

### **Agradecimentos**

À Doutora Nídia Caetano, por toda a dedicação, orientação, apoio e amizade patentada, pelo estímulo e exigência crescente que foi impondo à medida que caminhava para a conclusão desta tese.

À Doutora Teresa Mata por toda a compreensão, disponibilidade, motivação e força de incentivo que sempre demonstrou.

À empresa Novozymes pelo fornecimento da enzima Lipozyme TL IM, dando uma importante contribuição para que este trabalho fosse realizado.

À minha família, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo amor e compreensão em todos os momentos da minha vida.

A todos os meus amigos e namorada que sempre me ajudou e apoiou no decorrer do trabalho.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta tese.

Igor Sousa

---



## Resumo

A necessidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis e a emissão dos gases com efeito de estufa, implicou a aposta em diferentes tipos de matérias-primas capazes de serem usadas na produção de biodiesel, sendo este produzido industrialmente por transesterificação de óleos com um álcool de cadeia curta.

Este trabalho teve por objectivo a produção de biodiesel por via enzimática, a partir de um óleo de milho transgênico e etanol, sendo usada a catálise química como procedimento de referência.

Iniciou-se o trabalho com a caracterização da matéria-prima, o óleo de milho transgênico. Para o efeito, foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de acidez (0,26 mg KOH/g<sub>amostra</sub>), o número de iodo (130 g<sub>iodo</sub>/100 g<sub>amostra</sub>), a viscosidade a 40 °C (36,27 mm<sup>2</sup>/s), a massa específica (919 Kg/m<sup>3</sup>) e o teor em água (749 mg/Kg). Posteriormente, realizou-se a transesterificação do óleo por via química, usando como álcoois o metanol absoluto e o etanol absoluto. As condições usadas foram uma razão molar álcool/óleo de 6:1, 1% (m/m) catalisador/óleo, um tempo de reacção de 2 h e uma temperatura de reacção de 60 °C e 75 °C, usando metanol e etanol, respectivamente.

Os resultados obtidos nesta fase do trabalho correspondem a um rendimento médio do processo por via metílica de 83,5 %, comparado com 71,1 % por via etílica.

Após esta fase, prosseguiu-se o trabalho, mas agora testando a produção de esteres etílicos de ácidos gordos (FAEE) a partir de etanol a 70 %, 96 % e absoluto (% v/v), e usando uma enzima como catalisador, a Lipozyme TL IM. O único parâmetro variado experimentalmente, foi o tempo de reacção, respectivamente 24 e 48 h, mantendo-se constante a razão molar álcool/óleo de 3:1, a razão mássica óleo/enzima 35,3:1 e a temperatura de reacção de 35 °C. A velocidade de agitação também foi mantida aproximadamente constante.

Deste modo, verificou-se que, independentemente da pureza do etanol, foi notório que o rendimento de conversão do processo foi superior usando um tempo de reacção de 24 h. Nesta situação, tanto usando etanol absoluto como etanol a 96%, a taxa de conversão de óleo em biodiesel foi elevada, 91% e 94%, respectivamente. No entanto, optou-se por utilizar o etanol absoluto nos ensaios seguintes, devido às características de qualidade do biodiesel obtido serem melhores.

A fase seguinte deste trabalho implicou a optimização das condições de produção de FAEE por via enzimática, usando etanol absoluto. Os parâmetros manipulados foram a razão molar álcool/óleo nas proporções 3:1, 6:1 e 9:1, a razão mássica óleo/enzima nas proporções 35,3:1, 42,8:1 e 30:1, o tempo de reacção de 8h e 12 h e a temperatura de reacção, respectivamente 35 °C e 45 °C.

As condições óptimas na gama de condições testadas foram: razão molar álcool/óleo de 6:1, uma razão mássica óleo/enzima de 35,3:1, com um tempo de reacção de 12 h e uma

temperatura de reacção de 35 °C. Nestas condições, a taxa de conversão de óleo em biodiesel foi de 98,9 %.

Numa etapa final, efectuou-se a produção de biodiesel por via enzimática, ocorrendo a reutilização sucessiva da enzima Lipozyme TL IM. Este facto promoveu uma consequente diminuição na taxa de produção de FAEE, passando o teor de esteres de 70,4%, para reacção com enzima nova, para 56,8% na quinta utilização da enzima. Inicialmente a taxa de conversão do processo foi de 93,7 %, após a reutilização da enzima por quatro vezes o rendimento baixou para 70,8%, o que pode ter sido parcialmente originado pela perda de alguma enzima entre utilizações sucessivas, concluindo-se assim, que eventualmente é possível efectuar-se três reutilizações desta enzima, sem uma perda significativa de rendimento.

**Palavras-chave:** Biodiesel, catálise enzimática, FAEE, FAME, Lipozyme TL IM, Transesterificação.

## **Abstract**

The need to reduce dependence on fossil fuels and the greenhouse gas emissions, led to the search for different types of materials that could be used in the production of biodiesel, which is industrially produced by transesterification of oils with a short chain alcohol.

This work aimed to produce biodiesel using enzymatic catalysis, from a transgenic corn oil and ethanol, using chemical catalysis as reference procedure.

Work started with the characterization of the raw material, the transgenic corn oil. For this purpose, some parameters were evaluated: acid value (0,26 mg KOH/g<sub>sample</sub>), iodine value (130 g iodine/100 g<sub>sample</sub>), viscosity at 40 °C (36,27 mm<sup>2</sup>/s), density (919 Kg/m<sup>3</sup>) and water content (749 mg/Kg). Then chemical transesterification of oil, using absolute methanol and absolute ethanol was tested. The conditions used for this part of the work were a molar ratio alcohol/oil of 6:1, 1% catalyst/oil (w/w), a 2 h reaction time and a reaction temperature of 60 °C and 75 °C, when using methanol and ethanol, respectively.

The results obtained in this phase of the work showed an average yield of the process by methanol route of 83.5% compared to 71.1% in the ethanol route.

After this, work continued with the test for the production of fatty acid ethyl esters (FAEE) from ethanol at 70%, 96% and absolute (% v/v), and using an enzyme as catalyst, Lipozyme TL IM. The only parameter that was varied experimentally was the reaction time, respectively 24 and 48 h, keeping constant the molar ratio alcohol/oil of 3:1, a weight ratio oil/enzyme of 35.3:1 and a reaction temperature of 35 °C. Stirring speed was kept constant.

Thus, it was found that regardless of ethanol concentration it was clear that the yield of the process was higher using a reaction time of 24 h. In this situation, both when using absolute ethanol or ethanol at 96%, the conversion of oil to biodiesel was high, 91% and 94%, respectively. However, we chose to use absolute ethanol in the following tests, due to the quality of biodiesel produced.

The next phase of this work involved the optimization of the conditions for the production of FAEE by enzymatic route, using absolute ethanol. The manipulated conditions were the molar ratio alcohol/oil in the proportions 3:1, 6:1 and 9:1, the oil/enzyme weight ratio, in the proportions 35.3:1, 42.8:1 and 30:1, the reaction time of 8 h and 12 h and reaction temperature, respectively 35 °C and 45 °C.

The optimal conditions in the range of conditions tested were: molar ratio alcohol/oil ratio of 6:1, an oil/enzyme weight ratio of 35.3:1, a reaction time of 12 h and a reaction temperature of 35 °C. Under these reaction conditions, an oil conversion to biodiesel of 98.9 % was obtained.

In a final step, production of biodiesel via enzymatic catalysis was done reusing successively the enzyme Lipozyme TL IM. This promoted a consequent decrease in the production of FAEE, partially justified by some enzyme loss during enzyme recovery after each reaction.

The ester content obtained with fresh enzyme was of 70.4% while for the biodiesel produced in the fifth utilization of the same enzyme, the ester content decreased to 56.9%. Initially the process yield was 93.7%, after reusing the enzyme four times the yield was 70.8 %, leading to the conclusion, that eventually it may be possible to reuse the enzyme three times, without a significant loss of yield.

**Keywords:** Biodiesel, enzymatic catalysis, FAEE, FAME, Lipozyme TL IM, Transesterification.

## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Enquadramento do biodiesel .....	1
1.2. Óleos e gorduras .....	4
1.3. Matérias-primas usadas na produção de biodiesel .....	6
1.4. Biodiesel.....	7
1.5. Reacção de transesterificação.....	12
1.5.1. Purificação do biodiesel.....	15
1.5.2. Principais factores que afectam a produção de biodiesel .....	17
1.6. Processos de produção de biodiesel .....	19
1.6.1. Catálise alcalina .....	19
1.6.2. Catálise ácida.....	20
1.6.3. Fluidos em condições supercríticas.....	21
1.6.4. Catálise heterogénea .....	21
1.6.5. Craqueamento térmico (Pirólise) .....	22
1.6.6. Catálise enzimática .....	23
2. Procedimento Experimental.....	29
2.1. Material .....	29
2.2. Descrição Experimental.....	30
2.2.1. Reacção de transesterificação alcalina.....	30
2.2.2. Separação de fases.....	30
2.2.3. Recuperação e Purificação do Biodiesel .....	31
2.2.4. Reacção de transesterificação enzimática.....	32
2.2.5. Recuperação da Enzima e Separação de fases .....	32
2.3. Caracterizações do Biodiesel .....	34
2.3.1. Determinação do poder calorífico superior .....	35
2.3.2. Determinação da densidade a 15 °C .....	35
2.3.3. Determinação da viscosidade a 40°C .....	35
2.3.4. Determinação do teor de água .....	36
2.3.5. Determinação do índice de iodo .....	36
2.3.6. Determinação do índice de acidez.....	37
2.3.7. Determinação do teor de Na, K .....	37
2.3.8. Determinação da corrosão do cobre.....	38
2.3.9. Determinação do ponto de inflamação .....	38
2.3.10. Determinação da temperatura limite de filtrabilidade, CFPP .....	38
2.3.11. Determinação do teor em ésteres.....	39

3. Resultados e discussão.....	41
3.1. Caracterização do óleo de milho .....	41
3.2. Caracterização do biodiesel obtido por via química usando etanol/metanol .....	42
3.3. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática usando etanol .....	48
3.4. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática efectuando reutilização da enzima .....	58
3.5. Estimativa de custos laboratoriais de produção e caracterização de biodiesel etílico por via enzimática .....	62
4. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros.....	65
4.1. Conclusões.....	65
4.2. Sugestões para trabalhos futuros .....	67
5. Referências bibliográficas .....	69
A.1. Caracterização do óleo .....	75
A.2. Caracterização do biodiesel .....	77
A.2.1. Caracterização do biodiesel obtido por via química.....	77
A.2.2. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática (1ª parte) .....	81
A.2.3. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática (2ª parte) .....	83
A.2.4. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática (3ª parte) .....	87
A.3. Custos laboratoriais de produção do biodiesel por via enzimática.....	99
A.4. Custos laboratoriais referentes à caracterização do biodiesel obtido por via enzimática.....	101
A.5. Características da enzima Lipozyme TL IM.....	105

## Índice de figuras

Figura 1. 1 – Reacção de transesterificação; a) Equação Global; b) Reacções consecutivas e reversíveis [26].....	13
Figura 1. 2 – Equação geral da transesterificação dos triglicerídeos com metanol [26]. ...	13
Figura 1. 3 – Fluxograma da produção de biodiesel por via alcalina [32].....	20
Figura 1. 4 – Reacção de transesterificação usando um catalisador sulfónico [31]. ....	22
Figura 1. 5 – Mecanismo de craqueamento térmico de triglicerídeos [31]. ....	22
Figura 2. 1 – Ilustração do procedimento experimental de produção de biodiesel pelo processo de transesterificação alcalina convencional: a) Dissolução do KOH; b) Colocação do frasco no banho termostático; c) Mistura obtida após reacção; d), e) Separação das fases após reacção no processo de obtenção de biodiesel usando etanol e metanol respectivamente; f) Remoção do excesso de álcool numa instalação preparada com manta e coluna de condensação; g) Tiras de medição de pH usadas nas lavagens do biodiesel; h) Etapa de absorção da água residual presente no biodiesel usando terra de diatomáceas; i) Filtração a vácuo do biodiesel final obtido após secagem com terra de diatomáceas. ....	31
Figura 2. 2 – Ilustração do procedimento experimental de produção de biodiesel pelo processo de transesterificação por via enzimática: a) Amostra de óleo; b) Pesagem da enzima Lipozyme TL IM; c) Reacção de transesterificação por via enzimática; d) Filtração e recuperação da enzima Lipozyme TL IM; e) Lavagem da enzima com álcool isopropílico; f) Filtração da enzima após lavagem; g) Secagem da enzima; h) Separação do biodiesel por decantação; i) Lavagem do biodiesel em coluna contendo resina Lewatit GF 202. ....	33
Figura 3. 1 – Rendimento de conversão do óleo em biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador. ....	43
Figura 3. 2 – Variação da massa volúmica nas amostras de biodiesel obtido por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador. ....	44
Figura 3. 3 – Variação da viscosidade cinemática nas amostras de biodiesel obtido por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.....	44
Figura 3. 4 – Variação do teor de água nas amostras de biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador. ....	45
Figura 3. 5 – Variação do índice de iodo nas amostras de biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador. ....	45
Figura 3. 6 – Variação do índice de acidez nas amostras de biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador. ....	46

Figura 3. 7 – Variação do teor de sódio + potássio nas amostras de biodiesel, produzido por via metilica e etilica usando o hidróxido de potássio como catalisador. ....	47
Figura 3. 8 – Rendimento de conversão do óleo em biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%. ....	48
Figura 3. 9 – Variação da massa volúmica nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	49
Figura 3. 10 – Variação da viscosidade cinemática nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	50
Figura 3. 11 – Variação do teor de água nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	50
Figura 3. 12 – Variação do número de iodo nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	51
Figura 3. 13 – Variação do índice de acidez nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	51
Figura 3. 14 – Gráficos representativos do rendimento obtido no processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção .....	53
Figura 3. 15 – Variação da massa volúmica nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção). .	54
Figura 3. 16 – Variação da viscosidade cinemática nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção). ....	55
Figura 3. 17 – Variação do teor de água nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção). .	56
Figura 3. 18 – Variação do número de iodo nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção). .	57
Figura 3. 19 – Variação do índice de acidez nas amostras de biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, alterando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção). .	57
Figura 3. 20 – Rendimento obtido no processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) e efectuando-se a reutilização sucessiva da mesma.....	58

Figura 3. 21 – Características apresentadas pelo biodiesel obtido por via enzimática e efectuando-se a reutilização sucessiva da enzima. ....	60
Figura 3. 22 – Teor de ésteres apresentado pelo biodiesel obtido por via enzimática e efectuando-se a reutilização sucessiva da enzima. ....	62
Figura A2. 1 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra em que se usou enzima “fresca”.....	93
Figura A2. 2 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à primeira reutilização da enzima.....	95
Figura A2. 3 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à segunda reutilização da enzima. ....	96
Figura A2. 4 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à terceira reutilização da enzima.....	97
Figura A2. 5 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à quarta reutilização da enzima.....	98



## Índice de Tabelas

Tabela 1. 1 – Estrutura química dos ácidos gordos comuns. Adaptado de [15].	4
Tabela 1. 2 – Composição em ácidos gordos de alguns óleos vegetais. Adaptado de [15].	5
Tabela 1. 3 – Propriedades de alguns óleos vegetais. Adaptado de [15].	7
Tabela 1. 4 – Requisitos gerais aplicáveis e métodos de ensaio de combustíveis automóveis, conforme a norma EN 14214: 2003.	9
Tabela 1. 5 – Requisitos e métodos de ensaio (CFPP) de combustíveis automóveis, conforme estabelecido na norma EN 14214:2003.	10
Tabela 1. 6 – Consequências evidenciadas na ausência do cumprimento dos valores limite de alguns parâmetros da norma EN 14214:2003 [21].	10
Tabela 1. 7 – Vantagens e desvantagens apresentadas pelos álcoois usados [18].	14
Tabela 1. 8 – Diferentes abordagens para purificar o biodiesel bruto. Adaptado de [29].	16
Tabela 1. 9 – Propriedades físico-químicas do biodiesel produzido por via química usando diferentes matérias-primas. Adaptado de [29].	17
Tabela 1. 10 – Estudos realizados sobre a produção de biodiesel pela via química, incluindo condições dos ensaios realizados.	23
Tabela 1. 11 – Classes principais e várias subclasses de acordo com IUBMB [40].	24
Tabela 1. 12 – Estudos realizados sobre a produção de biodiesel pela via enzimática, incluindo condições aplicadas nos ensaios.	26
Tabela 1. 13 – Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores usados na produção do biodiesel. Adaptado de [29].	27
Tabela 1. 14 – Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel [30].	28
Tabela 2. 1 – Material, reagentes e equipamentos utilizados na elaboração do processo de produção de biodiesel.	29
Tabela 2. 2 – Condições estabelecidas no processo de transesterificação alcalina usando metanol ou etanol e KOH como catalisador.	30
Tabela 2. 3 – Condições estabelecidas no processo de produção de FAEE por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% ou a 70% e Lipozyme TL IM como catalisador.	32
Tabela 2. 4 – Condições estabelecidas no estudo da produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.	33
Tabela 2. 5 – Condições estabelecidas no processo de produção de FAEE por via enzimática usando uma reutilização de enzima.	34

Tabela 3. 1 – Valores dos parâmetros determinados experimentalmente relativos ao óleo de milho.....	41
Tabela 3. 2 – Custos referentes à produção de biodiesel etílico obtido por via enzimática, bem como os custos referentes à sua caracterização. ....	63
Tabela A1. 1 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectiva viscosidade cinemática determinada para o óleo de milho. ....	75
Tabela A1. 2 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução de hidróxido de sódio gasto e índice de acidez determinada no óleo de milho. ....	75
Tabela A1. 3 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinado no óleo de milho.....	76
Tabela A2. 1 – Valores da massa de óleo de milho, de catalisador hidróxido de potássio usados por via metílica e etílica, bem como o rendimento de conversão do processo.....	77
Tabela A2. 2 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel (massa volúmica, viscosidade cinemática, teor de água, índice de iodo e número de acidez), por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.....	78
Tabela A2. 3 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel (teor de potássio, teor de sódio, corrosão ao cobre, CFPP e ponto de inflamação), por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador. ...	78
Tabela A2. 4 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.....	79
Tabela A2. 5 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador. ....	79
Tabela A2. 6 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador. ....	80
Tabela A2. 7 – Condições estabelecidas no processo de produção de FAEE por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% e a 70% e Lipozyme TL IM como catalisador.....	81
Tabela A2. 8 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% e a 70% e Lipozyme TL IM como catalisador. ....	81

Tabela A2. 9 – Valores da massa de óleo de milho, de massa de enzima, bem como o rendimento de conversão do processo obtido usando diferentes concentrações de etanol. ....	82
Tabela A2. 10 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	82
Tabela A2. 11 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	82
Tabela A2. 12 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.....	83
Tabela A2. 13 – Condições estabelecidas no estudo do processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção....	83
Tabela A2. 14 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção. ....	85
Tabela A2. 15 – Valores da massa de óleo de milho, de massa de enzima, bem como o rendimento de conversão do processo por via enzimática usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção. ....	85
Tabela A2. 16 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.....	86
Tabela A2. 17 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.....	86
Tabela A2. 18 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.....	87
Tabela A2. 19 – Condições utilizadas no processo de produção de FAEE por via enzimática efectuando reutilizações da enzima.....	87

Tabela A2. 20 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel obtido por via enzimática, usando várias reutilizações da enzima. ....	88
Tabela A2. 21 – Média dos valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel obtido por via enzimática, usando várias reutilizações da enzima. ....	89
Tabela A2. 22 – Valores da massa de óleo de milho, de massa de enzima, bem como o rendimento de conversão do processo por via enzimática usando sucessivas reutilizações. ....	89
Tabela A2. 23 – Valores do tempo de escoamento médio obtido e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via enzimática usando sucessivas reutilizações. ....	90
Tabela A2. 24 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando sucessivas reutilizações. ....	91
Tabela A2. 25 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando sucessivas reutilizações. ....	92
Tabela A3. 1 – Consumo energético dos equipamentos e respectivos custos usados na produção de FAEE por via enzimática. ....	99
Tabela A3. 2 – Custos de reagentes e material consumidos na produção de FAEE por via enzimática. ....	99
Tabela A3. 3 – Consumo de água e respectivos custos determinados na produção de FAEE por via enzimática. ....	100
Tabela A4. 1 – Reagentes usados na determinação do número de iodo e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações. ....	101
Tabela A4. 2 – Reagentes usados na determinação do índice de acidez e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações. ....	102
Tabela A4. 3 – Reagentes usados na determinação do poder calorífico e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações. ....	102
Tabela A4. 4 – Reagentes usados na determinação do teor de água e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações. ....	102
Tabela A4. 5 – Reagentes usados na determinação do teor de ésteres e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações. ....	102
Tabela A4. 6 – Consumo energético dos equipamentos e respectivos custos usados na caracterização do biodiesel. ....	103

### Listas de abreviaturas

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub> – ensaios realizados no processo de produção de FAEE por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% e a 70%, variando o tempo de reacção e apresentando como catalisador a enzima Lipozyme TL IM.

A<sub>EI</sub> – pico da área correspondente ao metil heptadecanoato

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>7</sub> – ensaios realizados no estudo do processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

C – concentração exacta da solução padrão de tiosulfato de sódio usada (mol/L)

C' – concentração exacta da solução padrão de hidróxido de potássio usada (mol/L)

C<sub>EI</sub> – concentração da solução de metil heptadecanoato (mg/mL)

K – constante de calibração do viscosímetro (mm<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>)

m – massa de amostra usada na determinação do teor de ésteres (mg)

m<sub>0</sub> – massa de ácido benzóico usada (g)

m<sub>amostra</sub> – massa de amostra usada (g)

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>', R<sub>1</sub>'', R<sub>2</sub>'', R<sub>3</sub>'', R<sub>1</sub>'''', R<sub>2</sub>'''', R<sub>3</sub>'''', R<sub>1</sub>'''''', R<sub>2</sub>''''' e R<sub>3</sub>''''' – Ensaios realizados na produção de biodiesel por via enzimática, efectuando-se sucessivas reutilizações da enzima Lipozyme TL IM.

t – tempo de escoamento (s)

V – volume da solução padrão de hidróxido de potássio (mL)

V<sub>0</sub> – volume da solução de hidróxido de potássio usada até ao ponto de equivalência (mL)

V<sub>1</sub> – volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada no ensaio do branco (mL)

V<sub>2</sub> – volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)

V<sub>EI</sub> – volume da solução de metil heptadecanoato (mL)

### Listas de símbolos

ϕ – correcção da energia cinética (s)

v – viscosidade cinemática (mm<sup>2</sup>/s)

ΣA – somatório da área do pico do metil éster (C<sub>14</sub> – C<sub>24:1</sub>)



## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento do biodiesel

A qualidade do meio ambiente é significativamente afectada pelo consumo de combustíveis fósseis derivados do petróleo. O uso e a produção de combustíveis, os derrames de óleo, a geração de resíduos tóxicos e as mudanças climáticas resultam na poluição do ar. Nas grandes cidades o impacto mais significativo da queima dos derivados do petróleo é, provavelmente, a poluição do ar.

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém de fontes fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural. Como são fontes limitadas e com previsão de esgotamento num futuro relativamente próximo, a busca por fontes alternativas de energia é de máxima importância [1].

As fontes de energia utilizada pela civilização, antes do uso dos derivados de petróleo em larga escala (século XIX e início do século XX), eram o carvão mineral e os produtos da biomassa, principalmente de madeira ou subprodutos da actividade agrícola.

Os cientistas E. Duffy e J. Patrick [2] conduziram pela primeira vez em 1853 o processo de transesterificação de óleos vegetais, muitos anos antes do motor de ciclo diesel entrar em funcionamento.

No dia 10 de Agosto de 1893 foi criado o primeiro modelo do motor a diesel que funcionou de forma eficiente, tendo sido registada a primeira patente deste tipo de motor. No entanto, o primeiro protótipo funcional apenas seria construído dois anos mais tarde, nas instalações da MAN. A apresentação desta invenção foi efectuada em 1900, na Exposição Universal de Paris, sendo o combustível óleo de amendoim. O nome deste motor deve-se a ter sido criado por Rudolf Diesel, em Augsburg, Alemanha.

