

# ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXO VEGETAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM SISTEMA CONTÍNUO

C. M. T. SANTIN<sup>1</sup>, D. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, J. V. de OLIVEIRA<sup>1</sup> e C. DALLA ROSA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

<sup>2</sup> Universidade Federal Fronteira Sul

E-mail para contato: claudiatrentin06@yahoo.com.br

**RESUMO** – Este trabalho investiga a produção contínua de ésteres etílicos de ácidos graxos de soja, utilizando como catalisador a enzima imobilizada *Novozym 435*. Os experimentos foram realizados em um reator de polietileno de alta densidade com 1/16 in de diâmetro externo, diâmetro interno de 4,15 mm, comprimento de 2 metros e volume de 27,05 mL com o leito empacotado e submerso em um banho de ultrassom (Unique ultraSonic cleaner, modelo: USC-180A, frequência US: 40 KHz, potência de até US: 154 W). Avaliou-se os efeitos da razão molar, ácido graxo e álcool (metanol e etanol) 1:1, 1:3 e 1:6, potência de irradiação ultrassônica de 0 W, 61,6 W e 154 W sobre a conversão da reação. Os resultados mostraram que a conversões quase completa de ésteres de ácidos graxos, aproximadamente 98% em um tempo relativamente curto, 6 min de reação, para a temperatura de 65 °C e irradiação ultrassônica de 0 W e 61,6 W, mantendo-se esta conversão quase constante ao longo da reação e sem perda da atividade enzimática.

## 1. INTRODUÇÃO

Existem dois procedimentos básicos para a síntese de biodiesel, batelada e contínuo, que pode ser realizado a temperatura ambiente ou mais elevadas, à pressão atmosférica ou elevada, na presença ou ausência de catalisadores adequados. No método batelada, as fases de reação e da separação são geralmente efetuadas no mesmo tanque, de modo que requer um maior volume do reator e tempos de reação e separação mais longos e os tempos de separação (THANH et al., 2010). O processo contínuo proporciona um menor custo de produção, a qualidade do produto é uniforme, facilita o controle do processo e diminuindo o volume do reator, reduz-se o tempo de retenção necessário para atingir conversões desejadas (VELJKOVIĆ et al., 2012). Como mencionado por Laudani et al., (2007), o reator de leito empacotado pode ser vantajosamente empregado para catálise heterogênea, particularmente para as reações catalisadas por enzimas, devido ao fácil contato e posterior separação, remoção de substâncias inibidoras, além de facilitar a reutilização da enzima é adequado para longa reações e produção em escala industrial, pois proporciona maior contato entre enzima / substrato, e é mais rentável do que operações em bateladas convencionais.

Com base nestes aspetos, o principal objetivo deste trabalho é investigar a esterificação de

ácidos graxos de óleo de soja para produção de ésteres metílicos e etílicos, utilizando uma lipase comercial imobilizada, *Novozym 435*. Para isso, os experimentos foram realizados em um reator de leito empacotado, e avaliou-se os efeitos do álcool da carga ácida, da potência de irradiação ultrassônica e a vazão de alimentação de substratos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Nas reações de esterificação utilizou-se como ácido graxo vegetal (lote: PA 1060.525 A12) produzido por SGS Agricultura e Indústria Ltda, em Ponta Grossa – PR, álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e a enzima comercial *Novozym 435*, com atividade inicial de 47,9 U/g, produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macro porosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR.

Para a determinação da atividade enzimática os seguintes reagentes/ solventes foram utilizados: acetona PA ACS (Vetec, 99,5%), álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e hexano (Nuclear, P.A). Ácido láurico (Vetec, 98% CG) e álcool n-propílico normal (Nuclear, P.A 99,5%) foram utilizados como substratos para dosagem da atividade de esterificação das lipases.

### **2.2 Aparato e procedimento experimental**

O sistema experimental utilizado neste trabalho consiste num reator de polietileno de alta densidade (PA 12) com 1/16 in de diâmetro externo, espessura de 1,1 mm, diâmetro interno de 4,15 mm, comprimento de 2 metros e volume de 27,05 mL com alimentação da mistura reacional carga ácida e álcool etílico/álcool metílico (substrato), com uso de aproximadamente 11 g de catalisador, sendo este a enzima *Novozym 435*, um banho de ultrassom (Unique ultraSonic cleaner, modelo: USC-180A, frequência US: 40KHz, potência de até US: 154W).

