

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ANNY CAROLINE SOARES DA SILVA

ESTUDO CINÉTICO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS
UTILIZANDO CATÁLISE ENZIMÁTICA

CURITIBA

2011

ANNY CAROLINE SOARES DA SILVA

**ESTUDO CINÉTICO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS
UTILIZANDO CATÁLISE ENZIMÁTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: David Alexander Mitchell

Co-orientador: Wagner Roberto de Oliveira Pimentel

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida...

Aos professores do PPGEQ por todo aprendizado, em especial ao Professor Marcelo Lenzi pelo apoio e incentivo,

Ao meu orientador David Mitchell,

Ao meu co-orientador Wagner Roberto pela disponibilidade, mesmo nos feriados e finais de semana, pelo conhecimento compartilhado, apoio e amizade, muitíssimo obrigada!

Ao professor Fred de Carvalho e Filipe Coelho pelo compartilhamento de conhecimentos,

Aos amigos que mesmo distantes se fizeram presentes (Carla, Júnior, Thanyara),

À minha amiga-irmã Rosana Reis não existem palavras para agradecer a força durante toda a jornada,

À mãe Dilza, pai Zeca e irmã Vana que foi meu primeiro exemplo de vida,

Ao meu marido, Davi, pelo incentivo e paciência,

E, finalmente, meus pais (Antonio e Josefa) e minha irmã (Carlinha) que nunca duvidaram, nem por um instante, que daria tudo certo.

“... Sê forte e corajoso, não temas, nem te desanimes, porque o Senhor Deus, meu Deus, há de ser contigo; não te deixará, nem te desampará”.

(1 Crônicas 28.20)

RESUMO

O estudo da cinética da transesterificação enzimática de triacilgliceróis em éster de biodiesel na ausência de co-solvente é proposto neste trabalho. Sistemas ausentes de co-solventes vêm sendo estudados, pois além de serem mais corretos do ponto de vista ambiental, eliminam etapas de separação e recuperação do solvente. Entretanto, na literatura são encontrados diversos trabalhos que caracterizam a cinética da reação enzimática de modo superficial, sem a realização de maiores estudos que relacionam as reações cinéticas envolvidas. Dentre os modelos cinéticos encontrados, três descrevem reação com dois substratos e dois produtos; estes modelos foram testados e comparados a fim de selecionar o que melhor representa os dados experimentais. Os dois primeiros modelos seguem o mecanismo Ping Pong Bi Bi para explicar a cinética da reação de transesterificação na produção de biodiesel, com a incorporação de inibição por um dos reagentes, o álcool, enquanto o terceiro modelo propõe um mecanismo simples da reação de transesterificação no qual é desconsiderado o efeito de inibição do álcool. A modelagem matemática foi realizada utilizando dados experimentais encontrados na literatura. Os parâmetros cinéticos foram otimizados utilizando o método de algoritmo genético como ferramenta de otimização. A modelagem dos mecanismos encontrados na literatura e a simulação dos dados experimentais do sistema foram realizadas utilizando o software Matlab 7.0. Na escolha do modelo que melhor representou os dados experimentais, foram considerados os erros calculados e o coeficiente de correlação para cada conjunto de dados. O segundo modelo testado foi o que forneceu o melhor ajuste, nesse modelo tem-se a formação de biodiesel à medida que a o triacilglicerol é quebrado, entretanto novos ensaios são necessários para que seja medida, além do rendimento, a variação da concentração das demais espécies envolvidas no sistema ao longo do tempo de ensaio.

Palavras-chave: Biodiesel. Modelagem cinética. Ping Pong Bi Bi.

ABSTRACT

The current work analyzes the kinetics of the enzymatic transesterification of triacylglycerols, in a solvent free system, for the production of biodiesel esters. Solvent-free transesterification systems are more environmentally friendly, and eliminate the need for solvent separation and recovery steps. However, the kinetics of the transesterification reaction in this system have not been well characterized to date, with most studies simply limiting themselves to determining the optimum conditions for the reaction. In the current work three kinetic models that were recently proposed in the literature were tested against experimental results that were also obtained from the literature. The first two models are based on the Ping Pong Bi Bi mechanism and the third model proposes a mechanism that mimics simple chemical kinetics for each reaction. The genetic algorithm was used as an optimization tool to determine the parameters of the model that gave the best fit to the experimental results. The modeling and simulation were performed using Matlab 7.0. An inspection of the errors and the correlation coefficient for each data set showed that the second model tested gave the best fit. It is recommended that during future studies of enzymatic transesterification of triacylglycerols in solvent free systems the concentrations of all species in the system be determined, and not simply the concentration of biodiesel esters.

Keywords: Biodiesel. Kinetic Modeling. Ping Pong Bi Bi.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: REAÇÃO GERAL DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	16
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS VIA CATÁLISE ALCALINA. FONTE: KUČEK, 2004.....	17
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS VIA CATÁLISE ÁCIDA. FONTE: SCHUCHARDT <i>ET AL.</i> (1998).	18
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BIODIESEL.	19
FIGURA 5: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE PRODUZIDA PELA BACTÉRIA <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> . AS FITAS A E B SÃO INDICADAS RESPECTIVAMENTE PELAS HÉLICES EM AZUL E PELAS SETAS EM VERDE. EM AMARELO É INDICADA A POSIÇÃO DO ÍON Ca^{+2} E OS RESÍDUOS DA TRÍADE CATALÍTICA ESTÃO MOSTRADOS EM VERMELHO. FONTE: SCHRAG <i>ET AL.</i> , 1997.	20
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES. FONTE: ZAGO, 2010.	22
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO GERAL DO FUNCIONAMENTO DO MODELO DE PING PONG BI BI..	26
FIGURA 8: COMPLEXO DE REAÇÕES PARA O PRIMEIRO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP <i>ET AL.</i> , 2008. ADAPTADO DE CHEIRSILP <i>ET AL.</i> (2008).	27
FIGURA 9: DESTAQUE PARA O COMPLEXO EF E AS POSSÍVEIS ROTAS DE REAÇÕES POSSÍVEIS. ADAPTADO DE CHEIRSILP <i>ET AL.</i> (2008).	29
FIGURA 10: SEGUNDO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP <i>ET AL.</i> (2008). DESTAQUE PARA A ENZIMA FORMANDO COMPLEXO COM O TRIACILGLICEROL, DIACILGLICEROL, MONOACILGLICEROL E ÁCIDO GRAXO LIVRE. ADAPTADO DE CHEIRSILP <i>ET AL.</i> (2008).	31
FIGURA 11: APRESENTA O COMPLEXO DE REAÇÕES PARA O PRIMEIRO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP <i>ET AL.</i> (2008).	36
FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO DO SEGUNDO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP <i>ET AL.</i> (2008).	41
FIGURA 13: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL PARA O CONJUNTO DE DADOS T_1	54

FIGURA 14: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) FORMADO CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T ₁	54
FIGURA 15: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO T ₂	55
FIGURA 16: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T ₂	55
FIGURA 17: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T ₃	57
FIGURA 18: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T ₃	57
FIGURA 19: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T ₄	58
FIGURA 20: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T ₄	58
FIGURA 21: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T ₅	59
FIGURA 22: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T ₅	59
FIGURA 23: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS V ₁	60

FIGURA 24: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS V_160

FIGURA 25: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS V_261

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR SOB AGITAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> LTEB11.....	25
TABELA 2: INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO MEIO REACIONAL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR SOB AGITAÇÃO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> LTEB11.....	26
TABELA 3: DADOS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE POR SALUM (2010) UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO.....	48
TABELA 4: DADOS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE POR SALUM (2010) UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DOS MODELOS APRESENTADOS.....	49
TABELA 5: PARÂMETROS AJUSTADOS ATRAVÉS DO ALGORITMO GENETICO PARA O MODELO 01.....	51
TABELA 6: PARÂMETROS AJUSTADOS ATRAVÉS DO ALGORITMO GENETICO PARA O MODELO 02.....	52
TABELA 7: PARÂMETROS AJUSTADOS ATRAVÉS DO ALGORITMO GENETICO PARA O MODELO 03.....	52
TABELA 8: COMPARATIVO ENTRE OS ERROS CALCULADOS PARA OS MODELOS TESTADOS.....	53
TABELA 9: ANÁLISE DE VARIÂNCIA – ANOVA: CONJUNTO TREINAMENTO	62
TABELA 10: ANÁLISE DE VARIÂNCIA – ANOVA: CONJUNTO VALIDAÇÃO.....	62

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

- [Al] – concentração molar do álcool
- [D] - concentração molar do diacilglicerol
- [F] – concentração molar do ácido graxo livre
- [M] – concentração molar do monoacilglicerol
- [T] – concentração molar do triacilglicerol
- [W] – concentração molar da água
- Al – representa o álcool
- A_w – atividade de água
- B – representa o biodiesel
- $C_{[DE]}(t)$ – concentração do complexo enzima diacilglicerol
- $C_{[ME]}(t)$ – concentração do complexo enzima monoacilglicerol
- $C_{[TE]}(t)$ – concentração do complexo enzima triacilglicerol
- $C_c(t)$ – concentração de enzima ativa
- C_i – concentração de cada espécie i no sistema
- D – representa o diacilglicerol
- E – representa a enzima
- E^* - representa a enzima livre
- ED – complexo enzima diacilglicerol
- EDF – complexo enzima-diacilglicerol-ácido graxo livre
- E_{exp} – concentração de éster etílico
- EF – complexo enzima-ácido graxo livre
- EGF – complexo enzima-glicerol-ácido graxo livre
- EM – complexo enzima monoacilglicerol
- EMF – complexo enzima-monoacilglicerol-ácido graxo livre
- Es – representa o éster formado
- ET – complexo enzima-triacilglicerol
- E_T – representa a concentração de enzima total
- G – representa o glicerol
- i – número de amostras
- j - número de ensaios

$k_1, k_3, k_5, k_7, k_9, k_{11}, k_{13}, k_{15}, k_{17}, k_{19}, k_{21}$ e k_{23} – são constantes de velocidade no sentido direto

$k_2, k_4, k_6, k_8, k_{10}, k_{12}, k_{14}, k_{16}, k_{18}, k_{20}$ e k_{22} – são constantes de velocidade no sentido indireto

M – representa o monoacilglicerol

N_i – número de moles de cada espécie i

R – representa a cinética do sistema

r – representa a velocidade de cada reação

T – representa o triacilglicerol

V – representa o volume do reator

V_{eES} – constante de esterificação dos etil ésteres

V_{mD} – constante de hidrólise de diacilglicerol

V_{mM} – constante de hidrólise de monoacilglicerol

V_{mT} – constante de hidrólise do triacilglicerol

V_{rD} – constante de re-esterificação do diacilglicerol

V_{rM} – constante de re-esterificação do monoacilglicerol

V_{rT} – constante de re-esterificação do triacilglicerol

W – representa a água

X (t) – rendimento experimental

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1.	BIODIESEL.....	16
2.2.	CATÁLISE ENZIMÁTICA	18
2.2.1.	Lipases	19
2.2.2.	Produção de Lipases	21
2.2.3.1.	Trabalho experimental realizado por SALUM (2010)	24
2.3.	CINÉTICA ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	26
2.3.1.	Primeiro modelo proposto por CHEIRSILP <i>et al.</i> , 2008.	27
2.3.2.	Segundo modelo proposto por CHEIRSILP <i>et al.</i> , 2008.	31
2.3.3.	Terceiro modelo proposto por KROUMOV <i>et al.</i> , 2007.	31
2.4.1.	Algoritmo Genético	33
3.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
3.1.	OBJETIVO GERAL	35
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4.	MODELAGEM DO PROCESSO.....	36
4.1.	MODELOS CINÉTICOS	36
4.1.1.	Modelo 01	36
4.1.2.	Modelo 02.....	41
4.1.3.	Modelo 03.....	44
4.2.	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DOS MODELOS.....	46
4.3.	MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.	CONCLUSÃO E SUGESTÕES	63
6.1.	CONCLUSÃO	63
6.2.	SUGESTÕES.....	64
7.	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

A reação de transesterificação corresponde à reação de um triacilglicerol e um álcool, reação essa que pode ocorrer na presença ou ausência de um catalisador para produzir ésteres de ácidos graxos e glicerina.

SALUM (2010) realizou estudos, em escala de bancada, da transesterificação enzimática do óleo e álcool para a produção de éster de biodiesel. Esta reação, que foi realizada em ausência de co-solvente em um reator sob agitação, foi catalisada por um sólido fermentado contendo a lipase produzida pela bactéria *Burkholderia cepacia* e obteve rendimentos de aproximadamente 50%. Sistemas livres de co-solventes vêm sendo estudados, pois além de ser mais correto do ponto de vista ambiental, elimina etapas de separação e recuperação do solvente.

Para o estudo cinético das reações de transesterificação, a literatura (CHEIRSILP *et al.*, 2008, AL-ZUHAIR *et al.*, 2007, FJERBAEK *et al.*, 2009) mostra trabalhos onde modelos baseados no mecanismo de Ping Pong Bi Bi se ajustam. Os modelos consideram, entre outros fenômenos, o efeito de inibição da enzima pelo álcool.

KROUMOV *et al.* (2007) e CHEIRSILP *et al.* (2008) desenvolveram modelos cinéticos aplicados à reação de transesterificação catalisada enzimaticamente para a produção de biodiesel, em ausência de co-solvente. O modelo proposto por KROUMOV *et al.* (2007), parte de um mecanismo simples de reação com dois reagentes, sem considerar o efeito inibitório de um dos reagentes. Os dois modelos propostos por CHEIRSILP *et al.* (2008), consideram o efeito inibição do álcool, e eles diferem na rota da reação de formação do biodiesel.

O presente trabalho visa realizar a simulação cinética e otimização dos parâmetros cinéticos do sistema de SALUM (2010), utilizando os modelos cinéticos desenvolvidos por KROUMOV *et al.* (2007) e CHEIRSILP *et al.* (2008).

Os dados experimentais apresentados são relativos ao rendimento em éster de biodiesel para diferentes condições operacionais. Devido à restrição dos dados experimentais, uma vez que não foram realizadas medidas das outras espécies presentes ao longo do tempo reacional, tais como diacilglicerol, monoacilglicerol, ácido graxo e álcool, optou-se por utilizar a ferramenta de otimização algoritmo genético, AG, para o ajuste dos parâmetros cinéticos. Dessa forma, é realizada uma avaliação do modelo cinético que apresenta melhor

ajuste, avaliando os erros calculados para cada conjunto de dados e o coeficiente de correlação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIODIESEL

O biodiesel é definido quimicamente como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural (RAMOS, 1999; SCHUCHARDT *et al.*, 1998; ZAGONEL, 2001). No Brasil, a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), por meio da Lei de nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, definiu o biodiesel como combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna ou para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005). O único tipo de biodiesel que foi regulamentado no Brasil é o composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleo vegetais ou gordura animal (BRASIL, 2008).

O biodiesel apresenta diversas vantagens em relação ao diesel de petróleo, como por exemplo, a redução da poluição do ar, além de não contribuir para aumento do efeito estufa (PARENTE, 2003; VAN GERPEN, 2005). A redução da utilização do diesel proveniente de petróleo acarreta ainda na diminuição dos derramamentos de petróleo, bem como da geração de resíduos tóxicos. Outros fatores associados são: redução da dependência do diesel importado e facilidade de transporte e armazenamento, por apresentar menor risco de explosão (MAGALHÃES, 2010).

Esse combustível renovável pode ser produzido a partir do óleo de plantas oleaginosas, de óleos residuais e de gorduras animais, matérias-primas constituídas principalmente de triacilgliceróis. A reação de transesterificação, atualmente a rota mais usada para a produção de biodiesel, leva à obtenção de ésteres de ácidos graxos e glicerina a partir de um triacilglicerol e um álcool, geralmente na presença de um catalisador. A Figura 1 mostra a reação de transesterificação.



FIGURA 1: REAÇÃO GERAL DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O metanol é o álcool mais comumente utilizado na produção industrial de biodiesel, devido a sua reatividade. No Brasil, a partir de 2002, a etanolise tem se mostrado promissora (POUSA *et al.*, 2007), uma vez que o país é um dos maiores produtores do mundo de etanol de cana-de-açúcar (UNICA, 2011).

Existem três processos para a produção de biodiesel por transesterificação: a catálise química, a catálise enzimática e uso de condições especiais sem catalisador (por exemplo, altas temperaturas e pressões e fluidos supercríticos).

CANDEIA (2008) considera a catálise química como o processo mais viável para a produção de biodiesel. Isso se deve ao fato de a reação catalisada quimicamente apresentar maiores rendimentos em tempo reacionais inferiores. A Figura 2 mostra a reação de transesterificação utilizando a catálise alcalina.

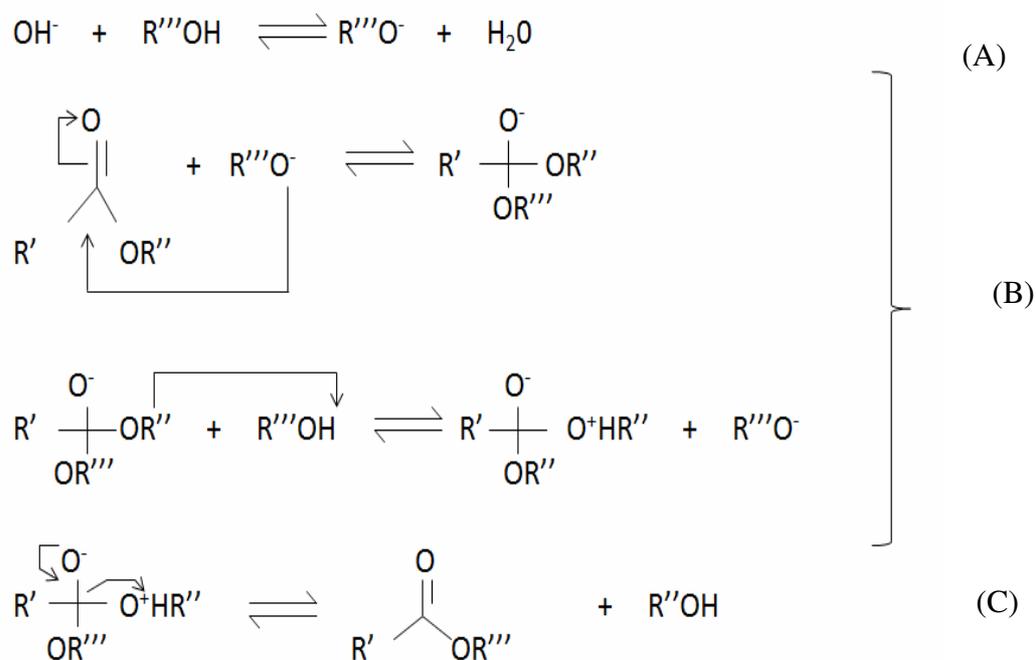


FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS VIA CATÁLISE ALCALINA. FONTE: KUCEK, 2004.

onde, R' = grupo alquila de cadeia longa, R''OH = diacilgliceróis, e R''' = CH₃CH₂- ou CH₃.