Os primeiros trabalhos utilizando catalisadores para auxiliar a transformação dos óleos vegetais em hidrocarbonetos foram realizados na França por Mailhe e no Japão com Kobayashi, em 1921. Os catalisadores usados por ambos são essencialmente do tipo ácido, tendo sido usados argilas naturais, alumina, cloretos de zinco e de alumínio. A primeira tentativa de industrialização de um processo de obtenção de hidrocarbonetos a partir do óleo vegetal foi feita por Egloff em 1930 [3].

No entanto, principalmente quando das crises de abastecimento ocorridas durante as duas grandes guerras mundiais e em diversos momentos do século XX, óleos vegetais *in natura* foram estrategicamente utilizados como combustíveis líquidos [4].

Por fim, a crise sentida no mercado mundial de petróleo na década de 1970, conduziu a um movimento no sentido da produção de combustíveis líquidos alternativos provenientes de fontes renováveis.

Durante esta época, foi oferecida uma alternativa para reduzir a viscosidade dos óleos vegetais aproximando mais as suas características às do óleo diesel e facilitando a sua utilização como combustível para motores do ciclo Diesel. Esta reacção, conhecida como transesterificação ou alcoólise de óleos vegetais, oferece como produto reaccional uma mistura de alquil monoésteres como os ésteres metílicos ou etílicos.

Na actualidade reconhece-se que o petróleo e seus derivados são a causa de uma dependência excessiva no mercado mundial e a sua oferta traz sérios problemas socioeconómicos e ambientais.

Assim, tendo em vista a substituição total ou parcial de combustíveis de origem fóssil, tem sido bastante priorizada nestas últimas décadas, a criação e a manutenção de programas dirigidos para a investigação de fontes alternativas de energia renovável, nomeadamente de origem agrícola, sendo estas iniciativas de vital importância para as economias em desenvolvimento [5].

A possibilidade de utilização de combustíveis de origem agrícola em motores do ciclo diesel é bastante atractiva do ponto de vista ambiental, por constituírem uma fonte de energia renovável [6] e também devido ao facto do seu desenvolvimento permitir a redução da dependência de importação de petróleo [7].

No entanto uma vez que alguns óleos e gorduras podem apresentar alta viscosidade ou um grande número de insaturações na cadeia carbónica dos ácidos gordos que constituem o biocombustível, nem todos os óleos e gorduras animais são adequados para serem utilizados na produção de biodiesel [8].

Os óleos vegetais, de entre as fontes de biomassa mais adequadas e disponíveis para a consolidação de programas de energia renovável, têm sido investigados não só pelas suas propriedades, mas também por representarem uma importante alternativa para a geração descentralizada de energia, actuando como forte apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida (infra-estrutura) em regiões empobrecidas, valorizando potencialidades regionais e, oferecendo alternativas a problemas económicos e sócio-ambientais de difícil solução [9].

Os biocombustíveis têm sido testados actualmente um pouco por todo o mundo. Visando estimular o desenvolvimento à escala industrial, países como a Argentina, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França, Itália e Portugal, já produzem biodiesel comercialmente. A produção de biodiesel da UE vai ultrapassar em 2009 a oferta total de 2008, de 7,76 milhões de toneladas, também devido ao aumento da capacidade instalada, segundo o Conselho Europeu de Biodiesel. Em 2008, quando a produção era 36% maior que em 2007, a capacidade de produção de biodiesel do bloco era de 16 milhões de toneladas, segundo o grupo europeu. Em 2009, a capacidade da UE de produzir biodiesel estava estimada em 20,9 milhões de toneladas, segundo a organização. O grupo europeu de biodiesel diz que a

capacidade de produção "significativa" da Europa vai contribuir para que o sector alcance a meta da União Europeia de expandir a utilização de combustíveis mais limpos no sistema de transportes. O bloco europeu aprovou no ano de 2007 a exigência de que pelo menos 10% dos combustíveis utilizados no transporte terrestre de cada país-membro viesse de fontes renováveis, encabeçada pelos biocombustíveis, a partir de 2020. Essa medida é parte de uma meta mais ampla da comunidade europeia de mais do que duplicar a participação total da energia renovável na União Europeia, de 27 países, para a média de 20% [10].

Em Portugal são produzidas anualmente cerca de 140 mil toneladas de biodiesel (dados referentes a 2007), repartidas essencialmente entre a Torrejana e a Iberol. Estimando-se que dentro de quatro anos, o país irá precisar de produzir 300 mil toneladas para satisfazer as necessidades energéticas [11].

A tributação dos combustíveis derivados do petróleo na Europa é extremamente alta, inclusive do óleo diesel mineral, garantindo a competitividade do biodiesel no mercado. Em Portugal, em 2006 a produção dos pequenos produtores dedicados foi isentada de ISP como incentivo à produção de biodiesel.

Em Maio de 2003, foi promulgada na Europa a Directiva nº 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de Maio, visando a substituição parcial dos combustíveis fósseis por combustíveis renováveis. A proposta era de incorporar na gasolina e no gasóleo comercializados, até Dezembro de 2010, 5,75% de biocombustíveis.

Com a publicação do Decreto-Lei nº 62/2006, de 21 de Março, foi transposta para a legislação nacional a Directiva 2003/30/CE. O referido Decreto-Lei "visa a colocação no mercado de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis, em substituição dos combustíveis fósseis". De acordo com o Decreto-Lei nº 66/2006, as metas estabelecidas para a incorporação mínima de biocombustível no mercado eram de 2% para o ano de 2006, 3% para o ano de 2007 e 5,75% (em média anual) para o período de 2008 a 2010. A Resolução do Conselho de Ministros n.º 21/2008, de 7 de Janeiro, ajustou estas metas para 1,75% em 2009, 4,25% em 2010, 6,5% em 2011 e 10% em 2012. A necessidade de produzir biodiesel é evidente nas metas estabelecidas.

Em Portugal, esta legislação já era há muito aguardada por alguns potenciais produtores, em particular devido à expectativa da possibilidade de isenção de ISP, o que torna a comercialização de biodiesel mais competitiva com a do gasóleo. No entanto essa isenção só é aplicável para pequenas quantidades, o que torna a produção de biodiesel para auto-consumo e com aproveitamento de gorduras vegetais aparentemente menos nobres mais apetecível.

## 1.2. Óleos e gorduras

As gorduras e os óleos, de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), formadas predominantemente por produtos de condensação entre glicerol e ácidos gordos [12].

Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres derivados do glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídeos), cujos ácidos gordos contêm cadeias de 8 a 24 átomos de carbono, com diferentes graus de insaturação.

Conforme a espécie de oleaginosa, são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos gordos presentes na estrutura e variações na composição química do óleo vegetal. Assim sendo, a análise da composição em ácidos gordos constitui o primeiro procedimento para a avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou de seus produtos de transformação e tal pode ser obtido através de vários métodos analíticos tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em fase gasosa e ressonância magnética nuclear [13].

Os ácidos gordos, que diferem pelo número de átomos de carbono e também pela presença de insaturações (ligações duplas entre os átomos de carbono) na sua cadeia hidrofóbica, são ácidos orgânicos lineares. São conhecidos como saturados os ácidos gordos sem ligações duplas e, aqueles que as possuem são chamados de insaturados ou poliinsaturados (uma ou mais duplas ligações, respectivamente). Nas tabelas seguintes são listados os ácidos gordos mais importantes, de entre os diversos existentes, a sua estrutura bem como a composição em ácidos gordos de alguns óleos vegetais comuns [14].

Tabela 1. 1 – Estrutura química dos ácidos gordos comuns. Adaptado de [15].

Ácido gordo	Designação química dos ácidos gordos	Estrutura (xx:y)	Formula
Láurico	Dodecanóico	12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Mirístico	Tetradecanóico	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Palmítico	Hexadecanóico	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Esteárico	Octadecanóico	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Oléico	cis-9-Octadecenóico	18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Linoléico	cis-9,cis-12-Octadecadienóico	18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Linolénico	cis-9,cis-12,cis-15-Octadecatrienóico	18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Araquídico	Eicosanóico	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Beénico	Docosanóico	22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
Erúcido	cis-13-Docosenóico	22:1	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
Lignocérico	Tetracosanóico	24:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>

Tabela 1. 2 – Composição em ácidos gordos de alguns óleos vegetais. Adaptado de [15].

Amostra	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Outros
Sementes de algodão	28,7	0	0,9	13,0	57,4	0	0
Semente de papoila	12,6	0,1	4,0	22,3	60,2	0,5	0
Colza	3,5	0	0,9	64,1	22,3	8,2	0
Sementes de girassol	6,4	0,1	2,9	17,7	72,9	0	0
Grãos de trigo	20,6	1,0	1,1	16,6	56,0	2,9	1,8
Palma	42,6	0,3	4,4	40,5	10,1	0,2	1,1
Polpa de milho	11,8	0	2,0	24,8	61,3	0	0,3
Sebo	23,3	0,1	19,3	42,4	2,9	0,9	2,9
Soja	13,9	0,3	2,1	23,2	56,2	4,3	0
Óleo de amendoim	11,4	0	2,4	48,3	32,0	0,9	4,0
Óleo de avelã	4,9	0,2	2,6	83,6	8,5	0,2	0
Óleo de noz	7,2	0,2	1,9	18,5	56,0	16,2	0

Na matéria-prima do biodiesel são usualmente encontradas as seguintes gamas de concentração de ácidos gordos livres [16]:

- Óleo vegetal refinado <0,05%
- Óleo vegetal bruto 0,3-0,7%
- Óleos usados provenientes de restaurantes 2-7%
- Gordura animal 5-30%
- Gordura “trap grease” 40-100%

É importante converter previamente os ácidos gordos livres (*free fatty acids*, FFA) a biodiesel quando se utiliza matéria-prima que contém 5-30% FFA ou até mais, sem o que o rendimento do processo será baixo.

Os métodos enzimáticos, glicerólise, catálise ácida e catálise ácida seguida de catálise alcalina são quatro das técnicas mais comuns de conversão dos FFA a biodiesel [16].

Os ácidos gordos são encontrados na natureza na forma não associada, sendo assim conhecidos como ácidos gordos livres, ou associados formando outras classes de compostos químicos como os fosfatídeos.

Os glicerídeos são uma das principais formas de apresentação dos ésteres de ácidos gordos na natureza; são compostos químicos também conhecidos como triacilglicerídeos, os quais são formados pela condensação entre ácidos gordos e o tri-álcool conhecido "popularmente" por glicerol. Dependendo, se uma, duas ou três moléculas de ácido gordo se associam ao glicerol, estes compostos são chamados de mono, di ou triacilglicerídeos, respectivamente. Os triacilglicerídeos podem ser formados por ácidos gordos iguais ou

diferentes entre si.

Tal como referido anteriormente as gorduras e os óleos são constituídos por uma mistura de diversos compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos gordos livres e seus derivados triacilglicerídeos e fosfatídeos.

Assim sendo, estas substâncias podem ser divididas em dois grupos, os glicerídeos e os componentes não-glicerídeos [13].

Os tipos de ácidos gordos dos quais são formados bem como a relação entre estas classes de compostos, depende essencialmente da matéria-prima e das condições em que foi produzida e/ou processada.

Nos últimos quinze anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao facto desses materiais serem obtidos de fontes naturais e utilizados como importantes matérias-primas para as indústrias química, farmacêutica e alimentar [17].

Os triacilglicerídeos são os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras e as suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos gordos presentes [13].

### **1.3. Matérias-primas usadas na produção de biodiesel**

Os óleos vegetais, gordura animal, óleos e gorduras residuais são as matérias-primas usadas para a produção de biodiesel. Existem diversas possibilidades em relação ao uso de oleaginosas para a produção de biodiesel, como soja, girassol, milho, algodão, amendoim, entre outros [12].

O sebo bovino, os óleos de peixes, a banha de porco, destacam-se entre as gorduras animais, pois são exemplos de gordura animal com potencial para produção de biodiesel, quer devido à disponibilidade, quer devido à potencial qualidade.

Como matéria-prima podem também ser utilizados os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial [4].

No processo de produção de biodiesel as propriedades químicas e físicas da matéria-prima utilizada estão directamente associadas ao rendimento da transesterificação e à qualidade do produto final para fins combustíveis [14].

De seguida apresenta-se uma tabela com a caracterização física de alguns óleos vegetais para uma melhor interpretação da matéria-prima usada na produção do biodiesel.

Uma vez que o balanço custo/benefício pode ser afectado, o teor de óleos das sementes deve ser considerado. Mesmo com esta diversidade de matérias-primas, e para garantir a qualidade do produto, já existe referência Internacional para caracterizar as propriedades do biodiesel, com destaque para a Norma Europeia EN 14214: 2003, e a Norma Norte Americana ASTM D6751.

Tabela 1. 3 – Propriedades de alguns óleos vegetais. Adaptado de [15].

Óleo vegetal	Viscosidade cinemática a 311 K (mm <sup>2</sup> /s)	Número de cetano	Poder calorífico (MJ/kg)	Ponto de inflamação (K)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Resíduo carbonoso (% m/m)
Milho	34,9	37,6	39,5	550	909,5	0,24
Semente de algodão	33,5	41,8	39,5	507	914,8	0,24
Semente de linho	27,2	34,6	39,3	514	923,6	0,22
Amendoim	39,6	41,8	39,8	544	902,6	0,24
Colza	37,0	37,6	39,7	519	911,5	0,30
Sésamo	35,5	40,2	39,3	533	913,3	0,25
Soja	32,6	37,9	39,6	527	913,8	0,27
Girassol	33,9	37,1	39,6	547	916,1	0,23
Palma	39,6	42,0	-	540	918,0	-
Sebo	-	-	40,0	474	-	6,21

Os procedimentos relativos à preparação da matéria-prima para a sua conversão em biodiesel, visam criar as melhores condições para a reacção de transesterificação, maximizando a taxa de conversão. A matéria-prima é submetida a um processo de neutralização para que tenha o mínimo de acidez e de humidade, através de uma lavagem com uma solução alcalina de hidróxido de sódio ou de potássio, seguida de uma operação de secagem ou desumidificação. As especificidades do tratamento dependem das condições da matéria gorda utilizada e da sua natureza.

Tal como no caso dos óleos e gorduras animais, na matéria-prima residual pode também ser necessário extrair o óleo, o que é feito aplicando-se água e vapor de água.

Para obtenção de biodiesel por via enzimática, não é necessária esta etapa, pois quanto mais ácidos gordos livres, mais rápida e eficiente será a reacção [18].

#### 1.4. Biodiesel

O valor de mercado do diesel, da gasolina e derivados do petróleo tende a subir cada vez mais. Ocorre que em cada ano as reservas diminuem e o consumo aumenta. Mas, apesar do problema físico, existe ainda o problema político, pois a cada crise internacional ou ameaça de guerra sucede-se um aumento significativo no preço do barril do petróleo.

O biodiesel apresenta as seguintes características que representam vantagens, enquanto produto, sobre os combustíveis derivados do petróleo: tem um elevado índice de cetano, é virtualmente livre de enxofre e de substâncias aromáticas, possui maior viscosidade e maior ponto de ignição que o diesel convencional, no caso do biodiesel de óleos residuais (fritura),

caracteriza-se por uma redução nas emissões de CO, CO<sub>2</sub>, hidrocarbonetos não queimados e SO<sub>x</sub>, possui uma área de mercado específica, directamente associada a actividades agrícolas, não contribui para o aumento do efeito de estufa, tem carácter não tóxico, não corrosivo e biodegradável, é uma fonte de energia limpa, tem preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial e, finalmente, por não ser inflamável, o transporte, armazenamento e manuseamento mostram-se muito mais seguros que os do congénere de natureza petrolífera.

No entanto existem algumas desvantagens, como: os grandes volumes de glicerina produzida (subproduto) só poderão ter mercado a preços muito inferiores aos actuais; tem uma produção ligeiramente mais baixa de energia, se comparada a um volume equivalente do diesel de petróleo; a produção intensiva da matéria-prima de origem vegetal leva a um esgotamento das capacidades do solo; pode ser mais caro do que o diesel de petróleo dependendo da área e da matéria-prima utilizada; poderá haver uma subida nos preços dos alimentos, ocasionada pelo aumento da procura de matéria-prima para a produção de biodiesel; poucos pontos de abastecimento se comparado ao diesel de petróleo; no inverno, pode apresentar problemas de congelamento a baixa temperatura [19].

A produção de biodiesel pode ser obtida, a um custo competitivo em comparação com o preço comercial do óleo diesel, se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for optimizado.

No entanto o biodiesel necessita de algumas características técnicas imprescindíveis, enquanto combustível: a reacção de transesterificação deve ser completa, levando a uma ausência total de ácidos gordos remanescentes e o biocombustível deve ter alta pureza, não contendo senão pequenas quantidades de glicerina, de catalisador residual ou de álcool excedente da reacção [20].

Os ácidos gordos mono-ésteres que podem ser usados como combustível diesel tomam o termo genérico de biodiesel. Este é produzido através da conversão do triglicérido (o óleo vegetal e gorduras animais) através dos vários processos de esterificação.

O biodiesel é definido, quimicamente, como éster monoalquílico de ácidos gordos derivados de óleos ou gorduras, de ocorrência natural, produzido através da reacção de transesterificação de triglicéridos com metanol ou etanol, na presença de um catalisador ácido ou básico [1].

Apesar de o biodiesel não ser um derivado do petróleo, pode ser utilizado como uma mistura em qualquer proporção com o diesel de petróleo.

Assim, deve-se salientar que os ésteres alquílicos de óleos e gorduras não podem ser caracterizados como biodiesel se não forem capazes de atender aos valores dos parâmetros fixados pelas especificações, como a norma EN 14214: 2003. Nas tabelas seguintes são apresentados os requisitos gerais e métodos de ensaio referentes ao

biodiesel referenciados na norma descrita anteriormente.

Tabela 1. 4 – Requisitos gerais aplicáveis e métodos de ensaio de combustíveis automóveis, conforme a norma EN 14214: 2003.

Parâmetro	Unidade	Limite		Método de ensaio
		Mínimo	Máximo	
Teor de ésteres	% (m/m)	96,5		EN 14103
Densidade a 15°C	Kg/m <sup>3</sup>	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Ponto de inflamação	°C	120	-	prEN ISO 3679
Teor de enxofre	mg/Kg	-	10,0	prEN ISO 20846 prEN ISO 20884
Resíduo carbonoso (em 10% resíduo de destilação)	% (m/m)	-	0,30	EN ISO 10370
Número de cetano		51,0		EN ISO 5165
Cinzas sulfatadas	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Teor de água	mg/Kg	-	500	EN ISO 12937
Contaminação total	mg/Kg	-	24	EN 12662
Corrosão ao cobre (3h a 50°C)	Gama	Classe 1		EN ISO 2160
Estabilidade oxidativa, 110°C	horas	6,0	-	EN 14112
Índice de acidez	mg KOH/g		0,50	EN 14104
Número de iodo	g iodo/100 g		120	EN 14111
Éster metílico do ácido linolénico	% (m/m)		12,0	EN 14103
Ésteres metílicos polinsaturados (>= 4 ligações duplas)	% (m/m)		1	
Teor metanol	% (m/m)		0,20	EN 14110
Teor de monoglicerídeos	% (m/m)		0,80	EN 14105
Teor de diglicerídeos	% (m/m)		0,20	EN 14105
Teor de triglicerídeos	% (m/m)		0,20	EN 14105
Glicerol livre	% (m/m)		0,02	EN 14105 EN 14106
Glicerol total	% (m/m)		0,25	EN 14105
Metais Grupo I (Na+K)	mg/Kg		5,0	EN 14108 EN 14109
Metais Grupo II (Ca+Mg)	mg/Kg		5,0	prEN 14538
Teor de fósforo	mg/Kg		10,0	EN 14107

Tabela 1. 5 – Requisitos e métodos de ensaio (CFPP) de combustíveis automóveis, conforme estabelecido na norma EN 14214:2003.

<b>Climas Temperados</b>								
<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Limites</b>						<b>Método de ensaio</b>
		<b>Grau A</b>	<b>Grau B</b>	<b>Grau C</b>	<b>Grau D</b>	<b>Grau E</b>	<b>Grau F</b>	
CFPP	°C, Max.	+5	0	-5	-10	-15	-20	EN 116
<b>Climas Árticos</b>								
<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Limites</b>					<b>Método de ensaio</b>	
		<b>Classe 0</b>	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>	<b>Classe 3</b>	<b>Classe 4</b>		
CFPP	°C, Max.	-20	-26	-32	-38	-44	EN 116	

O não cumprimento dos valores limite de alguns destes parâmetros, poderá acarretar consequências graves, tal como se pode evidenciar na tabela que se apresenta de seguida.

Tabela 1. 6 – Consequências evidenciadas na ausência do cumprimento dos valores limite de alguns parâmetros da norma EN 14214:2003 [21].

<b>Parâmetro</b>	<b>Consequências</b>
Densidade	Um valor acima da norma leva à formação de uma mistura rica ar/combustível aumentando a emissão de poluentes. Um valor abaixo da norma leva à formação de uma mistura pobre o que leva à perda de potência e ao aumento do consumo do combustível.
Viscosidade	Uma viscosidade elevada causa um aumento da pressão máxima de entrada do combustível, provoca a diminuição do débito de combustível, pulverização incorrecta nos injectores e consequentemente provoca uma incorrecta combustão na câmara de combustão e um desgaste elevado do corpo da bomba injectora, podendo a mesma ficar danificada.
Flash point	O resultado de um flash point baixo no biodiesel é uma combustão prematura, causando timings irregulares, um excesso da explosão do combustível na câmara de combustão e consequente aumento das emissões e desgaste de todos os componentes do motor.
Teor enxofre	Formação de óxidos de enxofre que reage com a água, formando o indesejável ácido sulfúrico, que desgasta os componentes muito mais rapidamente. O óxido de enxofre é também um problema ambiental, que provoca problemas nas vias respiratórias.
Teor de cinzas	Podem formar-se depósitos nos pistões, anéis, válvulas, bomba injectora, injectores e câmara de combustão, afectando a performance, durabilidade e fiabilidade do motor.

<b>Parâmetro</b>	<b>Consequências</b>
Corrosão do cobre	Valores superiores à norma causam um desgaste superior em todos os componentes internos do motor, encurtando o tempo de vida do mesmo.
Índice de Acidez	Uma acidez elevada poderá ter um efeito de solvente forte nas borrachas e tubos, provocando a rotura dos mesmos. Também poderá levar à formação de depósitos, provocando o entupimento do filtro do combustível ou a diminuição da pressão do mesmo. Corrosão de diferentes partes metálicas.
Índice de Iodo	Elevados valores de Índice de Iodo, a combustão do biodiesel leva à formação de polímeros. Polímeros esses que formam uma camada de resina nas diferentes partes do motor e bombas. A polimerização ocorre principalmente após um período de carga máxima do motor, seguida de uma paragem prolongada.
Índice de Cetano	Um valor muito elevado deste parâmetro indica que a combustão se efectua quando o pistão de compressão da câmara já se encontra em trajectória ascendente, resultando assim num deficiente aproveitamento do potencial energético do combustível. Um valor muito reduzido de Índice de cetano resulta na combustão enquanto o pistão está em trajectória descendente, resultando em perdas de eficiência, dificuldade no arranque a frio e permite o aparecimento de fumo branco devido à combustão incompleta e mau funcionamento do motor.
Glicerina total e livre	Formação de depósito de glicerina no fundo dos depósitos. Entupimento de bombas e filtros. Entupimento dos injectores, provocando que a combustão não se dê nas condições ideais, formando-se coque dentro do motor.
Fósforo, Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio	O fósforo pode envenenar o catalisador, diminuindo o rendimento. Pode criar depósitos nos pistões, válvulas e injectores afectando o desempenho, durabilidade e fiabilidade do motor. O sódio e o potássio podem formar sólidos abrasivos ou sabões metálicos que podem causar um efeito abrasivo ou entupir os filtros ou os injectores. O cálcio e o magnésio podem também formar sabões que podem causar o entupimento dos filtros ou dos injectores.
Teor de água	Redução do desempenho. Aumento dos consumos. Provoca a oxidação dos componentes metálicos. Desgaste prematuro da bomba injectora. Permite o aparecimento de bactérias, que vivem no meio aquoso e que se alimentam de combustível.