O procedimento experimental consistiu no empacotamento do reator com a enzima sob a ação de um agitador magnético, a fim de realizar um empacotamento mais eficiente, conforme Dalla Rosa et al., (2009). Após acoplou-se o reator ao sistema reacional e imergiu-o no banho de ultrassom já a condicionado na temperatura e potência ser realizado o experimento, iniciou-se o bombeamento contínuo dos substratos, previamente homogeneizados sob a mesma agitação durante a reação por um agitador mecânico (Marca Fisatom, Modelo 712) inserido no frasco contendo a mistura reacional, a uma dada razão molar (ácido graxo:álcool) e vazão volumétrica de alimentação do substrato, até o completo preenchimento do sistema reacional, usando uma bomba de alta pressão para líquidos (HPLC) Digital Série III (Marca Acuflow). A bomba é utilizada para deslocar a mistura reacional para a zona de reação e manter a pressão do sistema.

Embora as definições mais complexas poderiam ser usados para a avaliação do tempo de permanência no reator (o tempo de residência superficial) (IMAHARA et al, 2007), considerando o fato de que as temperaturas de operação são amenas, o tempo de residência aparente,  $\pi$ , foi calculado dividindo o volume do reator (ml) pela taxa de fluxo de substratos (mL/min) fixado na bomba de

líquido, o qual foi definido como tempo de residência aparente, tal como segue na Equação 1:

$$\tau = \frac{\varepsilon_L \times V_R}{q} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $\varepsilon$  é a fração do leito do reator vazio,  $V_R$  é o volume total do leito e  $q$  é a vazão de alimentação dos substratos (ácidos graxos + álcool). A fração do leito do reator vazio utilizado neste trabalho foi estimada utilizando o mesmo procedimento descrito por Dalla Rosa et al., (2009). Ao longo deste trabalho, a temperatura foi fixada em 65 °C, assim como este valor de temperatura tem sido relatado para se obter a melhor atividade de *Novozym 435* (Novo Nordisk, 1992).

**Metodologia analítica:** Para a quantificação de ésteres de ácidos graxos as amostras foram injetada (1  $\mu$ L) em um cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações.

Como a reação de esterificação produz além dos ésteres também água, as amostras coletadas foram analisadas através do método da titulação. Este é um método eficiente que substitui, neste caso, a utilização da cromatografia gasosa na quantificação dos ácidos graxos, sem necessidade de secagem para completa remoção da água da amostra e não necessitando de evaporação do excesso de álcool, como podem ser observados os resultados comparando o método cromatográfico e o de titulação, para comprovação da efetividade da técnica, com base na comparação realizada entre os dois métodos e a literatura reportada pelos seguintes autores (CHEN et al., 2012, ZHANG et al., 2012) a conversão dos ácidos graxos foi determinada por titulação.

A técnica da titulação foi realizada de acordo com a IUPAC 2.201 o AOCS Cd 3d - 63 e consiste na determinação da acidez do meio, devido a presença dos ácidos graxos livres. Estes ácidos são capazes de reagir com a solução de hidróxido de potássio e o resultado obtido é expresso em mg KOH/g de amostra e normalmente a acidez titulável corresponde ao dobro do percentual do ácido correspondente da amostra.

O índice de acidez é determinado pela Equação 2.

$$A = \frac{56,1 \times V_{KOH} \times N_{KOH}}{M_{amostra}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,  $A$  representa o índice de acidez (mg KOH/g), 56,1 é o Equivalente grama do KOH,  $V_{KOH}$  corresponde ao volume de KOH gasto na titulação (L),  $N_{KOH}$  é a molaridade do KOH (mol/L) usado na titulação e  $M_{amostra}$  é a massa (g) de amostra utilizada para titular.

Para determinar a o percentual de conversão do ácido graxo vegetal é necessário determinar a acidez da solução alimentada no reator. Determinando-se a acidez inicial e final (após a reação) é possível determinar a conversão de ácidos graxos, que está diretamente relacionada com o teor em ésteres da mistura. O cálculo para conversão dos ácidos graxos é apresentado na Equação 3.

$$Convers\tilde{a}o(\%) = \left( \frac{A_i - A_f}{A_i} \right) * 100 \quad (\text{Equa\c{c}\~ao 3})$$

Onde  $A_i$  corresponde ao índice de acidez inicial e  $A_f$  ao índice de acidez final.