Na representação do mecanismo da reação de transesterificação utilizando a catálise alcalina, na primeira reação (A) o álcool, juntamente com a base, forma a espécie ativa, um alcóxido, enquanto em uma segunda reação (B) ocorre o ataque nucleofílico do alcóxido no átomo de carbono da molécula do triacilglicerol, levando à formação de um produto intermediário tetraédrico. A partir de um rearranjo do intermediário tetraédrico, formam-se o

éster de mono-álcool e o ânion, o qual, após a desprotonação do ácido conjugado da base formada na reação (A), regenera a base de partida e produz, neste caso, um diacilglicerol (C). Reações similares ocorrem com os diacilgliceróis formados, produzindo monoacilgliceróis, que, em processos similares, levam à formação da glicerina (CANDEIA, 2008; ZAGO, 2010).

Já na transesterificação via catálise ácida, Figura 3, tem-se a protonação do grupo carbonila do acilglicerol, formando um carbocátion, que sofre um ataque do nucleófilo, produzindo um intermediário. O intermediário formado elimina o glicerol, formando um novo éster (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

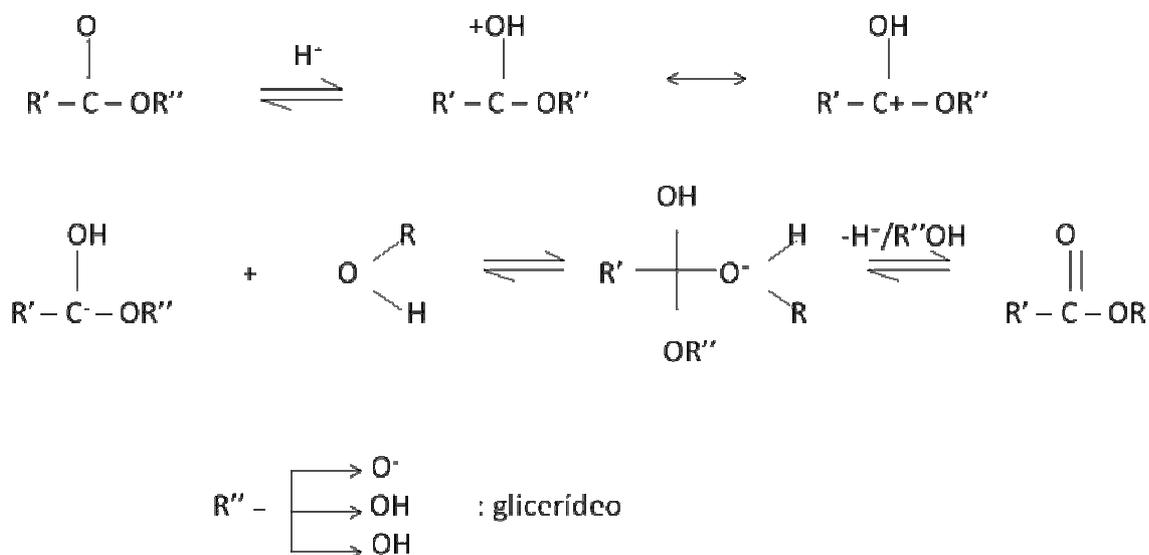


FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS VIA CATÁLISE ÁCIDA. FONTE: SCHUCHARDT *et al.*(1998).

No caso da rota química para produção de biodiesel, é necessária, posteriormente, a purificação e neutralização do produto biodiesel. O outro produto, glicerina, apresenta-se com um menor grau de pureza do que quando utilizada a catálise enzimática.

2.2. CATÁLISE ENZIMÁTICA

A catálise enzimática alcança rendimentos de cerca de 90% na transesterificação para a produção de biodiesel, apresentando-se como uma alternativa mais atraente que o uso de catalisadores químicos (SHIEH, 2003), visto a possibilidade de reutilização do catalisador, ausência de ácido e base no processo, além da simplificação da etapa posterior de separação do biodiesel e glicerol formado. Além disso, o catalisador enzimático pode ser reutilizado,

desde que imobilizado. As enzimas que catalisam a reação entre o triacilglicerol e o álcool para produzir éster são as lipases.

2.2.1. Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) são hidrolases que atuam sobre as ligações éster existentes nos triglicerídeos, liberando ácidos graxos e glicerol como produtos. Segundo Jaeger *et al.* (2002), constituem um grupo de carboxil éster hidrolases.

A quantidade de água presente no meio reacional pode deslocar a posição do equilíbrio na reação, no sentido da hidrólise ou sentido da síntese (PANDEY *et al.*, 1999). A Figura 4 mostra a reação de transesterificação enzimática do biodiesel.

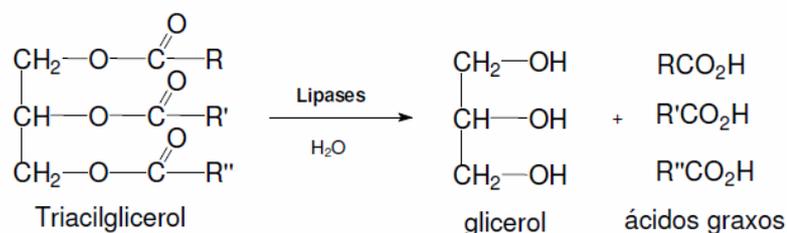


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BIODIESEL.

O mecanismo de catálise das lipases é complexo e a estrutura do sítio ativo varia significativamente de lipase para lipase. Contudo, a tríade catalítica, constituída por resíduos de serina, histidina e aspartato, é comum em todas as lipases (JAEGER *et al.*, 1994 *apud*. SALUM, 2010). A Figura 5 apresenta a estrutura tridimensional da *Burkholderia cepacia*.

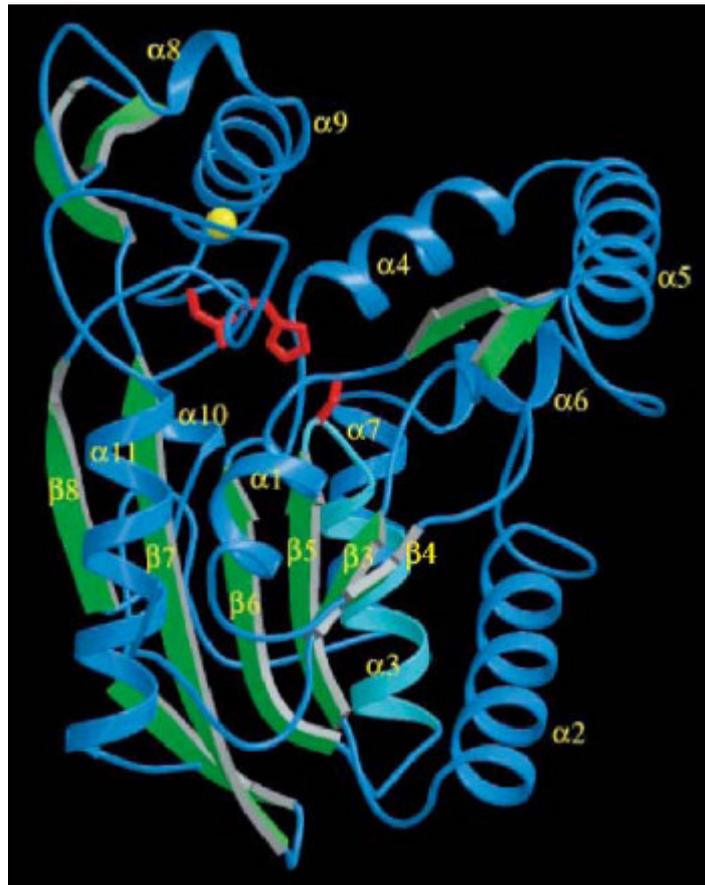


FIGURA 5: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE PRODUZIDA PELA BACTÉRIA *Burkholderia cepacia*. As fitas α e β são indicadas respectivamente pelas hélices em azul e pelas setas em verde. Em amarelo é indicada a posição do íon Ca^{+2} e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho. FONTE: SCHRAG *et al.*, 1997.

O fenômeno de ativação interfacial, ou seja, a mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água-óleo, foi descrito em 1936 por Holwerda *et al.*; esse fenômeno se caracteriza por uma maior atividade enzimática na presença de substratos pouco solúveis. A maioria das lipases apresenta uma tampa polipeptídica com uma curta α -hélice. O lado da tampa que fica voltado para o sítio catalítico é composto principalmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos na ausência de uma interface água-óleo, a tampa polipeptídica cobre o sítio catalítico, tornando a lipase inativa. Quando na presença de substratos hidrofóbicos, a tampa é aberta, dando a forma da enzima ativa. No entanto, algumas lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica apresentam a tampa anfifílica cobrindo os sítios catalíticos, mas não mostraram ativação interfacial (CASTRO *et al.*, 2004). Esta observação sugere que a presença de uma tampa polipeptídica e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Dessa forma, atualmente

as lipases são definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases têm a capacidade de atuar em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis em altas temperaturas, e apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade (PANDEY *et al.*, 1999).

2.2.2. Produção de Lipases

Embora lipases possam ser obtidas de fontes animais e vegetais, a produção de lipases em escala industrial é realizada convencionalmente por meio de microrganismos por estes apresentarem relativa facilidade de produção (LIMA, 2004).

As lipases podem ser produzidas por meio de fermentação submersa, que utiliza um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis (ALONSO 2001). As lipases também podem ser produzidas através de fermentação em estado sólido: nesse processo o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou em suportes inertes, na ausência (ou quase ausência) de água livre (FERNANDES, 2007).

Segundo Fernandes (2008) o processo de produção de lipases pode ser realizado por diversos microrganismos, dentre eles os fungos se destacam por secretarem as lipases para o meio extracelular, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação.

A literatura também mostra vários estudos de produção de lipase através de bactérias. Dentre as bactérias produtoras de lipases, se destacam *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp. (SAAD, 2006). SAAD (2005) empregou a lipase da *B. cepacia*, na produção de ésteres etílicos a partir do óleo de milho com rendimentos próximos de 95%. BARON (2009) estudou o processo de produção de ésteres etílicos a partir do óleo de mamona, empregando *B. cepacia* como catalisador; o melhor rendimento em ésteres etílicos foi de 96%. CASTIGLIONI (2009) estudou a aplicação da lipase *B. cepacia* na síntese enzimática de biodiesel e verificou que os melhores rendimentos foram encontrados quando se utilizou éter de petróleo como co-solvente, pH próximo de 6 e concentração de etanol próxima da quantidade estequiométrica.

A lipase proveniente da bactéria *Burkholderia cepacia* vem sendo estudada e empregada na síntese de biodiesel no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da UFPR (FERNANDES, 2007; LIMA *et al.*, 2002, 2004; SALUM, 2010; ZAGO, 2010). Ensaio de atividade e estabilidade dessa lipase mostram que ela é estável em uma ampla

faixa de pH (3 a 10) e mantém atividade em temperaturas relativamente altas (até 55°C) (LIMA *et al.* 2002, 2004).

A Figura 6 apresenta o mecanismo de atuação das lipases na reação de transesterificação enzimática para produção de biodiesel, proposto por Al-Zuhair, Lig e Jun (2007).

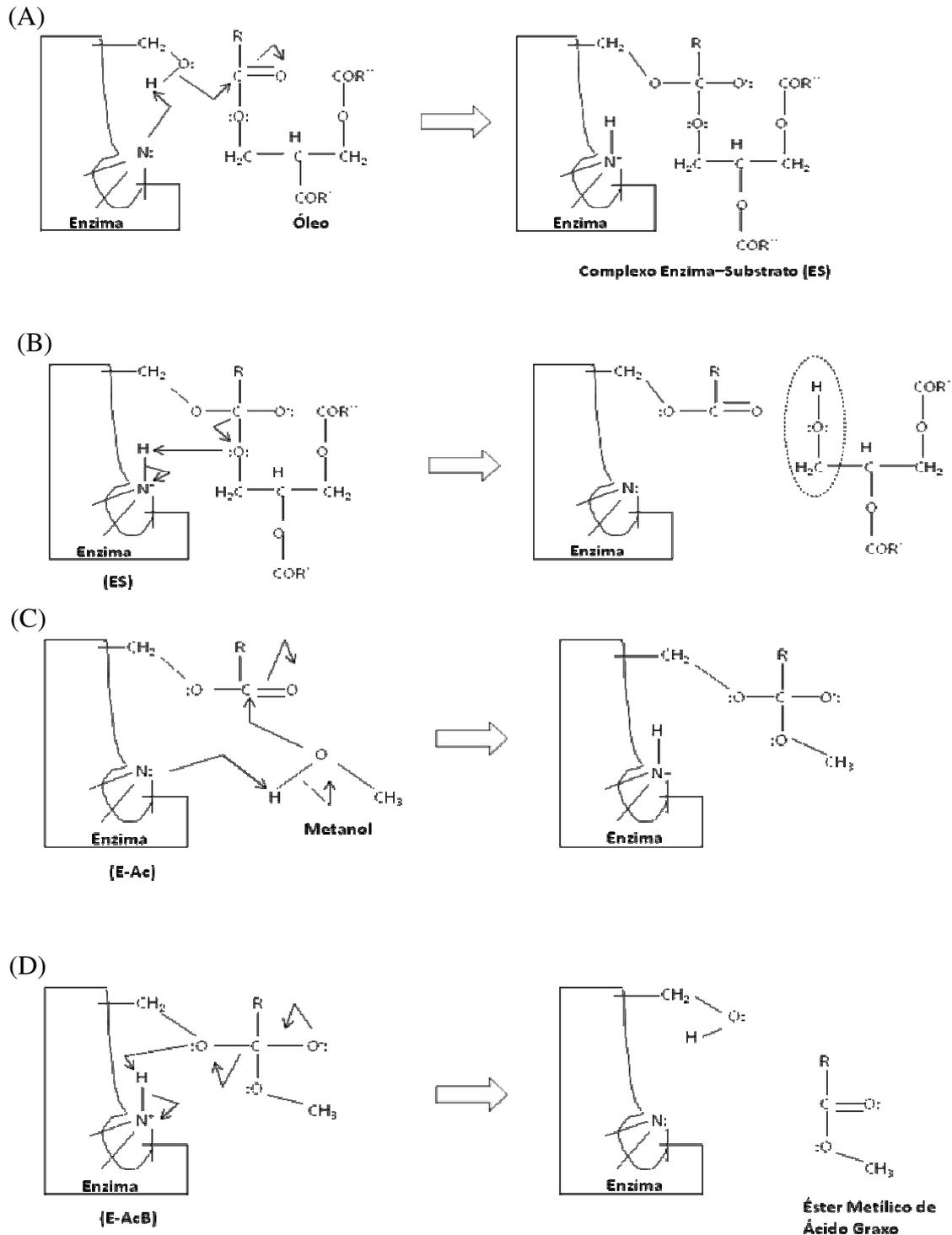


FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES. FONTE: ZAGO, 2010.

Na etapa A da catálise enzimática, o imidazol da histidina da enzima (base) desprotona a hidroxila do ácido carboxílico da estrutura da proteína, já na etapa B tem-se a adição nucleofílica, levando à formação do complexo enzima-substrato e, em seguida, a molécula de diacilglicerol é formada. Na etapa C, o álcool é desprotonado pelo grupo amino da enzima, levando à formação do intermediário e, por fim, na etapa D o próton é transferido do ácido conjugado do grupo amino da enzima, para o átomo de oxigênio do complexo enzima-álcool, tendo como resultado o éster alquílico do ácido graxo e glicerol (JAEGER e REETZ, 1998).

Para obtenção de biodiesel por catálise enzimática, alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como a quantidade de enzima, a razão molar entre os reagentes óleo e álcool, o tipo de óleo e álcool, o uso ou não de solvente orgânico na reação, a temperatura da reação, a quantidade de água adicionada na mistura e o reuso da enzima (RODRIGUES, 2009).

A quantidade de enzima utilizada pode ser limitada em função do tipo de reator utilizado nos ensaios, em reatores perfeitamente agitados quantidades elevadas de enzimas podem dificultar a agitação, limitando a quantidade de enzima utilizada no reator. Isto pode reduzir o rendimento da reação, considerando o mesmo tempo reacional, já que quanto maior a quantidade de catalisador maior é a velocidade da reação.

Ensaio preliminares podem ser realizados para se determinar as melhores razões entre os reagentes, a fim de obter maiores conversões de óleo e álcool em éster de biodiesel. O álcool é utilizado em excesso para assegurar o deslocamento do equilíbrio da reação em função da síntese, mas o excesso de álcool pode inibir a enzima e, com isso, reduzir o rendimento da reação ao invés de favorecê-lo. SAAD *et al.* (2005) testaram razões de álcool-óleo de 3:1, 4,5:1 e 6:1 na etanolise do óleo de milho, sendo maior o rendimento correspondente a este último (aproximadamente 95%). MORAIS *et al.* (2011) também testaram a influencia de razões molares na conversão de óleo de soja e álcool metílico em ésteres. Para a razão de 12:1 foi alcançada uma conversão de 99%. Com relação aos substratos, o álcool mais empregado em pesquisas é o metanol, sendo também bastante utilizados o etanol, o *n*-propanol e o *n*-butanol (SALUM, 2010).