Por envolver a participação de vários segmentos da sociedade como as cadeias produtivas do etanol e das oleaginosas, a implementação da produção do biodiesel de natureza etílica

no mercado nacional, abre oportunidades para grandes benefícios sociais decorrentes do elevado índice de geração de empregos [22].

Em termos gerais, cabe ainda salientar que, a adição de biodiesel ao diesel de petróleo pode melhorar as propriedades do combustível fóssil, permitindo uma redução dos níveis de ruído do motor e melhorando a eficiência da combustão pelo aumento do número de cetano. Pode-se referir os grandes volumes de subproduto (glicerol), como principal desvantagem; no entanto, esse subproduto do biodiesel pode ser convertido a biogás, o que faz aumentar a eficiência da conversão energética do processo [18].

### **1.5. Reacção de transesterificação**

O aproveitamento de outras fontes para a obtenção de combustíveis, como o uso de óleos vegetais e gorduras animais, surge pelas diversas variações no preço do petróleo. No entanto, o uso directo destas matérias-primas como combustível é problemático devido à sua elevada viscosidade e baixa volatilidade. Para reduzir a alta viscosidade destes combustíveis diferentes opções têm sido consideradas.

Devido aos processos de produção actualmente utilizados, a produção de biodiesel é economicamente competitiva, pois estes minimizam os custos devido à utilização de fontes renováveis de matéria-prima (óleos vegetais e gorduras animais) e catalisadores de baixo custo, além deste combustível ser técnica e ambientalmente aceitável.

A escolha da matéria-prima e da via de obtenção, a qual pode ser a catálise alcalina ou ácida, a utilização de condições supercríticas, pirólise (craqueamento térmico) ou catálise enzimática, diferenciam os métodos para a obtenção de biodiesel.

A alcoólise, também chamada de transesterificação, é um processo de conversão de triglicérides a ésteres de ácidos gordos e glicerol, através da reacção com álcoois, podendo ser catalisada por um ácido ou de uma base forte ou enzima.

Para o caso da produção de biodiesel, os triglicérides usados são gorduras animais ou óleos vegetais, os álcoois são metílicos ou etílicos, as bases são hidróxido de sódio ou potássio, o ácido é o sulfúrico e a enzima é uma lipase, gerando-se como produto final os ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e glicerina bruta como subproduto. Para evitar a alta viscosidade dos triacilglicérides tem sido amplamente utilizado este processo [23].

A transesterificação ocorre essencialmente pela mistura dos reagentes e é uma reacção reversível. Para acelerar a conversão, a reacção realiza-se na presença de um catalisador (uma base forte – NaOH, KOH – ou um ácido – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, HCl – ou enzimas – lipases). Assim, o seu rendimento depende do deslocamento do equilíbrio a favor dos ésteres [23].

Pode-se obter maior rendimento através da optimização das condições operatórias,

variando parâmetros como a temperatura, a velocidade de agitação, a concentração de catalisador em relação ao óleo e, principalmente, a razão molar álcool/óleo. Adiciona-se um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio a favor dos produtos (ésteres) pelo facto da reacção ser reversível.

Devido ao facto da água provocar uma mudança parcial da reacção produzindo sabão, na transesterificação com catalisador básico, os glicerídeos e o álcool devem ser anidros [24].

Todo o processo de transesterificação é uma sequência de três etapas consecutivas que são reacções reversíveis. Os ésteres são produzidos em todas estas reacções. A relação estequiométrica entre o álcool e o óleo é de 3:1. Para favorecer a reacção no sentido do produto desejado é geralmente usado um excesso de álcool [25].

Na figura seguinte apresenta-se a reacção global de transesterificação e as reacções consecutivas e reversíveis.

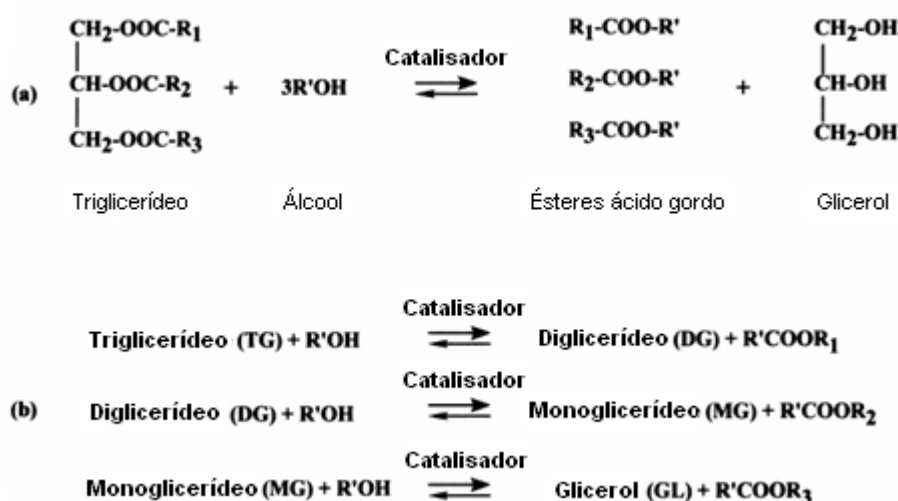


Figura 1. 1 – Reacção de transesterificação; a) Equação Global; b) Reacções consecutivas e reversíveis [26].

No processo do transesterificação o metanol e o etanol são mais frequentemente utilizados, dando-se o nome de metanólise se o metanol é usado no processo [24]. A metanólise de triacilglicerídeos está representada na Figura 1. 2.

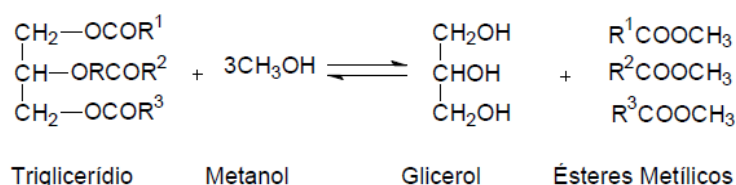


Figura 1. 2 – Equação geral da transesterificação dos triglicerídeos com metanol [26].

Na transesterificação é geralmente preferida, por razões económicas e por razões relacionadas com o processo de produção, a utilização de metanol. De facto, o metanol

possui uma molécula mais curta que o etanol e uma maior polaridade, permitindo uma mais fácil separação entre a glicerina e os ésteres. Contudo, a utilização de etanol pode ser atractiva do ponto de vista ambiental, uma vez que este álcool pode ser produzido a partir de uma fonte renovável e, ao contrário do metanol, não levanta tantas preocupações relacionadas com a toxicidade. Na tabela seguinte são apresentadas vantagens e desvantagens da utilização de metanol e etanol na produção de biodiesel [27].

Tabela 1. 7 – Vantagens e desvantagens apresentadas pelos álcoois usados [18].

<b>Uso de metanol</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<p>Consumo de metanol no processo de transesterificação é cerca de 45% menor que o do etanol anidro;</p> <p>O preço do metanol é quase metade do preço do etanol;</p> <p>É mais reactivo;</p> <p>Para uma mesma taxa de conversão (e mesmas condições operacionais), o tempo de reacção utilizando metanol é menos de metade do tempo quando se usa o etanol;</p> <p>Considerando a mesma produção de biodiesel o consumo de vapor na rota metílica é cerca de 20% do consumo na rota etílica, e o consumo de electricidade é menos de metade;</p> <p>Os equipamentos de processo da planta com rota metílica são cerca de um quarto do volume dos equipamentos para a rota etílica, para uma mesma produtividade e mesma qualidade</p>	<p>Apesar de poder ser produzido a partir da biomassa, é tradicionalmente um produto fóssil;</p> <p>É bastante tóxico;</p> <p>Maior risco de incêndios (mais volátil);</p> <p>Transporte tem que ser controlado</p>
<b>Uso de etanol</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<p>Produz biodiesel com um maior índice de cetano e maior lubricidade, se comparado ao biodiesel metílico;</p> <p>Se for feito a partir da biomassa, produz um combustível 100% renovável;</p> <p>Não é tóxico como o metanol;</p> <p>Menor risco de incêndios</p>	<p>Os ésteres etílicos possuem maior afinidade à glicerina, dificultando a separação;</p> <p>Possui azeotropia, quando misturado com água. Com isto, a desidratação requer maiores gastos energéticos e investimentos em equipamentos;</p> <p>Dependendo do preço da matéria-prima, os custos de produção do biodiesel etílico podem ser até 100% maiores que o metílico</p>

A purificação do biodiesel é uma etapa fundamental para que se possa caracterizar o biodiesel obtido e avaliar a qualidade do mesmo. Assim sendo, é feita de seguida uma abordagem a essa mesma etapa.

### **1.5.1. Purificação do biodiesel**

A massa reaccional final após a reacção de transesterificação é constituída por duas fases, separáveis por decantação e/ou por centrifugação. A fase mais densa é composta por glicerina bruta, impregnada do excesso de álcool, de água e impurezas. A fase menos densa é constituída por uma mistura de esteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adoptado, também impregnada de excesso de álcool, água e impurezas. Na fase leve é possível encontrar vestígios de glicerina e na fase pesada vestígios de ésteres. O processo de separação do biodiesel dos restantes constituintes da mistura é constituído por vários processos de decantação onde o éster é progressivamente separado da glicerina de forma a aumentar a sua pureza [18, 28].

A fase pesada é submetida a um processo de destilação, separando a glicerina bruta do álcool e da água, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado. O álcool residual é recuperado da mesma forma da fase leve. Após essa recuperação, o álcool proveniente de ambas as fases ainda contém água e deve ser desidratado [18].

Após os processos de recuperação, os excessos residuais de álcool contêm quantidades significativas de água, necessitando de uma separação. A destilação é normalmente o processo pelo qual a desidratação do álcool é feita. Uma vez que a diferença de volatilidade relativa dos constituintes da mistura é muito grande, no caso da desidratação do metanol a destilação é bastante simples e fácil de ser realizada. Por outro lado devido à azeotropia, a desidratação do etanol é mais difícil.

A separação do álcool e da água do éster é também efectuada por evaporação, sendo este último remetido para o processo de purificação. A mistura de álcool e água é encaminhada para a desidratação [18].

A glicerina é um resíduo importante da fase de transesterificação e, embora este produto seja extensivamente utilizado na indústria química, ele é obtido no estado bruto contendo grande teor de impurezas. A destilação a vácuo pode ser usada para a purificação da glicerina bruta, resultando um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada [18, 28].

Após a separação da fase glicerol, o biodiesel bruto está principalmente contaminado com catalisador residual, água, álcool não reagido, glicerol, e sabões que foram gerados durante a reacção de transesterificação. A presença de contaminantes pode ser prejudicial para os motores e para o meio ambiente. Normalmente, o biodiesel bruto entra numa etapa de neutralização e, em seguida, passa por uma etapa de lavagem. Nalguns casos, o ácido é

adicionado ao biodiesel bruto para neutralizar qualquer catalisador restante e para quebrar qualquer sabão. Sabões reagem com o ácido formando sais solúveis em água e ácidos gordos livres. Van Gerpen [16] afirmou que a neutralização antes da etapa de lavagem reduz as matérias necessárias para a etapa de lavagem e minimiza o potencial para a formação de emulsões durante a etapa de lavagem. O álcool não reagido deve ser removido com equipamento de destilação antes da etapa de lavagem para impedir a entrada de excesso de álcool nos efluentes águas residuais. O objectivo principal desta etapa é lavar os restos do catalisador, sabões, sais, álcool residual e glicerol livre do biodiesel bruto. Geralmente, as três principais abordagens adoptadas para a purificação do biodiesel são: lavagem com água, lavagem a seco e a extracção por membranas [29]. Estas abordagens são brevemente apresentadas na tabela seguinte.

Tabela 1. 8 – Diferentes abordagens para purificar o biodiesel bruto. Adaptado de [29].

Abordagens	Matéria-prima utilizada	Função	Separação de fases	Vantagem	Desvantagem
Lavagem com água	Água destilada quente	Impede a precipitação de ésteres de ácidos gordos saturados Retarda a formação de emulsão	Funil de separação, centrifugação, peneiros moleculares, gel de sílica, etc.	Muito eficaz na remoção de contaminantes	Aumento de custos e tempo de produção, efluente líquido, perda do produto, formação de emulsão
	Água desmineralizada	Elimina contaminações de cálcio e magnésio			
Lavagem a seco	Resina de permuta iónica Pó de silicato de magnésio	Conduz ao baixo nível de glicerol livre e remoção de sabões	-	Ausência de água	Supera o limite da norma EN
Extracção por membrana	Polissulfona	Remove os contaminantes	-	Evita a formação de emulsão e diminui a perda na refinação	Provavelmente elevado custo e baixa produção, devido à existência de contaminantes

O biodiesel pode utilizar as mesmas condições normais de armazenamento e

manuseamento usadas para o gasóleo. O biodiesel deve ser armazenado em ambiente limpo, seco e escuro, sendo preferíveis tanques de aço, alumínio, polietileno, polipropileno e teflon, uma vez que é higroscópico. Devem ser evitados tanques de cobre, latão, chumbo, bronze, estanho e zinco [18].

De seguida é apresentada uma tabela contendo valores de algumas propriedades físico-químicas do biodiesel após purificação, o qual foi produzido por via química a partir de diferentes tipos de matérias-primas.

Tabela 1. 9 – Propriedades físico-químicas do biodiesel produzido por via química usando diferentes matérias-primas. Adaptado de [29].

Matéria-prima	Viscosidade cinemática a 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Número de iodo (g <sub>iodo</sub> /100g <sub>amostra</sub> )	Índice acidez (mg <sub>KOH</sub> /g)	Poder calorífico (MJ/kg)
Soja	4,08	885	138,7	0,15	40
Colza	4,30-5,83	880-888	-	0,25-0,45	45
Girassol	4,90	880	142,7	0,24	45,3
Milho	3,39	880-890	120,3	-	45
Sebo	-	856	126	0,65	-

Entre os principais factores que afectam a produção de biodiesel pode-se salientar a quantidade de álcool usada no processo, tempo de reacção, temperatura de reacção e a concentração de catalisador usado. Assim sendo, será de seguida efectuada uma abordagem a esses factores.

### 1.5.2. Principais factores que afectam a produção de biodiesel

Muitos investigadores reconheceram que um dos principais factores que afectam a produção de biodiesel é a razão molar álcool/óleo. Teoricamente, a proporção estabelecida na reacção de transesterificação requer 3 mol de álcool para 1 mol de triglicerídeos para produzir 3 mol de ésteres de ácidos gordos e 1 mol de glicerol. Usa-se um excesso de álcool na produção de biodiesel para garantir que os óleos ou gorduras sejam totalmente convertidos em ésteres e, uma maior razão molar de álcool/triglicerídeos pode resultar numa maior conversão a éster num curto espaço de tempo. No entanto, aumentando a quantidade de álcool além da proporção ideal, o rendimento não vai aumentar, mas vai aumentar o custo para a recuperação do excesso de álcool.

Além disso, a razão molar está associada ao tipo de catalisador utilizado, sendo na maioria dos estudos de 6:1, quando se usa um catalisador alcalino. Quando a percentagem de ácidos gordos livres nos óleos ou gorduras é elevada, como no caso de resíduos de óleo de cozinha, pode ser necessária uma razão molar tão elevada como 15:1 quando se utiliza

transesterificação catalisada por ácido.

Freedman et al. [56] concluíram que a taxa de conversão a ésteres de ácidos gordos aumenta com o tempo de reacção. No início, a reacção é lenta, devido à mistura e dispersão de álcool no óleo. Depois de um determinado tempo, a reacção ocorre muito rapidamente. Normalmente, o rendimento atinge um máximo num tempo de reacção <90 min, e depois continua relativamente constante com o aumento do tempo de reacção. Além disso, um excesso no tempo de reacção levará a uma redução no rendimento do produto devido à reacção inversa de transesterificação, resultando numa perda de ésteres, bem como originando que mais ácidos gordos formem sabões.

A temperatura influencia claramente a reacção e o rendimento em biodiesel. Uma maior temperatura de reacção pode diminuir a viscosidade dos óleos e resultar num aumento da velocidade de reacção e num menor tempo para a conversão total. No entanto, Leung e Guo [60] e Eevera et al. [61] descobriram que quando a temperatura de reacção aumenta além do nível óptimo, o rendimento do biodiesel diminui porque uma maior temperatura de reacção acelera a reacção de saponificação de triglicerídeos. A temperatura de reacção deve ser inferior ao ponto de ebulição do álcool, a fim de garantir que o álcool não se vai perder através de evaporação. Dependendo do óleo usado, a temperatura óptima varia entre 50 °C e 60 °C, por exemplo no caso de o álcool utilizado ser o metanol.

A concentração de catalisador pode afectar o rendimento de produção de biodiesel. Como mencionado anteriormente, o catalisador mais utilizado para a reacção é o hidróxido de sódio. No entanto, Freedman et al. [56] constataram que o metóxido de sódio é mais eficaz do que o hidróxido de sódio porque aquando da mistura de hidróxido de sódio com metanol produz-se uma pequena quantidade de água, o que afectará o rendimento do produto por causa da reacção de hidrólise. Esta é a razão pela qual o catalisador deve ser adicionado ao metanol primeiro e depois misturado com o óleo. Como a concentração de catalisador aumenta, a conversão de triglicerídeos também aumenta, assim como o rendimento em biodiesel. Isto porque uma quantidade insuficiente de catalisador resulta numa conversão incompleta dos triglicerídeos em ésteres de ácidos gordos.

Normalmente, o rendimento da reacção atinge um valor ideal, quando a concentração de catalisador (NaOH) atinge 1,5% (m/m) e, em seguida, diminui um pouco com um aumento da concentração de catalisador. A redução da produção do biodiesel é devida à adição de excesso de catalisador alcalino levando a reagir triglicerídeos com o catalisador alcalino e formando sabão [29].

A produção de biodiesel é economicamente competitiva devido aos processos de produção actualmente utilizados.

Os métodos para a obtenção de biodiesel podem diferenciar na escolha da matéria-prima e na forma de produção, as quais podem ser catálise alcalina, catálise ácida, utilização de

fluidos em condições supercríticas, pirólise (craqueamento térmico) e catálise enzimática, sendo de seguida feita uma abordagem a essas mesmas vias de produção.

## **1.6. Processos de produção de biodiesel**

### **1.6.1. Catálise alcalina**

A catálise alcalina é o processo utilizado quando a quantidade de ácidos gordos livres presentes no triglicerídeo é baixa (menor que 2,5% (m/m)), pois com percentagens elevadas de ácidos gordos livres ocorreriam reacções de saponificação, diminuindo a eficiência da conversão. Para que uma melhor conversão seja alcançada neste processo é necessário que a temperatura de operação varie aproximadamente entre 60 e 70 °C e que a quantidade de catalisador na mistura se encontre numa gama de 0,5 a 1,0 % (m/m). Isto porque um excesso de catalisador pode ter como consequências a formação de gel e a dificuldade de separação do glicerol. Assim, seguindo esta lógica, deve ser usada matéria-prima com pouca água. Embora a transesterificação química, resulte em elevadas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, empregando catálise alcalina, quando se trata de curtos tempos de reacção, existem algumas desvantagens tais como: os elevados consumos de energia, a dificuldade e demora na recuperação do glicerol, a necessidade de remoção do catalisador e a necessidade de um tratamento à água alcalina residual resultante da lavagem do biodiesel [30, 31].

O processo de produção de biodiesel via catálise alcalina é actualmente, um dos mais utilizados industrialmente devido ao baixo custo das bases utilizadas e, porque é eficiente e menos corrosivo que o processo ácido, apresentando somente problemas na separação do glicerol quando a reacção ocorre em tempos curtos.

Conforme anteriormente descrito, os ácidos gordos livres presentes na matéria-prima irão reagir com o catalisador alcalino formando sabões. A quantidade máxima de ácidos gordos livres aceitável num sistema de catálise alcalina é inferior a 2,5% FFA (m/m). Assim, se o óleo ou gordura tiver um teor de FFA acima de 2,5 %, será necessária uma etapa de pré-tratamento antes do processo de transesterificação [32].

Na Figura 1. 3 apresenta-se um fluxograma simplificado do processo de catálise alcalina.

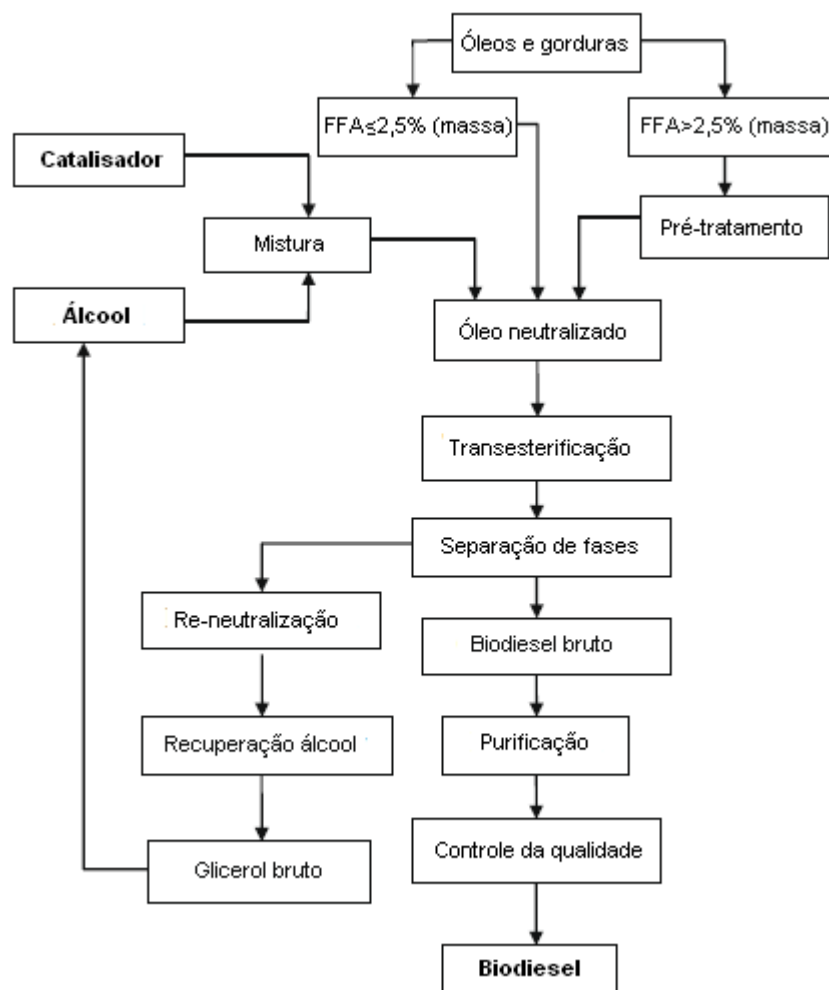


Figura 1. 3 – Fluxograma da produção de biodiesel por via alcalina [32].

### 1.6.2. Catálise ácida

Quando o óleo usado possui elevado teor de ácidos gordos livres, usa-se catálise ácida para a produção de biodiesel. Este é o caso de óleos já utilizados para frituras.

Na catálise ácida, os ácidos que podem ser utilizados no processo de transesterificação incluem ácido sulfúrico, sulfônico, fosfórico ou hidrocloreto, entre outros, sendo o primeiro o mais utilizado.

Entre as possibilidades associadas à catálise ácida está a transesterificação *in-situ*, onde a matéria-prima rica em triglicerídeos é utilizada directamente na reacção com o álcool, em vez de ser utilizado o óleo já refinado. Desta forma, a extracção do óleo e a transesterificação ocorrem em simultâneo no reactor.

No entanto, a catálise ácida apresenta taxas de conversão de triglicerídeos muito inferiores às obtidas na catálise básica homogénea e exige quantidades maiores de catalisador e relações álcool/óleo mais altas (razão molar 30:1), estando a gama de temperatura compreendida entre 55 °C e 80 °C. Os tempos de reacção são mais longos e o consumo energético maior, visto que a maioria dos processos necessita de aquecimento [30, 31].

