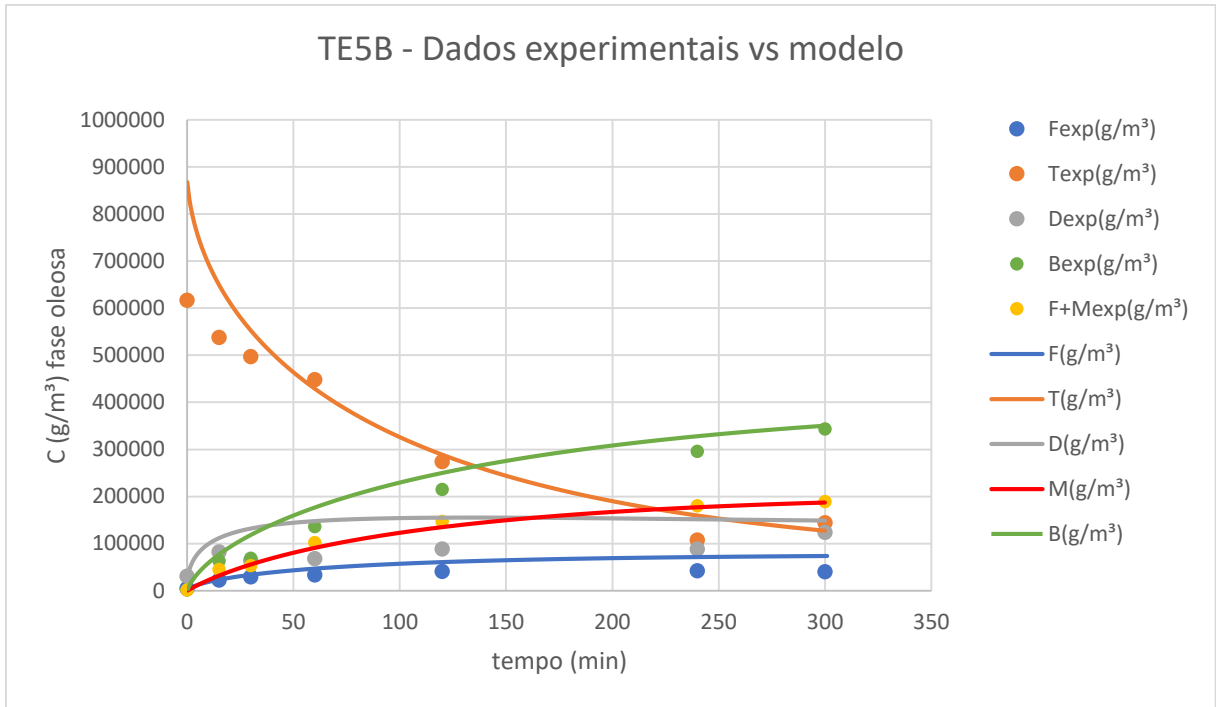
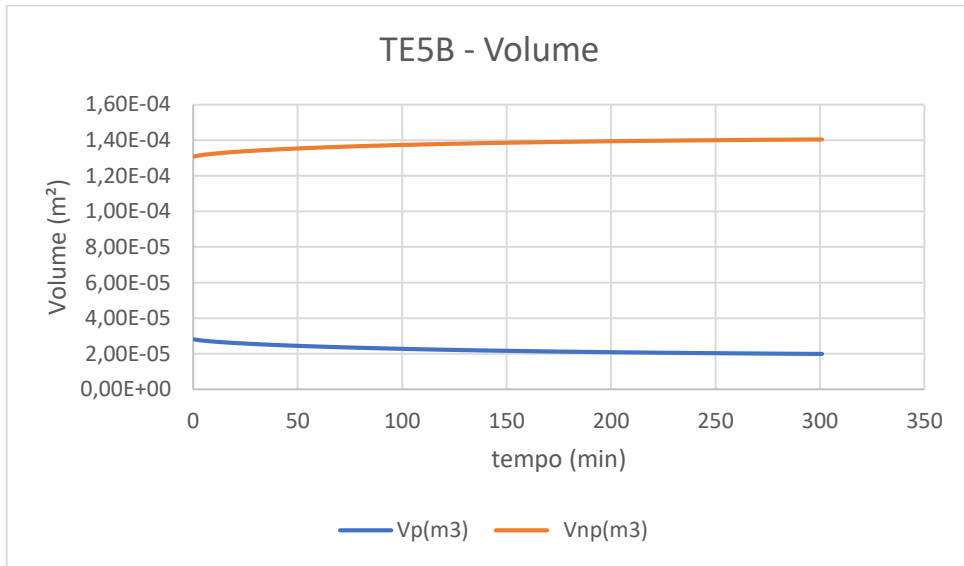


FIGURA 64. Variação do volume no tempo para o experimento TE5B



B.8 Experimento TE6A

(Álcool 2.0 eq., lipase 0.5% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C)