O uso de solventes em reações de transesterificação é comum, uma vez que ele contribui para a não desnaturação da enzima, podendo levar a maiores rendimentos e favorecendo a reutilização da enzima quando imobilizada. No entanto, a utilização de solventes apresenta adição de custos, devido à necessidade de uma etapa adicional no processo para a recuperação do solvente. Sistemas em ausência de co-solvente vêm sendo

estudados, pois além de serem mais corretos do ponto de vista ambiental, eliminam etapas de separação e recuperação do solvente. Este tipo de sistema tem sido empregado com bons rendimentos (acima de 92%) para reações de transesterificação para produção de biodiesel, entretanto, o tempo reacional é superior (HAJAR *et al.*, 2009 apud SALUM, 2010; ISO *et al.*, 2001; SALIS *et al.*, 2005).

A temperatura que favorece o maior rendimento da reação pode ser determinada pela realização de ensaios em temperaturas diferentes, observando o rendimento obtido para o sistema em cada uma das temperaturas estudadas. MORAIS *et al.* (2011) estudaram a reação de transesterificação do óleo de soja a 40 °C, 60 °C e 80 °C. As maiores conversões (99%) foram encontradas na temperatura de 40 °C. A 60 e 80 °C foi reportado a vaporização do álcool, principalmente nesta última, e os rendimentos de éster foram afetados. Além disso, em temperaturas elevadas a enzima pode ser desnaturada.

A presença de água no meio reacional é necessária para promover a conformação correta para a enzima, permitindo que o sítio catalítico fique ativo. Entretanto, em uma reação de síntese, a água em grande quantidade na mistura reacional pode causar o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da hidrólise do éster (VILLENEUVE, 2007).

A imobilização enzimática é bastante reportada na literatura (AMÉRICO *et al.*, 2007; BRAGA *et al.*, 2005; BRANCO *et al.*, 2004; MENONCIN *et al.*, 2009). A utilização de suportes permite que a enzima possa ser reutilizada em outros ciclos catalíticos, por facilitar sua recuperação ao final da reação. CAVARLHO *et al.* (2006) relataram que quando a enzima está imobilizada ela é mais estável e fica menos sujeita a agentes desnaturantes. Além disso, as enzimas imobilizadas ficam menos sujeitas a desativação ocasionadas por alterações de pH e temperatura.

2.2.3.1. Trabalho experimental realizado por SALUM (2010)

Os experimentos de SALUM (2010) considerados no presente trabalho foram realizados em escala de bancada e consistiram na utilização de reator sob agitação contendo inicialmente lipase imobilizada, álcool e óleo.

Em seus ensaios, o microrganismo utilizado foi a cepa de *Burkholderia cepacia* LTEB11 que secreta a lipase, deixando-a livre no sólido fermentado. Este microrganismo foi cultivado por fermentação de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol (50:50 m/m) com umidade de 75% (base seca), a 29°C durante 96 h, e apresentou

uma atividade de hidrólise de $234 \pm 11 \text{ U.gSS}^{-1}$, determinada pelo método *p*NPP em meio aquoso.

O óleo de soja e o etanol foram utilizados como substratos da reação. A composição do óleo apresentou como ácidos graxos (em percentagem m/m): palmítico 11,5; esteárico 3,6; oleico 27,2; linoleico 52,5 e linolênico 5,2; tendo uma massa molecular calculada de 871,34 g/mol (SALUM, 2010).

SALUM (2010) estudou, ainda, o efeito do etanol na atividade lipolítica do sólido fermentado, pois é reportado na literatura referente à transesterificação enzimática o efeito de inibição de lipases pelo álcool. A atividade lipolítica sofreu influência do etanol: com o aumento da razão molar de álcool:óleo a conversão foi reduzida, atingindo somente 7,7% de conversão quando se utilizou a razão molar álcool:óleo 12:1.

Os ensaios foram realizados em ausência de co-solvente, apresentando conversão máxima de aproximadamente 50% após 96 h de ensaio. Diferentes razões molares foram testadas, conforme mostra a Tabela 1. Pode-se observar que a melhor conversão foi obtida na razão molar álcool: óleo de 3:1, esse dado revela que o álcool, quando utilizado em excesso, reduz o rendimento da reação pelo processo de desnaturação da enzima e, portanto, que o álcool em excesso na catálise enzimática pode não ser vantajoso. Conforme esperado, na proporção de 12:1 foi obtido o menor rendimento em ésteres de biodiesel, devida à maior inibição pelo substrato álcool.

TABELA 1: INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR SOB AGITAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Tempo (h)	Conversão em ésteres (%), 3:1	Conversão em ésteres (%), 6:1	Conversão em ésteres (%), 9:1	Conversão em ésteres (%), 12:1
0	0	0	0	0
24	8,4	4,5	3,0	1,9
48	29,1	10,3	5,8	3,9
72	44,2	15,3	9,1	6,0
96	49,2	21,8	12,1	7,7

DADOS EXTRAÍDOS DOS GRÁFICOS DO TRABALHO ORIGINAL DE SALUM (2010) UTILIZANDO O SOFTWARE ORIGIN VERSÃO 8.5.1. FONTE: SALUM (2010).

Outra variável testada foi a quantidade de água adicionada nos ensaios, conforme mostra a Tabela 2. As condições experimentais foram assim mantidas: razão molar álcool:óleo 3:1, temperatura de 37°C, orbital de 180 rpm.

TABELA 2: INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO MEIO REACIONAL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR SOB AGITAÇÃO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Tempo (h)	Conversão (%) na concentração (massa de água / massa total de substrato)				
	Ausência de água	0,5	1	5	10%
0	0	0	0	0	1,3
24	3,2	6,7	8,2	5,4	1,3
48	7,3	21	24,5	9,2	1,5
72	13,3	36,2	40,8	10,9	1,5

DADOS EXTRAÍDOS DOS GRÁFICOS DO TRABALHO ORIGINAL DE SALUM (2010) UTILIZANDO O SOFTWARE ORIGIN VERSÃO 8.5.1. FONTE: SALUM (2010).

Foram observados maiores conversões quando adicionado 0,5% e 1% (m/m total de substratos) de água no meio reacional. Ao acrescentar 10% de água, a conversão ficou em torno de 2% apenas.

2.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O objetivo de estudos de cinética enzimática é desenvolver expressões matemáticas que descrevam a dependência da velocidade da reação nos vários fatores, tais como a concentração da enzima, a presença ou ausência de inibidores, o pH e a temperatura.

Alguns trabalhos (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; CHEIRSILP *et al.*, 2008; FJERBAEK *et al.*, 2009) mostram estudos onde modelos baseados no mecanismo de Ping Pong Bi Bi se ajustam para explicar a cinética de reações de transesterificação para a produção de biodiesel. Este mecanismo envolve dois substratos (óleo e álcool) e dois produtos (um éster e um grupo álcool livre no glicerol), Figura 7.

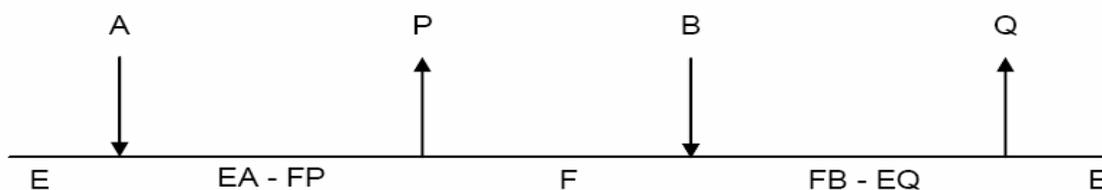


FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO GERAL DO FUNCIONAMENTO DO MODELO DE PING PONG BI BI

Na representação do mecanismo Ping Pong Bi Bi, A e B são os substratos, P e Q são os produtos, E é enzima livre, F é enzima substituída, e EA-FP e FB-EQ são complexos de transição. No caso específico da reação de transesterificação enzimática de óleos vegetais, ocorre o ataque da lipase ao triacilglicerol, formando um complexo enzimático acilado e liberando o diacilglicerol. O complexo é atacado pela espécie álcool, dando origem ao éster e

liberando a enzima para o início do novo ciclo. Essa mesma reação acontece com o diacilglicerol e o monoacilglicerol.

AL-ZUHAIR *et al.* (2009) utilizaram o mecanismo Ping Pong Bi Bi, com inibição competitiva, para simular o sistema de produção de biodiesel composto por lipase imobilizada em cerâmica, óleos residuais de cozinha, solvente orgânico e metanol, considerando as resistências de transferência de massa dos reagentes.

KROUMOV *et al.* (2007) e CHEIRSILP *et al.* (2008) desenvolveram modelos matemáticos para a cinética de reações catalisadas enzimaticamente para produção de biodiesel. No primeiro trabalho, foram utilizados três tipos de alcoóis diferentes na presença e ausência de co-solvente. O segundo trabalho, partindo do mecanismo Ping Pong Bi Bi, descreve a cinética enzimática de um sistema de óleo de palma e etanol, livre de co-solvente, e propõe dois modelos diferentes.

2.3.1. Primeiro modelo proposto por CHEIRSILP *et al.*, 2008.

O primeiro modelo de CHEIRSILP *et al.* (2008) considera o complexo de reações mostrado na Figura 8. No destaque da figura a enzima, E, pode sofrer duas reações distintas. Elas são mostradas nas reações 01 e 02:

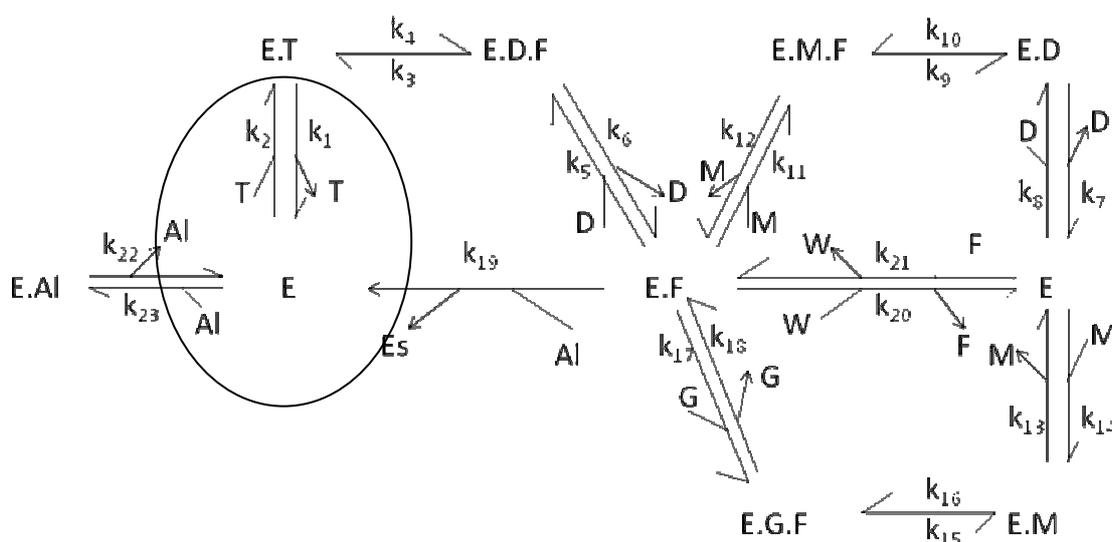


FIGURA 8: COMPLEXO DE REAÇÕES PARA O PRIMEIRO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP *et al.*, 2008. Adaptado de CHEIRSILP *et al.* (2008).



onde *AI* corresponde ao álcool, k_{23} e k_{22} às constantes de velocidade do sentido direto e inverso, *T* ao triacilglicerol, e k_1 e k_2 às constantes de velocidade do sentido direto e inverso, respectivamente.

A reação 01 mostra o efeito inibitório do etanol, que ocorre se a enzima forma complexo com o álcool. A outra reação, em destaque na figura 8, mostra a formação do complexo enzima-triacilglicerol. Esse triacilglicerol é quebrado em diacilglicerol, *D*, formando o complexo enzima-diacilglicerol-ácido graxo livre, *EDF*, conforme mostra a reação 03:



onde k_4 e k_3 são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente, da reação 03.

O complexo *EDF* formado é quebrado para formar o complexo *EF*, conforme mostra a reação 04:



onde k_5 e k_6 são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente, da reação 04.

O complexo *EF* formado, após quebra do diacilglicerol, poderá seguir rotas distintas, destaque da Figura 9.

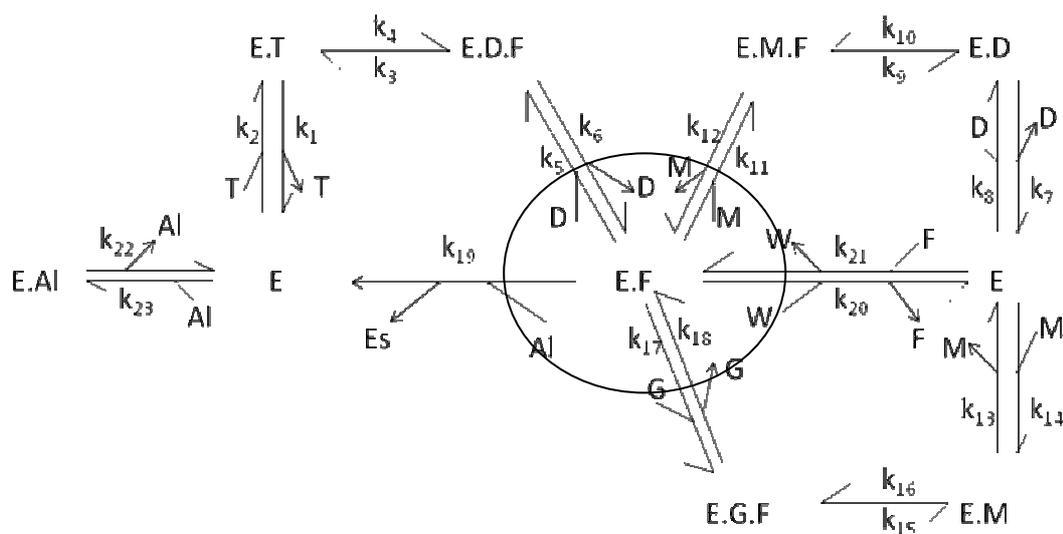


FIGURA 9: DESTAQUE PARA O COMPLEXO EF E AS POSSÍVEIS ROTAS DE REAÇÕES POSSÍVEIS. Adaptado de CHEIRSILP *et al.* (2008).

A reação 05 mostra a rota onde o monoacilglicerol se junta ao complexo *EF*, formando um novo complexo enzima-monoacilglicerol-ácido graxo livre, *EMF*:



onde k_{12} e k_{11} são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

A reação 06 mostra a formação do complexo enzima-diacilglicerol, *ED*:



onde k_{10} e k_9 são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

A enzima libera o acil, ficando em sua forma livre, conforme mostra a reação 07:



onde k_8 e k_7 são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

A reação 03 mostrou a formação do complexo EF . Outra rota possível para esse complexo seria a hidrólise do ácido graxo livre, conforme mostra a reação 08:



onde k_{21} e k_{20} são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

A enzima livre formará um novo complexo da enzima com o monoacilglicerol, EM , conforme reação 09:



onde k_{13} e k_{14} são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

A reação 10 mostra a formação do complexo EGF , enzima-glicerol-ácido graxo:



onde k_{15} e k_{16} são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

O glicerol é então liberado, voltando à formação do complexo EF , de acordo com a reação 11:



onde k_{17} e k_{18} são constantes de velocidade no sentido direto e inverso, respectivamente.

O éster é formado e liberado, assim com o álcool, e a enzima fica em sua forma livre, onde poderá ser iniciado um novo ciclo, reação 12:



onde k_{19} é constante de velocidade no sentido direto.

2.3.2. Segundo modelo proposto por CHEIRSILP *et al.*, 2008.

A Figura 10 mostra o sistema de reações pressupostas para o segundo modelo:

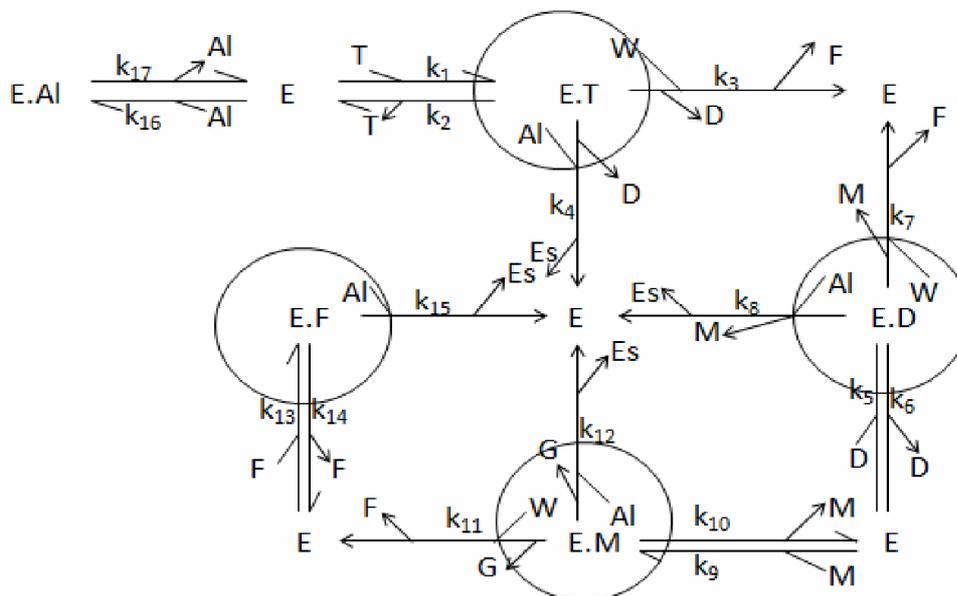


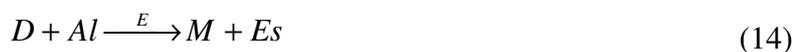
FIGURA 10: SEGUNDO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP *et al.* (2008). Destaque para a enzima formando complexo com o triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e ácido graxo livre. Adaptado de CHEIRSILP *et al.* (2008).