### 1.6.3. Fluidos em condições supercríticas

Este processo tem como objectivo a obtenção de ésteres de ácidos gordos sem a utilização de catalisadores, tornando mais fácil a separação dos produtos dessa reacção em relação às catálises ácida e alcalina. A matéria-prima reage com o álcool em condições de alta pressão (45 MPa) e temperatura (350 °C), ficando a mistura na forma de vapor, proporcionando homogeneidade, fazendo com que hipoteticamente o solvente supercrítico assumira natureza hidrofílica, com baixa constante dielétrica. Além disso, o metanol líquido é um solvente polar e apresenta pontes de hidrogénio entre o OH-oxigénio e o OH-hidrogénio formando “clusters” de metanol, dificultando o acesso do triglicérido. Estas podem ser algumas razões para a transesterificação em condições supercríticas apresentar maior velocidade de reacção.

Todavia, a razão molar de 42:1 na relação álcool/óleo e as altas pressões e temperaturas, ainda tornam este processo industrialmente inviável [20, 30, 31].

### 1.6.4. Catálise heterogénea

A utilização de catalisadores heterogéneos além de evitar o problema da saponificação, também permite obter uma fracção de glicerina mais pura.

Uma categoria de resinas estudada para a produção de biodiesel é a sulfónica. Esta resina macroporosa, permutadora de catiões, é um catalisador versátil, podendo substituir o seu análogo homogéneo ( $H_2SO_4$ ) em diversas reacções orgânicas. Este método torna-se vantajoso também, devido à possibilidade do catalisador recuperado por uma operação de filtração simples poder ser regenerado depois da reacção, através de um processo em que os sítios activos que foram envenenados sejam reactivados e ocorra uma regeneração das cargas. Evita-se também a neutralização e separação da mistura de reacção, que originam uma série de problemas ambientais relacionados com o uso de grandes quantidades de solventes e energia, como na catálise homogénea.

As resinas catalíticas são avaliadas, principalmente, pela sua capacidade de troca catiónica (CTC), pois esta determina o teor de grupos sulfónicos acessíveis no meio aquoso, no caso das resinas sulfónicas. A quantidade de iões retidos pelo catalisador polimérico depende da afinidade dos iões pelo grupo sulfónico e do grau de inchamento (*swelling*) da estrutura polimérica. Para uma resina ser de boa qualidade para troca catiónica, as estruturas cristalinas não devem ser tão rígidas, pois isso dificulta o acesso das moléculas de triglicéridos aos grupos sulfónicos, prejudicando a reacção de transesterificação ilustrada na Figura 1. 4 [30, 31].

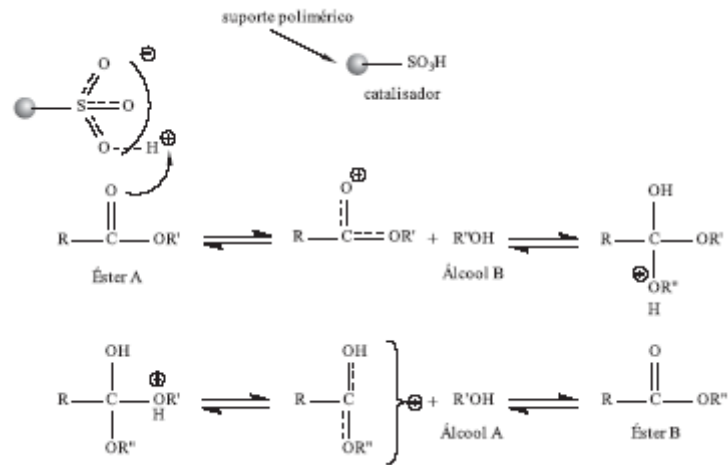


Figura 1. 4 – Reacção de transesterificação usando um catalisador sulfónico [31].

### 1.6.5. Craqueamento térmico (Pirólise)

O craqueamento térmico pode ser uma metodologia adequada à produção de biodiesel em pequenas localidades. No processo de craqueamento, um reactor trabalhando a altas temperaturas promove a cisão das moléculas do óleo vegetal e um catalisador remove os compostos oxigenados corrosivos. Há um gasto relativamente elevado com energia térmica, uma vez que a cisão molecular ocorre a partir dos 350 °C e a produção é em pequena escala. Os catalisadores típicos utilizados são o óxido de silício,  $\text{SiO}_2$ , e o óxido de alumínio,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . A remoção do oxigénio do processo reduz os benefícios de ser um combustível oxigenado, diminuindo as suas vantagens ambientais e geralmente produzindo um combustível mais próximo da gasolina que do diesel. O processo é demonstrado na Figura 1. 5 [18].

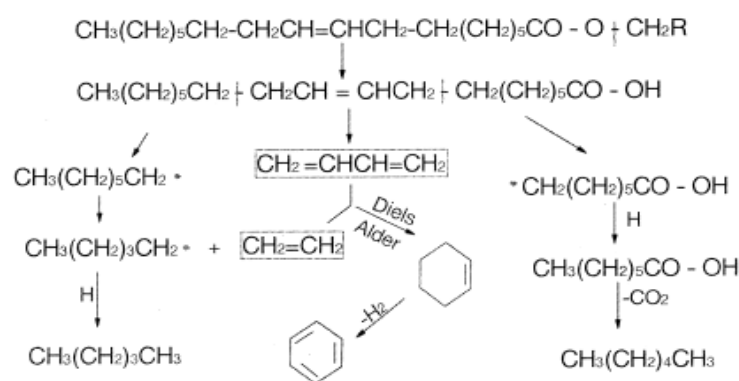


Figura 1. 5 – Mecanismo de craqueamento térmico de triglicerídeos [31].

Na tabela apresentada de seguida resumem-se alguns estudos realizados sobre a produção de biodiesel pela via química, incluindo referências aos artigos mais importantes.

Tabela 1. 10 – Estudos realizados sobre a produção de biodiesel pela via química, incluindo condições dos ensaios realizados.

Matéria-prima	Condições de produção				Rendimento (%)	Referências
	Temperatura de reacção (°C)	Tempo da reacção transesterificação (min)	Razão molar	Quantidade de catalisador (% m/m)		
Soja	65	90	Óleo/metanol 1:12	CaO 8% (2,03% H <sub>2</sub> O em metanol)	>95	[33]
Colza	65	120	Óleo/metanol 1:6	KOH 1%	95-96	[34]
Girassol	60	120	Óleo/metanol 1:6	NaOH 1%	97,1	[35]
Milho	80	60	Óleo/metanol 1:9	KOH 2%	85-96	[36]
Sebo	60	1440	Óleo/metanol 1:30	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,5%	98,28	[37]
Girassol	25-60	120	Óleo/metanol 1:6-1:20	NaOH 0,25-1%	97-98	[38]
Amêndoa	Temperatura ambiente	60	Óleo/metanol 1:4,5	KOH 1,5%	90,72	[39]
Amêndoa	30	60	Óleo/etanol 1:9,45	KOH 2%	80,69	[39]

Na secção seguinte será feita uma abordagem sobre a catálise enzimática, importante para uma melhor compreensão do estudo realizado.

### 1.6.6. Catálise enzimática

A catálise enzimática possui entre outras vantagens, a possibilidade de sintetizar especificamente ésteres alquílicos, permitir a recuperação simples do glicerol, a transesterificação de glicerídeos com elevado teor em ácidos gordos, a transesterificação total dos ácidos gordos livres, e o uso de condições brandas no processo com rendimentos de, no mínimo, 90% tornando-se uma alternativa comercialmente muito mais rentável. A catálise enzimática faz com que não ocorram reacções colaterais de formação de subprodutos, o que reduz gastos com a posterior purificação.

A nomenclatura sistemática foi estabelecida pela união internacional de bioquímica e biologia molecular (IUBMB), na qual as enzimas são divididas em seis classes principais e várias subclasses tal como se evidencia na tabela seguinte.

Tabela 1. 11 – Classes principais e várias subclasses de acordo com IUBMB [40].

Número	Classe	Tipo de reacção catalisada	Subclasse
1	Oxidoreductases	Reacções de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C e C=C	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
2	Transferases	Transferência de grupos aldeídico, cetónico, acila, fosforila ou metila	Transaldolases, transcetolases, etc.
3	Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases, etc.
4	Liasas	Adição-eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoacidoliasas, hidroliasas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isómeros	Racemases, epimerases, etc.
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

O potencial de aplicação de lipases em processos biotecnológicos para a modificação de óleos e gorduras tem sido objecto de grande interesse nos meios científico, económico e industrial nos últimos anos [41].

Actualmente, mais de 95% dos processos enzimáticos utilizam hidrolases (proteases, carbohidrolases e lipases). As lipases são extremamente versáteis, pois catalisam várias reacções e diversos substratos, quando comparadas com as outras hidrolases [18, 30].

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases e actuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis os seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é uma reacção reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado através da variação da concentração de reagentes e/ou produtos.

As lipases são encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Actualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microorganismos, devido às facilidades de controlo e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Em geral, os microorganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos géneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucos* [31].

Uma característica específica das lipases é a sua capacidade de agir sobre substratos pouco solúveis em água, actuando somente na interface água/lípido, diferenciando-se, assim, das esterases, que actuam sobre a ligação éster de substâncias solúveis em água. A actividade catalítica das lipases é sensivelmente diminuída na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água por elas

catalisadas [42].

À semelhança do que acontece nas resinas, a presença de água na reacção de transesterificação, catalisada por enzimas, é um factor importante. Por um lado a sua presença é indesejável devido à hidrólise dos triglicerídeos, por outro, ela é necessária para interagir com os grupos hidrofílicos, localizados na superfície das enzimas, deixando os sítios activos mais “expostos”. Assim, na catálise enzimática a presença de água é necessária, mas num teor controlado, por várias razões, tais como: a água funciona como um “lubrificante”, mantendo a enzima na forma activa; promove a agregação das enzimas; elevados teores de água podem causar problemas difusivos; a água promove a hidrólise do triglicerídeo, diminuindo o rendimento da reacção [43].

Devido ao seu elevado poder catalítico, as lipases têm sido utilizadas numa grande variedade de aplicações industriais nestas últimas décadas. As lipases estão presentes em diversos organismos, incluindo animais evoluídos, plantas, fungos e bactérias, onde desempenham um papel chave na biodegradação de lípidos [44].

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular entre 20 a 75 kDa, actividade em pH na faixa compreendida entre 4 a 9 e a temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, na sua maioria, uma actividade óptima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C. Contudo, a sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica [45].

A utilização de uma enzima imobilizada tem como principais vantagens a inexistência de resíduo aquoso alcalino, menor produção de outros contaminantes, maior selectividade, bons rendimentos, reutilização em outras reacções, além de melhorar a estabilidade e actividade da enzima. Essas vantagens motivam a realização de pesquisas que visem diminuir a principal desvantagem da metodologia que é o elevado custo das enzimas puras. Por outro lado, o elevado custo dos processos de extracção e purificação das macromoléculas e a sua instabilidade em solução representam um obstáculo à recuperação do biocatalisador após a sua utilização.

As lipases são munidas de uma especificidade pelo substrato que subjugua a especificidade de todas as outras enzimas conhecidas.

Isto confere-lhes uma potencial aplicação de fronteira. As lipases podem ser usadas na produção de fármacos, cosméticos, modificações de couros, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos e de outros materiais orgânicos sintéticos. A estrutura cristalina da maioria das lipases, apresenta uma tríade no sítio catalítico, formada por Ser-His-Asp ou Ser-His-Glu, conhecida como regra dos três pontos ou “tríade catalítica”.

O mecanismo para a hidrólise ou formação de éster é essencialmente o mesmo para as lipases e esterases. Primeiro, o substrato é ligado à serina activa, gerando um intermediário

tetraédrico estabilizado pelos resíduos catalíticos His e Asp. Neste processo, é libertada uma molécula de álcool, formando um complexo acil-enzima que sofre um segundo ataque nucleofílico, libertando o ácido gordo e regenerando o sítio catalítico da enzima [42].

Nas duas tabelas que se apresentam de seguida resumem-se alguns estudos realizados sobre a produção de biodiesel pela via enzimática, incluindo referências aos artigos mais importantes, bem como as vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores usados na produção do biodiesel.

Tabela 1. 12 – Estudos realizados sobre a produção de biodiesel pela via enzimática, incluindo condições aplicadas nos ensaios.

Tipo de óleo	Fonte de enzima	Álcool	Condições ótimas	Meio de imobilização	Rendimento máximo	Outros detalhes	Referências
Canola	<i>Candida antarctica</i> (42,3% enzima)	Metanol (razão molar a óleo 3.5:1)	38 °C, 12,4 h	-	97,9%	Teor de água 7,2%	[46]
Gordura reciclada	PS-30 lipase (13,7 %)	Etanol (razão molar a óleo 6,6:1)	38,4°C, 2,47 h	-	85,4%	-	[47]
Milho	Lipozyme TL IM (razões mássicas a óleo 42,8:1 e 30:1)	Etanol 96% (razão molar a óleo 3:1)	35-38°C, 24 h	-	90%	-	[48]
Jatropha	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Etanol	40°C, 10h, 200rpm	Celite-545	92%	Teor de água 0,5%	[49]
Jatropha	<i>Burkholderia cepacia</i>	Etanol	40°C, 24h, 200rpm	-	79%	Pré-tratamento ultra-sons, 110W, 2-3h	[50]
Soja	<i>Rhizomucor miehei</i> (LipozymeIM-77)	Metanol (razão molar a óleo 3,4:1)	36,5°C, 6,3h, 200rpm	Resina aniónica fraca macroporosa	92,2%	Solvente n-hexano, teor de água 5,8%	[51]
Soja	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Metanol (razão molar a óleo 1:1)	40°C, 50h, 150rpm	Sílica gel	90%	Lipase 10%, Etapa adicional de metanol	[52]
Soja	<i>Mucor miehei</i>	Etanol	45°C, 5h, 200rpm	-	97,4%	Solvente hexano	[53]
Girassol	<i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Metanol	50° C, 15h, 130rpm	Suporte resina macroporosa, diâmetro 0,3-0,9mm	97%	Teor de água 400ppm	[54]

Tabela 1. 13 – Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores usados na produção do biodiesel. Adaptado de [29].

<b>Tipo</b>	<b>Exemplo</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Desvantagem</b>
Alcalino Homogéneo	NaOH, KOH	Alta actividade catalítica, baixo custo, cinética favorável, condições de operação moderadas	Exigência de baixo teor de FFA, condições anidras, saponificação, formação de emulsão, mais águas residuais provenientes da purificação
Alcalino Heterogéneo	CaO, CaTiO <sub>3</sub> , CaZrO <sub>3</sub> , CaO–CeO <sub>2</sub> , CaMnO <sub>3</sub> , Ca <sub>2</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , KOH/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , KOH/NaY, ETS-10 zeolite	Não corrosivo, benigno ambientalmente, recicláveis, menos problemas de vazão, fácil separação, maior selectividade, maior tempo de vida do catalisador	Exigência de baixo teor de FFA, condições anidras, mais águas residuais provenientes da purificação, exigência de alta proporção molar de álcool a óleo, temperatura de reacção e pressão alta, limitações de difusão, elevado custo
Ácido Homogéneo	Ácido sulfúrico concentrado	Catálise por esterificação e transesterificação simultaneamente, evita a formação de sabão	Corrosão de equipamento, mais resíduos de neutralização, difíceis de reciclar, maior temperatura de reacção, maior tempo de reacção, fraca actividade catalítica
Ácido Heterogéneo	ZrO <sub>2</sub> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , TiO <sub>2</sub> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , catalisador ácido sólido à base de carbono, catalisador derivado carbohidratos	Catalise por esterificação e transesterificação simultaneamente, reciclável, eco-amigável	Baixas concentrações locais de ácido, baixa microporosidade, limitações de difusão, elevado custo
Enzimático	<i>Candida antarctica</i> fracção B lipase  <i>Rhizomucor mieher</i> lipase	Evita a formação de sabão, não poluente, purificação mais fácil	Caro, desnaturação

Actualmente, o processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, apesar de a via enzimática ter despertado grande interesse na comunidade científica. Um aspecto comum aos processos existentes é a sua tentativa de melhorar as condições de reacção, de modo a conferir-lhes características que os tornem viáveis e

disponíveis para aplicações industriais.

Entretanto, apesar de algumas desvantagens, essencialmente económicas, o processo enzimático, uma vez optimizado, poderá apresentar vantagens muito interessantes em relação ao processo químico, tal como se evidencia na Tabela 1. 14 [30].

Tabela 1. 14 – Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel [30].

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	Simplicidade Alto rendimento Curto tempo de reacção	Dificuldade de separação do catalisador Impossibilidade da reutilização do catalisador Obtenção de produtos com menor grau de pureza Necessidade de tratamento de água após a transesterificação Dificuldade de utilização de etanol hidratado
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador Obtenção de produtos com maior grau de pureza Permite o uso de etanol hidratado na reacção	Longo tempo de reacção Custo das enzimas

Assim, pelos aspectos salientados anteriormente, justifica-se o estudo do processo de produção de FAEE's por transesterificação do óleo de milho com etanol, usando enzimas suportadas (Lipozyme TL IM, produzidas pela Novozymes) como catalisador. Para o efeito, será necessário avaliar o efeito das condições operatórias de modo a permitir optimizar a produção de biodiesel pela via enzimática: razão molar etanol/óleo, razão mássica óleo/enzima, pureza do etanol e temperatura da reacção. Outro aspecto interessante será a comparação entre o processo de produção de FAEE pela via enzimática e o processo de transesterificação alcalina convencional. Finalmente realizar-se-á uma estimativa dos custos de produção de FAEE nas condições optimizadas durante o estudo efectuado.

No capítulo seguinte será abordada a parte experimental do processo de produção do biodiesel agora descrito.

## 2. Procedimento Experimental

A realização de ensaios à escala laboratorial é essencial para avaliação da influência das diversas condições operatórias na produção do biodiesel etílico (FAEE), assim como da qualidade do biodiesel formado. Neste capítulo apresenta-se a descrição dos materiais e métodos usados na execução experimental.

### 2.1. Material

Na tabela seguinte apresenta-se o material usado no desenvolvimento deste trabalho, bem como os reagentes e equipamentos indispensáveis à realização deste estudo.

Tabela 2. 1 – Material, reagentes e equipamentos utilizados na elaboração do processo de produção de biodiesel.

Material	Reagentes	Equipamentos
Ampolas de decantação	Etanol absoluto, 96% e 70% (v/v)(Panreac)	Bomba de vácuo (KnF, N035AN.18)
Viscosímetro capilar (Cannon Fenske, 100)	Enzima Lipozyme TL IM, Novozymes	Banho termostaticado com agitação (Selecta, unitronic)
Densímetro (Dujardin-Salleron Paris, Série 330, 0,8 a 0,9 g/cm <sup>3</sup> )	KOH comercial (Pronalab)	Doseador (Metrohm, 715 Dosimat)
Frascos de Reação de ½ L, autoclaváveis e com tampa de roscar	Óleo de milho (Aro, Makro)	Placa de aquecimento e agitação magnética multiposições (Selecta, multimatic-9N)
Funis de filtração, papel de filtro ( $\phi$ = 47 mm, porosidade 1,2 $\mu$ m)	Óxido de magnésio	Equipamento para determinação da corrosão ao cobre (Normalab analis, 941220)
Termómetros digitais (testo 922, equipado com termopar do tipo K)	Metanol absoluto (Pronalab)	Bomba calorimétrica (Parr, Calorimetric Thermometer 6772)
Gobelés	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% (Panreac)	Equipamento para determinação do ponto de inflamação (Petrotest, Rapid Tester S.3)
Balões volumétricos	Terra de diatomáceas (Panreac)	Equipamento para determinação do CFPP (Normalab, NTL 450)
Pipetas volumétricas	Álcool isopropílico (99,5%, Merck)	Coulómetro Karl Fischer (Metrohm, Titrino KF 701)
Tina de perspex	Gases para GC (H <sub>2</sub> , He, Ar reconstituído, GASIN)	GC (Dani, GC 1000 DPC) com FID e coluna para FAME's/FAEE's AT-WAX
		Fotómetro de chama (Corning, Flame Photometer 410)

## 2.2. Descrição Experimental

### 2.2.1. Reacção de transesterificação alcalina

Inicialmente começou-se por efectuar a comparação entre a produção de biodiesel pela via química alcalina, usando diferentes álcoois e tendo as condições de ensaio tal como se resume na tabela seguinte, para uma melhor compreensão desta etapa inicial do estudo.

Tabela 2. 2 – Condições estabelecidas no processo de transesterificação alcalina usando metanol ou etanol e KOH como catalisador.

<b>Condições estabelecidas (via química)</b>		
Álcool	Metanol Absoluto	Etanol Absoluto
Razão molar álcool/óleo	6:1	6:1
Agitação do banho termostaticado (rpm)	60	60
% Catalisador relativa ao óleo (m/m)	1	1
Tempo de reacção (h)	2	2
Temperatura de reacção (°C)	60	75

O processo de produção do biodiesel compreendeu as etapas de reacção, decantação, remoção do excesso de álcool, lavagem e secagem do biodiesel, conforme se descreve de seguida.

Pesou-se cerca de 300 g de óleo de milho para um frasco de vidro autoclavável, com tampa de roscar e colocou-se o frasco fechado num banho termostático para aquecer o óleo. Dissolveu-se 3 g de KOH no metanol ou etanol previamente pesado, aquecendo-se ligeiramente e com alguma agitação (tempo de dissolução aproximadamente 5 minutos, no caso do metanol, e 10 minutos, no caso do etanol). De seguida, adicionou-se a mistura álcool/catalisador ao óleo pré-aquecido e agitou-se vigorosamente no frasco rolhado. Colocou-se o frasco fechado no banho termostaticado (60 °C ou 75 °C, para a produção de biodiesel metílico (FAME) ou etílico (FAEE), respectivamente) com agitação a 60 rpm, durante 2 horas.

### 2.2.2. Separação de fases

Após o tempo de reacção, colocou-se a mistura resultante num funil de decantação (no caso do FAEE, adicionou-se 75 g de glicerina) e deixou-se repousar cerca de 15 minutos, para que ocorresse a separação de fases. Removeu-se a fase inferior (glicerol contaminado com o excesso de álcool e outras impurezas) para um gobelé previamente pesado e avaliou-se a massa de glicerol bruto recuperado.

### 2.2.3. Recuperação e Purificação do Biodiesel

Colocou-se o biodiesel que ficou retido no funil de decantação num balão de destilação e removeu-se o metanol em excesso numa instalação preparada com manta e coluna de condensação. Aqueceu-se água desionizada a cerca de 80 °C, para efectuar as lavagens do biodiesel. Na primeira lavagem usaram-se cerca de 30ml de água às quais foram adicionadas cerca de 10 gotas de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ , 85%), fazendo-se lavagens sucessivas com água desionizada quente e medindo-se o pH da água de lavagem até que este fosse neutro. Quando necessário, adicionaram-se mais algumas gotas de ácido fosfórico à água das lavagens intermédias para ajudar a neutralizar o pH.

Colocou-se o biodiesel lavado e neutralizado num gobelé, adicionando-se cerca de 2 g de terra de diatomáceas, para absorver a água residual e algumas impurezas não removidas pelas águas de lavagem, agitou-se lentamente em agitador magnético durante cerca de 15 min, deixou-se repousar e filtrou-se a vácuo. O biodiesel purificado foi guardado em frascos de vidro para posterior caracterização.