FIGURA 65. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE6A

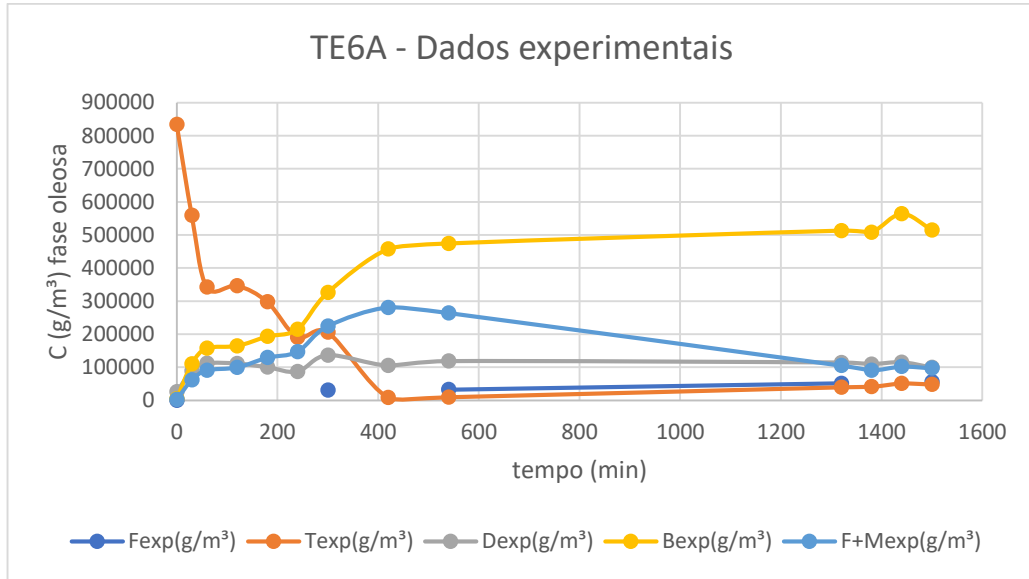


FIGURA 66. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE6A

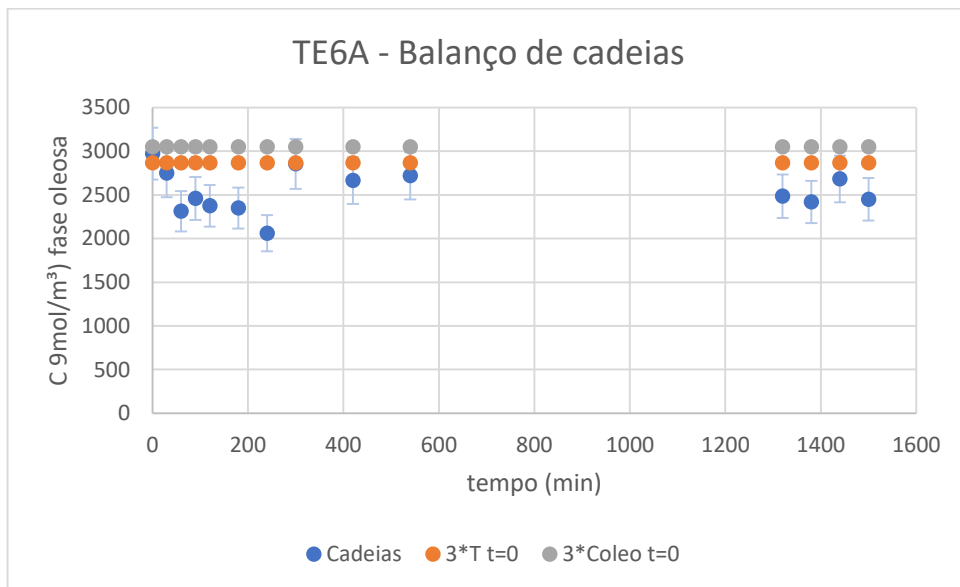
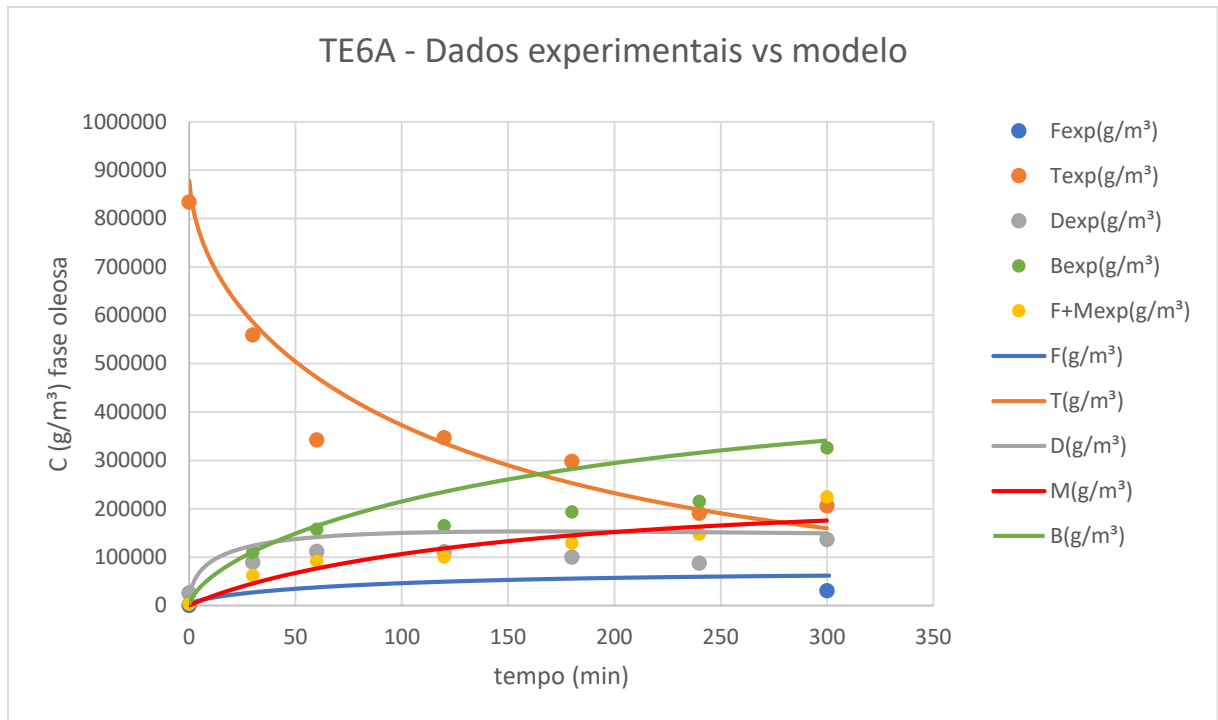
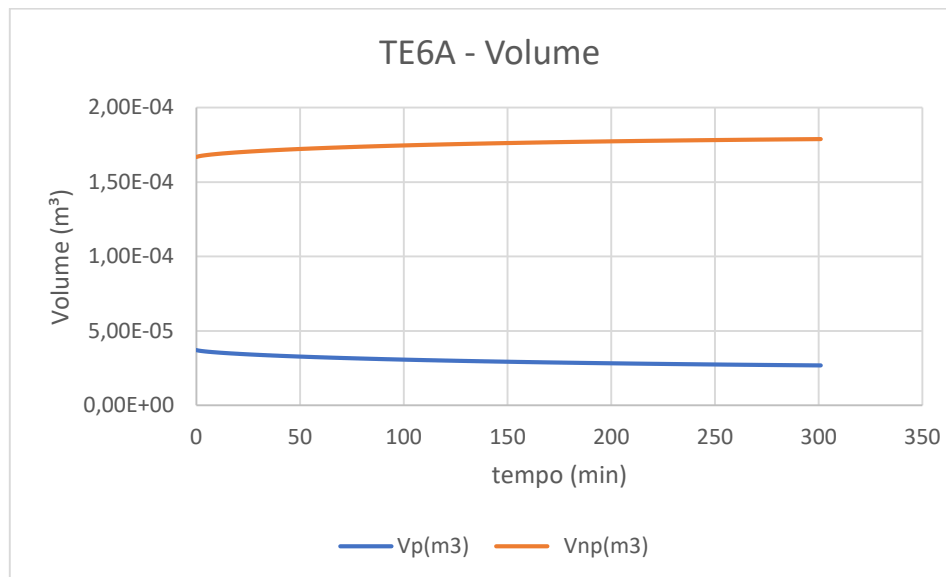


FIGURA 67. Curvas de ajuste para o experimento TE6A**FIGURA 68.** Variação do volume no tempo para o experimento TE6A

B.9 Experimento TE6B

(Álcool 2.0 eq., lipase 0,5% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C)