A enzima forma o complexo com o triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e ácido graxo livre, *ET*, *ED*, *EM* e *EF*, respectivamente. O complexo *EF* poderá liberar o acil e ficar livre novamente para catalisar outra reação de síntese, ou uma reação de hidrólise. Se o álcool entrar na reação, é liberado éster e a enzima fica livre para um novo ciclo. O complexo *ET* pode ainda liberar o acil, deixando a enzima livre, que poderá sofrer inibição pelo álcool.

No trabalho de CHEIRSILP *et al.* (2008), foi mostrado que os modelos desenvolvidos apresentam equações com flexibilidade matemática para se ajustar aos resultados obtidos na reação de transesterificação enzimática.

2.3.3. Modelo proposto por KROUMOV *et al.*, 2007.

Este modelo tem por base um mecanismo simples de transesterificação. As reações elementares 13 a 15 foram consideradas:





onde T , D e M correspondem ao triacilglicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol, respectivamente; G e Es correspondem aos produtos glicerol e o éster de biodiesel, respectivamente; Al corresponde ao álcool utilizado nas reações e E corresponde à enzima.

Para descrever a cinética, KROUMOV *et al.* (2007) consideraram que o triacilglicerol forma complexo com a enzima, formando o complexo TE. O álcool interage com esse complexo formando éster, quebrando o triacilglicerol em diacilglicerol. A enzima fica livre e forma um novo complexo com o diacilglicerol, ED. O álcool também interage com esse novo complexo, levando à formação do éster, à liberação do monoacilglicerol e à liberação da enzima. O monoacilglicerol também forma complexo com a enzima e com o álcool, formando, posteriormente, o éster, o glicerol e a enzima livre, que pode iniciar um novo ciclo. As reações de 16 a 21 mostram essas reações intermediárias:



onde TE , DE e ME correspondem, respectivamente, ao complexo triacilglicerol-enzima, diacilglicerol-enzima e monoacilglicerol-enzima; Al corresponde ao álcool; Es corresponde ao éster formado; k_1 e k_2 , k_4 e k_5 , e k_7 e k_8 correspondem, respectivamente, às constantes de velocidade da reação 16, 18 e 20; k_3 , k_6 e k_9 correspondem às constantes de velocidade no sentido direto das reações 17, 19 e 21, respectivamente.

2.4 MODELAGEM MATEMÁTICA, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO

As ferramentas de modelagem e simulação ajudam no entendimento do funcionamento dos reatores e das reações, pois o comportamento do sistema pode ser avaliado sem que para isso sejam necessários ensaios experimentais. Nesse contexto, a modelagem pode ser usada como uma ferramenta para avaliar o potencial de novas configurações para o reator.

Pelo fato da função objetivo para estudos de cinética de processos químicos geralmente apresentar vários pontos de mínimo local, é necessário aplicar uma técnica de otimização que busque o mínimo global e, dentre as técnicas robustas, o método de algoritmo genético é considerado um método heurístico de otimização razoável (CARVALHO, 2009).

2.4.1. Algoritmo Genético

O algoritmo genético, AG, é um método de otimização e busca inspirado nos mecanismos de evolução de populações de seres vivos (GALVÃO *et al.*, 1999). Foi introduzido por John Holland (HOLLAND, 1975) e popularizado por um dos seus alunos, David Goldberg (GOLDBERG, 1989). Este algoritmo segue o princípio da seleção natural e sobrevivência do mais apto, declarado em 1859 pelo naturalista e fisiologista inglês Charles Darwin em seu livro *A Origem das Espécies*. De acordo com Charles Darwin, "Quanto melhor um indivíduo se adaptar ao seu meio ambiente, maior será sua chance de sobreviver e gerar genes parentais" (DARWIN *apud* CARVALHO, 2009).

FERREIRA (2006) descreve o AG através dos seguintes passos: primeiro é criada uma população de soluções potenciais, chamadas cromossomos, geralmente aleatoriamente, em que cada cromossomo representa um ponto dentro do espaço de soluções. Eles são codificados por sequências de valores binários, inteiros ou reais, que guardam sua informação e permitem que lhes sejam atribuídos valores de aptidão, através dos quais os cromossomos serão selecionados ou para constituírem uma população intermediária ou para serem descartados.

Segundo vem o processo de reprodução. Este processo consiste em alocar os cromossomos aptos na população intermediária, ou seja, abriga um percentual dos melhores cromossomos da população inicial que darão origem a uma nova geração.

Os operadores de *crossover* e a mutação são introduzidos na reprodução. Eles são os principais mecanismos de busca do AG para explorar regiões desconhecidas do espaço de busca. O operador *crossover* é aplicado a um par de cromossomos retirados da população

intermediária, gerando dois cromossomos filhos. Cada um dos cromossomos parentais tem sua cadeia de bits cortada em uma posição aleatória. Não ocorrendo o *crossover*, os filhos serão iguais aos parentais, permitindo que algumas soluções sejam preservadas. O outro operador aplicado é a mutação que inverte os valores dos bits, de 1 para 0 ou de 0 para 1, melhorando a diversidade dos cromossomos na população (GALVÃO *et al.*, 1999).

Cada membro formado é avaliado e recebe um valor de aptidão. A função objetivo resulta em uma medida de performance com respeito a um conjunto particular de parâmetros e a aptidão transforma esta medida em alocação de oportunidades reprodutivas.

Muitos algoritmos utilizam a estratégia do elitismo. Essa estratégia consiste em ‘copiar’ um ou mais indivíduos mais aptos de uma geração para a geração seguinte, objetivando a eliminação do risco de serem perdidos durante a fase de reprodução (MAGALHÃES, 2006).

Ao final da reprodução, verifica-se uma população de mesmo tamanho da inicial, mas, quase sempre, com indivíduos mais aptos que os da anterior. Então, o processo é repetido até que um critério de parada seja satisfeito.

A grande vantagem do algoritmo genético em relação a outros métodos de otimização é o uso de uma população de soluções potenciais no início do processo, ao invés de um único ponto de partida. Dessa forma, as soluções são direcionadas para convergir para ótimos locais tornando o método mais robusto (FERREIRA, 2006).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As pesquisas sobre a cinética da transesterificação de óleos vegetais com enzimas como catalisadores não tratam, em sua grande maioria, sobre meios livres de solventes durante a reação. A proposta deste trabalho é o estudo da cinética de um sistema de transesterificação enzimática livre de co-solventes. Para isso, foram utilizados os dados extraídos da tese de doutorado de SALUM (2010).

SALUM (2010) utilizou um tanque sob agitação contendo inicialmente lipase imobilizada, etanol e óleo. A abordagem cinética será realizada tomando como base três modelos propostos pela literatura: dois modelos propostos por CHEIRSILP *et al.* (2008) e um modelo proposto por KROUMOV *et al.* (2007).

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo comparativo entre três diferentes modelos, obtidos na literatura, da cinética da transesterificação enzimática em ausência de co-solventes, utilizando dados experimentais obtidos por SALUM (2010) para obtenção dos parâmetros cinéticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a cinética de lipases em reações de transesterificação em sistemas livres de co-solvente. Para isto serão utilizados os modelos propostos por CHEIRSILP *et al.* (2008) e KROUMOV *et al.* (2007);

- Obter os parâmetros cinéticos de cada modelo usando o método de otimização do Algoritmo Genético (dados experimentais provenientes de SALUM, 2010);

- Comparar os diferentes modelos, visando obter aquele que melhor se adéqua aos dados experimentais de SALUM (2010).

4. MODELAGEM DO PROCESSO

4.1. MODELOS CINÉTICOS

Os modelos para descrição cinética da transesterificação enzimática de óleo de soja e etanol em éster de biodiesel foram obtidos a partir de CHEIRSILP *et al.* (2008) e KROUMOV *et al.* (2007). A seguir, serão apresentadas as equações obtidas dos sistemas de reações mostrados no item 2.3 do presente trabalho.

4.1.1. Modelo 01

A representação do modelo é apresentada na Figura 11, proposto por CHEIRSILP *et al.* (2008).

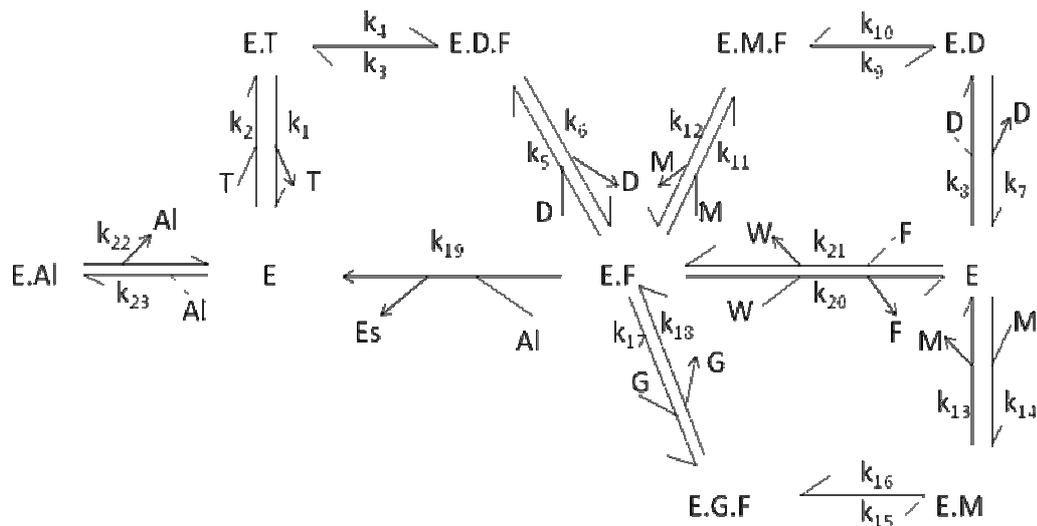


FIGURA 11: APRESENTA O COMPLEXO DE REAÇÕES PARA O PRIMEIRO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP *et al.* (2008).

O modelo é baseado no pressuposto de equilíbrio rápido da formação do complexo enzima-substrato nas reações 02, 07, 08 e 09, da subseção 2.3.1. Em cada caso, isto faz com que a velocidade de consumo do substrato seja diretamente proporcional à concentração do complexo. O pressuposto de equilíbrio rápido sugere que a formação dos complexos ET, ED, EF e EM acontece de forma rápida não aparecendo nas equações de velocidade. Assumindo isto as equações 22 a 28 representam a variação dos reagentes e produtos consumidos e formados ao longo do tempo:

$$\frac{d[T]}{dt} = -k_3[ET] + k_4[EDF] \quad (22)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_3[ET] - k_4[EDF] + k_9[ED] + k_{10}[EMF] \quad (23)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = k_9[ED] - k_{10}[EMF] - k_{15}[EM] + k_{16}[EGF] \quad (24)$$

$$\frac{d[G]}{dt} = k_{15}[EM] - k_{16}[EGF] \quad (25)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[F]}{dt} = -\frac{d[W]}{dt} = & k_3[ET] - k_4[EDF] + k_9[ED] - k_{10}[EMF] + k_{15}[EM] - \\ & -k_{16}[EGF] - k_{19}[EF] \end{aligned} \quad (26)$$

$$\frac{d[Es]}{dt} = k_{19}[EF][Al] \quad (27)$$

$$\frac{d[Al]}{dt} = -k_{22}[E][Al] + k_{22}[EAl] - k_{19}[EF][Al] \quad (28)$$

onde E é a enzima livre e ET , ED , EM , EF , EDF , EMF , EGF e EAl são os diferentes complexos entre a enzima e as espécies Triacilglicerol (T), Diacilglicerol (D), Monoacilglicerol (M), Ácido Graxo Livre (F) e Álcool (Al).

Equações 29 a 33 mostram as relações entre as concentrações dos complexos enzima-substrato e seus respectivos componentes, conforme o pressuposto de equilíbrio rápido:

$$[ET] = \frac{k_1}{k_2}[E][T] \quad (29)$$

$$[ED] = \frac{k_7}{k_8} [E][D] \quad (30)$$

$$[EM] = \frac{k_{13}}{k_{14}} [E][M] \quad (31)$$

$$[EF] = \frac{k_{20}}{k_{21}} \frac{[E][M]}{[W]} \quad (32)$$

$$[EAI] = \frac{k_{22}}{k_{23}} [E][AI] \quad (33)$$

Equação 34 mostra a relação entre a concentração total da enzima, a concentração da enzima livre e as concentrações desses complexos:

$$E_T = [E] + [ET] + [ED] + [EM] + [EF] + [EDF] + [EMF] + [EGF] + [EAI] \quad (34)$$

onde E_T corresponde à concentração total da enzima (nas formas livre e complexada).

Pela substituição das equações 29 a 33 nas equações 22 a 28 e através de manipulações algébricas, são obtidas as equações de 35 a 42:

$$\frac{d[T]}{dt} = \left(-V_{mT}[T] + V_{rT} \frac{[F][G]}{[W]} \right) [E^*] \quad (35)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = \left([T]V_{mT} - V_{rT} \frac{[F][D]}{[W]} - V_{mD}[D] + V_{mD} \frac{[F][M]}{[W]} \right) [E^*] \quad (36)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = \left([D]V_{mD} - V_{rD} \frac{[F][M]}{[W]} - V_{mM}[M] + V_{rM} \frac{[F][G]}{[W]} \right) [E^*] \quad (37)$$

$$\frac{d[G]}{dt} = \left([M]V_{mM} - V_{rM} \frac{[F][G]}{[W]} \right) [E^*] \quad (38)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = \left([T]V_{mT} + V_{mD}[D] + V_{mM}[M] - \frac{[F]}{[W]} (V_{rT}[D] + V_{rD}[M] + V_{rM}[G + V_{eES}[Al]]) \right) [E^*] \quad (39)$$

$$\frac{d[W]}{dt} = -\frac{d[F]}{dt} \quad (40)$$

$$\frac{d[E_{eES}]}{dt} = \left(V_{eES} \frac{[F]}{[W]} [Al] \right) [E^*] \quad (41)$$

$$\frac{d[Al]}{dt} = -\left(V_{eES} \frac{[F]}{[W]} [Al] \right) [E^*] \quad (42)$$

onde $[T]$, $[D]$, $[M]$, $[F]$, $[G]$, $[W]$, e $[Al]$ correspondem às concentrações molares de triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres, glicerol, água, e álcool, respectivamente, V_{mT} , V_{mD} , e V_{mM} são as razões entre as constantes de hidrólise do T , D e M ; V_{rT} , V_{rD} , e V_{rM} representam as razões entre as constantes de re-esterificação de T , D e M , respectivamente; V_{eES} é a razão entre as constantes de esterificação dos etil ésteres.

As Equações de (43) a (49) mostram a definição das razões entre essas constantes.

$$V_{mT} = \frac{k_1 k_3}{k_2} \quad (43)$$

$$V_{mD} = \frac{k_7 k_9}{k_8} \quad (44)$$

$$V_{mM} = \frac{k_{13} k_{15}}{k_{19}} \quad (45)$$

$$V_{eEs} = \frac{k_{20}k_{19}}{k_{21}} \quad (46)$$

$$V_{rT} = \frac{k_4k_6k_{20}}{k_5k_{21}} \quad (47)$$

$$V_{rD} = \frac{k_{10}k_{12}k_{20}}{k_{11}k_{21}} \quad (48)$$

$$V_{rM} = \frac{k_{16}k_{18}k_{20}}{k_{17}k_{21}} \quad (49)$$

A equação 50 define $[E^*]$:

$$[E^*] = \frac{[E_T]}{1 + K_{mT}[T] + K_{mD}[D] + K_{mM}[M] + K_{mF}\left(\frac{[F]}{W}\right)\left(1 + K_{mDF}[D] + K_{mMF}[M] + K_{mGF}[G] + \left(\frac{AI}{K_I}\right)\right)} \quad (50)$$

onde $[E_T]$ é a concentração molar total de enzima; K_{mT} , K_{mD} , K_{mM} , K_{mF} , K_{mDF} , K_{mMF} , e K_{mGF} são as razões das constantes de equilíbrio das reações contendo as espécies T , D , M , F , DF , MF , e GF , respectivamente e K_I é a constante de inibição do álcool.

As razões entre as constantes de equilíbrio, K_{mT} , K_{mD} , K_{mM} , K_{mF} , K_{mDF} , K_{mMF} , e K_{mGF} , são definidas a seguir, respectivamente, pelas Equações (51) a (57):

$$K_{mT} = \frac{k_1}{k_2} \quad (51)$$

$$K_{mD} = \frac{k_7}{k_8} \quad (52)$$

$$K_{mM} = \frac{k_{13}}{k_{14}} \quad (53)$$

$$K_{mF} = \frac{k_{20}}{k_{21}} \quad (54)$$

$$K_{mDF} = \frac{k_6 k_{20}}{k_5 k_{21}} \quad (55)$$

$$K_{mMF} = \frac{k_{12} k_{20}}{k_{11} k_{21}} \quad (56)$$

$$K_{mGF} = \frac{k_{18} k_{20}}{k_{17} k_{21}} \quad (57)$$

onde k_1 a k_{23} são constantes de velocidade do complexo de reações do primeiro modelo mostrado no item 2.3.

A constante de inibição é definida pela Equação (58):

$$K_I = \frac{k_{23}}{k_{22}} \quad (58)$$

onde K_I relaciona as constantes de equilíbrio da equação 01.

4.1.2. Modelo 02

O sistema de reações do modelo é apresentado na Figura 12.