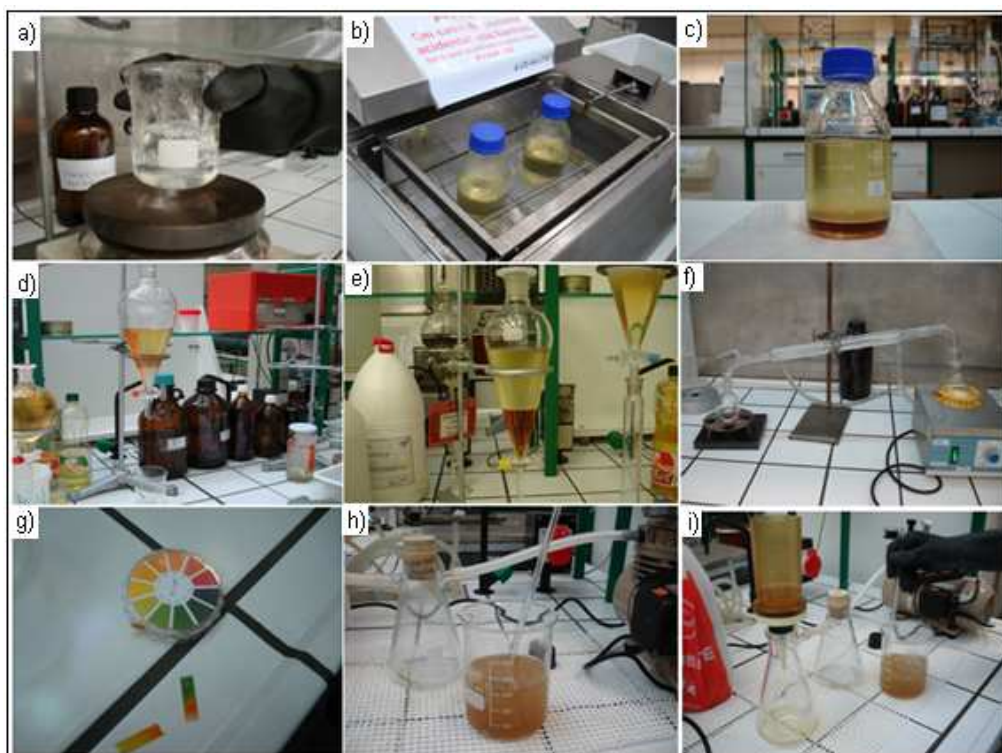


Figura 2. 1 – Ilustração do procedimento experimental de produção de biodiesel pelo processo de transesterificação alcalina convencional: a) Dissolução do KOH; b) Colocação do frasco no banho termostático; c) Mistura obtida após reacção; d), e) Separação das fases após reacção no processo de obtenção de biodiesel usando etanol e metanol respectivamente; f) Remoção do excesso de álcool numa instalação preparada com manta e coluna de condensação; g) Tiras de medição de pH usadas nas lavagens do biodiesel; h) Etapa de absorção da água residual presente no biodiesel usando terra de diatomáceas; i) Filtração a vácuo do biodiesel final obtido após secagem com terra de diatomáceas.

#### 2.2.4. Reacção de transesterificação enzimática

Na etapa seguinte deste trabalho, efectuou-se a produção de biodiesel por via enzimática, testando álcool etílico de diferentes purezas, a fim de avaliar qual o que poderia conduzir a melhores rendimentos/qualidade do biodiesel bem como o tempo de reacção necessário para obter o biodiesel etílico com a qualidade necessária.

Tabela 2. 3 – Condições estabelecidas no processo de produção de FAEE por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% ou a 70% e Lipozyme TL IM como catalisador.

Condições	Ensaio					
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>
Pureza do Etanol	Absoluto	96%	70%	Absoluto	96%	70%
Razão molar álcool/óleo	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1
Razão mássica óleo/enzima	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1
Tempo de reacção (h)	24	24	24	48	48	48
Temperatura de reacção (°C)	35	35	35	35	35	35

Pesou-se cerca de 200 g de óleo de milho para um frasco de vidro autoclavável, com tampa de rosca e colocou-se o frasco fechado num banho termostático para aquecer o óleo até à temperatura de reacção. Mediu-se o volume de álcool necessário, de acordo com o respectivo ensaio, adicionando-se ao óleo. Pesou-se a massa de enzima Lipozyme TL IM correspondente e de seguida juntou-se à mistura álcool/óleo de milho já colocado no frasco rolhado, adicionando-se uma barra de agitação magnética. Colocaram-se os frascos rolhados numa tina termostatizada à temperatura de 35 °C, usando uma agitação constante (de cerca de 60 rpm), durante as respectivas 24 e 48 horas de acordo com os diferentes ensaios.

#### 2.2.5. Recuperação da Enzima e Separação de fases

No final da reacção retiraram-se os frascos do banho, filtrando-se a solução, sob vácuo, de forma a recuperar a enzima. Introduziu-se o filtrado num funil de decantação, adicionou-se cerca de 75 g de glicerina e deixou-se repousar cerca de 15 minutos. Recuperou-se a fase mais densa (glicerol) para um gobelé previamente pesado e avaliou-se a massa de glicerol bruto recuperado. Fez-se passar o biodiesel que ficou no funil de decantação por uma coluna contendo resina Lewatit GF 202. De seguida removeu-se alguma quantidade residual de etanol numa instalação preparada com manta de aquecimento e coluna de condensação. Num gobelé adicionou-se ao biodiesel, sob agitação em placa de agitação magnética, cerca de 2 g de terras de diatomáceas, para absorver a água e/ou glicerina residual, seguindo-se uma etapa de filtração a vácuo.

O biodiesel purificado foi guardado em frascos de vidro para posterior caracterização.



Figura 2. 2 – Ilustração do procedimento experimental de produção de biodiesel pelo processo de transesterificação por via enzimática: a) Amostra de óleo; b) Pesagem da enzima Lipozyme TL IM; c) Reacção de transesterificação por via enzimática; d) Filtração e recuperação da enzima Lipozyme TL IM; e) Lavagem da enzima com álcool isopropílico; f) Filtração da enzima após lavagem; g) Secagem da enzima; h) Separação do biodiesel por decantação; i) Lavagem do biodiesel em coluna contendo resina Lewatit GF 202.

Numa terceira fase deste trabalho, a produção de biodiesel foi efectuada pela via enzimática, usando etanol absoluto e sendo as condições de ensaio as observadas na tabela seguinte. Foram determinadas as condições para a produção de FAEE pela via etílica, usando etanol absoluto e Lipozyme TL IM como catalisador.

Tabela 2. 4 – Condições estabelecidas no estudo da produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Condições	Ensaio						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>
Razão molar álcool/óleo	3:1	3:1	6:1	9:1	6:1	6:1	3:1
Razão mássica óleo/enzima	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1	42,8:1	30:1	35,3:1
Tempo de reacção (h)	8	12	12	12	12	12	12
Temperatura de reacção (°C)	35	35	35	35	35	35	45

O procedimento experimental adoptado para a realização destes ensaios foi o descrito anteriormente (2.2.4. e 2.2.5.), sendo feitas as necessárias adaptações em termos das massas de enzima, álcool, tempo ou temperatura de reacção.

Na fase final do trabalho experimental, após a determinação das condições óptimas de ensaio, foi feita a produção de biodiesel por via enzimática, efectuando-se a reutilização de enzima. Os dados das condições utilizadas nos ensaios realizados podem ser observados na tabela seguinte.

Tabela 2. 5 – Condições estabelecidas no processo de produção de FAEE por via enzimática usando uma reutilização de enzima.

<b>Condições usadas</b>	
Pureza do álcool	Etanol absoluto
Enzima	Lipozyme TL IM
Razão molar álcool/óleo	6:1
Razão mássica óleo/enzima	35,3:1
Tempo de reacção (h)	12
Temperatura de reacção (°C)	35

O procedimento experimental adoptado para a realização destes ensaios foi o descrito anteriormente (2.2.4. e 2.2.5.), sendo feitas as necessárias adaptações em termos das massas de enzima, álcool, tempo ou temperatura de reacção. No final de cada ensaio, o catalisador recolhido no filtro foi lavado com álcool isopropílico, filtrando-se de seguida e deixando-se secar a enzima ao ar.

Repetiu-se os ensaios anteriormente descritos usando a enzima reutilizada e mantendo todas as condições estabelecidas anteriormente. Efectuaram-se quatro reutilizações sequenciais da enzima.

Os FAEE produzidos nestas etapas do trabalho, quer pela via enzimática quer pelo processo de transesterificação alcalina convencional, foram caracterizados sendo avaliados os valores de diversos parâmetros, conforme descrito de seguida.

### **2.3. Caracterizações do Biodiesel**

A qualidade de um combustível pode ser avaliada em termos do seu poder calorífico e, no caso dos biocombustíveis, a caracterização dos ésteres metílicos ou etílicos formados deve ser feita de acordo com os métodos indicados na norma EN 14214:2003 e, os valores dos parâmetros correspondentes devem estar compreendidos na gama de valores aí indicados. No Laboratório de Tecnologia Química do DEQ/ISEP estão reunidas condições para a

avaliação dos seguintes parâmetros: poder calorífico superior, densidade a 15 °C, viscosidade a 40 °C, teor de água pelo método Karl Fischer; índice de iodo, índice de acidez, teor de sódio e teor de potássio, corrosão da lâmina de cobre, ponto de inflamação, temperatura limite de filtrabilidade (CFPP). O teor de ésteres foi determinado recorrendo a equipamento existente no CIETI/DEQ/ISEP.

### 2.3.1. Determinação do poder calorífico superior

Pesou-se cerca de 0,50 g de amostra a analisar colocando-a na matriz. De seguida mediu-se exactamente 2 litros de água desionizada e introduziu-se no balde do calorímetro. Mediu-se 10 cm de fio de fusão e colocou-se no suporte com as pontas bem presas no mesmo. Colocou-se a *pelet* sobre o fio de fusão, tendo cuidado ao mexer na



bomba para que a *pelet* não perdesse o contacto com o fio de fusão. Fechou-se a bomba pressionando o suporte, com a válvula de saída do gás aberta. Ajustou-se a rosca até ao máximo e fechou-se a válvula de saída do gás. Encheu-se a bomba com oxigénio até à pressão de 30 atm. Colocou-se a bomba dentro do balde do calorímetro e a tampa do corpo do calorímetro com o agitador e o termopar. Deu-se início ao ensaio, introduzindo-se o valor exacto da massa da amostra. No final do ensaio, obtém-se o valor do poder calorífico superior da amostra expresso em cal/g. Retirou-se a bomba do balde do calorímetro e despressurizou-se lentamente, por abertura da válvula da saída do gás, efectuando-se a lavagem da mesma.

### 2.3.2. Determinação da densidade a 15 °C

Colocou-se a amostra numa proveta adequada onde se mergulhou um densímetro. Após atingir temperatura constante, leu-se o valor da densidade na escala do densímetro bem como a temperatura, sendo a leitura posteriormente corrigida para os 15 °C.

Norma de referência – EN ISO 3675:1998

### 2.3.3. Determinação da viscosidade a 40°C

Montou-se o viscosímetro na posição apropriada com cerca de 10 mL da amostra, imerso num banho termostaticado (Thermomix BM, Braun) com controlo de temperatura. Com o auxílio de um sugador, levou-se o líquido até à marca pretendida. De seguida



determinou-se o tempo que um volume fixo do fluido demorou a escoar sob acção da gravidade por um viscosímetro capilar Cannon Fenske tamanho 100.

O valor da viscosidade foi calculado pela seguinte relação:

$$v = K \times (t - \vartheta)$$

Em que:

$$v = \text{viscosidade cinemática (mm}^2 / \text{s)}$$

$$K = \text{constante de calibração do viscosímetro (mm}^2 / \text{s}^2)$$

$$t = \text{tempo de escoamento (s)}$$

$$\vartheta = \text{correção da energia cinética (s)}$$

Norma de referência – EN ISO 3104:1994

### 2.3.4. Determinação do teor de água

Injectou-se uma quantidade conhecida de amostra, através do septo da tubuladura do aparelho de Karl Fischer. O excesso de iodo é detectado quando toda a água é titulada e termina a titulação. No final aparece no mostrador o resultado expresso em % de água na amostra.



Norma de referência – EN ISO 12937:2003

### 2.3.5. Determinação do índice de iodo

Colocou-se num erlenmeyer de 500 mL, cerca de 0,2 g da amostra a analisar e dissolveu-se usando 20 ml de solvente (mistura de iguais volumes de ciclohexano e ácido acético glacial). Adicionou-se 25 ml de reagente de Wijs usando pipeta de precisão. Preparou-se um branco com solvente e reagente, como indicado anteriormente, mas omitindo a amostra de ensaio. Tapou-se os matrizes, agitou-se ligeiramente e colocou-se os mesmos no escuro durante 1h. Após este tempo, juntou-se 20 ml de solução de iodeto de potássio (100 g/L), 150 ml de água desionizada e realizou-se uma titulação com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, até ao desaparecimento da coloração amarelada. Em seguida adicionou-se 6 a 8 gotas de solução de amido como indicador e prosseguiu-se a titulação até ao desaparecimento da coloração azulada.

O valor do índice de iodo foi calculado pela seguinte relação

$$\frac{\text{g iodo}}{100\text{g FAEE}} = \frac{12,69 \times C \times (V_1 - V_2)}{m_{\text{amostra}}}$$

Em que:

$C$  = concentração exacta da solução padrão de tiosulfato de sódio usada (mol/L)

$V_1$  = volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada no ensaio do branco (mL)

$V_2$  = volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)

$m_{amostra}$  = massa de amostra usada (g)

Norma de referência – EN 14111:2003

### 2.3.6. Determinação do índice de acidez

Pesou-se cerca de 20 g da amostra em matrizes de 250 mL, adicionou-se 100 mL do solvente mistura (iguais volumes de éter diétilico e etanol 96%) neutralizado, antes de usar, adicionando solução de hidróxido de potássio ( $\approx 0,1$  mol/L) na presença de 0,3 mL de uma solução alcoólica de fenolftaleína por 100 mL de solvente mistura. Titulou-se com solução padronizada de hidróxido de potássio.

O valor do índice de acidez foi calculado pela seguinte relação

$$\frac{\text{mg KOH}}{\text{g}} = \frac{56,1 \times C \times V}{m_{amostra}}$$

Em que:

$C'$  = concentração exacta da solução padrão de hidróxido de potássio usada (mol/L)

$V$  = volume da solução padrão de hidróxido de potássio (mL)

$m_{amostra}$  = massa de amostra usada (g)

Norma de referência – EN 14104:2003

### 2.3.7. Determinação do teor de Na, K

As concentrações de sódio e potássio nas amostras a analisar foram determinadas através do fotómetro de chama (Flame Photometer 410). Para isso, prepararam-se inicialmente soluções padrão para traçar as respectivas curvas de calibração, sendo que para o sódio se usaram concentrações inferiores a 30 ppm e para o potássio foram usadas concentrações inferiores a 10 ppm. De seguida aspirou-se a amostra a ensaiar e leu-se a concentração do respectivo metal presente.



Normas de referência – EN 14108:2003 e EN 14109:2003

Nota: Não foi usada espectrofotometria de absorção atômica, conforme indicado na norma

de referência, porque os valores de concentração do K eram elevados.

### 2.3.8. Determinação da corrosão do cobre

Colocou-se 30 mL de amostra em tubos de ensaio e adicionou-se aos tubos uma lâmina de cobre polida, sendo o conjunto aquecido num banho a 50 °C durante 3 horas. Após o tempo de ensaio, as lâminas foram retiradas e a cor comparada com padrões de corrosão.



Norma de referência – EN ISO 2160:1998

### 2.3.9. Determinação do ponto de inflamação

Injectou-se um volume específico de amostra (4 mL) no vaso de teste, mantido à temperatura de inflamação esperada para a amostra. Após um tempo determinado, aplicou-se uma chama e a presença ou ausência de inflamação é observada. De seguida, realizaram-se testes adicionais com amostras “frescas” a diferentes temperaturas até que o ponto de inflamação foi determinado com a sensibilidade especificada.



Norma de referência – EN ISO 3679:2004

### 2.3.10. Determinação da temperatura limite de filtrabilidade, CFPP

Utilizou-se um aparelho automático para determinação da temperatura limite de filtrabilidade (Normalab Analys, NTL 450). O equipamento contempla a ligação física a uma unidade de refrigeração de circulação externa (JULABO CIRFRG/1) e uma impressora térmica, que deverão ser previamente accionados.



Antes do ensaio é necessário programar a unidade de refrigeração de modo a manter o banho de arrefecimento à temperatura pretendida (limite: -60°C).

Deverá efectuar-se uma pré-lavagem do sistema de filtração com acetona, seguida de secagem com ar filtrado.

Posteriormente, filtrou-se uma toma de aproximadamente 50 mL de amostra à temperatura ambiente, através de papel de filtro seco de (5±1) µm de porosidade.

Verificou-se se o banho de arrefecimento (CIRFRG/1) está à temperatura de -34 ± 0,5 °C.

Introduziu-se a toma de ensaio previamente filtrada no vaso de ensaio, até atingir o traço indicador do volume de 45 mL.

Colocou-se o vaso de ensaio no suporte, e o conjunto na camisa. Desceu-se suavemente o conjunto de filtração até se ajustar ao vaso de ensaio.

No menu principal iniciou-se o processo, o aparelho entra em modo automático realizando o arrefecimento sucessivo do fluido a ensaiar. Obtêm-se assim os patamares com as respectivas temperaturas, bem como a temperatura limite de filtrabilidade.

Finalmente realizou-se então a operação de descongelamento (Defrost), a uma temperatura elevada (40°C), para fluidificar a amostra.

Retirou-se o conteúdo do tubo, e procedeu-se à lavagem do sistema, primeiro com heptano e de seguida com acetona.

Norma de referência – NP EN 116:2002

### 2.3.11. Determinação do teor em ésteres

Inicialmente preparou-se uma solução de metil heptadecanoato 10 mg/mL. Para isso pesou-se 500 mg de metil heptadecanoato 99% num balão volumétrico de 50 mL e perpez-se o volume com n-heptano.

Pesou-se cerca de 100 mg de amostra de biodiesel num frasco de 5 ml, adicionou-se 2 ml de solução de metil heptadecanoato preparada anteriormente utilizando uma pipeta, efectuando-se posteriormente a



análise no cromatógrafo. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso Dani GC 1000 DPC com uma coluna AT-WAX. Manteve-se o injector split a 250 °C e o detector FID a 255 °C. O gás de arraste utilizado foi o azoto a um caudal de 2 mL/min. A injeção foi realizada em modo split, a um caudal de 50 mL/min, e o volume injectado foi de 1,5 µL. Utilizou-se o seguinte programa de temperatura: 120 °C, aumentando-se a temperatura 4 °C/min até atingir 220 °C, que se mantêm durante 10 minutos.

A determinação do teor de ésteres foi baseada na seguinte relação:

$$C_{\text{Ésteres}} = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$$

Em que:

$\Sigma A$  = somatório da área do pico do metil éster ( $C_{14} - C_{24:1}$ )

$A_{EI}$  = pico da área correspondente ao metil heptadecanoato

$C_{EI}$  = concentração da solução de metil heptadecanoato (mg/mL)

$V_{EI}$  = volume da solução de metil heptadecanoato (mL)

$m$  = massa de amostra usada (mg)

Norma de referência – EN 14103:2003

### 3. Resultados e discussão

De seguida serão apresentadas as características do óleo vegetal usado na produção do biodiesel, pela via química e enzimática.

#### 3.1. Caracterização do óleo de milho

A Tabela 3. 1, abaixo representada, resume os valores de alguns parâmetros determinados experimentalmente (poder calorífico, massa volúmica, viscosidade cinemática, teor de água, índice de iodo e número de acidez) para o óleo de milho usado na produção do biodiesel.

Tabela 3. 1 – Valores dos parâmetros determinados experimentalmente relativos ao óleo de milho.

Parâmetros	Valores experimentais
Poder calorífico superior (cal/g)	9513
Massa volúmica a 20 °C (Kg/m <sup>3</sup> )	919
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm <sup>2</sup> /s)	36,27
Teor de água (mg/kg)	749
Índice de iodo (g <sub>iodo</sub> /100 g <sub>amostra</sub> )	130
Nº Acidez (mg KOH/g)	0,26

O óleo de milho transgênico usado neste trabalho experimental tem origem vegetal, é da marca ARO, do hipermercado Makro. Relativamente às características organolépticas, observou-se que este óleo apresentava um aspecto líquido oleoso, límpido e sem depósito à temperatura de 20 °C. A sua coloração é amarelada e o seu odor é *sui generis*.

O valor do poder calorífico superior obtido foi de 9513 cal/g (39,8 MJ/kg). Este valor está próximo do esperado 39,5 MJ/kg, de acordo com Balat [15].

Segundo Moretto e Fett [13], a densidade para os triacilglicerídeos é tanto menor quanto menor for o seu peso molecular e mais elevado o seu grau de insaturação, ou seja, as gorduras são mais densas no estado sólido do que no estado líquido.

O valor teórico da massa volúmica para óleo de girassol encontra-se na gama 917 a 925 kg/m<sup>3</sup>, segundo a norma NP-961. Experimentalmente, o valor obtido foi 919 kg/m<sup>3</sup>, concluindo-se assim que se encontra dentro da gama de valores esperada.

A viscosidade cinemática é uma propriedade dinâmica do fluido que exprime a resistência oferecida pela substância ao escoamento sob gravidade. O controlo da viscosidade de uma substância visa garantir um funcionamento adequado dos sistemas de injeção e bombas

de combustível.

Relativamente ao valor que se obteve para o parâmetro viscosidade cinemática foi 36,3 mm<sup>2</sup>/s (a 40 °C). Este valor está próximo do indicado por Balat em 2008 [15]: 34,9 mm<sup>2</sup>/s (a 38 °C).

A análise do teor de humidade dos óleos foi efectuada pelo método de Karl Fischer. Este parâmetro é importante, pois um elevado teor de humidade resultaria numa menor solubilidade de óleo na fase alcoólica, com consequente queda no rendimento dos ésteres etílicos [63]. O valor do teor de água encontrado para a amostra de óleo vegetal foi de 749 mg/kg. Este valor é baixo, revelando que este óleo é adequado para ser usado em reacções de transesterificação.

Diferentes tipos de óleos vegetais apresentam índices de iodo semelhantes aos dos triacilglicerídeos de origem vegetal. Deste modo, quando o objectivo é avaliar a estabilidade à oxidação de um determinado óleo, o índice de iodo deixa de ser o método mais adequado uma vez que, que existem óleos diferentes com números de iodo semelhantes, porém, com estabilidade à oxidação consideravelmente diferente.

Esta propriedade influencia extremamente a oxidação do combustível e o tipo de produtos e de depósitos do envelhecimento formados em injectores dos motores diesel.

De acordo com a norma NP-961 para óleo de girassol, o valor mínimo e máximo do índice de iodo é de respectivamente, 110 e 143 g<sub>iodo</sub>/ 100 g<sub>amostra</sub>. Na determinação do índice de iodo, constatou-se que o valor obtido experimentalmente foi de 130 g<sub>iodo</sub>/100 g<sub>amostra</sub>, estando assim dentro dos limites estabelecidos para o óleo de girassol. Este parâmetro indica-nos o grau de insaturação do óleo.

O valor do número de acidez determinado no óleo foi de 0,26 mg KOH/g. Este valor está dentro do esperado, segundo o indicado na norma NP-961: máximo de 0,60 mg KOH/g.

O índice de acidez é um valor indicativo da qualidade de um óleo vegetal. Uma acidez elevada no óleo pode neutralizar um catalisador básico numa reacção de transesterificação sendo, portanto, necessária uma maior quantidade de catalisador para a reacção se processar com eficiência. Segundo Dantas et al. [59], os índices de acidez e ácidos gordos livres influenciam na hidrólise e oxidação do biodiesel quando em valores elevados.

### **3.2. Caracterização do biodiesel obtido por via química usando etanol/metanol**

Actualmente, a produção de biodiesel a nível industrial é realizada usando metanol como álcool, pois é mais barato. No entanto, o metanol apresenta algumas desvantagens quer em termos de manuseamento (perigosidade para a saúde e ambiente) quer a nível ambiental, pois é derivado de um combustível fóssil.

Em alternativa, testou-se o etanol pois não é tão agressivo para o meio ambiente, apresenta menos riscos na armazenagem e manipulação e pode ser produzido a partir de fontes renováveis.

De seguida é apresentado um gráfico que representa o rendimento de conversão do processo obtido por via química usando metanol e etanol, sendo que as condições usadas foram uma razão molar álcool/óleo de 6:1, 1% catalisador/óleo (m/m), tempo de reacção de 2 h e uma temperatura de reacção de 60 °C e 75 °C usando metanol e etanol, respectivamente.