A acidez no tempo  $t$  é calculada pontualmente, de acordo com a cinética realizada, ou seja, assim que a amostra é coletada já é devidamente pesada e titulada evitando a evaporação dos componentes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito da razão molar e do álcool

O efeito da razão molar e do álcool foi avaliado para as seguintes variáveis, razão molar (carga ácida/etanol) e (carga ácida/metanol) 1:3 e 1:1, temperatura 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W e vazão de alimentação de substrato de 0,5mL/min para o biocatalisador *Novozym 435*. A Figura 1 apresenta os resultados obtidos nesta etapa.

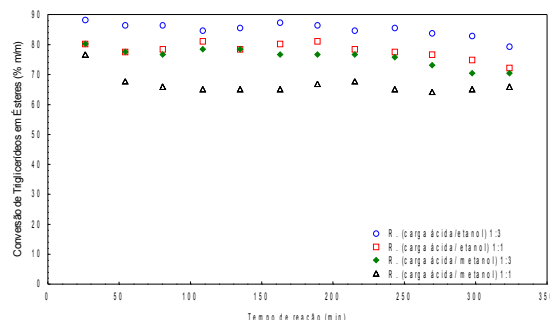


Figura 1- Efeito da razão molar e do álcool sobre a conversão em ésteres. Razão molar (carga ácida/etanol) e (carga ácida/metanol) 1:3 e 1:1, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W.

Com base na Figura 1 verifica-se que também para a reação de esterificação o etanol apresenta vantagens sobre o metanol, proporcionando melhores conversões em ésteres, e em relação à razão molar pode-se visualizar claramente que a reação realizada com a razão molar (carga ácida/etanol) 1:3 apresentou os melhores resultados visto que para os tempos de reação de 27 a 81 minutos obteve-se 88,26, 86,56 e 86,88% em ésteres. Para a razão molar 1:1, obteve-se 80,39, 77,25 e 78,62% em ésteres etílicos. Para todos os experimentos realizados as conversões se mantiveram constantes ao longo dos 324 minutos de reação estudados.

Como a reação de esterificação produz água, as análises de conversão foram realizadas através do método de titulação, mas para comprovar a eficiência do método adotado realizou-se a análise comparativa em cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), conforme Figura 2.

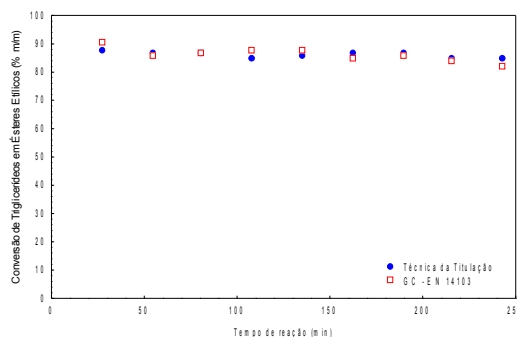


Figura 2 - Comparação entre da técnica de titulação e a EN 14103. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W.

Ao final de cada reação de esterificação, realizou-se a medida de atividade da enzima *Novozym 435*, conforme apresentado na Tabela 1. A análise desta tabela permite verificar que a enzima não perdeu sua atividade de esterificação (atividade inicial de 47,80 U/g).

Tabela 1 - Atividade enzimática ao final da reação de esterificação de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom.

Razão molar	Atividade Enzimática (U/g)
Carga ácida/ etanol (1:3)	44,93
Carga ácida/ etanol (1:1)	54,15
Carga ácida/ metanol (1:3)	47,02
Carga ácida/ metanol (1:1)	53,53

### 3.2 Efeito da potência ultrassônica

O efeito da potência ultrassônica foi avaliado para as potências de 0 e 154 W, 65 °C, vazão de alimentação de substrato de 0,5mL/min e razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, de acordo com a Figura 3.