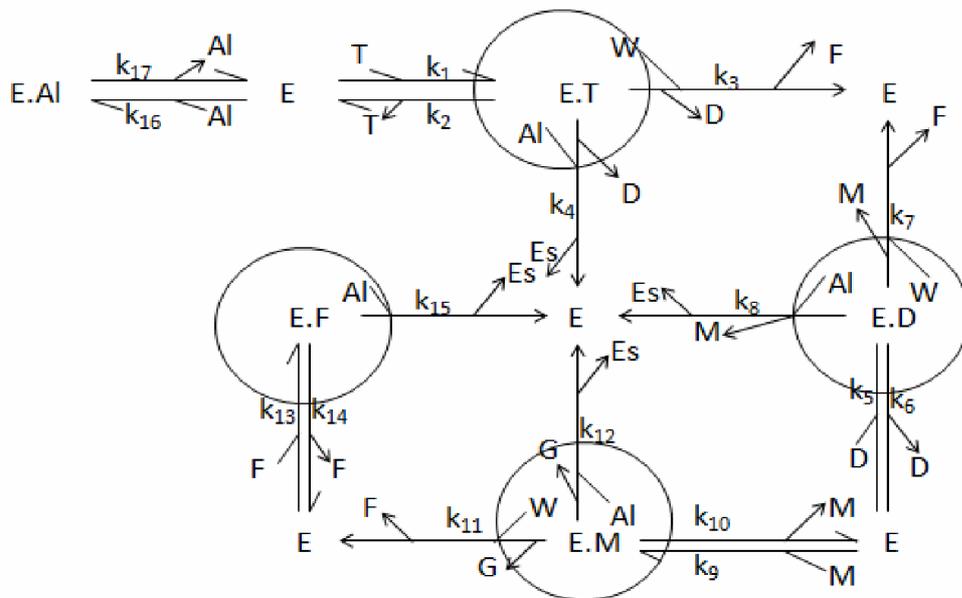


FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO DO SEGUNDO MODELO PROPOSTO POR CHEIRSILP *et al.* (2008).

No segundo modelo proposto por CHEIRSILP *et al.* (2008) é apresentada, em destaque, a enzima formando complexo com o tri, di, monoacilglicerol e ácido graxo livre. As equações de 59 a 65 são obtidas a partir do complexo de reações para o modelo 02, proposto por CHEIRSILP *et al.* (2008):

$$\frac{d[T]}{dt} = -(V_{mT}[W] + V_{eT}[Al])[T][E]^* \quad (59)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = ((V_{mT}[W] + V_{eT}[Al])[T] - (V_{mD}[W] + V_{eD}[Al])[D])[E]^* \quad (60)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = ((V_{mD}[W] + V_{eD}[Al])[D] - (V_{mM}[W] + V_{eM}[Al])[M])[E]^* \quad (61)$$

$$\frac{d[G]}{dt} = (V_{mM}[W] + V_{eM}[Al])[M][E]^* \quad (62)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = ((V_{mT}[T] + V_{mD}[D] + V_{mM}[M])[W] - V_{eEs}[F][Al])[E]^* \quad (63)$$

$$\frac{d[W]}{dt} = -(V_{mT}[T] + V_{mD}[D] + V_{mM}[M])[W][E]^* \quad (64)$$

$$\frac{d[Es]}{dt} = -\frac{d[Al]}{dt} = (V_{eT}[T] + V_{eD}[D] + V_{eM}[M] + V_{eEs}[F][Al])[E]^* \quad (65)$$

onde $[T]$, $[D]$, $[M]$, $[F]$, $[G]$, $[W]$, e $[Al]$ correspondem às concentrações molares de triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres, glicerol, água, e álcool, respectivamente, V_{mT} , V_{mD} , V_{mM} e V_{eEs} são as constantes de hidrólise do T , D e M .

As Equações (66) a (69) mostram a definição de V_{mT} , V_{mD} , V_{mM} , e V_{eEs} :

$$V_{mT} = \frac{k_1 k_3}{k_2} \quad (66)$$

$$V_{mD} = \frac{k_{11}k_{19}}{k_{10}} \quad (67)$$

$$V_{mM} = \frac{k_5k_7}{k_6} \quad (68)$$

$$V_{eEs} = \frac{k_{15}k_{13}}{k_{14}} \quad (69)$$

As constantes de etanolise V_{eT} , V_{eD} , e V_{eM} são dadas pelas Equações (70) a (72):

$$V_{eT} = \frac{k_1k_4}{k_2} \quad (70)$$

$$V_{eD} = \frac{k_7k_8}{k_6} \quad (71)$$

$$V_{eM} = \frac{k_9k_{12}}{k_{10}} \quad (72)$$

A expressão que define $[E^*]$ é dada pela Equação (73) mostrada a seguir:

$$[E]^* = \frac{[E_T]}{1 + K_{mT}[T] + K_{mD}[D] + K_{mM}[M] + K_{mF}[F] + (AI/K_I)} \quad (73)$$

onde $[E_T]$ é a concentração molar total de enzima (incluindo as formas livre e complexada); K_{mT} , K_{mD} , K_{mM} , K_{mF} , e K_I são as razões das constantes de equilíbrio das reações contendo as espécies T, D, M e F, respectivamente.

As equações (74) a (77) definem as constantes K_{mT} , K_{mD} , K_{mM} , K_{mF} , e K_I :

$$K_{mT} = \frac{k_1}{k_2} \quad (74)$$

$$K_{mD} = \frac{k_5}{k_6} \quad (75)$$

$$K_{mF} = \frac{k_{13}}{k_{14}} \quad (76)$$

$$K_I = \frac{k_{17}}{k_{16}} \quad (77)$$

onde k_1 a k_{17} são constantes de velocidade do complexo de reações do segundo modelo mostrado no item 2.3.

4.1.3. Modelo 03

KROUMOV *et al.* (2007) consideraram as seguintes hipóteses, 78 e 79, no desenvolvimento do modelo:

$$r_{[TE]}(t) = r_{[DE]}(t) = r_{[ME]}(t) = 0 \quad (78)$$

$$C_E^t = C_e(t) + C_{[TE]}(t) + C_{[DE]}(t) + C_{[ME]}(t) \quad (79)$$

onde r corresponde à velocidade de cada reação considerada e C_E^t corresponde à concentração total de enzima, $C_e(t)$ corresponde à concentração de enzima ativa e $C_{[TE]}(t)$, $C_{[DE]}(t)$ e $C_{[ME]}(t)$ são as concentrações dos complexos enzimáticos $[TE]$, $[DE]$ e $[ME]$, respectivamente.

A hipótese mostrada pela equação 78 mostra que para cada complexo, a velocidade de formação é igual à velocidade de consumo, fazendo com que a concentração do complexo permaneça constante ao longo do tempo. A equação 79 relaciona que a soma de todas as formas da enzima é constante.

As equações de 80 a 82 representam as velocidades máximas das reações 16, 18 e 20, da seção 2.3.3. e foram utilizadas como simplificações para o modelo:

$$V_{\max A}(t) = k_3 C_{Al}(t) C_E^t \quad (80)$$

$$V_{\max B}(t) = k_6 C_{Al}(t) C_E^t \quad (81)$$

$$V_{\max C}(t) = k_3 C_{Al}(t) C_E^t \quad (82)$$

As equações de 83 a 85 representam relações matemáticas estabelecidas pelo autor e utilizadas como simplificações no modelo:

$$K_{mA}(t) = \frac{(k_2 + k_3 C_{Al}(t))}{k_1} \quad (83)$$

$$K_{mB}(t) = \frac{(k_5 + k_6 C_{Al}(t))}{k_4} \quad (84)$$

$$K_{mC}(t) = \frac{(k_8 + k_9 C_{Al}(t))}{k_7} \quad (85)$$

Após as simplificações, e conhecendo-se as concentrações, as velocidades de reação de T , D e M nas equações 12, 13 e 14 foram descritas pelas equações 86 a 88:

$$r_{T,12}(t) = \frac{-km_{13}(t)km_{14}(t)V \max_{12} C_T(t)}{[km_{12}(t)km_{13}(t)km_{14}(t) + C_T(t)km_{13}(t)km_{14}(t) + C_D(t)km_{12}(t)km_{14}(t) + C_M(t)km_{12}(t)km_{13}(t)]} \quad (86)$$

$$r_{D,13}(t) = \frac{-km_{12}(t)km_{14}(t)V \max_{13} C_D(t)}{[km_{12}(t)km_{13}(t)km_{14}(t) + C_T(t)km_{13}(t)km_{14}(t) + C_D(t)km_{12}(t)km_{14}(t) + C_M(t)km_{12}(t)km_{13}(t)]} \quad (87)$$

$$r_{M,14}(t) = \frac{-km_{12}(t)km_{13}(t)V \max_{14} C_M(t)}{[km_{12}(t)km_{13}(t)km_{14}(t) + C_T(t)km_{13}(t)km_{14}(t) + C_D(t)km_{12}(t)km_{14}(t) + C_M(t)km_{12}(t)km_{13}(t)]} \quad (88)$$

Através das simplificações provenientes da aplicação das hipóteses já mostradas e aplicando o balanço molar para cada espécie, são obtidas as equações 89 a 94:

$$\frac{d(C_T(t))}{dt} = r_{r,12}(t) \quad (89)$$

$$\frac{d(C_D(t))}{dt} = r_{D,13}(t) - r_{r,12}(t) \quad (90)$$

$$\frac{d(C_M(t))}{dt} = r_{M,14}(t) - r_{D,13}(t) \quad (91)$$

$$\frac{d(C_{Al}(t))}{dt} = r_{r,12}(t) + r_{M,14}(t) + r_{D,13}(t) \quad (92)$$

$$\frac{d(C_G(t))}{dt} = -r_{M,14}(t) \quad (93)$$

$$\frac{d(C_{Es}(t))}{dt} = -r_{r,12}(t) - r_{M,14}(t) - r_{D,13}(t) \quad (94)$$

onde $r_{r,12}(t)$, $r_{D,13}(t)$ e $r_{M,14}(t)$ correspondem às velocidades para reações 12, 13 e 14, respectivamente, da subseção 2.3.3.; $C_{Al}(t)$, $C_G(t)$ e $C_{Es}(t)$ correspondem às concentrações de álcool, glicerol e éster formado, respectivamente.

4.2. OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DOS MODELOS

A descrição do modelo matemático para o reator em batelada contendo enzima imobilizada foi realizada partindo do balanço de massa do sistema em questão. Considerando que a concentração das espécies reagentes é espacialmente uniforme, e como o volume do reator permanece constante, o balanço de massa é expresso pela equação 95:

$$\frac{1}{V} \frac{dN_i}{dt} = \frac{dC_i}{dt} = R \quad (95)$$

onde V é o volume do reator (considerado constante); N_i corresponde ao número de moles da espécie i ; C_i corresponde à concentração da espécie i no sistema; R representa a cinética do sistema.

Para a modelagem e otimização do sistema foi considerado que o sistema era isotérmico e perfeitamente agitado.

No presente trabalho, os parâmetros cinéticos associados aos modelos cinéticos foram obtidos utilizando a ferramenta do algoritmo genético na otimização dos dados experimentais.

O algoritmo genético utilizado foi o *Toolbox Genetic Algorithm and Direct Search* versão 2.3 do Matlab versão 7.6 (R2008a). O algoritmo foi executado com uma população de 100 indivíduos ao longo de 500 gerações. O *crossover* escolhido foi o *crossover* uniforme implementado através da função *crossover_scattered*. Por padrão, o Matlab gera 80% da geração seguinte através de *crossover*. Mutações, por sua vez, foi implementada através da função *mutation_adapt_feasible*, que gera direções randômicas que são adaptativas com respeito à última geração. Outra configuração utilizada foi o elitismo, com a manutenção dos dois melhores indivíduos de uma geração para a geração seguinte. O método de seleção utilizado foi amostragem estocástica uniforme.

A função objetivo utilizada foi a soma dos quadrados das diferenças entre os dados experimentais e as variáveis simuladas, conforme equação 96:

$$f_o = \sum_i \sum_j (E_{\text{exp},i,j} - E_{s,i,j})^2 \quad (96)$$

onde i corresponde ao número da amostra do ensaio j e E_{exp} é a concentração de éster etílico obtida e E_s corresponde a concentração de éster etílico calculada pelo modelo. A busca foi feita para o mínimo desta soma.

A estimativa inicial dos parâmetros foi retirada de CHEIRSILP *et al.* (2008), considerando uma margem de $\pm 50\%$ para os dois primeiros modelos testados e KROUMOV *et al.* (2007), considerando uma margem de $\pm 50\%$ para o terceiro modelo testado.

4.3. MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os dados experimentais utilizados para a modelagem e otimização foram extraídos do trabalho de SALUM (2010). Nestes experimentos, realizados em um reator sob agitação

orbital de 180 rpm, o maior rendimento alcançado em um tempo reacional de 96 horas, 52%, conforme mostra a tabela 1, foi obtido quando foram utilizados 30 mmol de álcool e 10 mmol de óleo de soja (que representa, portanto, uma razão molar – RM – de álcool:óleo de 3:1 e 1% (m/m) de água no meio reacional. Para todos os ensaios a temperatura foi mantida constante e igual à 37°C e foram utilizados 1,5 g de sólido fermentado.

Todos os dados experimentais foram utilizados simultaneamente na obtenção dos parâmetros cinéticos.

TABELA 3: DADOS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE POR SALUM (2010) UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO.

CONJUNTO DE TREINAMENTO	ÁLCOOL	ÓLEO	RM ÁLCOOL: ÓLEO	T (°C)	% ÁGUA (m/m)	CONVERSÃO MÁXIMA (%)	TEMPO (h)
T ₁	Etanol	Soja	3:1	37	1	52	96
T ₂	Etanol	Soja	3:1	37	0,5	49,6	96
T ₃	Etanol	Soja	3:1	37	0	18,9	96
T ₄	Etanol	Soja	9:1	37	1	12,1	96
T ₅	Etanol	Soja	3:1	37	5	11,7	96

Fonte: SALUM (2010).

O erro, E , e o rendimento, $X(t)$, foram calculados segundo proposto por KROUMOV et al. (2007), equações 97 e 98, respectivamente:

$$E = \sum_{k=1}^n \left[\frac{X_{\text{exp}}(t) - X(t)}{\max(X_{\text{exp}})} \right]^2 \quad (97)$$

$$X(t) = 100 \left(\frac{C_B(t) - C_B(t=0)}{3C_T(t=0)} \right) \quad (98)$$

onde $X_{\text{exp}}(t)$ é o rendimento experimental no tempo t ; $C_B(t)$ corresponde à concentração de biodiesel no tempo t ; e $C_B(t=0)$ e $C_T(t=0)$ corresponde à concentração de biodiesel e triacilglicerol, respectivamente, no tempo $t=0$.

O sistema de equações diferenciais ordinárias foi integrado utilizando a ferramenta ode15s do Matlab, a qual é uma ferramenta apropriada para resolver equações diferenciais ordinárias com tolerância de erro relativo 10^{-6} e tolerância de erro absoluto 10^{-9} .

O modelo foi validado utilizando os dados experimentais obtidos nas condições mostradas na tabela 4.

TABELA 4: DADOS OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE POR SALUM (2010) UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DOS MODELOS APRESENTADOS.

CONJUNTO DE VALIDAÇÃO	ÁLCOOL	ÓLEO	RM: ÁLCOOL:ÓLEO	T (°C)	% ÁGUA (m/m)	CONVERSÃO MÁXIMA (%)	TEMPO (h)
V ₁	Etanol	Soja	3:1	37	1	49,2	96
V ₂	Etanol	Soja	6:1	37	1	21,8	96

Fonte: SALUM (2010).

No próximo capítulo serão mostrados os resultados obtidos para os conjuntos de dados de treinamento, T₁, T₂, T₃ e T₄, e os dois conjuntos de validação V₁ e V₂.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi desenvolvida uma estratégia de simulação e otimização para determinar qual dos três modelos conseguiu se ajustar melhor aos dados de SALUM (2010). A ferramenta de otimização de algoritmo genético foi utilizada para determinar os parâmetros que deram o melhor ajuste para cada um dos modelos e, com base no menor somatório dos erros, o melhor modelo foi selecionado.

Neste capítulo, serão mostrados os resultados obtidos a partir do ajuste dos modelos aos dados experimentais.

5.1 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A tabela 05 mostra os valores obtidos dos parâmetros ajustados para o modelo 01, mostrado na seção 4.1.1.

A concentração de enzima total, C_{eT} , também foi otimizada. A faixa de busca, baseada na literatura, foi entre 0,02 g e 0,5 g. O valor obtido após o ajuste foi de 0,06 g.

A tabela 06 mostra os valores obtidos dos parâmetros ajustados para o modelo 02, mostrado na seção 4.1.2. O valor obtido da C_{eT} após o ajuste foi de 0,39 g.

A tabela 07 mostra os valores obtidos dos parâmetros ajustados para o modelo 03, mostrado na seção 4.1.3. O valor obtido da C_{eT} após o ajuste foi de 0,90 g.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MODELOS CINÉTICOS

Com os parâmetros cinéticos otimizados pelo algoritmo genético, a etapa seguinte consistiu em usar estes parâmetros nos modelos cinéticos para calcular a quantidade teórica de biodiesel formada ao longo do tempo, considerando as condições operacionais dos experimentos de SALUM (2010). Além disso, foi possível prever os perfis das espécies triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e álcool.

De posse do perfil da quantidade de biodiesel formado ao longo do tempo, foi determinado o rendimento da reação calculado pelo modelo usando a Equação 98. Em seguida, o rendimento calculado foi comparado com o rendimento experimental obtido de

SALUM (2010) e assim, através da Equação 97, foi calculado o erro do modelo cinético, tabela 08, numa dada condição experimental.

TABELA 5: PARÂMETROS AJUSTADOS ATRAVÉS DO ALGORITMO GENETICO PARA O MODELO 01.

PARÂMETROS MODELO 01	
Razão das constantes de velocidade ($\text{mmol}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
V_{mT}	11,90
V_{mD}	1,94
V_{mM}	$5,1 \cdot 10^{-3}$
V_{eES}	12,07
V_{rT}	10,16
V_{rD}	6,41
V_{rM}	3,13
Razão das constantes de equilíbrio	
k_{mT}	0,09
k_{mD}	0,19
k_{mM}	0,06
k_{mF}	0,06
k_{mDF}	0,07
k_{mMF}	0,06
k_{mGF}	0,03
Constante de Inibição	
k_I	0,02

TABELA 6: PARÂMETROS AJUSTADOS ATRAVÉS DO ALGORITMO GENETICO PARA O MODELO 02.

PARÂMETROS MODELO 02	
Razão das constantes de velocidade ($\text{mmol}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
V_{mT}	0,15
V_{mD}	0,60
V_{mM}	0,90
V_{eT}	0,01
V_{eD}	0,02
V_{eM}	0,03
V_{eEs}	0,04
Razão das constantes de equilíbrio	
k_{mT}	0,02
k_{mD}	0,05
k_{mM}	0,005
k_{mF}	0,01
Constante de Inibição	
k_I	0,55

TABELA 7: PARÂMETROS AJUSTADOS ATRAVÉS DO ALGORITMO GENETICO PARA O MODELO 03.