FIGURA 69. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE6B

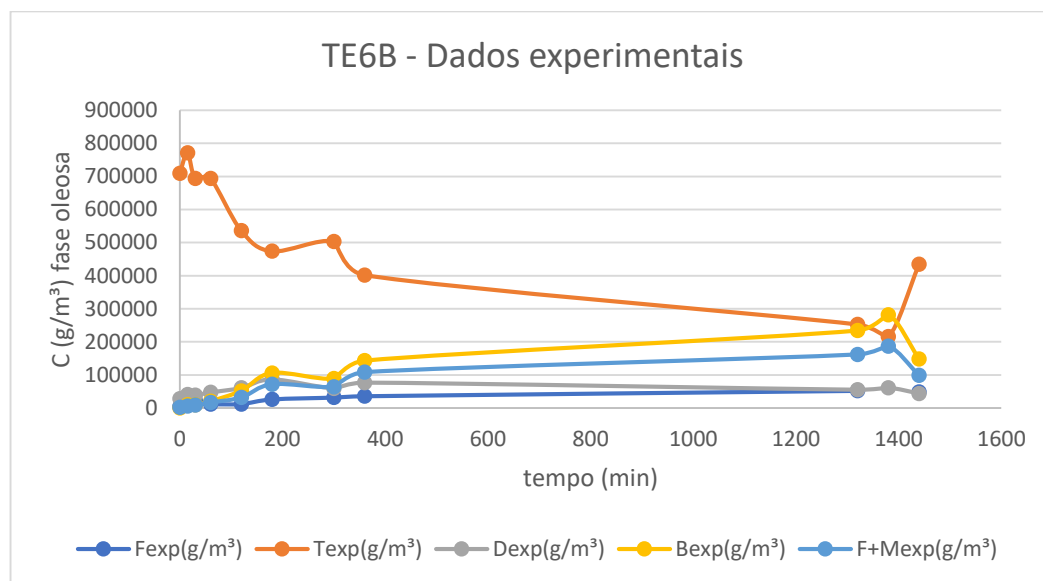


FIGURA 70. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE6B

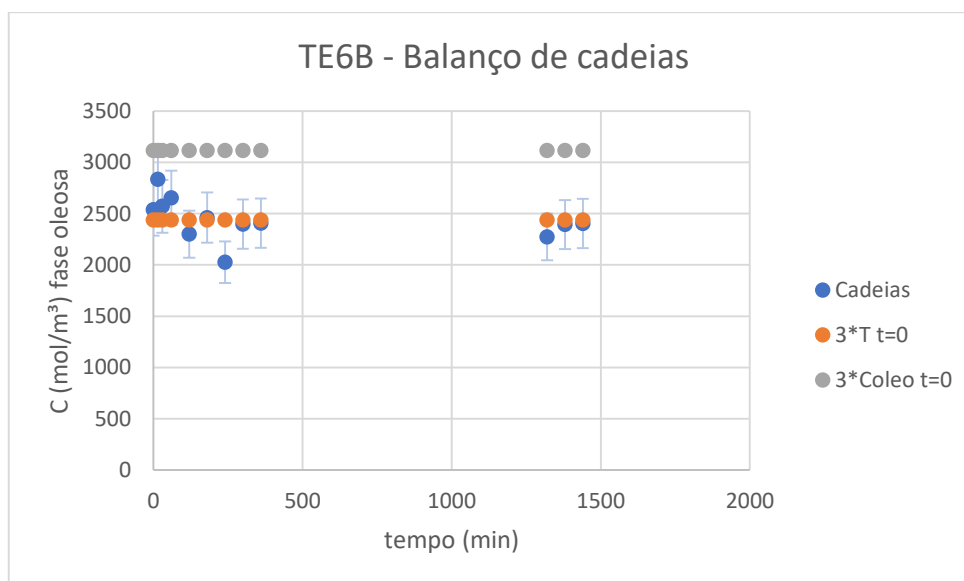


FIGURA 71. Curvas de ajuste para o experimento TE6B

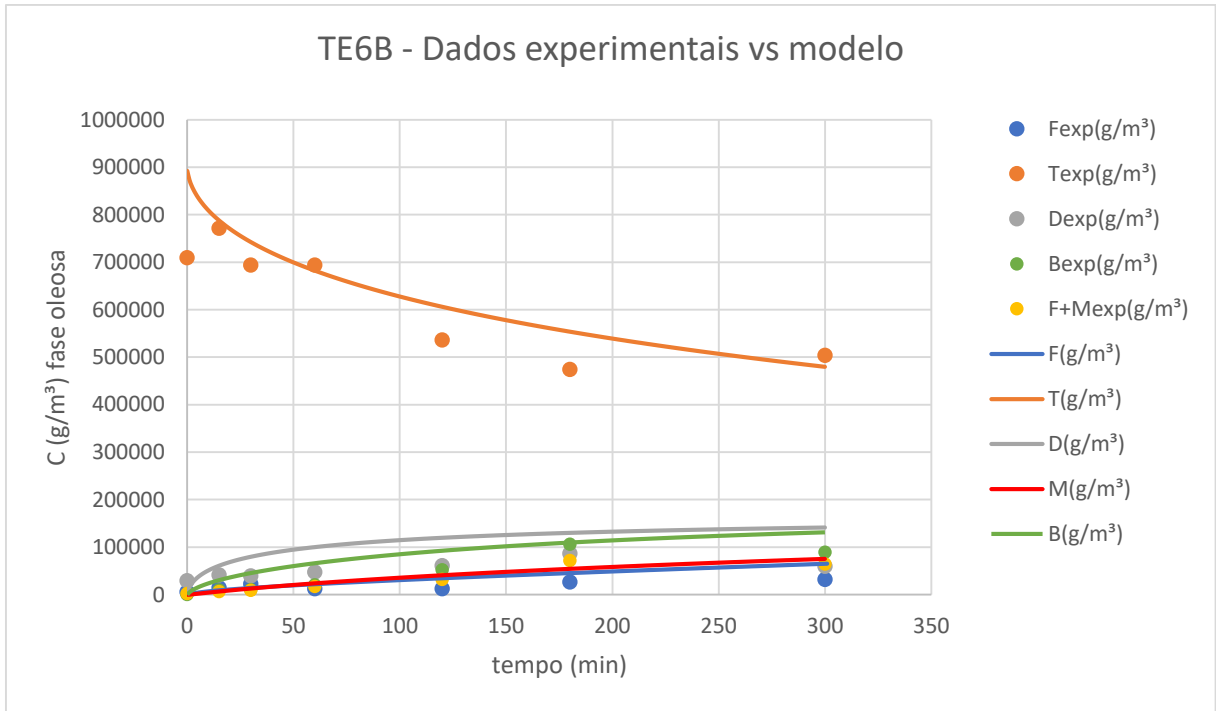
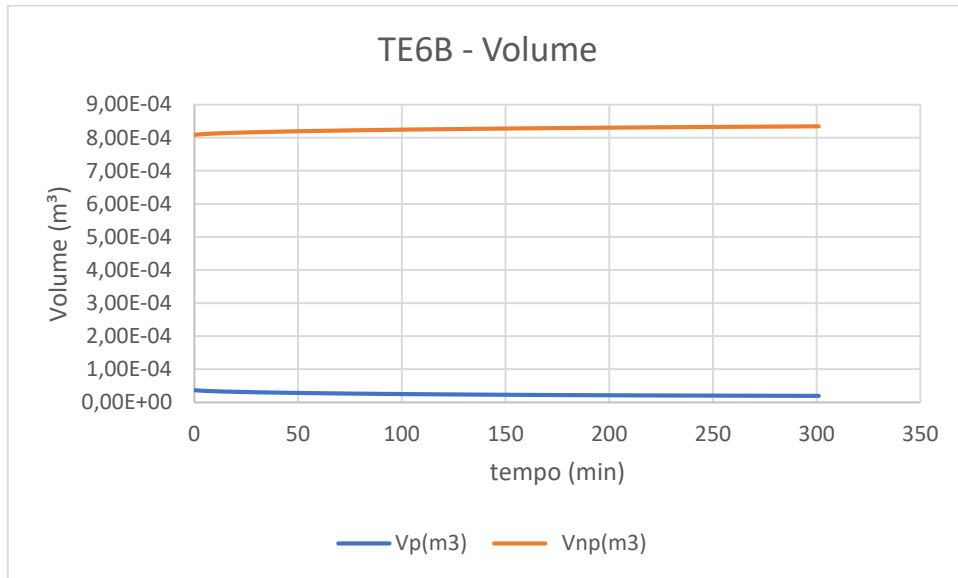


FIGURA 72. Variação do volume no tempo para o experimento TE6B



B.10 Experimento TE7B

(Álcool 2.0 eq., lipase 1.0% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C)

FIGURA 73. Concentração mássica (g/m³) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE7B