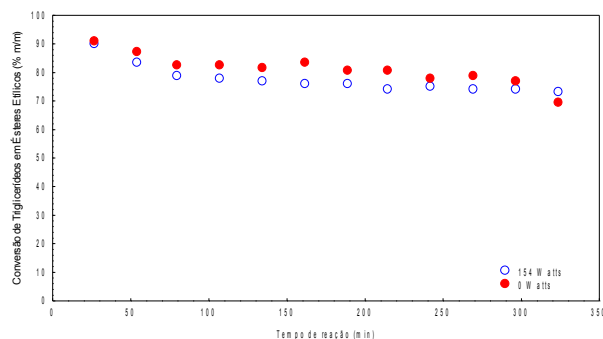
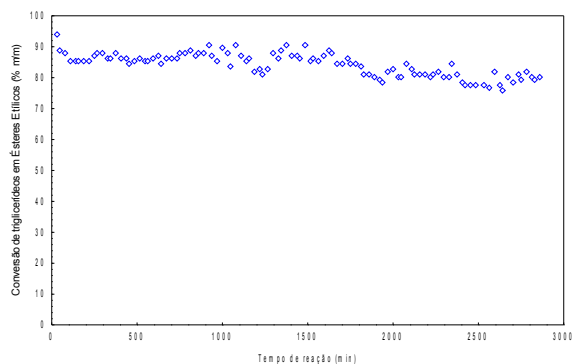


Figura 3 - Efeito da potência ultrassônica. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154 W.

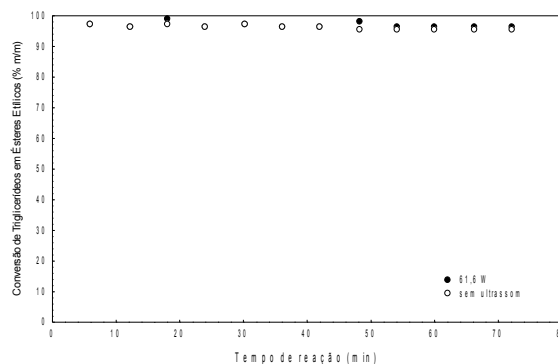
A potência ultrassônica não exerceu nenhuma influência sobre a reação de esterificação, conforme pode ser observado na Figura 3. A atividade enzimática ao final da reação para a reação realizada a 154 W foi de 45,85 U/g e para a reação realizada a 0 W foi de 45,80 U/g, comprovando também que a utilização do ultrassom não interfere na atividade enzimática.

Lee et al., (2011) estudaram o efeito da irradiação ultrassônica sobre o processo de produção de biodiesel a partir de óleo vegetal e verificaram que o ultrassom apresentou efeitos sobre o aquecimento e mistura dos reagentes. A irradiação ultrassônica reduziu o tempo de reação e as propriedades do biodiesel sem qualquer passo adicional de mistura no processo de esterificação de óleos vegetais.

Estabilidade da produção de biodiesel enzimático: Com base nos resultados expressos pelas Figuras 1 e 3 verifica-se que a produção de biodiesel através da reação de esterificação é praticamente constante durante a cinética realizada de 324 minutos. Desta forma, com o intuito de comprovar esta estabilidade, realizou um estudo com a melhor condição, sendo esta, 65 °C, vazão de alimentação de substrato de 0,5 mL/min, razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3 e 0 W de potência, e vazão de alimentação de 2,5 mL/min, razão molar (carga ácida/ etanol) de 1:6, conforme apresentado na Figura 4 (a-b).



(a)



(b)

Figura 4 – (a) Estabilidade da produção de biodiesel via esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 W. (b) Produção de biodiesel via reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, sem potência ultrassônica e com potência ultrassônica de 61,6 W.

Ao final da reação, a enzima apresentou atividade de 32,40 U/g e o estudo realizado comprovou a eficácia do processo sendo que a produção de biodiesel permaneceu contínua e estável durante as 48 horas estudadas.

De acordo com a Figura 4(b), é possível constatar que a potência ultrassônica não exerce nenhuma influência em relação a conversão de ésteres, e com o aumento da razão molar e da vazão de alimentação observa-se uma melhor conversão em ésteres etílicos, sendo esta de 97,86% em 6 minutos de reação e de 96,97% em 72 minutos. Já a atividade enzimática ao final da reação foi de 47,25 U/g, não ocorrendo alteração na mesma, para ambas as potências. Verifica-se também que os dados da Figura 4(b) apresentam o mesmo comportamento dos dados da Figura 5(a), sendo que possivelmente se a reação tivesse percorrido um tempo igual ou superior às 48 horas a conversão em ésteres também seria estável. Ao compararmos estes valores com os apresentados na Figura 3, comprova-se que não é necessário tempos de reação longos para obter bons resultados, sendo que em 27 minutos para a razão molar 1:3 e vazão de alimentação de 0,5 mL/min obteve-se 93,71% e em 48 horas 80,07% em ésteres etílicos.