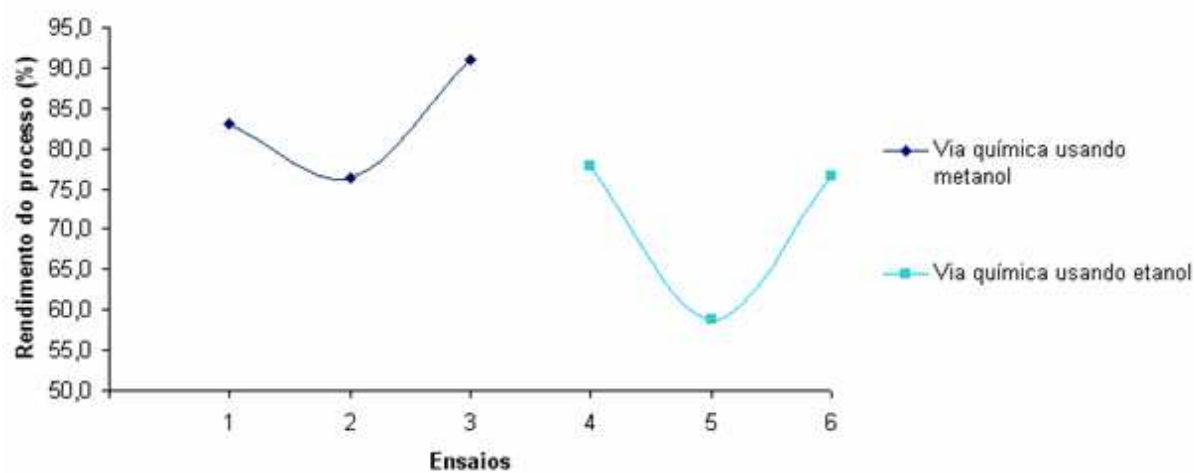


Figura 3. 1 – Rendimento de conversão do óleo em biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

Através da análise da Figura 3. 1, verifica-se que o rendimento de conversão do óleo em biodiesel por via metílica foi bastante maior que o obtido por via etílica.

O rendimento médio do processo por via metílica foi de 83,5 % comparado com 71,1 % por via etílica, sendo os valores máximos de 99,1 e 77,9%, respectivamente quando se usou metanol ou etanol. Isto encontra-se de acordo com o esperado, já que a reacção pela via etílica é mais lenta, mesmo quando realizada a temperatura mais elevada.

O consumo de metanol no processo de transesterificação é menor que o do etanol anidro, pois o metanol é mais reactivo e para uma mesma taxa de conversão e para as mesmas condições operacionais, o tempo de reacção usando metanol é menos de metade do tempo quando se usa etanol. Isto poderá explicar os resultados.

Após a determinação da eficiência de conversão do óleo em biodiesel, procedeu-se à caracterização das amostras de biodiesel. Para isso estudaram-se diferentes propriedades deste biocombustível que poderão condicionar as suas características.

De seguida apresentam-se as Figuras 3.2 a 3.7, que mostram os resultados obtidos para cada um dos parâmetros estudados no biodiesel, obtido por via metílica e etílica, usando

hidróxido de potássio como catalisador.

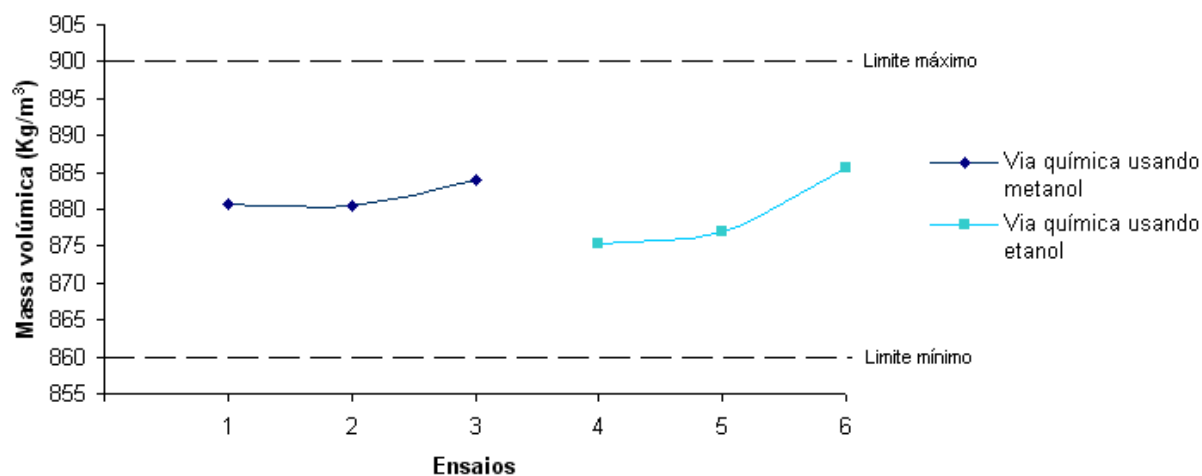


Figura 3. 2 – Variação da massa volúmica nas amostras de biodiesel obtido por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

Relativamente ao parâmetro massa volúmica do biodiesel produzido constata-se que independentemente do álcool usado, este parâmetro encontra-se dentro da gama de valores mínimo e máximo admissível, respectivamente, 860 e 900 Kg/m<sup>3</sup>.

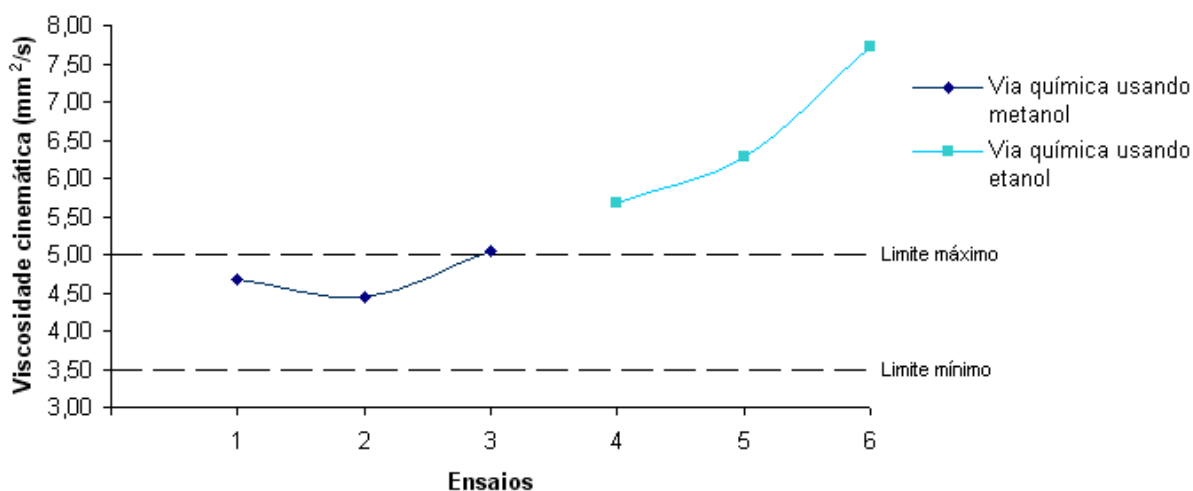


Figura 3. 3 – Variação da viscosidade cinemática nas amostras de biodiesel obtido por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

O valor teórico admissível para a viscosidade cinemática encontra-se na gama compreendida entre 3,5 e 5 mm<sup>2</sup>/s. Através da análise da Figura 3. 3, verifica-se que os valores médios obtidos nas amostras de biodiesel quando foi usado metanol e etanol foram, respectivamente, 4,71 mm<sup>2</sup>/s e 6,56 mm<sup>2</sup>/s. Assim é perceptível que usando a via etanólica

o valor da viscosidade cinemática encontra-se ligeiramente acima do limite máximo estabelecido, o que poderá promover uma incorrecta combustão na câmara, bem como um desgaste elevado da bomba injectora podendo mesmo danificá-la. No entanto poderão ser efectuados alguns tratamentos de forma a reduzir a viscosidade, já que pode acontecer que o biodiesel etílico não esteja ainda suficientemente purificado.

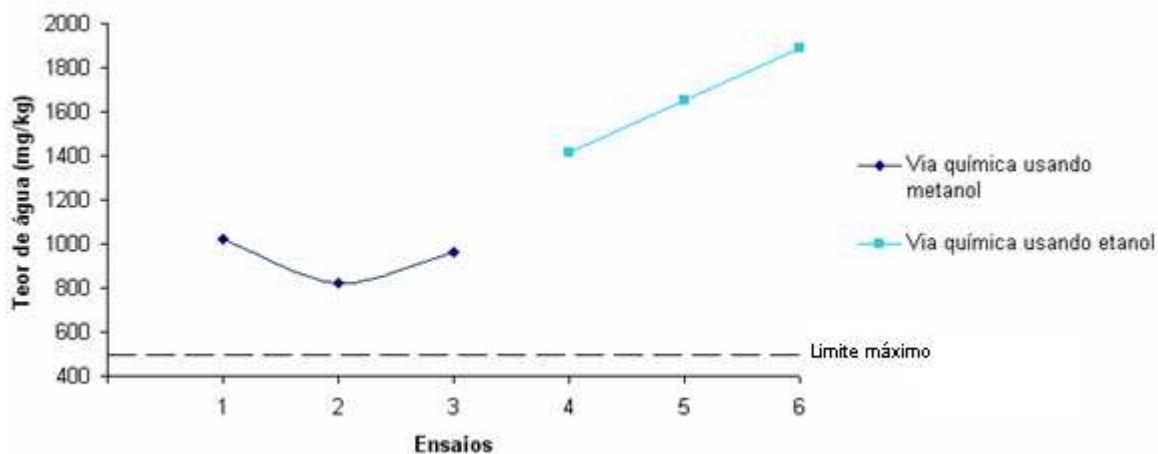


Figura 3. 4 – Variação do teor de água nas amostras de biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

Através dos resultados obtidos para o teor de água, constata-se que para ambos os processos alcoólicos, a humidade contida nas amostras de biodiesel encontrava-se muito acima do valor máximo recomendado de 500 mg/kg. Isto mostra que eventualmente a adição de terra de diatomáceas às amostras poderá não ter sido suficiente para promover a secagem do biodiesel.

No entanto, de acordo com a bibliografia é comum o etanol formar um azeótropo quando misturado com a água, assim a desidratação requer maiores consumos de energia e um maior investimento em equipamento.

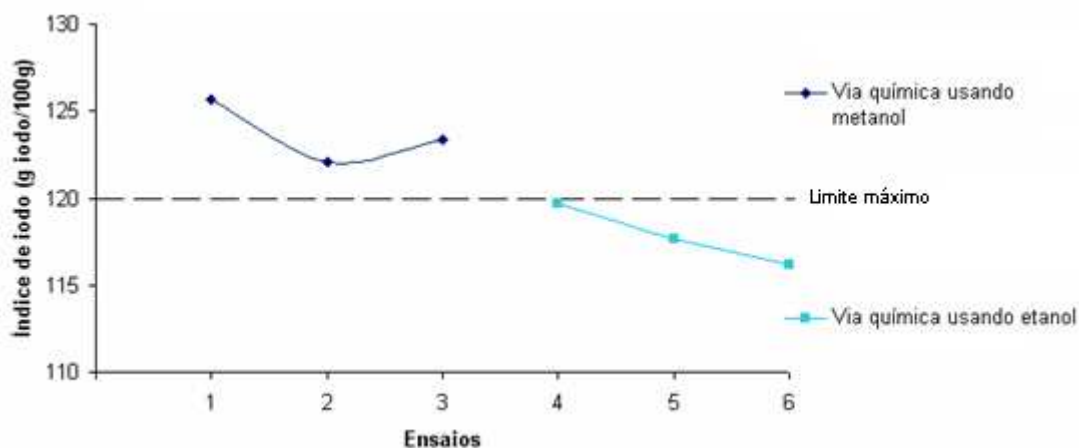


Figura 3. 5 – Variação do índice de iodo nas amostras de biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

O valor máximo recomendado para o índice de iodo nas amostras de biodiesel é de  $120 \text{ g}_{\text{iodo}}/100 \text{ g}_{\text{amostra}}$ . Na determinação desta propriedade, constatou-se que as amostras de biodiesel produzido na transesterificação pela via etílica apresentaram um valor médio de  $118 \text{ g}_{\text{iodo}}/100 \text{ g}_{\text{amostra}}$ , estando dentro do limite estabelecido. Por sua vez, as amostras sujeitas a via metílica apresentaram um valor de número de iodo ligeiramente superior ao admissível, (média de  $124 \text{ g}_{\text{iodo}}/100 \text{ g}_{\text{amostra}}$ ), constatando-se um abaixamento do índice de iodo mais significativo no biodiesel obtido pela via etanólica.

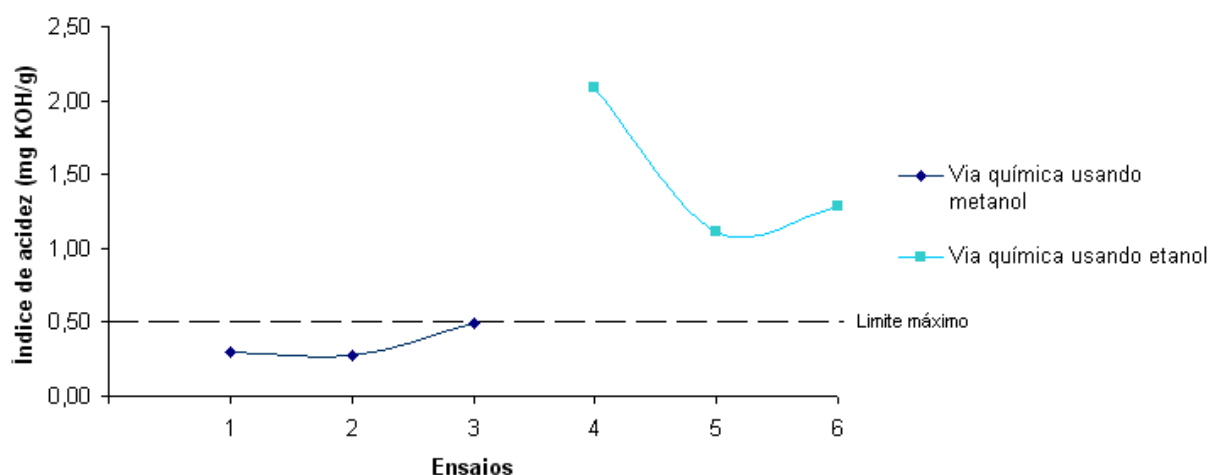


Figura 3. 6 – Variação do índice de acidez nas amostras de biodiesel, por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

Pela análise da Figura 3. 6, observa-se que o índice de acidez nas amostras de biodiesel produzido com metanol, apresenta um valor médio de  $0,36 \text{ mg KOH/g}$  comparativamente inferior a um valor médio de  $1,49 \text{ mg KOH/g}$  ao biodiesel produzido por via etílica. Conclui-se que usando o etanol, o índice de acidez é superior ao valor máximo admitido de  $0,50 \text{ mg KOH/g}$ , no entanto, este valor poderia ser corrigido na etapa de neutralização do biodiesel etílico.

A acidez elevada afecta a estabilidade térmica do combustível na câmara de combustão, e a presença de ácidos gordos livres no biodiesel tem um efeito corrosivo nos componentes metálicos do motor [63].

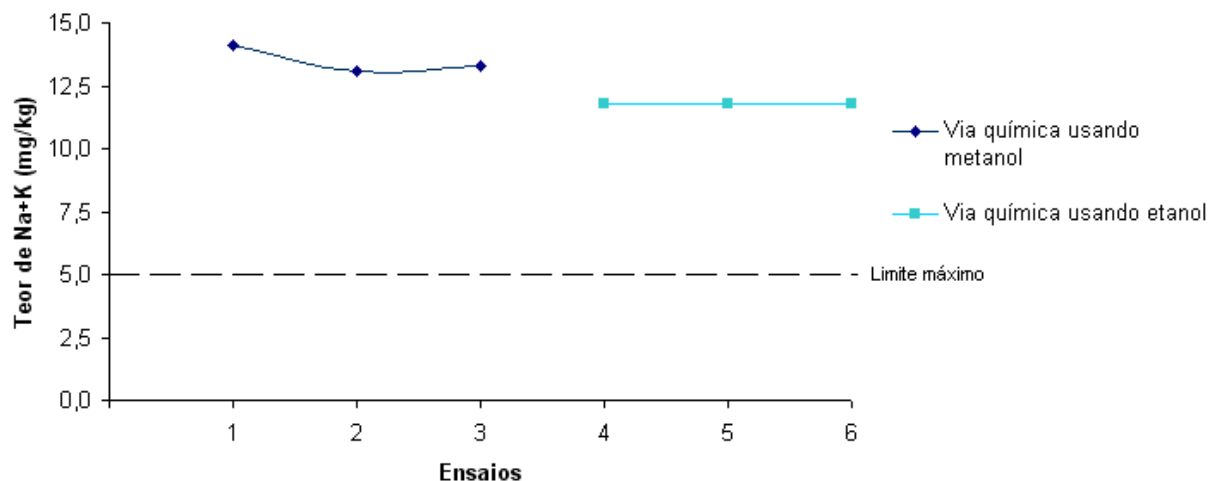


Figura 3. 7 – Variação do teor de sódio + potássio nas amostras de biodiesel, produzido por via metílica e etílica usando o hidróxido de potássio como catalisador.

Segundo a norma EN 14214: 2003, o valor máximo de referência para o teor de sódio+potássio nas amostras de biodiesel é de 5,0 mg/kg.

Todas as amostras de biodiesel, independentemente do álcool usado, apresentam um teor em sódio+potássio, muito acima do limite máximo estabelecido. Usando o metanol o teor médio de sódio+potássio foi de 13,5 mg/kg, e aplicando o etanol o teor médio foi de 11,8 mg/kg. Uma possível justificação poderá dever-se às deficientes lavagens do biodiesel com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ , 85%), verificando-se também em algumas amostras a presença de uma emulsão.

O efeito destes metais relaciona-se com a possibilidade de formação de sólidos abrasivos ou sabões metálicos que podem entupir os filtros ou injectores.

Um outro parâmetro físico avaliado foi a corrosividade ao cobre. A corrosão pode afectar todos os materiais em contacto com o combustível, particularmente os componentes do motor, e equipamento de armazenamento e manutenção. Este parâmetro é uma indicação da possibilidade de corrosão do cobre, bronze ou outro metal.

Segundo a norma, as amostras de biodiesel devem encontrar-se dentro da classe 1. Experimentalmente, constatou-se que em todas as amostras, independentemente da via usada, a corrosividade enquadrou-se dentro da classe 1, isto pressupõe portanto que o biodiesel produzido não é corrosivo às peças de cobre, ligas e outros metais.

Pode-se constatar que as amostras de biodiesel usando metanol, apresentam um valor de CFPP de  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e portanto enquadram-se dentro da classe C ( $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

No biodiesel produzido por via etílica, o valor de CFPP obtido foi de  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e portanto enquadra-se dentro da classe A ( $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Pode concluir-se que independentemente da via

usada para produção deste biocombustível, este poderia ser usado em países de clima temperado, como é o caso de Portugal.

Um outro parâmetro físico testado foi o ponto de inflamação. O valor mínimo requerido para esta propriedade é de 120 °C. Experimentalmente, verificou-se que todas as amostras apresentavam um ponto de inflamação superior a 150 °C, estando dentro do valor aceitável. Caso o ponto de inflamação fosse baixo, isto poderia implicar uma combustão prematura e consequentemente um aumento das emissões, bem como um desgaste nos componentes do motor.

Os parâmetros da caracterização do biodiesel obtido por via química podem ser observados de uma forma mais completa no Anexo A.2.1.

### 3.3. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática usando etanol

O objectivo do trabalho, foi numa primeira fase, avaliar as vantagens da utilização de cada via (metilica e etilica) para a produção de biodiesel, seguido da caracterização de cada uma das propriedades deste biocombustível.

Após esta fase, prosseguiu-se o trabalho, mas agora testando a produção de FAEE a partir de etanol em diferentes concentrações (70%, 96% (v/v) e absoluto), e de uma enzima usada como catalisador, a Lipozyme TL IM, gentilmente fornecida pela Novozymes. Neste processo, o único parâmetro variado experimentalmente, foi o tempo de reacção, 24 h e 48 h. Quanto às outras condições, usou-se uma razão molar álcool/óleo de 3:1, razão mássica óleo/enzima 35,3:1 e uma temperatura de reacção de 35 °C.

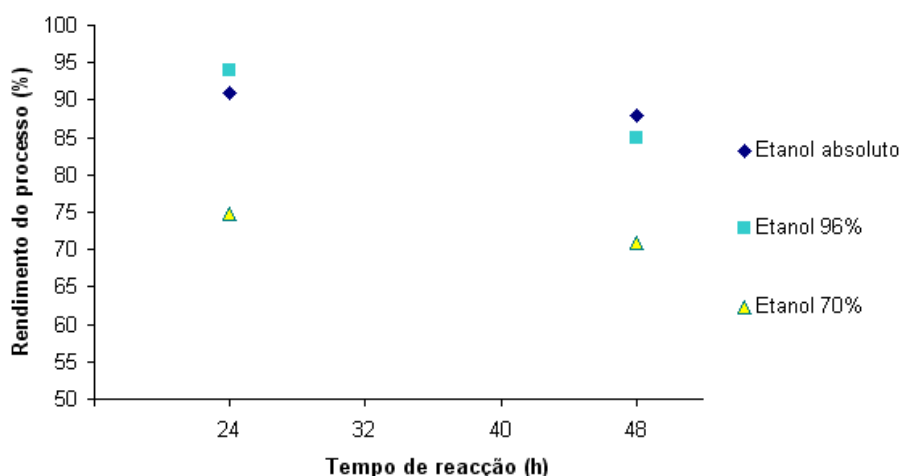


Figura 3. 8 – Rendimento de conversão do óleo em biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

Através da análise da Figura 3. 8, constata-se que, independentemente da concentração de etanol, é notório que o rendimento de conversão do óleo em biodiesel é ligeiramente superior usando um tempo de reacção de 24 h, relativamente às 48 h. Uma possível justificação poderá dever-se ao facto da reacção ser reversível.

Por outro lado, com um tempo de reacção de 24 h observou-se, tanto com etanol absoluto como usando etanol a 96%, um elevado rendimento de conversão em biodiesel, 91% e 94%, respectivamente.

A densidade do biodiesel, segundo a norma EN14214:2003 deve estar compreendida entre 860 e 900 kg/m<sup>3</sup>. Pela análise da Figura 3. 9, verifica-se que a massa específica das amostras de biodiesel se encontra dentro dos limites teóricos estabelecidos nesta norma.

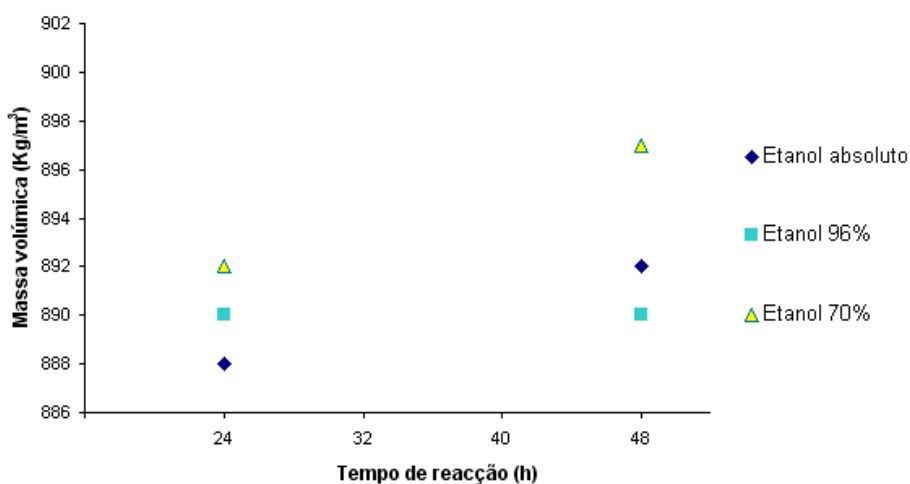


Figura 3. 9 – Variação da massa volúmica nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

O limite mínimo e máximo da viscosidade cinemática é de 3,50 e 5,00 mm<sup>2</sup>/s, respectivamente.