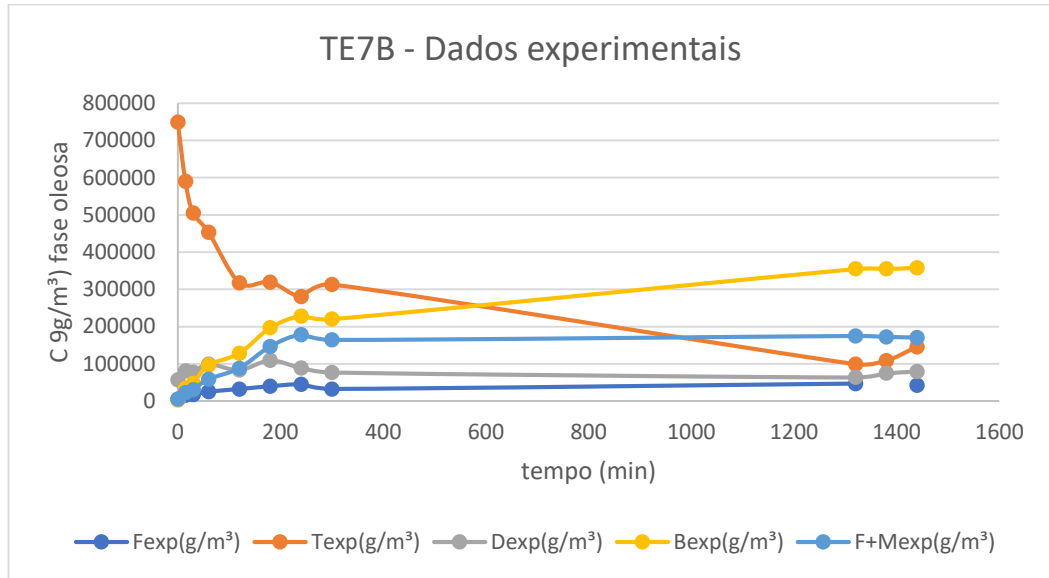


FIGURA 74. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE7B

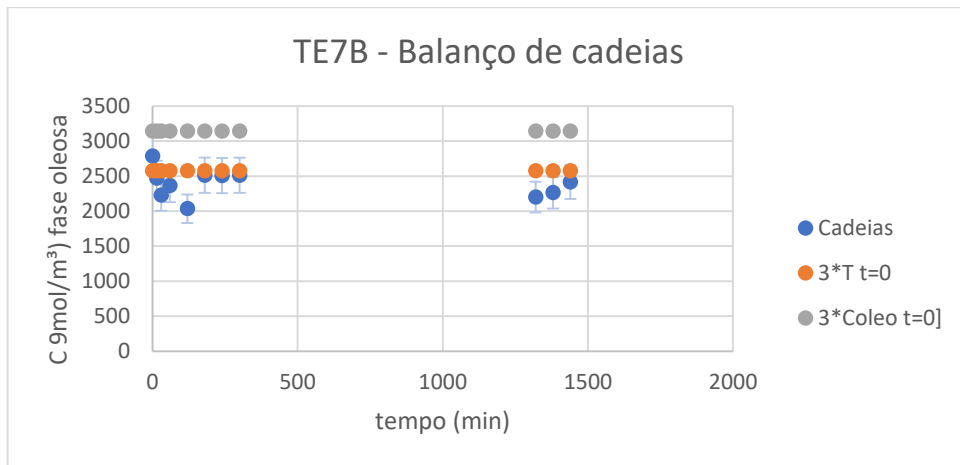


FIGURA 75. Curvas de ajuste para o experimento TE7B

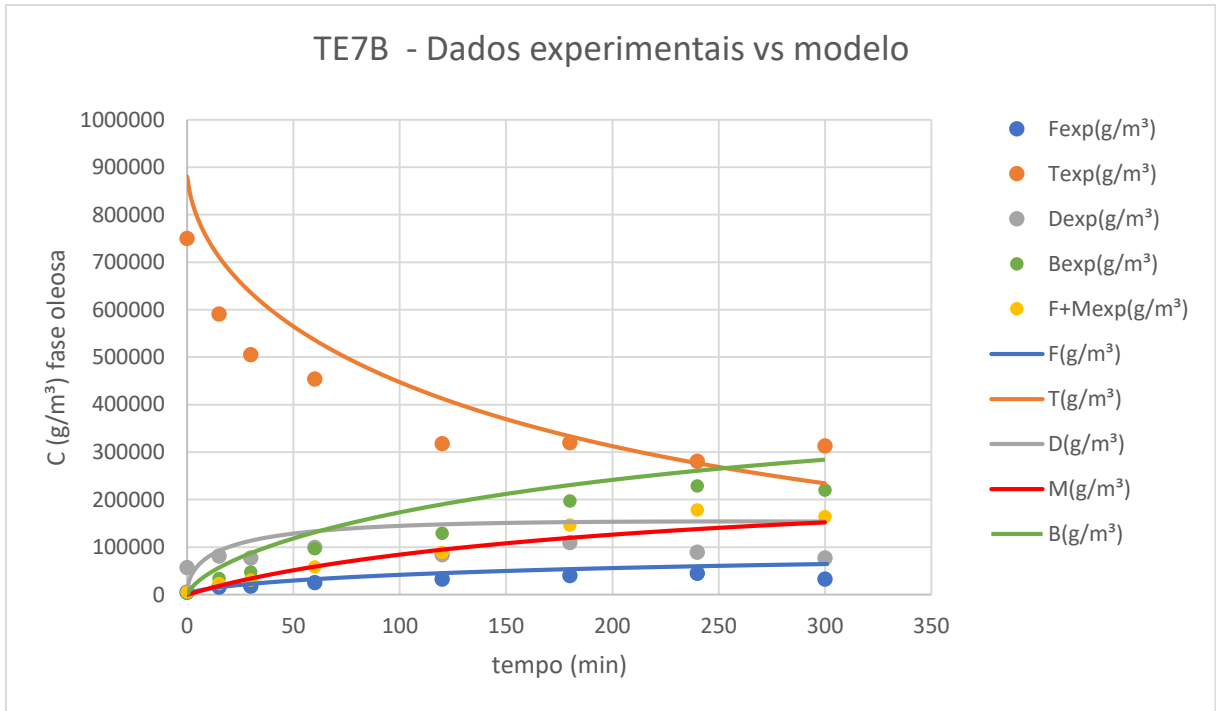
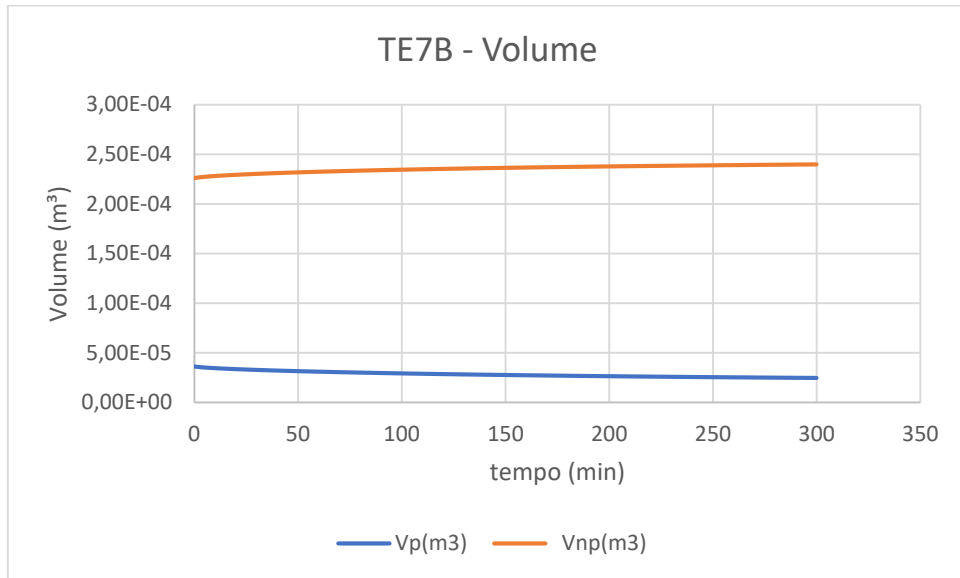


FIGURA 76. Variação do volume no tempo para o experimento TE7B



B.11 Experimento TE8A

(Álcool 1.5 eq., lipase 0.5% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 1200 RPM, 35 °C)