PARÂMETROS MODELO 03	
Constantes de Velocidade no sentido direto da reação ($\text{kg g}_E^{-1} \text{h}^{-1}$)	
k_1	0,03
k_3	0,01
k_4	0,04
k_6	$1,3 \cdot 10^{-4}$
Constantes de Velocidade no sentido inverso da reação ($\text{mol g}_E^{-1} \text{h}^{-1}$)	
k_2	1,24
k_5	1,42
k_7	$2,9 \cdot 10^{-3}$
k_8	1,00
k_9	$1,3 \cdot 10^{-3}$

TABELA 8: COMPARATIVO ENTRE OS ERROS CALCULADOS PARA OS MODELOS TESTADOS*

MODELO CINÉTICO			
CONJUNTOS	01	02	03
Treinamento			
T₁	0,89	0,01	1,17
T₂	0,54	0,02	0,96
T₃	3,92	0,58	1,26
T₄	7,04	0,05	14,40
T₅	3,09	0,20	4,44
Validação			
CONJUNTOS	01	02	03
V₁	0,99	0,05	1,27
V₂	0,46	0,07	1,34

*Equação (97) foi utilizada para o cálculo do erro

Ao avaliar os valores dos erros calculados para os três modelos, o segundo modelo apresenta os menores erros tanto no conjunto de treinamento quanto no de validação.

O primeiro conjunto de dados, T₁, testado considera uma razão molar de 3:1, 1% (m/m) de água, à temperatura constante de 37°C. Foram modelados rendimentos experimentais e predito pelo modelo 02 ao longo do tempo reacional de 96 horas. O comportamento obtido pode ser visualizado na Figura 13. O rendimento máximo obtido experimentalmente no tempo reacional de 96 horas foi de 51,9 %, frente ao valor de 51,7% calculado pelo modelo. Conforme mostrado na tabela 06, o erro calculado para este conjunto de dados foi de 0,01. Considerando esses mesmos dados, foram simulados os perfis de reagentes e produtos, Figura 14.

Para o segundo conjunto de dados, T₂, a Figura 15 compara o perfil calculado com os dados experimentais. Esse conjunto de dados considera uma razão molar álcool: óleo de 3:1, 0,5% (m/m) de água, à temperatura constante de 37°C. O rendimento máximo medido experimentalmente nas 96 horas de ensaio foi de 49,6%, enquanto o teórico foi de 50,9%, obtendo perfis muito próximos. O erro calculado para esse modelo foi de 0,02. A Figura 16 mostra os perfis de reagentes e produto simulados pelo modelo para o mesmo conjunto de dados, T₂.

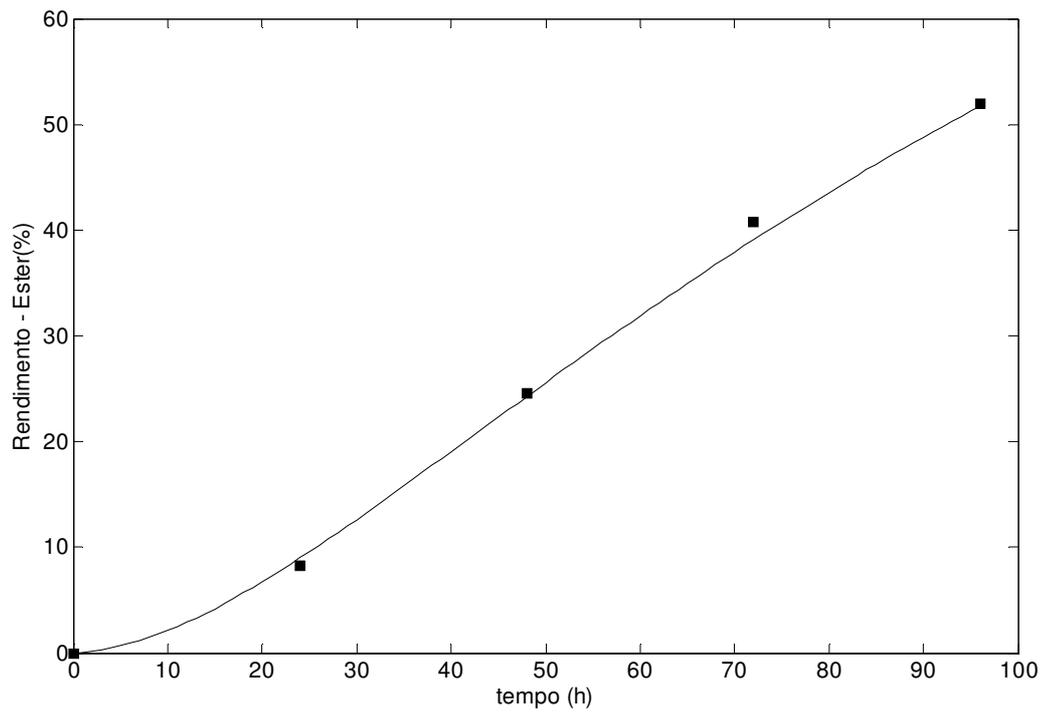


FIGURA 13: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL PARA O CONJUNTO DE DADOS T_1 .

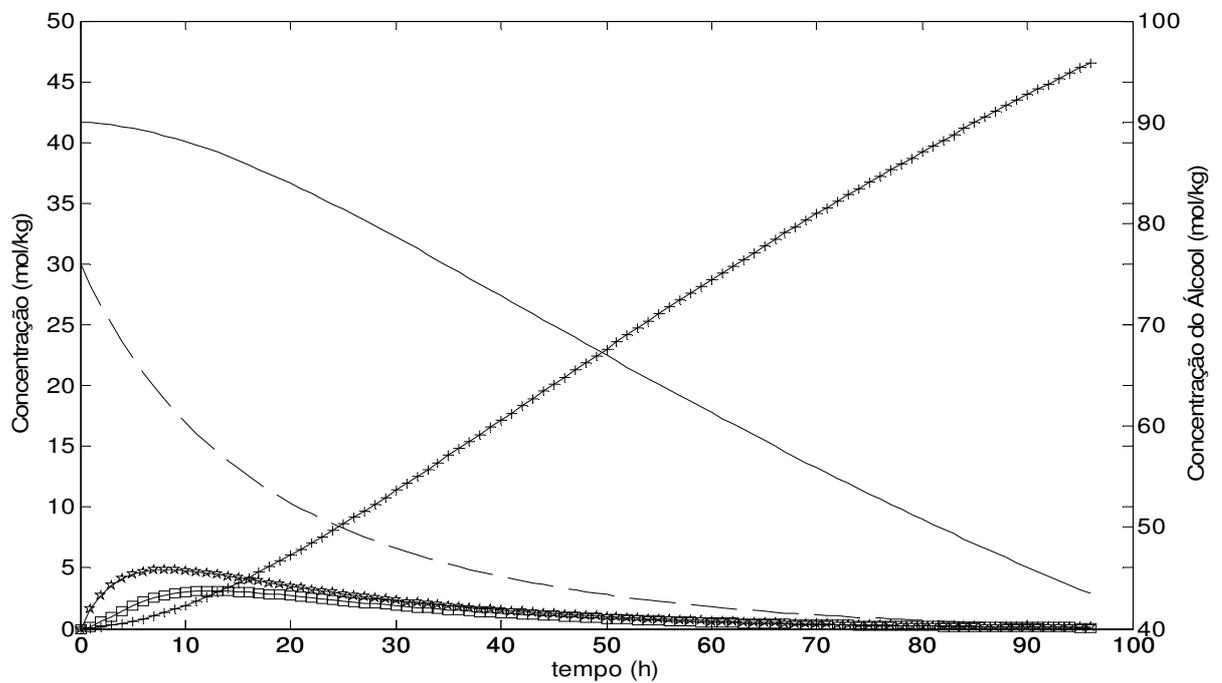


FIGURA 14: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) FORMADO CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T_1 .

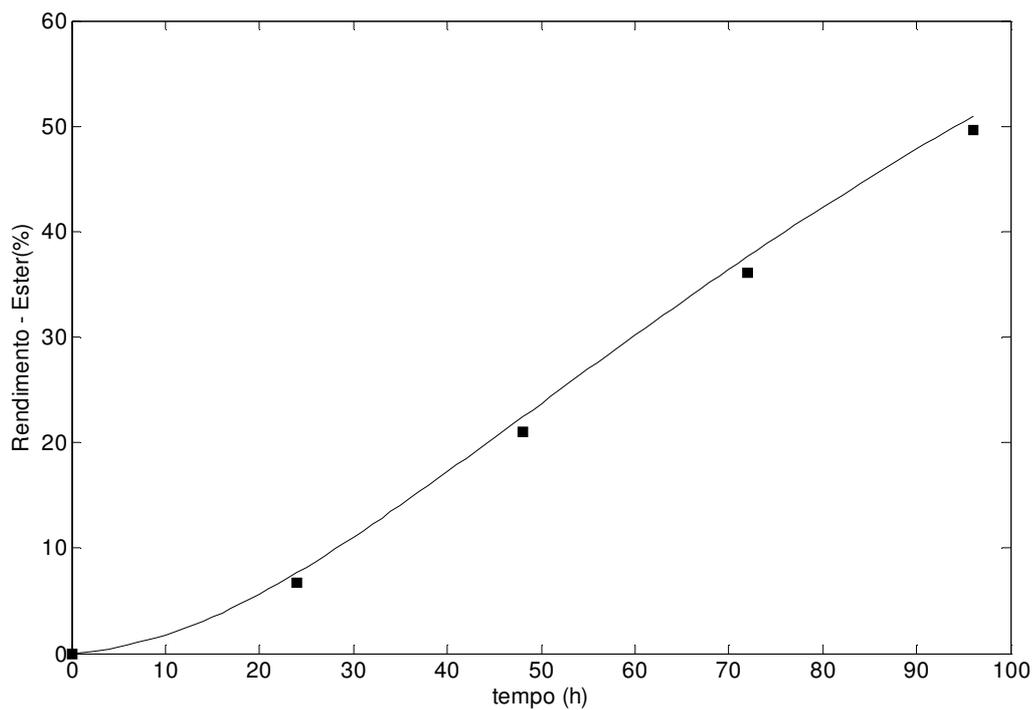


FIGURA 15: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO T₂.

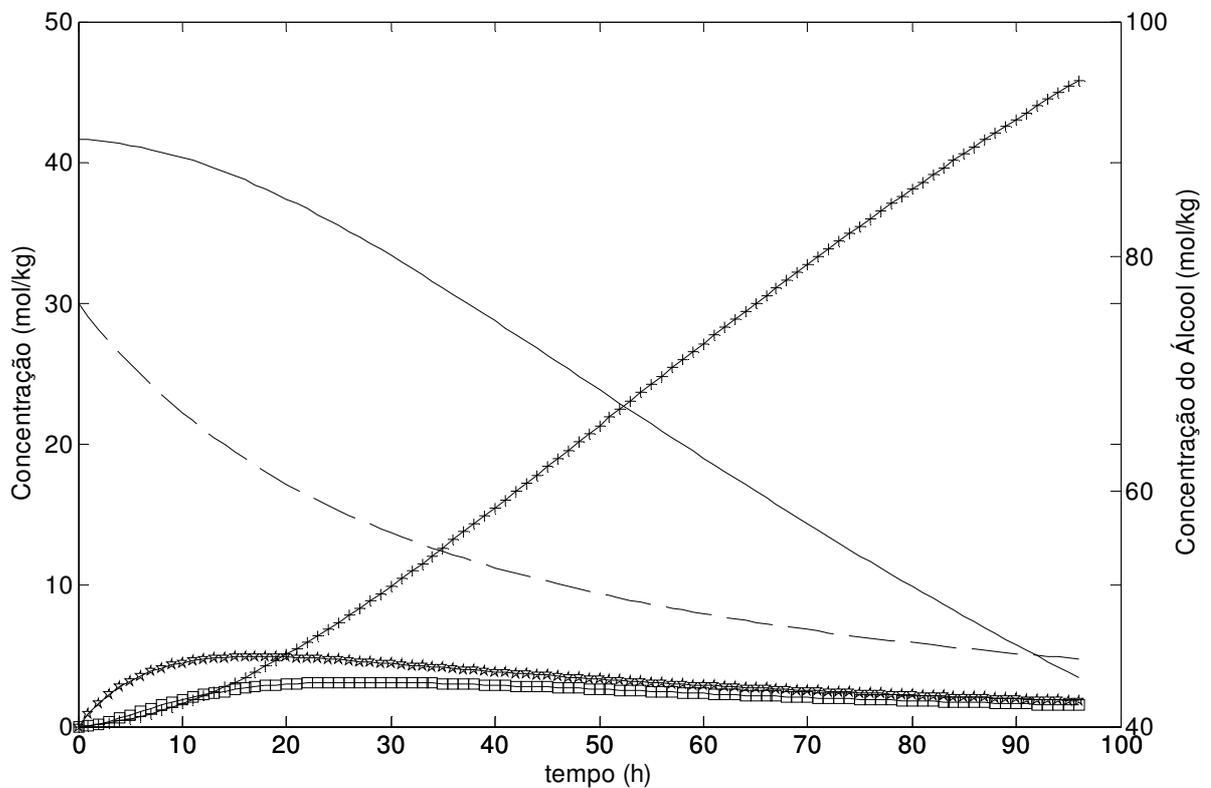


FIGURA 16: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T₂.

O conjunto de dados T_3 considera uma razão molar de 3:1, ausência de água, à temperatura constante de 37°C . A melhor comparação do perfil calculado com estes dados é mostrada em Figura 17. Pode-se observar que o rendimento máximo obtido experimentalmente no tempo reacional de 96 horas foi de 7,7% frente o calculado pelo modelo de 11,7%. O baixo rendimento observado pode ser explicado pela desnaturação da enzima, uma vez que o sistema reacional esteve em ausência de água durante todo o tempo reacional. O modelo 02 não descreve o fenômeno de desnaturação enzimática, o que pode justificar a distância entre o perfil simulado e os dados experimentais. O erro calculado para este conjunto de dados, T_3 , foi de 0,57. A simulação realizada com esses dados pode ser vista na Figura 18, onde são mostrados os reagentes e o biodiesel formado.

O conjunto de dados T_4 considera uma razão molar de álcool:óleo de 9:1, 1% (m/m) de água, à temperatura constante de 37°C . A Figura 19 mostra o perfil teórico calculado pelo modelo 02 *versus* os dados obtidos experimentalmente. O rendimento experimental obtido por SALUM (2010) no tempo reacional de 96 horas foi de 12,1%, *versus* o teórico de 12,3%. Tem uma boa concordância entre os resultados preditos e experimentais. O erro calculado para esse modelo foi de 0,04. A Figura 20 mostra os perfis obtidos pela simulação para os reagentes e produtos considerando o conjunto de dados T_4 .

O conjunto de dados T_5 considera uma razão molar de álcool:óleo de 3:1, 5% (m/m) de água, à temperatura constante de 37°C . A Figura 21 mostra uma comparação do perfil calculado com os perfil obtido experimentalmente para o conjunto de dados T_5 . O rendimento teórico calculado para esse conjunto de dados foi de 11,7, frente o calculado pelo modelo de 15,12. O perfil dos dados calculados pelo modelo se distancia dos dados experimentais. O erro nesse caso foi de 0,2. Uma possibilidade é que o percentual de água utilizado desfavorece a atividade enzimática, um efeito não prevista pelo modelo 02. A simulação desses dados é mostrada na Figura 22, onde os perfis para os reagentes e produtos podem ser visualizados.

O conjunto de dados de validação V_1 considera uma razão molar de 3:1, 1% (m/m) de água, à temperatura constante de 37°C . As curvas de rendimento experimental e rendimento calculado pelo modelo ao longo do tempo, correspondente a esse conjunto de dados, são mostradas na Figura 23. Houve uma boa concordância nos rendimentos preditos pelo modelo em relação aos rendimentos experimentais. O erro correspondente a esse conjunto de dados de validação, V_1 , foi de 0,05. Os perfis obtidos na simulação para reagentes e produtos considerando o tempo de ensaio de 96 horas são mostrados na Figura 24.

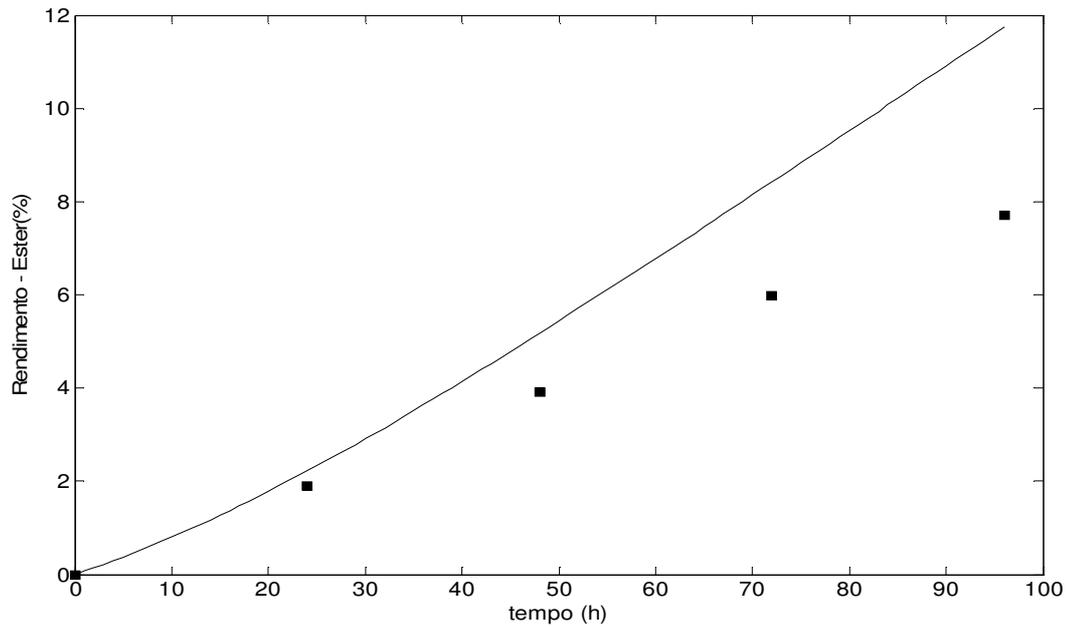


FIGURA 17: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T₃.