É notório pela observação da Figura 3. 10, que as amostras contendo etanol a 70 %, são as que apresentam maior valor da viscosidade cinemática, provavelmente devido à baixa conversão de óleo em biodiesel. Além disso, todas as amostras de biodiesel estão fora do limite estabelecido pela norma. Uma possível explicação para estes resultados deve-se ao facto da maior dificuldade existente na separação do glicerol quando é utilizado o etanol como reagente.

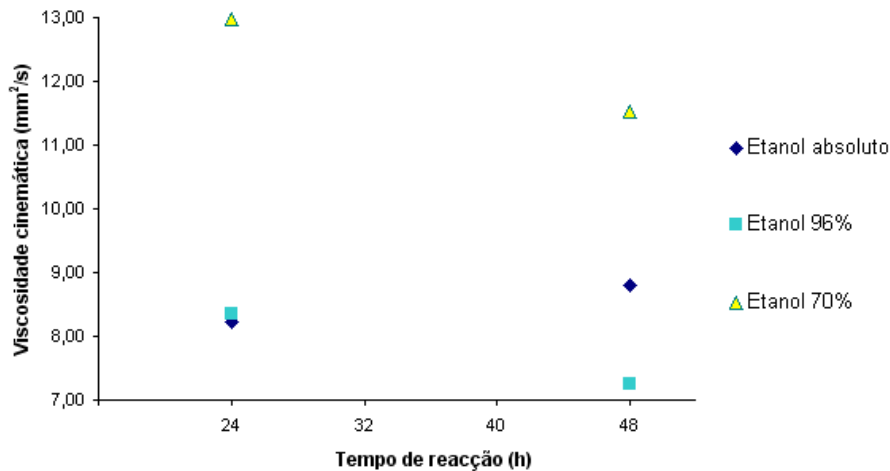


Figura 3. 10 – Variação da viscosidade cinemática nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

O gráfico representado na Figura 3. 11 mostra que em todas as amostras de biodiesel o teor de água está muito acima do valor máximo recomendado (500 mg/kg).

Observa-se também que as amostras produzidas com etanol a 70%, são as que apresentam maior teor de humidade, respectivamente 3679 e 2721 mg/kg a 24 e 48 h, respectivamente, tal como esperado, indicando a necessidade de utilização de um processo de secagem mais eficiente.

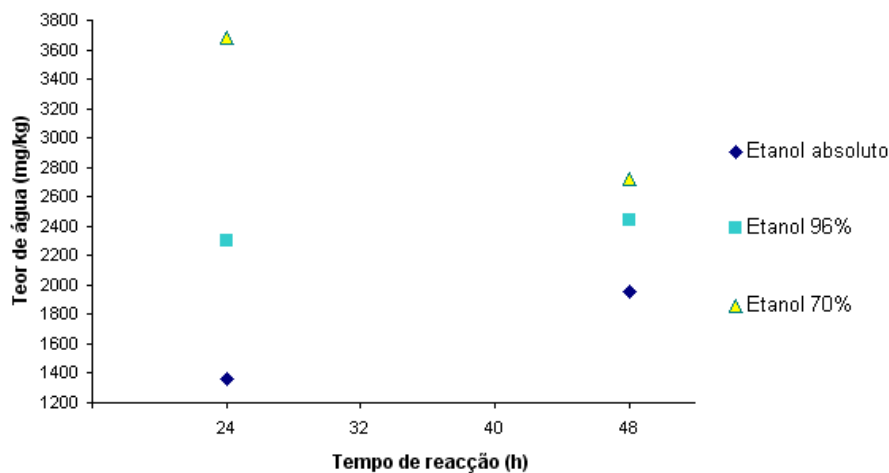


Figura 3. 11 – Variação do teor de água nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

A Figura 3. 12 mostra que a propriedade número de iodo está dentro do limite máximo estabelecido, ou seja de  $120 \text{ g}_{\text{iodo}}/100 \text{ g}_{\text{amostra}}$ , em todas as amostras de biodiesel, sendo patente um abaixamento significativo do número de iodo no biodiesel relativamente ao valor medido inicialmente no óleo.

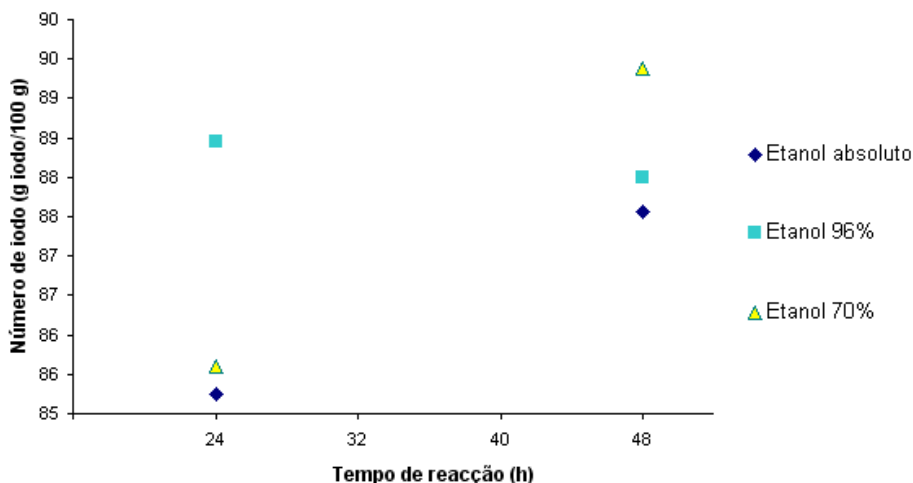


Figura 3. 12 – Variação do número de iodo nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

Relativamente ao índice de acidez nas amostras de biodiesel, constata-se que todas estão acima do limite máximo recomendado de 0,50 mg KOH/g. No entanto, reduzindo-se a pureza do etanol usado na reação o valor do índice de acidez agrava-se substancialmente.

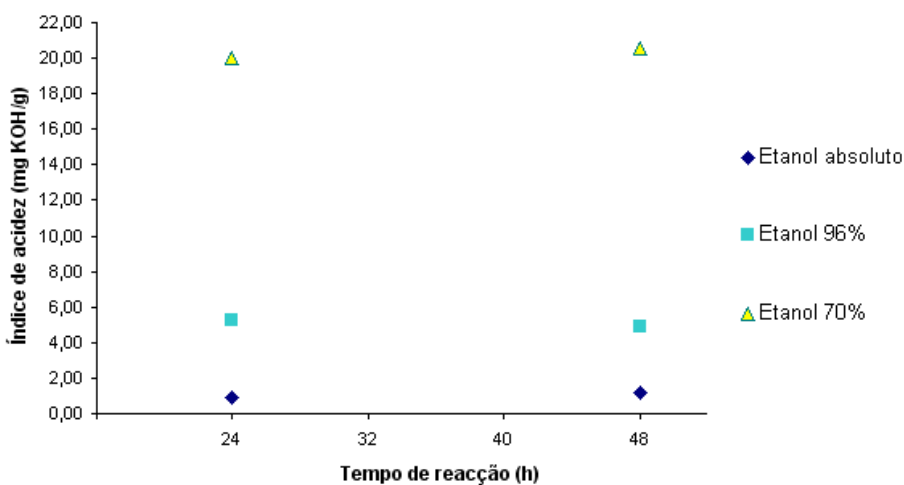


Figura 3. 13 – Variação do índice de acidez nas amostras de biodiesel, por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

Através da análise da Figura 3. 8, pode concluir-se que o uso de um tempo de reação de 48 h, não melhora a eficiência de conversão do óleo em biodiesel. Por outro lado, o uso de um etanol a 70 % (com um maior teor de água) piora o rendimento do processo e as propriedades do biodiesel, tais como: a viscosidade cinemática, o teor de água e o índice de acidez.

Além disso, verifica-se que tanto usando etanol absoluto como etanol a 96% obteve-se uma elevada conversão de óleo em biodiesel, no entanto usando etanol absoluto resultou em

melhores características das amostras do biodiesel obtido. Como consequência, escolheu-se o etanol absoluto para se prosseguir para os ensaios seguintes.

As propriedades do biodiesel etílico produzido nestes ensaios podem ser observadas no Anexo A.2.2.

Após o estudo realizado anteriormente produziu-se, numa terceira fase deste trabalho, FAEE por via enzimática (usando Lipozyme TL IM como catalisador) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo de reacção e a temperatura de reacção, sendo as condições dos ensaios as observadas na Tabela A2. 13 do Anexo A.2.3.

De seguida são apresentados gráficos que ilustram o rendimento de conversão do processo para as várias situações estudadas.

Comparando os ensaios B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, constata-se que o único parâmetro que varia entre eles é o tempo de reacção, respectivamente 8 e 12 h. O ensaio B<sub>2</sub> resultou numa maior conversão do óleo em biodiesel, 95,3 %. Pode concluir-se assim, que um tempo de reacção de 12 h deverá ser suficiente e favorece a produção de biodiesel.

Através da análise dos ensaios B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>, o único parâmetro que varia entre si é a razão molar álcool/óleo, respectivamente 3:1, 6:1 e 9:1. O rendimento do processo para os ensaios mencionados foi respectivamente 95,3 %, 98,9 % e 94,6 %. Constata-se assim, que usando uma razão molar álcool/óleo superior a 6:1 a produção de biodiesel não aumenta.

A transesterificação de óleos vegetais é uma reacção cineticamente favorecida quando um excesso de álcool é usado em relação ao triglicerídeo. Contudo, uma razão molar etanol/óleo vegetal muito alta pode interferir na separação do glicerol devido ao aumento da sua solubilidade no etanol. A presença de glicerol no meio reaccional favorecerá a formação de triglicerídeos. Isto poderá justificar a diferença de rendimento obtido, usando cada uma das respectivas razões.

Encinar et al. [62] mostraram que a razão molar etanol/óleo 9:1 era bastante apropriada para transesterificações, pois abaixo dessa proporção a reacção poderia ser incompleta ou não se processar, e acima dessa proporção haveria uma maior acumulação de glicerol que prejudicaria o rendimento em esteres etílicos, no entanto como se pode constatar pelos resultados obtidos, uma razão molar álcool/óleo 6:1 foi suficiente.

Um outro parâmetro que foi variado, mantendo os restantes constantes foi a razão mássica óleo/enzima (ensaios B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>). As proporções usadas para os correspondentes ensaios foram 35,3:1, 42,8:1 e 30:1 [48], cujos rendimentos foram respectivamente, 98,9%, 84,0% e 87,5%. Pode concluir-se que um excesso de enzima (razão 30:1) não promove um aumento no rendimento de conversão do óleo em biodiesel, mas por outro lado o uso de elevadas razões óleo/enzima (42,8:1), pode não ser suficiente para a produção pretendida.

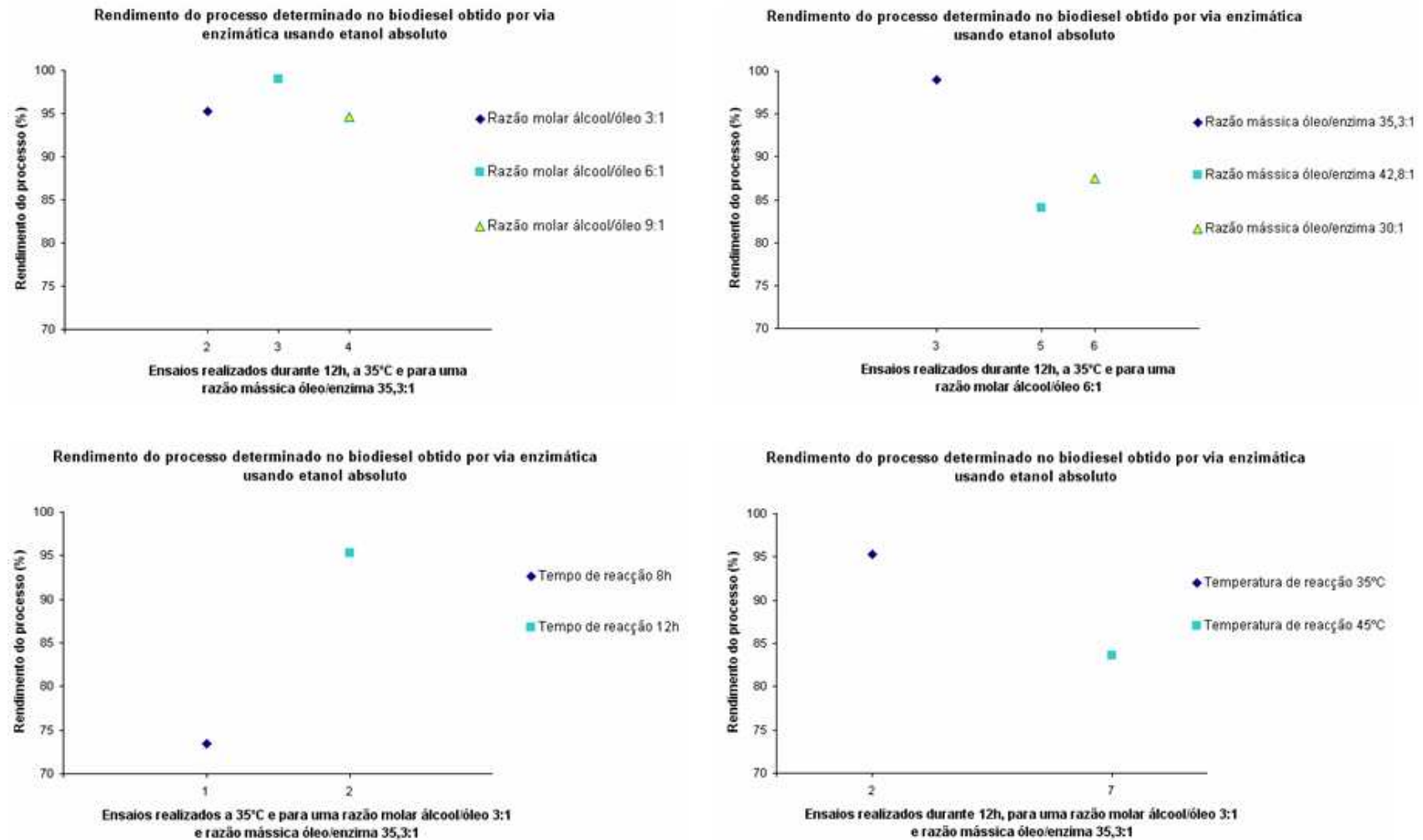


Figura 3. 14 – Gráficos representativos do rendimento obtido no processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção

O ensaio B<sub>7</sub> foi o único em que se manipulou a temperatura mantendo constante as restantes condições. O ensaio B<sub>7</sub> foi comparado com o B<sub>2</sub>, decorrendo cada um respectivamente a 45 e 35 °C, mantendo constante a razão molar álcool/óleo de 3:1, a razão mássica óleo/enzima 35,3:1 e o tempo de reacção de 12 h.

Através da análise dos resultados dos ensaios experimentais, conclui-se que realizando a transesterificação a uma temperatura de 35 °C o rendimento obtido foi de 95,3%, valor esse superior ao obtido quando foi usada uma temperatura de 45 °C (83,6 %).

Segundo a ficha técnica da enzima Lipozyme TL IM, a gama de temperatura óptima de funcionamento desta proteína, encontra-se entre os 30 e 40 °C. Uma possível justificação, para o facto de a 45 °C o rendimento ser inferior ao obtido quando foi usada uma temperatura de 35 °C, pode ser devido à desnaturação da proteína, com a consequente perda da sua actividade.

Assim, pode concluir-se que, para a transesterificação com etanol e usando Lipozyme TL IM como catalisador, as condições que produziram uma maior conversão de óleo em biodiesel foram: razão álcool/óleo de 6:1, uma razão mássica óleo/enzima de 35,3:1, um tempo de reacção de 12 h e um temperatura de reacção de 35 °C, tendo sido obtido um rendimento de cerca de 98,9%.

De seguida são apresentados diversos gráficos referentes às características do biodiesel obtido por via enzimática usando etanol absoluto e variando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, razão mássica óleo/enzima, tempo e temperatura de reacção), para uma melhor avaliação da qualidade do biodiesel produzido.

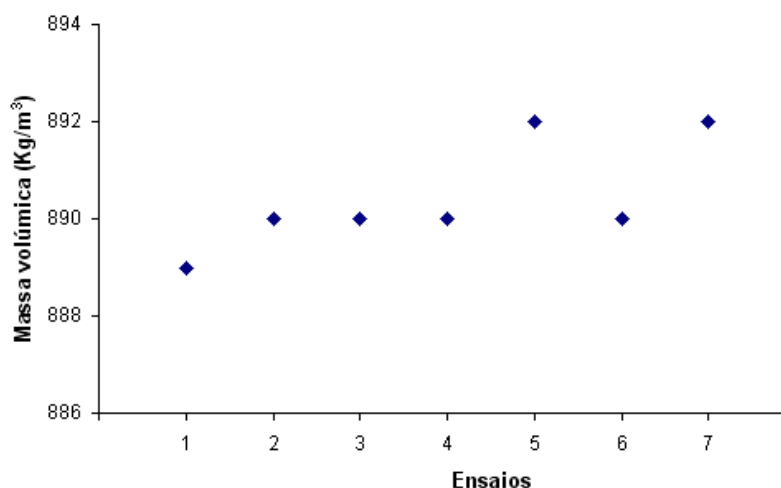


Figura 3. 15 – Variação da massa volúmica nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção).

Através da análise da Figura 3. 15, constata-se que, independentemente das condições aplicadas no processo, os valores da massa volúmica para cada ensaio, de B<sub>1</sub> a B<sub>7</sub>, estão compreendidos dentro dos limites mínimo e máximo estabelecidos na norma EN 14214:2003, respectivamente 860 e 900 kg/m<sup>3</sup>.

Segundo a norma EN 14214:2003, os limites máximo e mínimo para a viscosidade cinemática admitidos são respectivamente, 3,50 e 5,00 mm<sup>2</sup>/s. Pela análise dos resultados, representados no gráfico da Figura 3. 16, verifica-se que os valores deste parâmetro estão muito acima dos valores admissíveis, quaisquer que sejam as condições usadas.

No entanto comparando os ensaios B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, em que se variou o tempo de reacção, observa-se que a viscosidade cinemática é maior quando usado um menor tempo de reacção, obtendo-se respectivamente 12,57 e 8,95 mm<sup>2</sup>/s.

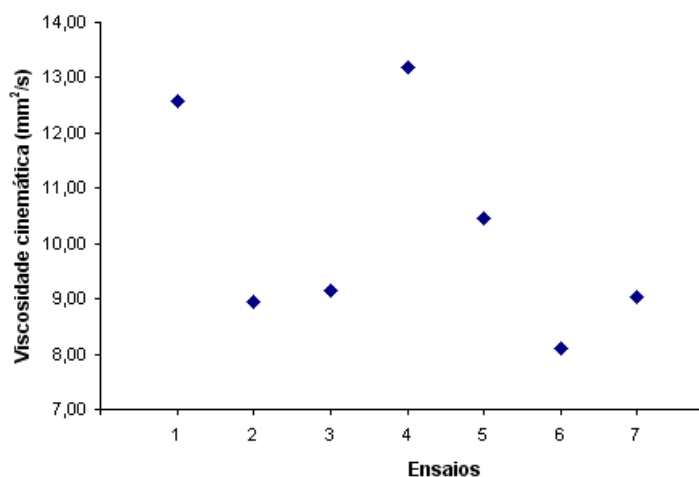


Figura 3. 16 – Variação da viscosidade cinemática nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção).

Relativamente aos ensaios B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>, é notório que usando razões molares álcool/óleo mais baixas, a viscosidade do biodiesel tende a baixar também, obtendo-se respectivamente 8,95, 9,15 e 13,18 mm<sup>2</sup>/s.

Comparando os ensaios B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>, é perceptível que o uso de razões mássicas óleo/enzima elevadas, influência negativamente a viscosidade do biodiesel. Obteve-se para os ensaios B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>, respectivamente, 9,15, 10,45 e 8,09 mm<sup>2</sup>/s.

O uso de temperaturas mais baixas promove um abaixamento ligeiro na viscosidade do biocombustível, ainda que pouco significativo. Os ensaios B<sub>2</sub> e B<sub>7</sub>, realizados a 35 e 45 °C respectivamente, originaram um biodiesel com uma viscosidade cinemática de 8,95 e 9,03 mm<sup>2</sup>/s, respectivamente.

O valor máximo do teor de água admissível neste biocombustível é de 500 mg/kg. Constatase que as amostras têm um teor de humidade acima do limite estipulado, com excepção do ensaio B<sub>5</sub> (razão molar álcool/óleo de 6:1, razão mássica óleo/enzima de 42,8:1, um tempo de reacção de 12 h e uma temperatura de reacção de 35 °C).

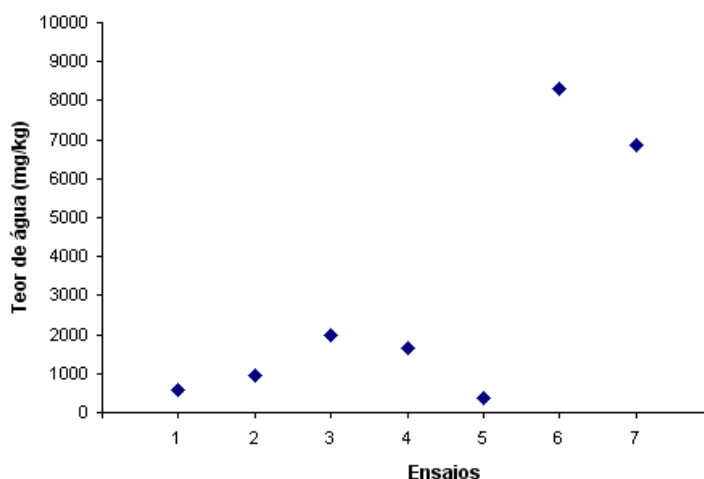


Figura 3. 17 – Variação do teor de água nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção).

A partir da análise dos ensaios B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, o valor do teor de humidade foi mais baixo usando um tempo de reacção de 8 h (558 mg/kg), quando comparado com os 962 mg/kg para um tempo de reacção de 12 h.

Usando as razões molares álcool/óleo de 9:1 e de 3:1 em alternativa à razão 6:1, verifica-se respectivamente um teor de água mais baixo (respectivamente, 1637 mg/kg e 962 mg/kg) quando comparado com 1966 mg/kg. Embora todos os valores estejam muito acima do limite máximo.

Comparando entre si os ensaios, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>, verifica-se que usando razões mássicas óleo/enzima maiores (42,8:1), o teor de humidade é mais baixo, 388 mg/kg.

Observa-se que temperaturas mais elevadas, a 45 °C, surtiram um efeito negativo no teor de água presente no biodiesel, cerca de 6844 mg/kg em comparação com 962 mg/kg, para o biodiesel produzido a 35 °C.

Através da análise da Figura 3. 18, observa-se que em todos os ensaios o número de iodo se encontra dentro do limite máximo recomendado ( $120 \text{ g}_{\text{iodo}}/100 \text{ g}_{\text{amostra}}$ ).

Portanto, pode concluir-se que, qualquer seja o factor a manipular, a variação do número de iodo do biodiesel é sempre no sentido de o tornar menor do que o óleo de partida.

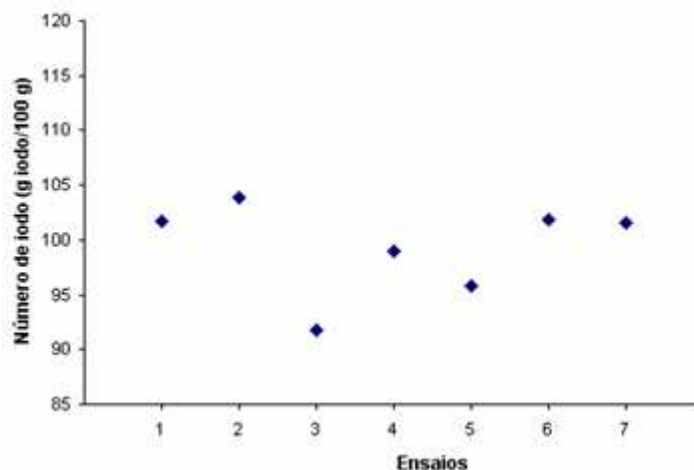


Figura 3. 18 – Variação do número de iodo nas amostras de biodiesel obtido, por via enzimática, usando etanol absoluto, alternando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção).