FIGURA 77. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE8A

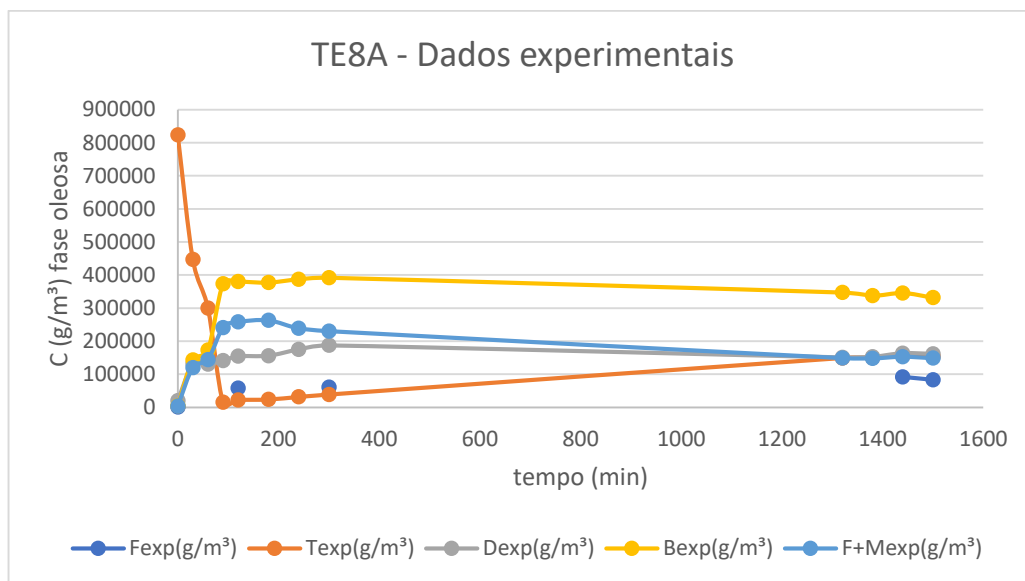


FIGURA 78. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE8A

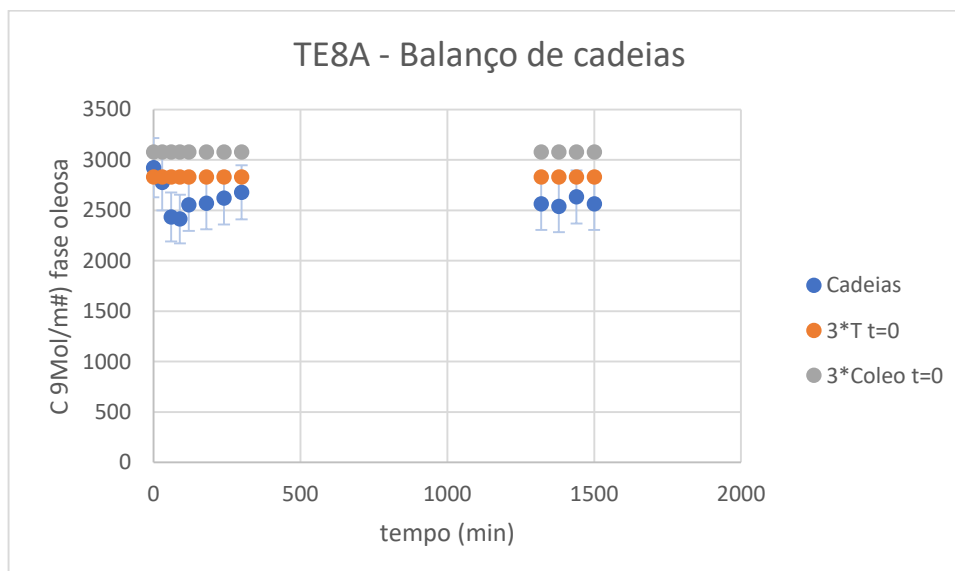


FIGURA 79. Curvas de ajuste para o experimento TE8A

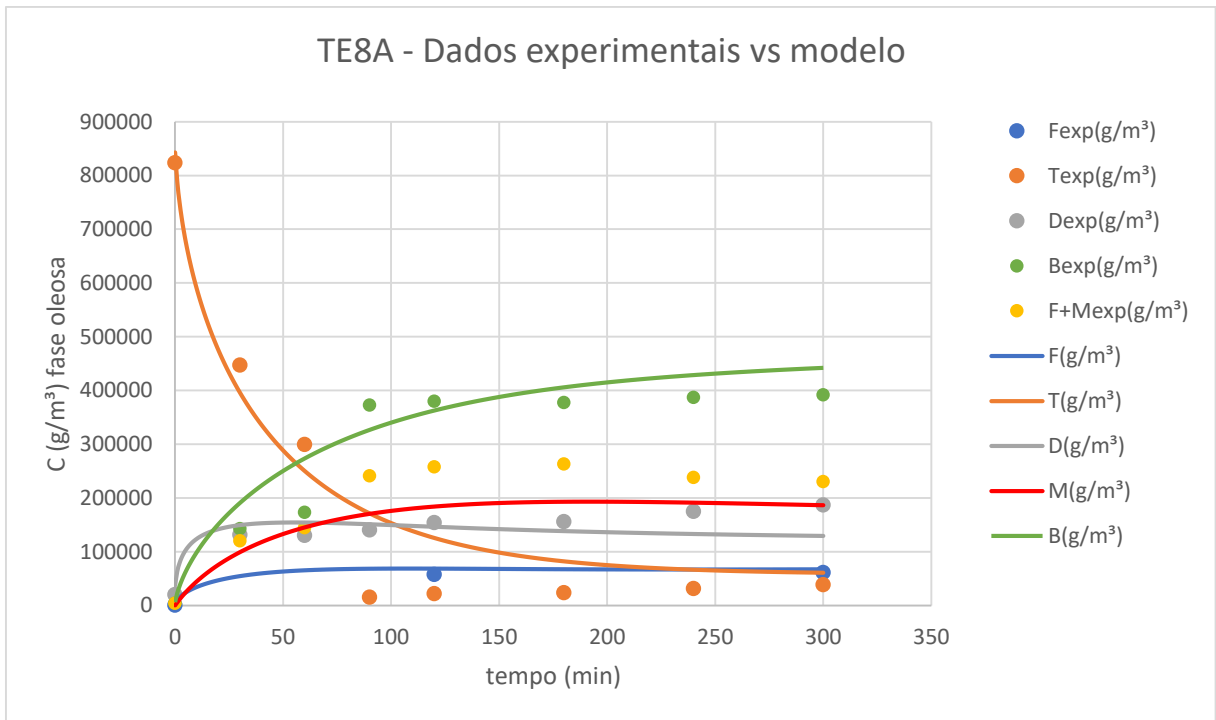
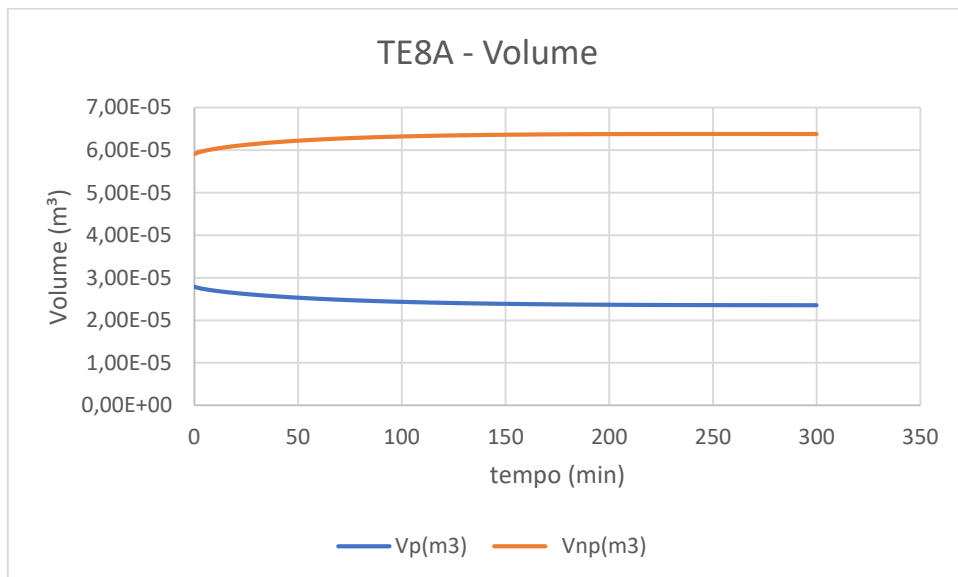