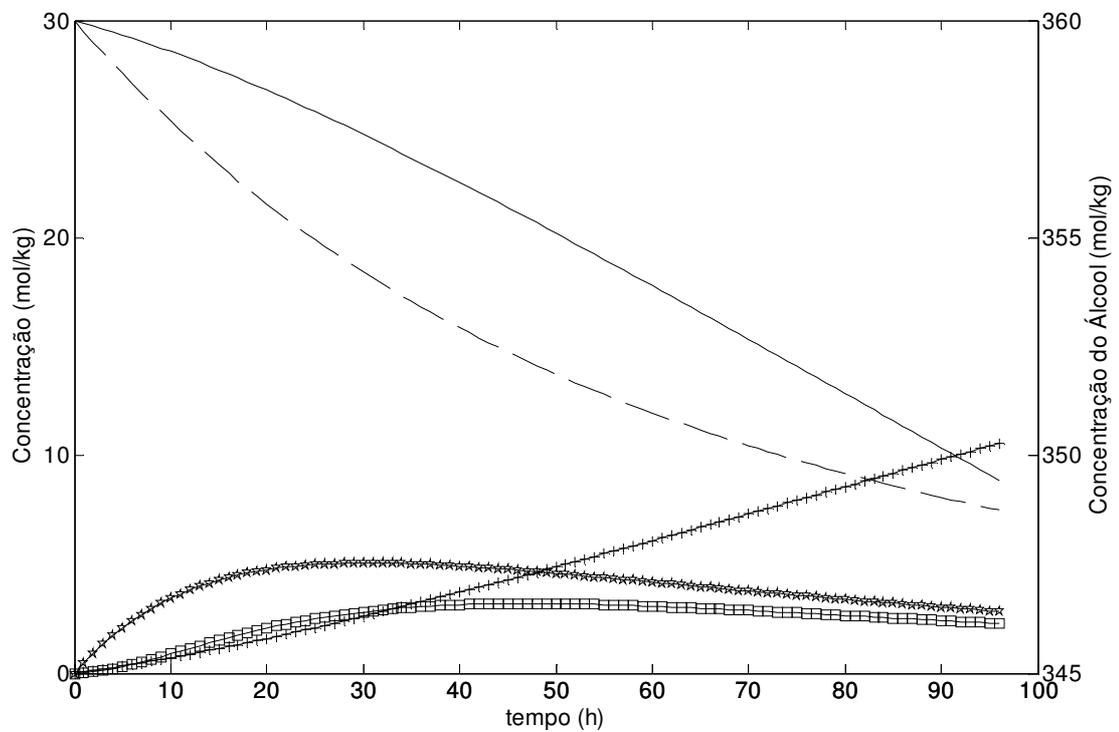


FIGURA 18: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T₃.

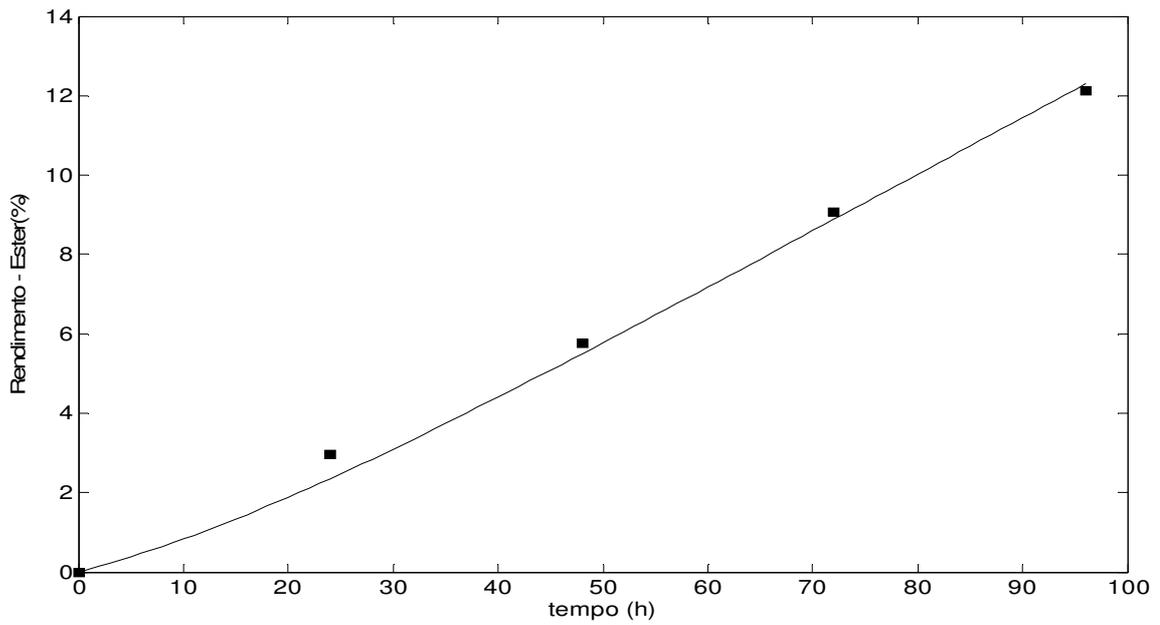


FIGURA 19: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T₄.

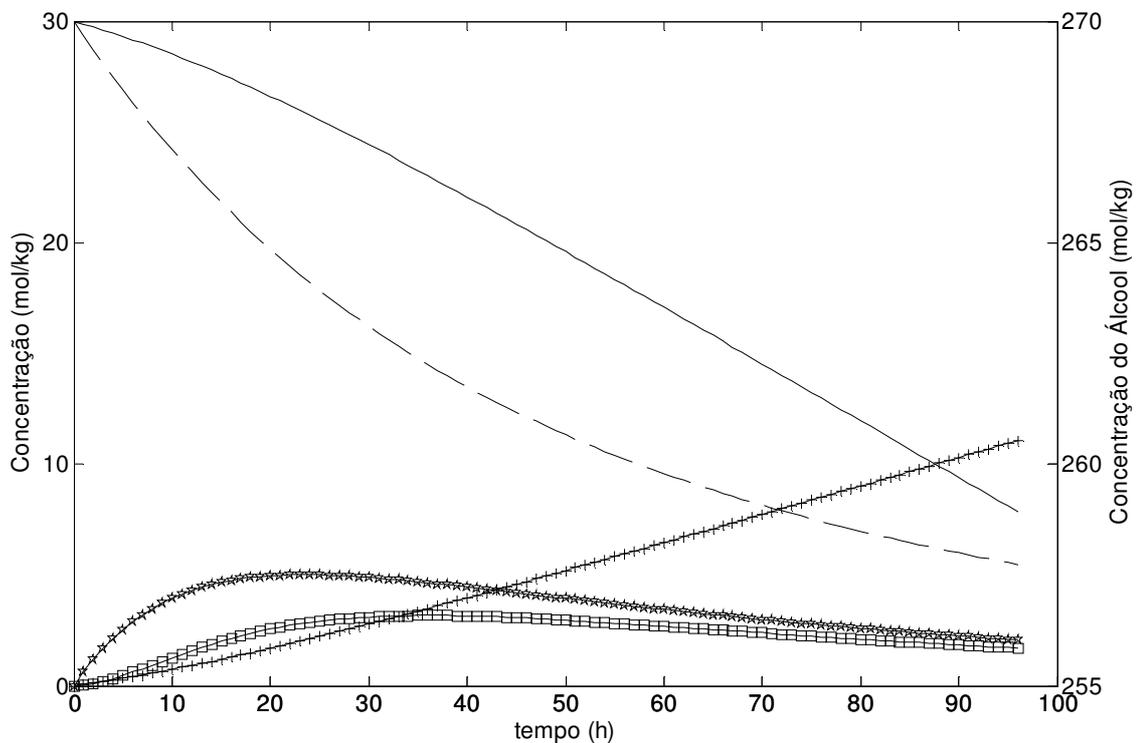


FIGURA 20: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T₄.

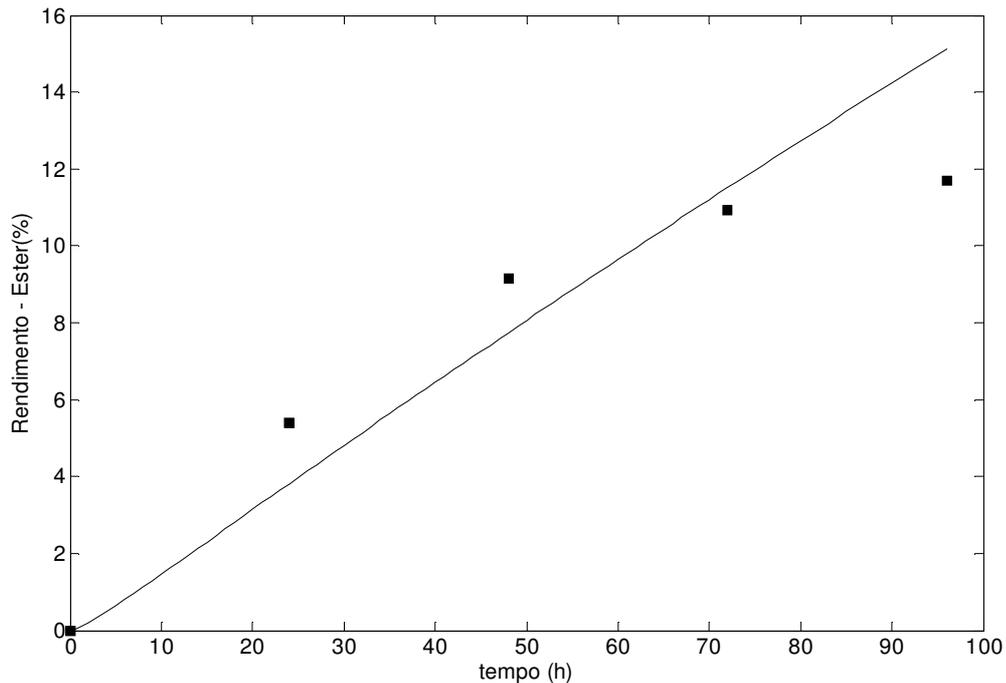


FIGURA 21: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS T₅.

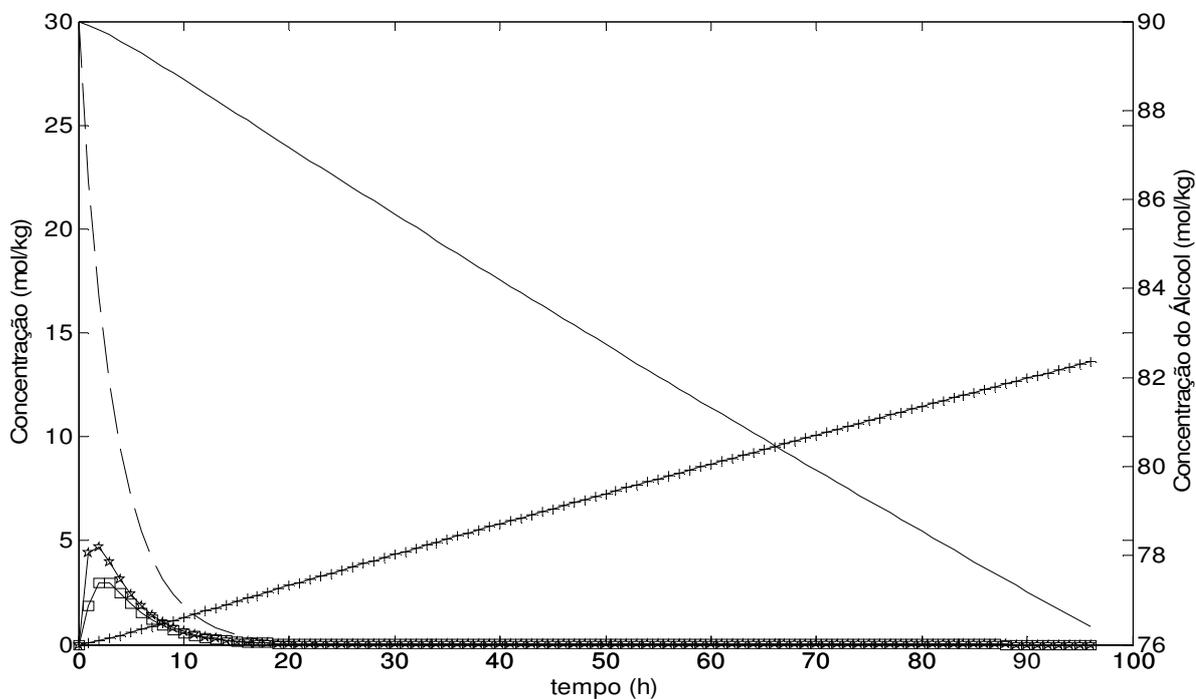


FIGURA 22: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS T₅.

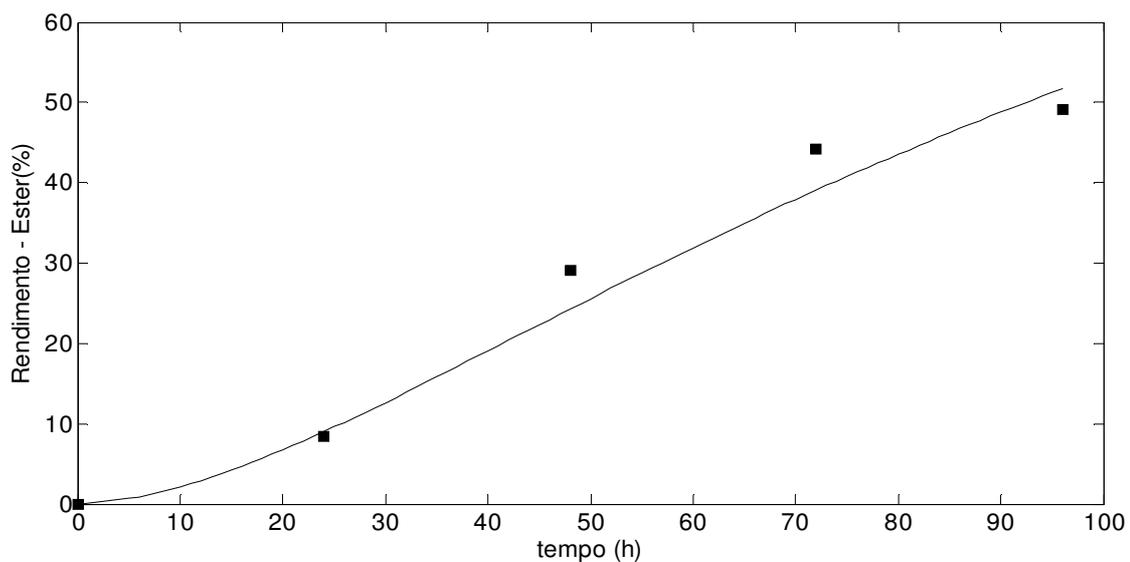


FIGURA 23: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS V_1 .

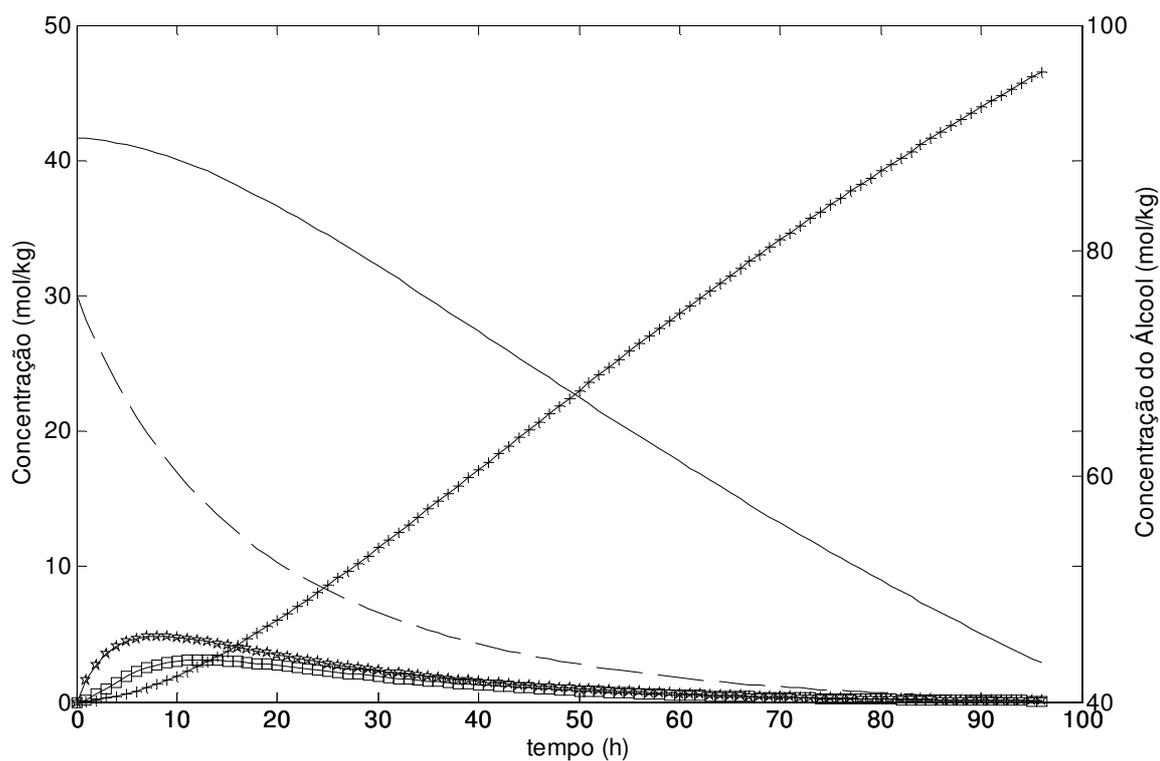


FIGURA 24: PERFIS CALCULADOS DE TRIACILGLICEROL (---), DIACILGLICEROL (*), MONOACILGLICEROL (□), ÁLCOOL (—) E BIODIESEL (+) EM 96 HORAS DE ENSAIO PARA O CONJUNTO DE DADOS V_1 .