A fim de verificar o efeito do catalisador realizou-se uma reação sem a presença do mesmo, com razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato de 0,5 mL/min, 65 °C e 0 W de potência, e constatou-se que a reação de esterificação é auto-catalítica, isto é, mesmo sem a utilização do catalisador conversões na ordem de 25,26% foram obtidas.

Avellaneda e Salvadó (2011) compararam a transesterificação convencional com a transesterificação em reator tubular contínuo. Neste reator os reagentes (metanol, óleo e hidróxido de potássio) escoavam através de um tubo helicoidal submerso em um banho de aquecimento a 60 °C. O reator possui a cinco tomadas de amostras distribuídas sem uniformidade para permitir a retirada de alíquotas em tempos diferentes de reação com o intuito de encontrar o melhor/menor tempo de reação, evitando assim a necessidade de agitação mecânica do sistema. Os autores estudaram uma maneira de melhorar a qualidade do biodiesel obtido e variaram o sistema helicoidal incorporando um micromix estático, fornecendo a energia sob a forma do ultrassom no banho de aquecimento. O reator produziu biodiesel e glicerina em composições aproximadamente iguais aqueles obtidos no processo em batelada (índice de ácidos graxos 89% no tempo de 75 minutos), mas no processo contínuo (2,5 mL/min) foi observado o mesmo rendimento para um tempo de 13 minutos, aproximadamente 6 vezes mais rápido.

## 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliou-se os efeitos de algumas variáveis de processo sobre a produção de ésteres a partir de uma carga ácida utilizando a *Novozym 435* como catalisadores em um reator de leito empacotado. Os resultados mostraram que a esterificação catalisada por lipase pode ser uma alternativa potencial para a produção de biodiesel convencional, pois foram obtidos rendimentos satisfatórios em torno de 97% em um tempo de 6 minutos de reação com condições de temperatura e potência de irradiação amenas, abrindo possibilidades para manipular variáveis de processo como configurações de reatores bem como para alcançar rendimentos muito satisfatórios. Além disso, a boa estabilidade do sistema reacional pode ser de grande interesse devido à pequena perda de atividade da enzima tornando possível a construção de equipamento em larga escala para possíveis operações em longo prazo.



## 5. REFERÊNCIAS

- AVELLANEDA, F.; SALVADÓ, J. Continuous transesterification of biodiesel in a helicoidal reactor using recycled oil. *Fuel Process. Technol.*, v. 92, p. 83-91, 2011.
- CHEN, W.; YIN, Y.; CHEN, H.; WANG, Z. Production of biodiesel by esterification of stearic acid over aminophosphonic acid resin D418. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 51, p. 5402-5407, 2012.
- DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids, *Bioresour. Technol.* 100, 5818-5826. 2009.
- IMAHARA, H.; MINAMI, E.; HARI, S.; SAKA, S. Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol, *Fuel*, v. 87, p. 1-6, 2007.
- LAUDANI, C.G.; HABULIN, M.; KNEZ, H.; PORTA, G.D.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench scale packed-bed reactor study, *J. Supercrit. Fluids*, v. 41, p. 74-81, 2007.
- LEE, S. B.; LEE, J. D.; HONG, I. K. Ultrasonic energy effect on vegetable oil based biodiesel synthetic process. *J. Ind. Eng. Chem.*, v. 17, p. 138-143, 2011.
- LEMAIRE, A.; WANG, Q. Y.; WEI, Y.; LIU, Z.; SU, B. L. Hierarchically structured meso-macroporous aluminosilicates with high tetrahedral aluminium content in acid catalyzed esterification of fatty acids. *J. Colloid and Interface Sci.*, v. 363, p. 511-520, 2011.
- Novo Nordisk. Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions, *Technical Report A-05948*, 1992.
- STANDARD UNE-EN 14103. Fat and oil derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid, 2003.
- VELJKOVIĆ, V.B.; AVRAMOVIĆ, J. M.; STAMENKOVIĆ, O. S. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 16, p. 1193-1209, 2012.
- ZHANG, H.; DING, J.; QIU, Y.; ZHAO, Z. Kinetics of esterification of oil with different alcohols by a cation ion-exchange resin/polyethersulfone hybrid catalytic membrane. *Bioresour. Technol.*, v. 112, p. 28-33, 2012.