FIGURA 80. Variação do volume no tempo para o experimento TE8A



B.12 Experimento TE8B

(Álcool 1.5 eq., lipase 1.0% w/w óleo, água 10% w/w óleo, 800 RPM, 35 °C)

FIGURA 81. Concentração mássica (g/m^3) na fase oleosa em função do tempo para o experimento TE8B

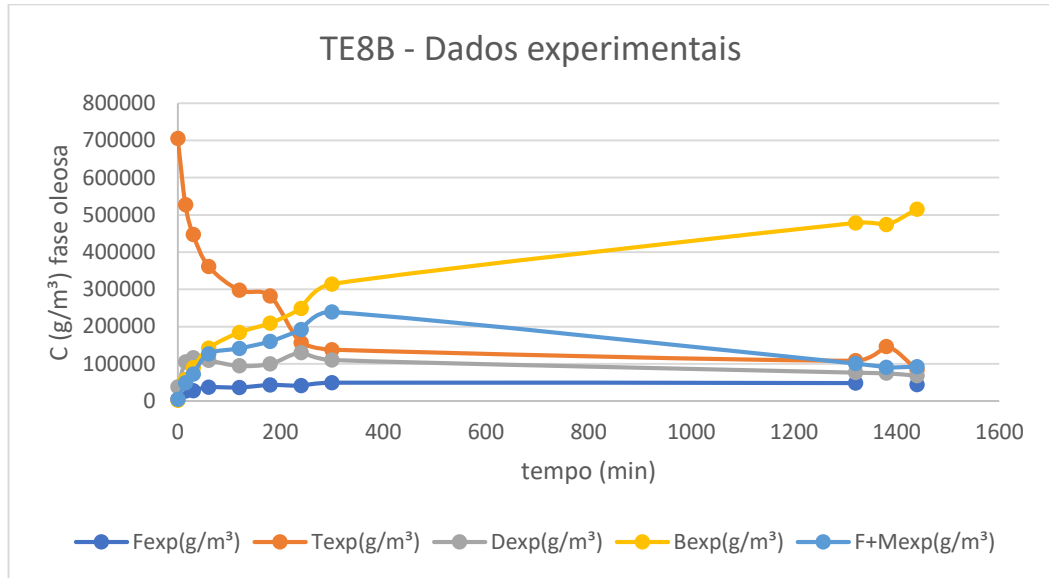


FIGURA 82. Balanço de cadeias para os dados experimentais obtidos no experimento TE8B