A Figura 25 mostra o perfil calculado pelo modelo e o teórico para o conjunto de dados V₂. Esse conjunto de dados considera uma razão molar de álcool:óleo de 6:1, 1% (m/m) de água, à temperatura constante de 37°C. Na Figura 25 pode-se observar o rendimento máximo obtido experimentalmente no tempo reacional de 96 horas foi de 21,7%, frente o calculado pelo modelo de 22,3%. Conforme mostrado na tabela 06, o erro calculado para este conjunto de dados foi de 0,07.

Os dados obtidos na otimização utilizando o modelo 02 foram submetidos à análise de variância, ANOVA. Tanto para os conjuntos de treinamento quanto de validação, os resultados da análise são apresentados na tabela 09. A Tabela 9 mostra que o modelo foi capaz de explicar 97,8% da variação em torno da média (Variância Explicada), sendo 99,13% o máximo explicável para os dados de treinamento. O teste F de significância do modelo mostrou, com 95% de confiança, que a regressão foi significativa (o valor calculado foi 40 vezes maior do que o valor tabelado). Resultados semelhantes foram obtidos para os conjuntos de validação, os quais apresentaram uma regressão não tão significativa como a que foi obtida para o conjunto de treinamento. No entanto, o modelo não apresentou falta de ajuste aos dados dos conjuntos de validação, no nível de confiança considerado. O valor obtido pela razão MQfaj/MQep foi inferior ao valor tabelado para o teste F, indicando que o modelo cinético 2 não possui falta de ajuste, com 95% de confiança.

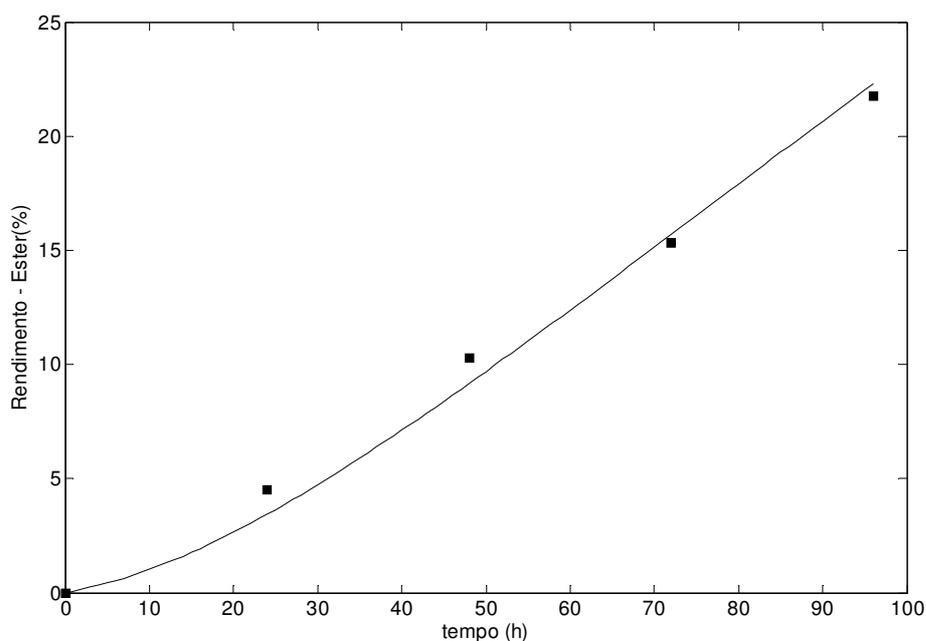


FIGURA 25: PERFIS COMPARATIVOS ONDE (—) CORRESPONDE AO RENDIMENTO TEÓRICO E O (■) CORRESPONDE AO RENDIMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO O CONJUNTO DE DADOS V₂.

TABELA 9: ANÁLISE DE VARIÂNCIA – ANOVA – PARA OS CONJUNTOS DE TREINAMENTO E VALIDAÇÃO

	CONJUNTOS DE TREINAMENTO		CONJUNTOS DE VALIDAÇÃO	
	SOMA QUADRÁTICA	MÉDIA QUADRÁTICA	SOMA QUADRÁTICA	MÉDIA QUADRÁTICA
REGRESSÃO	2278,2	569,55	1236,10	309,02
RESÍDUOS	51,53	3,44	59,31	19,77
FALTA DE AJUSTE	31,24	15,62	39,03	19,52
ERRO PURO	20,28	10,14	20,28	10,14
VARIAÇÃO EXPLICADA		97,79%		95,42%
MÁXIMA DE VARIAÇÃO EXPLICÁVEL		99,13%		98,43%
TESTE F PARA A SIGNIFICÂNCIA DO MODELO MQR/MQr		165,8		15,63
TESTE F PARA VERIFICAR A FALTA DE AJUSTE MQfaj/MQep		1,54		1,92

6. CONCLUSÃO E SUGESTÕES

6.1. CONCLUSÃO

Através da estimação de parâmetros realizada pela ferramenta de otimização Algoritmo Genético, foram calculados pelo modelo dados de rendimento em biodiesel, e as concentrações das espécies envolvidas no sistema.

Para o segundo modelo foram otimizados 15 parâmetros necessários para resolução das equações. Informações ao longo do tempo de ensaio de oito espécies (tri, di, monoacilglicerol, ácido graxo livre, etanol, água, glicerol e éster) seriam necessárias para a estimação desses parâmetros se fossem utilizados métodos clássicos de otimização visto que tenderiam a convergir para um mínimo local. A ferramenta de otimização Algoritmo Genético mostrou ser útil, visto que foi capaz de fornecer parâmetros cinéticos que se adequaram aos dados experimentais, tanto para conjunto de treinamento quanto de validação.

Esse modelo propõe que a reação de síntese ocorre desde que o álcool se junte à enzima substituída.

Em ausência de água, o modelo não foi capaz de descrever o fenômeno de desnaturação, ocasionando em perfis distantes de rendimentos calculados e teóricos (7,7 *versus* 11,7%, respectivamente), conforme foi visualizado na Figura 17.

Através da análise de variância ANOVA, o teste F de significância do modelo mostrou, com 95% de confiança, que a regressão foi significativa (o valor calculado foi 40 vezes maior do que o valor tabelado).

Novos experimentos devem ser realizados, nos quais deve ser analisada a variação ao longo do tempo reacional das demais espécies envolvidas na reação. Outras condições operacionais, além das testadas neste trabalho, devem ser estudadas para serem utilizadas na otimização dos parâmetros cinéticos.

6.2. SUGESTÕES

Para trabalhos futuros pode-se sugerir:

- Obter dados experimentais avaliando as demais espécies (triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, álcool e glicerol formado), ao longo do tempo para a transesterificação enzimática do óleo de soja em ausência de co-solvente, a fim de avaliar os modelos cinéticos aqui estudados e ajustar de forma mais satisfatória os modelos.

- Para o estudo do reator de leito fixo, no qual SALUM (2010) reporta rendimentos em éster de biodiesel mais elevados (95%), são necessários estudos mais detalhados, tornando possível a utilização de equações diferenciais parciais.

- Uma vez obtidas as diferentes concentrações das diferentes espécies presentes no meio reacional, outros métodos de otimização podem ser utilizados na otimização dos parâmetros cinéticos.

7. REFERÊNCIAS

AMERICO, C.J., Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

ALONSO, F.O.M., Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

AL SAADI, A.N.; JEFFREYS, G.V. Esterification of butanol in a two phase liquid-liquid system. *AIChE Journal*, v. 27, p. 754-772, 1981.

AL-ZUHAIR, S., DOWAIDAR, A., KAMAL, H. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. *Biochem. Eng. Journal*, v. 44, p.256-262, 2009.

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.

BALCÃO, V.M., PAIVA, A.L., MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: state-of-the-art. *Enzyme Microb Technol.*, v.18, p.392– 416, 1996.

BARON, A.M. Preparação e Caracterização de Lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. Tese (doutorado em Química). Curso de Química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba –PR, 2008.

BENJAMAS, C.; H-KITTIKUN, A.; LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p. 261-269, 2008.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; MUNÓZ, N.; SERRA, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, v. 47, n. 1-2, p. 13-20, 2007.

BRANCO, R. V., CUNHA, A. G., PINTO, J. C., PAIVA, L. M. C., FREIRE, D. M. G. Imobilização de lipases microbianas em suportes poliméricos com diferentes graus de hidrofobicidade. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004.

BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Lei n. 11.097 de 13 de janeiro de 2005. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 14 jan. 2005.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP n. 7, de 19 de março de 2008. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 mar. 2008.

BOUSQUET-DUBOUCH, M. P.; GRABER, M.; SOUSA, N.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1550, n. 1, p. 90-99, 2001.

CANDEIA, R. A. Biodiesel de soja: síntese, degradação e misturas binárias. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

CARVALHO, F. O. Desenvolvimento de estratégias para utilização de sistemas inteligentes nas áreas de engenharia. Projeto do Laboratório de sistemas inteligentes aplicados - LABSIA, Universidade Federal de Alagoas, 2009.

CARVALHO, W., CANILHA, L., SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, n 23, 2006.

CASTIGLIONI, G. L., Estudo da produção de lipase de *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática de biodiesel. Tese de doutora, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2009.

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

CHANG, S.W., SHAW, J.-F., YANG, C.-K., SHIEH, C.J. Optimal continuous biodynesis of hexyl laurate by packed bed bioreactor. *Process Biochem*, v. 42, p. 1362–1366, 2007.

CHEIRSILP, B., H-KITTIKUNA, A., LIMKATANYUB, A. S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. Prince of Songkla University, Thailand. *Biochemical Engineering Journal*, v.42, p. 261–269, 2008.

CUNHA, M. B.; Modelagem e simulação de bioreatores com células imobilizadas para produção de etanol. Iniciação científica, Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Universidade do Vale do Itajaí, Universidade Federal de Santa Catarina. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630. Santa Catarina, 2004.

DORAN, P. M. Principios de ingeniería de los bioprocesos. University of New South Wales Sydney, Australia. Editora Acribia, S. A. Zaragoza, Espanha. 1995.

FACCIO, K. Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim – RS, 2004.

FERREIRA, C. S. Alocação ótima de dispositivos limitadores de corrente elétrica de curto-circuito em redes de energia utilizando algoritmos genéticos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FERREIRA, R. M. Modelagem e simulação de biorreatores tipo torre operando com leveduras auto-imobilizáveis para produção de etanol. Tese (Mestrado em Engenharia

Química) – Desenvolvimento de processos biotecnológicos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2003.

FERNANDES, M.L.M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Tese (Doutorado em Química), Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. *Biochemical Engineering Journal*, v. 25, n. 1, p. 69- 77, 2005.

FORESTI, M. L.; ALIMENTI, G. A.; FERREIRA, M.L.; Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. *Interfacial activation*, *Biochemical Engineering Journal*, 2004.

FROMENT, G. F., HOFMANN, H. P. K. (1987) Design of fixed-bed gas-solid catalytic reactor. In: Carberry JJ, Varma A (eds) *Chemical Reaction and Reaction Engineering*. Marcel Dekker Inc, New York and Basel, p 373-440

FUKADA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Kobe University, *Journal of Bioscience and bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 405-416, Japão, 2001.

GALVÃO, C. O., VALENÇA, M. J. S.; *Sistemas Inteligentes: aplicações a recursos hídricos e sistemas ambientais* – Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRS/ABRH, Coleção ABRH de Recursos Hídricos; p. 99-130; 1999.

GANDHI, N. N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 74, p. 621, 1997.

GOLDBERG, D.E.; *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., 1ª edição, Boston, USA, 1989.

GONÇALVEZ, E.D.L., FERREIRA, L.L. Flexibilidade na utilização de Diesel ou Biodiesel: uma abordagem via Opções Reais. FGV – RJ. PETROBRAS., v. 5, n.3, p. 229 -243. Vitória-ES, 2008.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, n. 3, p. 188-194, 2009.

HALIM, F.A., KAMARUDDIN, A.H., FERNANDO, W.J.N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 710–716. 2009.

HOLLAND, J.H.; *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, University of Michigan Press, 1975.

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

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalyst: Molecular biology , three dimensional structures and biotechnological applications as lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 53, p. 315 – 351, 1999.

JESUS, P. C., JOÃO, J. J., SILVA, P. L. F., BURLIN, G., NASCIMENTO, M. G. Organogel: um novo sistema para a imobilização de lipases e suas aplicação em síntese orgânica. *Química nova*, v. 20, 1997.

KROUMOV, A.D., MÓDENES, A.N., WENZEL, B.M.; Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. *Acta Sci. Technol.*, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.

KUCEK, K. T., Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LAUDANI, C.G., HABULIN, M., KNEZ, Z., PORTA, C.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.

LIMA, V. M.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Lipase de uma cepa selvagem de *Bacillus* sp e a sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. Universidade Estadual de Maringá, VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá – PR, 2002.

LIMA, V. M.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C; FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus Megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.31, p. 53-61, 2004.

MAZIERO, J.V.G.; CORRÊA, I.M.; ÚNGARO, M. R.; BERNARDI, J. A.; STORINO, M. Desempenho de um motor diesel com óleo bruto de girassol. *Agrociência*, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 249-255, 2007.

MAGALHÃES, C. S.; Algoritmos genéticos para o problema de docking proteína-ligante. Tese (Doutorado em Ciências da Computação). Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro, 2006.

MAGALHÃES, S. P.; Estudo de Modelos Cinéticos para a Reação de Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2010.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by Transesterification – a review. Indian Institute of Technology Delhi, Renewable & Sustainable Energy Reviews, India, 2004.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F., FURIGO JÚNIOR, E. B. A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. Química Nova, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENONCIN, S., DOMINGUES, N. M., FREIRE, D. M. G., OLIVEIRA, J. V., Di LUCCIO, M., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D.; Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. Ciência e Tecnologia de alimentos, p 440-443, 2009.

MERCHUK, J.C.; SIEGEL, M.H. Air-lift reactors in chemical and biological technology. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v. 41, p. 105-120, 1988.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.

MORAIS, F. R., LIMA NETO, E. G. ; LOPES, C.S. ; RAMOS, A.L.D; SILVA, G.F.; Estudo da influência da temperatura, razão molar e modo de operação do reator contínuo sobre a conversão em ésteres na reação de transesterificação do óleo de soja. Simpósio Nacional do biodiesel. Universidade Federal de Sergipe, Aracajú – 2011.

NIE, K. L.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. W. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 16, p. 142-147, 2006.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSK, C.; Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. Ciência Tecnol. Aliment., Campinas, v. 24, n. 2, p. 178-182, 2004.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X.; Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and microbial technology*, v. 27, p. 187–204, 2000.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., Solid State Fermentation for the Production of industrial enzymes. In: *Current Science* v. 77, p. 149-161, 1999.

PARK, Y. M.; LEE, D. W.; KIRN, D. K.; LEE, J. S.; LEE, K. Y. The heterogeneous catalyst system for the continuous conversion of free fatty acids in used vegetable oils for the production of biodiesel. *Catalysis Today*, p. 238-243, 2008.

PINHEIRO, T. L.F. Produção de lipases por Fermentação em Estado Sólido e Submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. 2006. 120f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Setor de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI. Erechim, 2006.

POUSA, G.P.A.G., SANTOS, A.L.F., SUAREZ, P.A.Z. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*., v. 35, P. 5393–5398, 2007.

RAMOS, L. P. Conversão de óleos vegetais em biocombustível alternativo ao diesel convencional. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, Embrapa-Soja, 1999. p. 233-236, 1999.

RASHID, U.; ANWAR, F. Production of biodiesel through optimized alkaline catalyzed transesterification of rapeseed oil. *Fuel*, v. 87, n. 3, p. 265-273, 2008.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 2005.

RIGO, E. Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Araguaia e das Missões, Erechim, 2004.

RODRIGUES, Rafael Costa. Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalizada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 183 f. Tese (Doutor) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SAAD, E.B. Etanolise de Óleo de Milho Empregando Catálise Alcalina e Enzimática. 97p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

SCHRAG, J.D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSIN, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, v. 5, n. 2, p. 187-202, 1997.

SANTOS, J. R.; FILHO, E. H. C.; FERREIRA, A. L. O. Obtenção de modelo cinético para a produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada como catalisador. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal – RN, 2009.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.

SALUM, T F. C. Produção e imobilização de Lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SALVADOR, A.A.; RIBAS, C.; MASO, L.; PALHAREZ, S. Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim Biophys*, v. 30, p. 513-521, 1958.

SCRAGG, A. H., MORRIS, P., ALLAN, E.J., BOND, P. & FOWLER, M. W. Enzyme and Microbial Technology. v. 9, p. 619-624, 1987.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., Vargas, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. J. Braz Chem. Soc., v.9, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. Bioresource Technology, v. 88, n. 2, p. 103-106, 2003.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; Appl. Biochem. Biotechnol., v. 77, p. 745, 1999.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, n. 4, p. 716-722, 2007.

VAN GERPEN, Jon; Biodiesel processing and production, Fuel Processing Technology, v. 86, p. 1097– 1107, 2005.

VILLENEUVE, P.; Lipases in lipophilization reactions. Biotechnology Advances, v. 25, n.6, p.515-536, 2007.

VITOLO, M. 2001b. Reatores com enzimas imobilizadas. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher LTDA.

WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor., v. 78, n. 7, 2001.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; Enzyme Microbial Technology, v. 23, p. 438, 1998.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. Chemical Engineering Science, v. 59, n. 2, p. 373-383, 2004.

XIAO, Y., GAO, L., XIAO, G., JIANHUA LV. Kinetics of the transesterification reaction catalyzed by solid base in a fixed-bed reactor. Energy & Fuels article, v 24, p. 5829-5833, 2010.

ZAGO, E. C. Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, 2010.

ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleos vegetais. Revista de Química Industrial, v.717, p.17-26, 2001.

ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleos vegetais. Revista de Química Industrial, v. 717, p. 17-26, 2001.

ZHANG, Y., DUBE, M. A., McLEAN, D. D., KATES, M., Biodiesel production from waste cooking oil. Process design and technological assessment. Bioresource Technol, v. 89, p. 1–16, 2003.