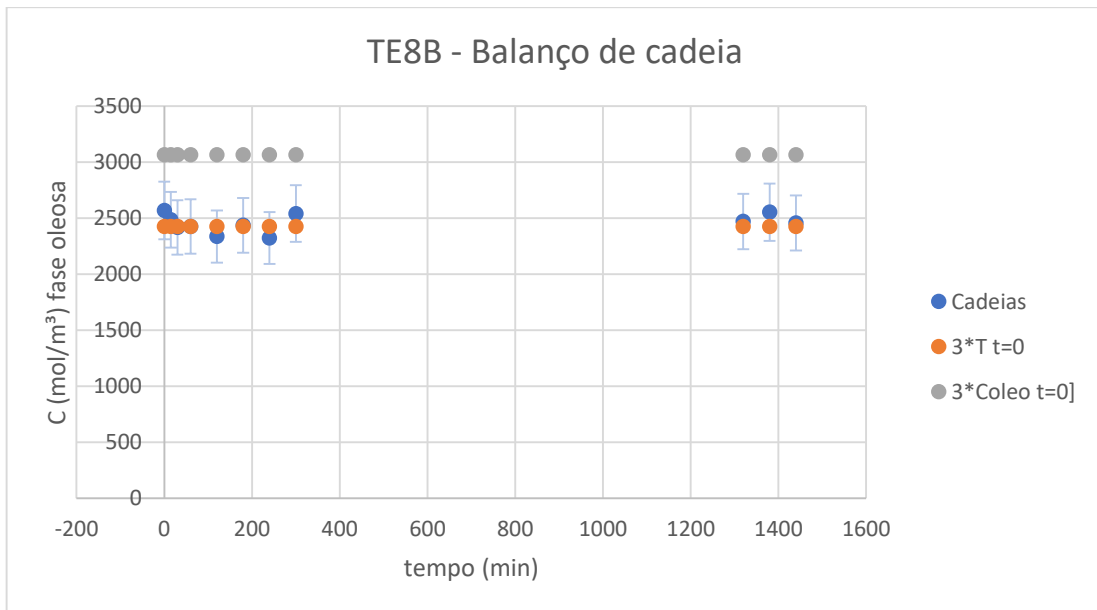


FIGURA 83. Curvas de ajuste para o experimento TE8B

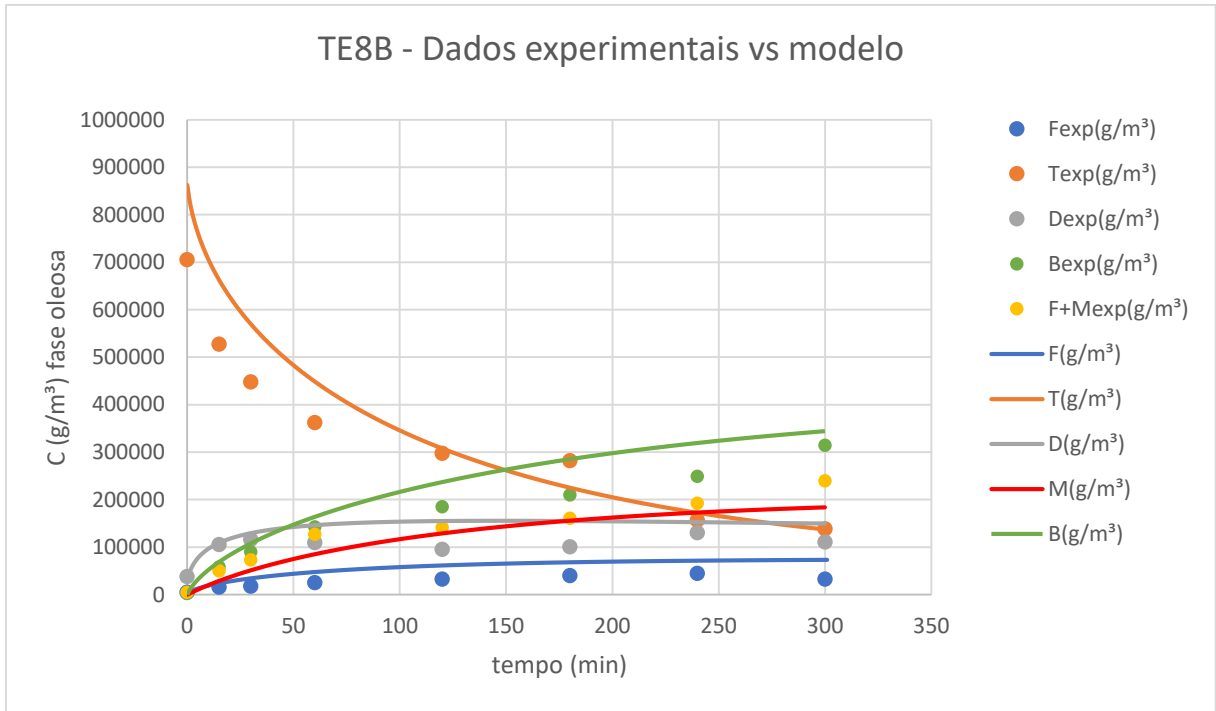
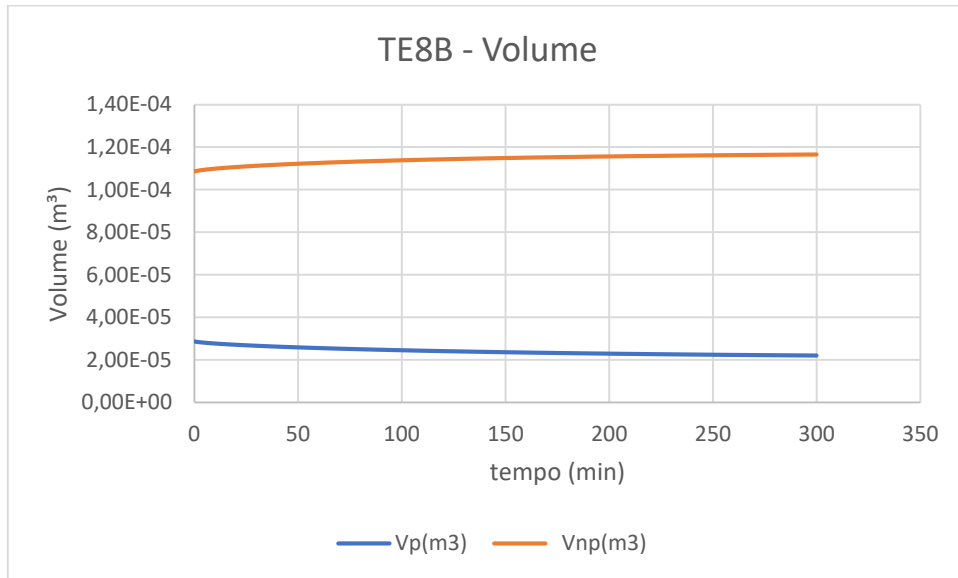


FIGURA 84. Variação do volume no tempo para o experimento TE8B



APÊNDICE C: Resultados obtidos na quantificação de etil éster.

TABELA 24. Conteúdo de ésteres (g ésteres/g amostra) analisados pela cromatografia líquida e a cromatografia gasosa.

Experimento	Conteúdo de ésteres quantificado por HPLC (g ésteres/g amostra)	Conteúdo de ésteres quantificado por GC (g ésteres/g amostra)	Desvio padrão
1	0,5680	0,6023	0,0243
2	0,4549	0,4813	0,0187
3	0,3910	0,3947	0,0026
4	0,5949	0,5866	0,0059
5	0,4699	0,4609	0,0064
6	0,6776	0,7056	0,0198
7	0,8762	0,8907	0,0103
8	0,4280	0,4129	0,0107
9	0,6592	0,7192	0,0424
10	0,7748	0,7274	0,0335

APÊNDICE D: Ajuste preliminar do modelo usando todos os dados experimentais

FIGURA 85. Perfis de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante ajuste preliminar do modelo para experimentos de reações de transesterificação em reator aberto

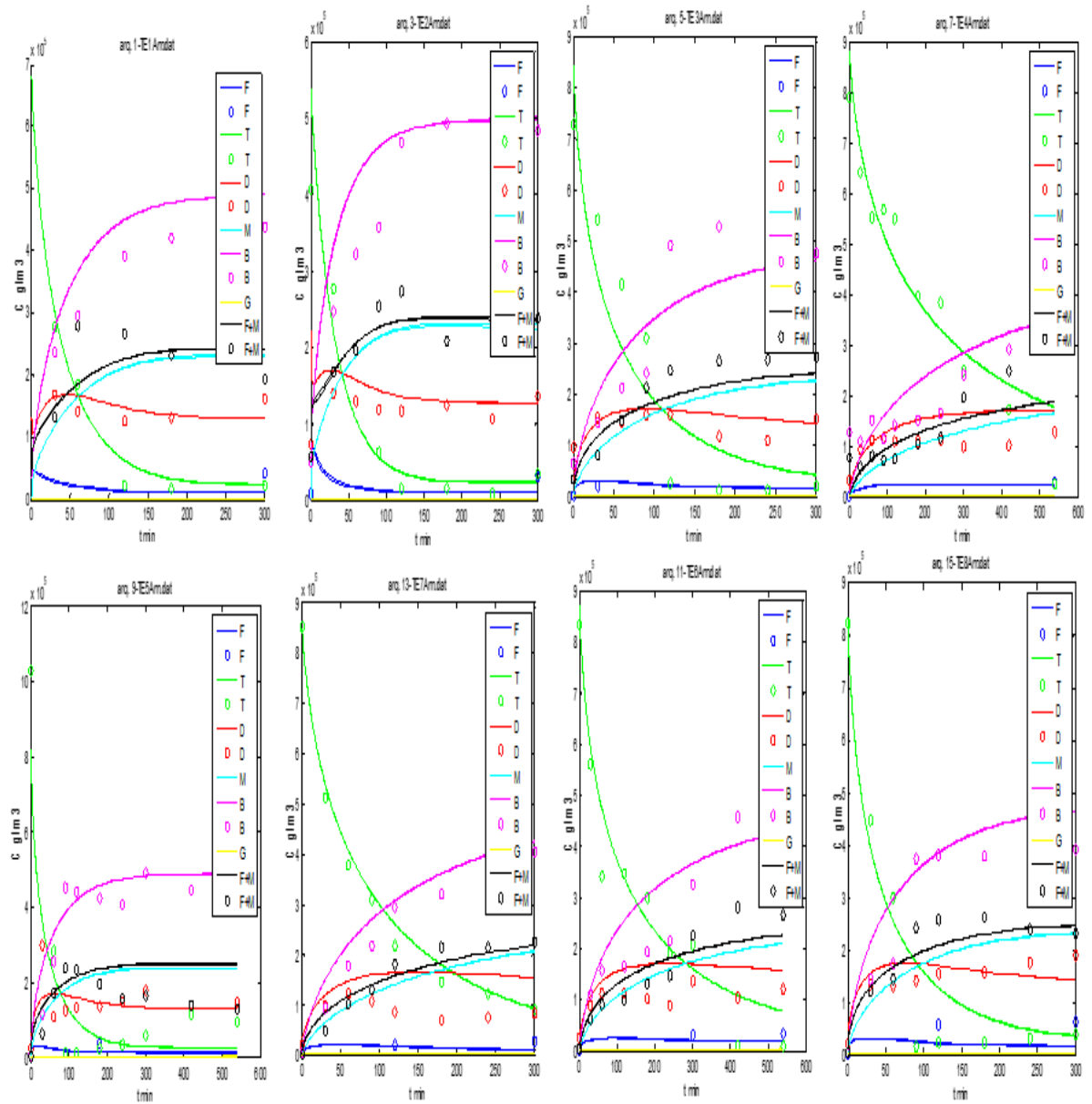


FIGURA 86. Perfis de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante ajuste preliminar do modelo para experimentos de reações de transesterificação em reator fechado

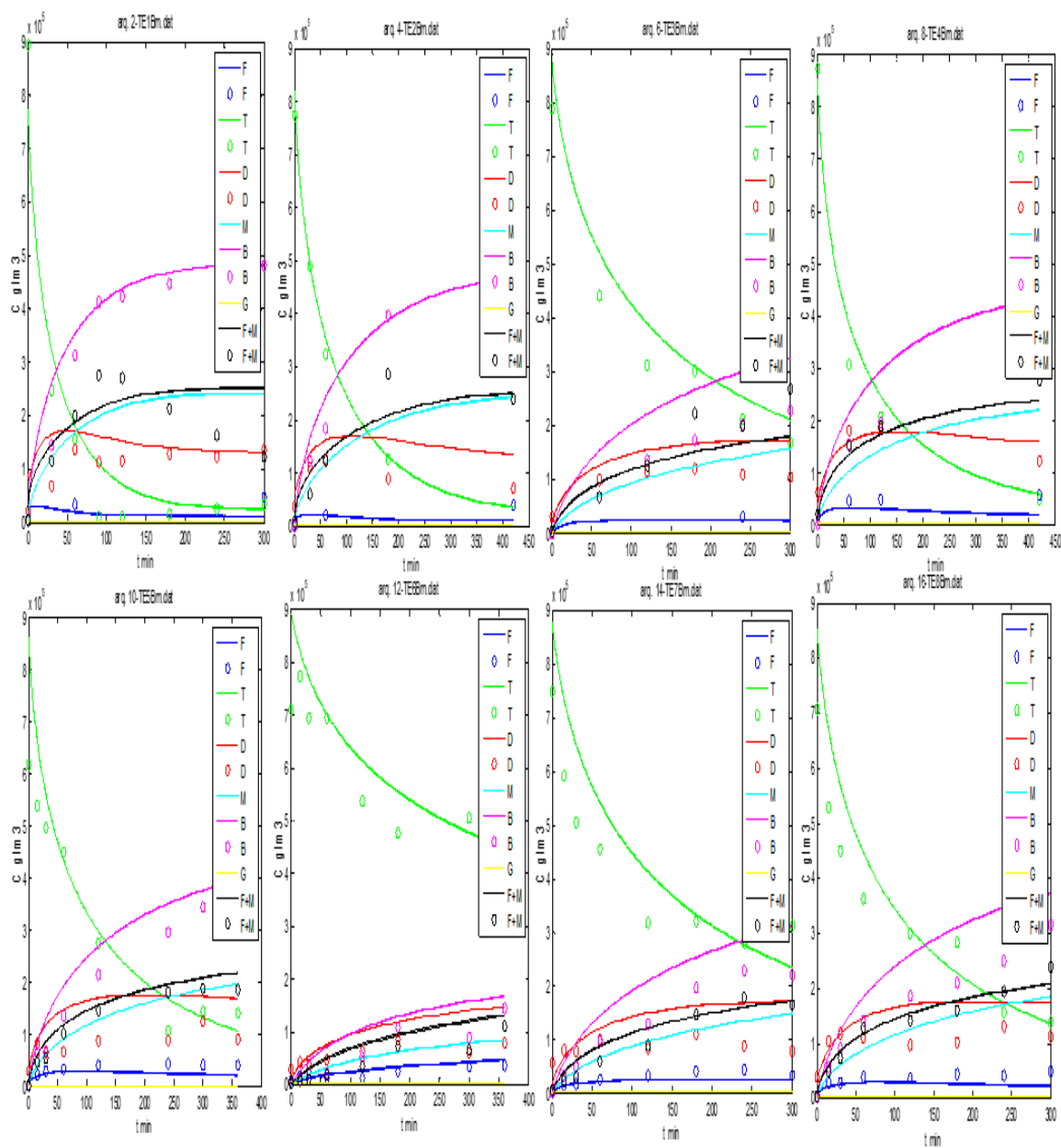


FIGURA 87. Perfil de concentração mássica da fase oleosa obtidas durante ajuste preliminar do modelo para experimentos de reações de hidrólise em reator aberto

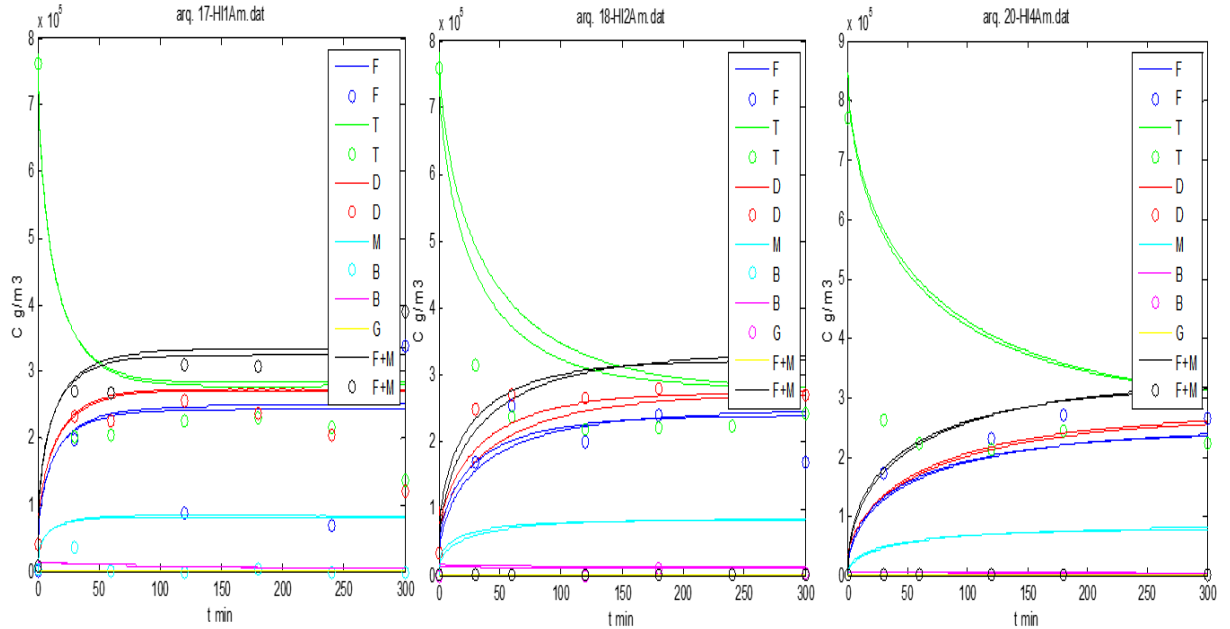


TABELA 25. Parâmetros cinéticos obtidos no ajuste preliminares para o modelo matemático da síntese enzimática de biodiesel etanólico com a lipase líquida NS-40116

Parâmetro	Depois do ajuste	Parâmetro	Depois do ajuste
$K_1 \left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right)$	1,2647E+00	$k_6 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	6,9607E+03
$k_2 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	1,0682E+07	$k_{-6} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	1,9327E+08
$k_{-2} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	2,2711E+10	$k_7 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	9,1151E+03
$k_3 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	3,7031E+06	$k_{-7} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	7,5157E+01
$k_{-3} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	3,9014E+03	$k_8 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	1,6839E+01
$k_4 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	1,5866E+03	$k_{-8} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	3,4281E+02
$k_{-4} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	1,7478E+04	$k_9 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	4,2799E+01
$k_5 \left(\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right)$	1,8244E+05	$k_{-9} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	1,9001E+01
$k_{-5} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{min}} \right)$	9,8287E+04	$K_{10} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol}} \right)$	7,1014E-04

Reposta da função objetivo: 3.19×10^{17} (Local mínimo possível)