O limite máximo recomendado para o índice de acidez no biodiesel é de 0,50 mg KOH/g. Os resultados obtidos mostram que nas amostras de biodiesel o índice de acidez estava acima do valor máximo admissível, embora os ensaios B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub>, estejam apenas ligeiramente acima (respectivamente, 0,52 e 0,54 mg KOH/g).

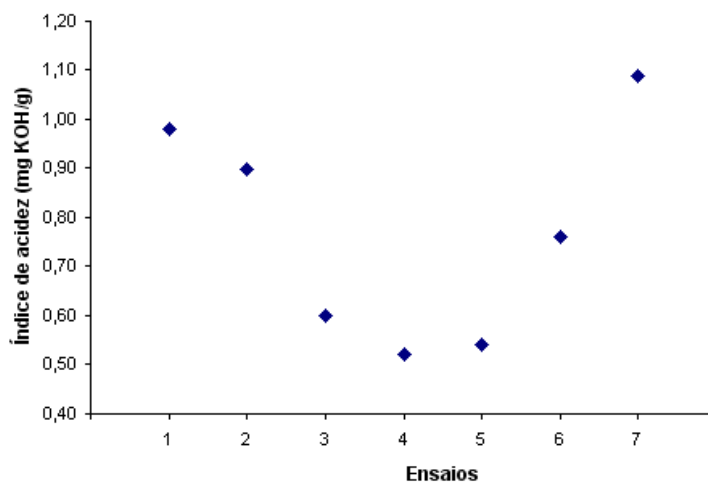


Figura 3. 19 – Variação do índice de acidez nas amostras de biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, alterando diversos parâmetros de ensaio (razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção).

Um tempo de reacção maior, 12 h em comparação com 8 h, promoveu um abaixamento ligeiro do número de acidez, 0,98 a 0,90 mg KOH/g (ensaios B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>).

Relativamente à variação da razão molar álcool/óleo nos ensaios B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>, ficou evidente que o uso de razões molares maiores (9:1) se traduziu num menor índice de acidez, 0,52

mg KOH/g.

Para os ensaios B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>, em que se manipulou a razão mássica óleo/enzima, observa-se que um aumento dessa razão resulta num abaixamento do índice de acidez.

Por sua vez, o factor temperatura também interferiu no índice de acidez, pois o uso de temperaturas mais baixas (35 °C) originou um biodiesel com um índice de acidez também menor, 0,90 mg KOH/g (1,09 mg KOH/g a 45 °C).

Assim sendo, e analisando as características do biodiesel pode concluir-se que, para a transesterificação do óleo com etanol e usando Lipozyme TL IM como catalisador, as condições que resultaram num biodiesel de melhor qualidade/menor conversão foram: razão álcool/óleo de 6:1, uma razão mássica óleo/enzima de 35,3:1, um tempo de reacção de 12 h e um temperatura de reacção de 35 °C, tal como se tinha concluído anteriormente.

Os parâmetros da caracterização do biodiesel obtido nestes ensaios podem ser observados no Anexo A.2.3. de uma forma mais explícita.

### 3.4. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática efectuando reutilização da enzima

Na fase final do trabalho, após a determinação das condições óptimas na gama de condições testadas, foi feita a produção de biodiesel por via enzimática, efectuando-se a reutilização de enzima Lipozyme TL IM segundo as condições mencionadas anteriormente. Seguidamente, apresentam-se as Figura 3. 20 e Figura 3. 21 relativas, respectivamente, ao rendimento do processo de conversão do óleo em biodiesel por via enzimática e às propriedades do biodiesel (massa volúmica, viscosidade cinemática, teor de água, índice de acidez e número de iodo), após reutilização da enzima Lipozyme TL IM, até um máximo de quatro vezes.

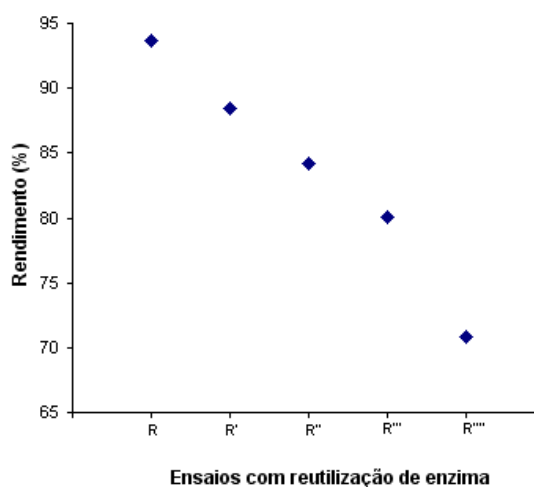


Figura 3. 20 – Rendimento obtido no processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) e efectuando-se a reutilização sucessiva da mesma.

Através da análise da Figura 3. 20, verificou-se que a reutilização sucessiva da enzima Lipozyme TL IM promoveu uma consequente diminuição gradual na taxa de produção de FAEE. Inicialmente o rendimento do processo foi de 93,7 %, após a reutilização da enzima por quatro vezes o rendimento passou para 70,8 %. Uma possível explicação para a diminuição da taxa de conversão, relaciona-se com a perda de massa da enzima ao longo das sucessivas reutilizações, ocorrida na fase de filtração, lavagem e secagem da enzima. Constatou-se que até à terceira reutilização da enzima, ocorreu um abaixamento constante no rendimento de conversão. A partir desta reutilização, ocorreu um abaixamento excessivo do rendimento, podendo concluir-se que apenas deverá ser possível usar esta enzima até à terceira reutilização.

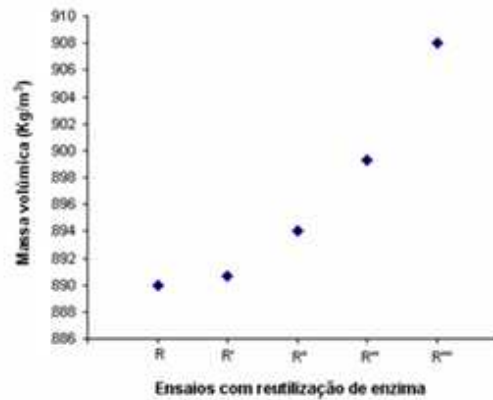
Relativamente ao parâmetro massa volúmica do biodiesel, é perceptível que ocorre um aumento desta, como resultado das sucessivas reutilizações da enzima. Segundo a norma EN 14214:2003, os valores limite admissíveis estão compreendidos entre 860 e 900 kg/m<sup>3</sup>. No entanto, através da análise da Figura 3. 21 observou-se que todas as amostras estão dentro dos limites estipulados, com excepção do ensaio resultante da quarta reutilização que se encontra ligeiramente acima do máximo permitido (908 kg/m<sup>3</sup>).

No que diz respeito à determinação da viscosidade cinemática do biodiesel, constatou-se que todas as amostras estão muito acima do limite máximo admitido (5,00 mm<sup>2</sup>/s). Verificou-se que as sucessivas reutilizações da enzima promoveram um aumento na viscosidade, variando esta entre os 10,54 e os 27,79 mm<sup>2</sup>/s. Isto está de acordo com o esperado, pois as sucessivas reutilizações da enzima desfavoreceram a reacção de conversão do óleo em biodiesel, no entanto poderão ser feitos tratamentos de forma a reduzir essa mesma viscosidade.

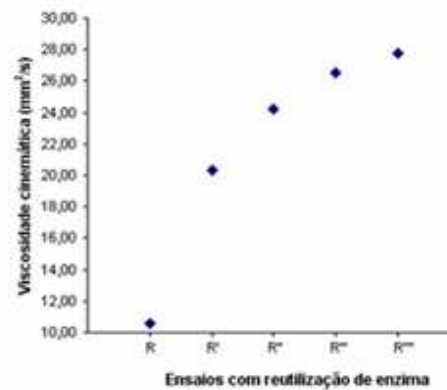
O limite máximo admissível para o teor de água nas amostras de biodiesel é de 500 mg/kg de acordo com a norma EN 14214:2003. A partir da análise dos resultados, constatou-se que em todas as amostras de biodiesel o teor de água está muito acima do valor máximo admissível. No entanto é notório, que as sucessivas reutilizações da enzima promoveram uma diminuição do teor de água, que variou entre, 1956 e 870 mg/kg.

Relativamente ao parâmetro número de iodo, verificou-se que todas as amostras de biodiesel se encontram dentro do limite máximo permitido, 120 g<sub>iodo</sub>/100 g<sub>amostra</sub>, com excepção da amostra resultante da quarta de reutilização (124 g<sub>iodo</sub>/100 g<sub>amostra</sub>).

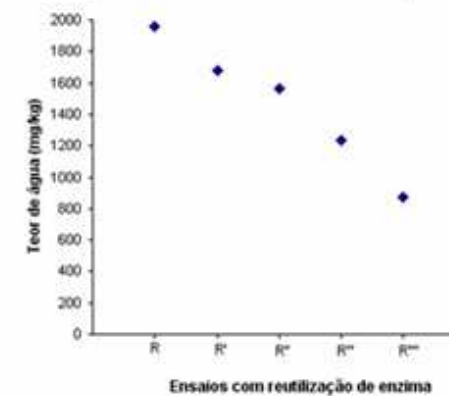
Massa volúmica determinada no biodiesel obtido por via enzimática



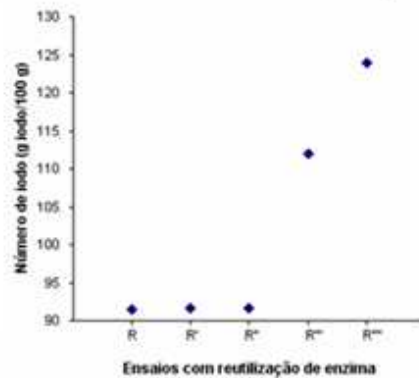
Viscosidade cinemática determinada no biodiesel obtido por via enzimática



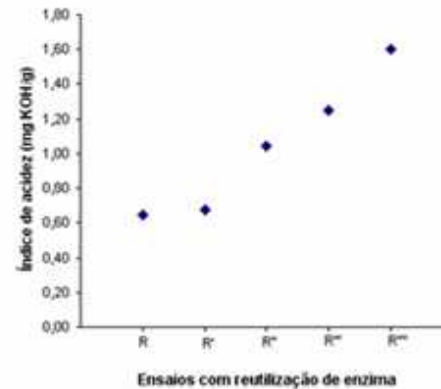
Teor de água determinado no biodiesel obtido por via enzimática



Número de iodo determinado no biodiesel obtido por via enzimática



Índice de acidez determinada no biodiesel obtido por via enzimática



Poder calorífico determinado no biodiesel obtido por via enzimática

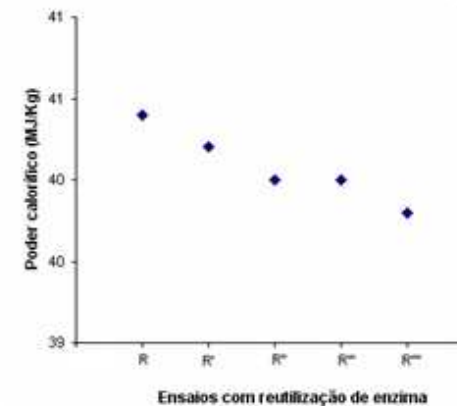


Figura 3. 21 – Características apresentadas pelo biodiesel obtido por via enzimática e efectuando-se a reutilização sucessiva da enzima.

Segundo a norma EN 14214:2003, o valor máximo estabelecido para o parâmetro índice de acidez é de 0,50 mg KOH/g. Através da análise deste parâmetro nas amostras de biodiesel, verificou-se que o índice de acidez está fora do valor máximo recomendado. Observou-se ainda que as sucessivas reutilizações da enzima favorecem o aumento do índice de acidez.

Segundo Dennis et al. [29] o valor teórico do poder calorífico do biodiesel é de 45 MJ/kg. No entanto, através da análise das amostras de biodiesel observou-se que os valores deste parâmetro estão ligeiramente abaixo daquele valor teórico, contudo em todas as amostras o poder calorífico do biodiesel se encontrava acima do poder calorífico do óleo de milho transgênico (39,8 MJ/kg), determinado experimentalmente.

Na determinação da corrosão ao cobre, as amostras de biodiesel devem encontrar-se dentro da classe 1. Experimentalmente, constatou-se que todas as amostras de biodiesel, independentemente do número de reutilizações da enzima efectuadas, se enquadraram dentro da classe 1, isto pressupõe portanto, que o biodiesel produzido não é corrosivo às peças de cobre, ligas e outros metais.

Um outro parâmetro físico a ser estudado foi o ponto de inflamação. O valor mínimo requerido para esta propriedade é de 120 °C. Experimentalmente, verificou-se que todas as amostras apresentavam um ponto de inflamação superior a 150 °C, estando portanto dentro do valor aceitável.

Na figura seguinte apresenta-se a representação do teor de ésteres determinado para as várias amostras de biodiesel produzido com enzimas após sucessivas reutilizações.

Através da análise dos vários cromatogramas obtidos para os diferentes ensaios (Anexo A.2.4., Figura A2. 1 a Figura A2. 5), conclui-se que os ésteres obtidos são principalmente constituídos por C<sub>16</sub>, C<sub>18:1</sub> e C<sub>18:2</sub>, tal como esperado visto se tratar de um biodiesel obtido a partir de origem vegetal, nomeadamente de óleo de milho.

Pela análise da Figura 3. 22, conclui-se que em todas as amostras de biodiesel, o teor de ésteres, se encontra muito abaixo do valor mínimo estabelecido na norma EN 14214:2003 (96,5%). No entanto visto se tratar de biodiesel obtido por via etílica e portanto sendo mais difícil a sua obtenção e purificação, os valores apresentados são bastante razoáveis, situando-se em torno dos 70% com excepção do último ensaio que apresenta um valor de 56,8%.

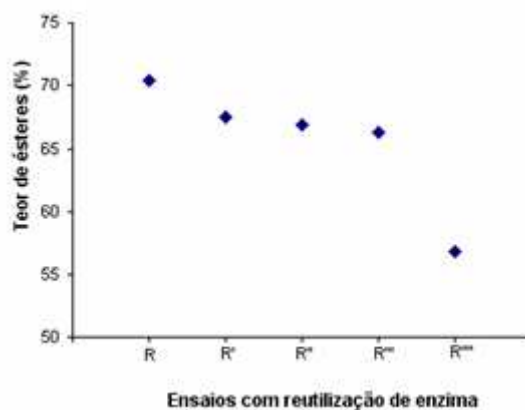


Figura 3. 22 – Teor de ésteres apresentado pelo biodiesel obtido por via enzimática e efectuando-se a reutilização sucessiva da enzima.

Através dos resultados obtidos para as condições óptimas: razão álcool/óleo de 6:1, uma razão mássica óleo/enzima de 35,3:1, um tempo de reacção de 12 h e uma temperatura de reacção de 35 °C, por via enzimática com reutilização da enzima Lipozyme TL IM, verificou-se que até à terceira reutilização da enzima alguns parâmetros do biodiesel se encontram dentro dos limites estabelecidos, e portanto conclui-se que eventualmente é possível usar por três vezes esta enzima. No entanto, isto só poderá ser possível tendo em atenção o processo de regeneração da enzima com éter isopropílico, bem como minimizar o máximo de perdas de massa da enzima durante os processos de filtração e secagem.

As propriedades do biodiesel etílico produzido nestas condições podem ser observadas no Anexo A.2.4.

De um modo geral o rendimento de conversão obtido por via enzimática foi substancialmente melhor do que o que foi obtido na produção pela via química, mesmo quando foi usado o metanol, no entanto a qualidade do biodiesel produzido encontra-se um pouco abaixo da obtida por via química usando metanol, nomeadamente no que se refere às características teor de água, viscosidade e índice de acidez.

### 3.5. Estimativa de custos laboratoriais de produção e caracterização de biodiesel etílico por via enzimática

Após a fase de ensaios de produção de biodiesel etílico pela via enzimática e caracterização do biodiesel correspondente, foi efectuada uma estimativa dos custos de produção e de caracterização do biodiesel etílico produzido laboratorialmente por via enzimática.

Os preços dos reagentes (Anexos A.3. e A.4.) foram fornecidos pelo Laboratório de

Tecnologia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto, com exceção da enzima Lipozyme TL IM que foi estimado após consulta bibliográfica [58].

Não foram contabilizados os custos com mão-de-obra ou as amortizações de equipamentos.

Na Tabela 3. 2, que se apresenta de seguida, resumem-se os custos estimados, referentes à produção e caracterização do biodiesel determinados por ensaio (0,19 L) e por processo (2,8 L).

Tabela 3. 2 – Custos referentes à produção de biodiesel etílico obtido por via enzimática, bem como os custos referentes à sua caracterização.

<b>Custos referentes à etapa de produção do biodiesel</b>		
Custo energético	2,06 €/ensaio	10,33 €/processo
Custo de reagentes e material	2,03 €/ensaio	23,94 €/processo
Custo de água	0,05 €/ensaio	0,58 €/processo
<b>Total</b>	<b>4,14 €/ensaio</b>	<b>34,85 €/processo</b>
<b>Custos referentes à caracterização do biodiesel</b>		
Custo energético	0,63 €/ensaio	1,55 €/processo
Custo reagentes usados na determinação do número de iodo	1,31 €/ensaio	20,97 €/processo
Custo reagentes usados na determinação do índice de acidez	0,62 €/ensaio	9,26 €/processo
Custo reagentes usados na determinação do poder calorífico	0,48 €/ensaio	7,20 €/processo
Custo reagentes usados na determinação do teor de água	1,58 €/ensaio	6,52 €/processo
Custo reagentes usados na determinação do teor de ésteres	9,56 €/ensaio	47,81 €/processo
<b>Total</b>	<b>14,18 €/ensaio</b>	<b>93,27 €/processo</b>

Pela análise dos resultados pode-se constatar que tanto na etapa de produção de biodiesel como na caracterização do mesmo, o custo dos reagentes consumidos tem especial importância numa abordagem final dos gastos do processo. Sendo que, para isto contribuiu de forma bastante significativa o consumo de reagente de Wijs usado na determinação do número de iodo e de metil heptadecanoato usado na determinação do teor de ésteres.

Outro aspecto a salientar, foi o facto de se efectuar uma reutilização de enzima que reduziu de forma acentuada os custos de produção de biodiesel.

Relativamente aos consumos de energia e de água, estes tiveram um papel pouco significativo no custo final. Este facto pode ser explicado pela produção de biodiesel em pequena escala, visto se tratar de uma produção ao nível laboratorial. A nível industrial estes consumos teriam uma menor contribuição por volume de biodiesel produzido, devido ao aproveitamento de economias de escala.

Assim sendo, o custo total referente à produção laboratorial de biodiesel por via enzimática usando reutilização da enzima (excluindo custos com mão-de-obra e amortizações de equipamentos) foi de 34,85 €/processo e o custo total para a caracterização do biodiesel foi de 93,27 €/processo, valores que face à pequena escala de produção (2,8 L), são razoáveis.

## 4. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

### 4.1. Conclusões

A necessidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, implicou a aposta em diferentes tipos de matérias-primas alternativas capazes de serem usadas na produção de biocombustíveis, como é o caso do biodiesel.

Actualmente a produção de biodiesel tem vindo a sofrer uma pesquisa contínua com vista a apostar em novas matérias-primas, testar novos catalisadores e otimizar as condições experimentais.

Neste trabalho usou-se como matéria-prima óleo de milho transgénico, comprado num hipermercado.

Numa primeira fase, efectuou-se a produção do biodiesel por via química, usando metanol/etanol como álcoois e sendo o catalisador hidróxido de potássio.

Posteriormente, realizou-se a produção de FAEE, por via enzimática usando a Lipozyme TL IM (da Novozymes) como catalisador. Para isso inicialmente, optou-se por testar a utilização de etanol com diferentes purezas (70 %, 96 % (v/v) e absoluto) e dois tempos de reacção diferentes (24 h e 48 h) de modo a estimar-se qual o álcool e o tempo de reacção que conduziu a uma maior taxa de conversão de óleo em biodiesel, bem como o estudo de alguns dos parâmetros mais significativos na caracterização das amostras de biodiesel.

Escolhido o álcool que originou melhores resultados (etanol absoluto), partiu-se numa segunda fase para a manipulação das condições operatórias, respectivamente a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo de reacção e a temperatura de reacção, de modo a otimizar a produção de biodiesel pela via enzimática. Contudo a determinação das condições óptimas na gama de condições testadas foi feita somente com base nos resultados experimentais, a partir da análise dos resultados gráficos, não se aplicando qualquer software estatístico.

Após determinação dessas condições óptimas procedeu-se à produção de biodiesel por via enzimática nessas condições, efectuando-se a reutilização sucessiva da enzima Lipozyme TL IM, e estimando-se os custos da produção de FAEE nas condições optimizadas.

Através da análise dos resultados pode-se concluir que:

- O rendimento médio do processo por via química metílica foi de 83,5 % comparado com 71,1 % na via etílica, o que se encontra de acordo com o esperado. Uma possível justificação prende-se com o facto do consumo de metanol no processo de transesterificação ser menor que o do etanol anidro, pois o metanol é mais reactivo e para uma mesma taxa de conversão e para as mesmas condições operacionais, o

tempo de reacção usando metanol é menos de metade do tempo necessário quando se usa etanol – no caso presente o tempo de reacção foi igual.

- Relativamente à produção de biodiesel por via enzimática verificou-se, através da análise dos resultados, que independentemente da concentração de etanol, é notório que o rendimento de conversão do processo é ligeiramente superior usando um tempo de reacção de 24 h quando comparado com 48 h. Isto pode ser devido eventualmente ao facto da reacção ser reversível. Para um tempo de reacção de 24 h observou-se, tanto usando etanol absoluto como etanol a 96%, um elevado rendimento de conversão em biodiesel, 91% e 94%, respectivamente, no entanto usando etanol absoluto o biodiesel resultante apresentou melhores características nos parâmetros avaliados.

O uso de etanol com uma concentração de 70 % (isto é, a presença de uma grande quantidade de água) afecta mais evidentemente (e negativamente) o rendimento do processo, e as propriedades do biodiesel, tais como: a viscosidade cinemática, o teor de água e o índice de acidez.

- Posteriormente, foram determinadas as condições óptimas na gama de condições testadas, sendo estas: razão álcool/óleo de 6:1, uma razão mássica óleo/enzima de 35,3:1, um tempo de reacção de 12 h e uma temperatura de reacção de 35 °C, cujo rendimento de transesterificação do óleo em biodiesel foi de 98,9 %. Além disso, para estas condições o biocombustível apresentou as melhores características. Este rendimento foi substancialmente melhor do que o que foi obtido na produção pela via química, mesmo quando foi usado o metanol, no entanto a qualidade do biodiesel produzido encontra-se um pouco abaixo da obtida por via química usando metanol, nomeadamente no que se refere às características teor de água, viscosidade e índice de acidez. Foram assim determinadas umas boas condições operatórias para a produção de biodiesel etílico por via enzimática nas condições de ensaio testadas, podendo estas condições não ser efectivamente as condições óptimas de produção de biodiesel etílico.
- A reutilização sucessiva da enzima Lipozyme TL IM promoveu uma consequente diminuição na taxa de produção de FAEE. Inicialmente o rendimento do processo foi de 93,7 %, após a reutilização da enzima por quatro vezes o rendimento foi de 70,8 %. Uma possível explicação para a diminuição da taxa de conversão, relaciona-se com a perda de massa da enzima ao longo das sucessivas reutilizações e possível perda da sua actividade.

Além disso, constatou-se que até à terceira reutilização da enzima, ocorreu um abaixamento constante no rendimento de conversão. A partir desta reutilização,

ocorreu um abaixamento excessivo do rendimento, o que poderá ser explicado pela perda de actividade desta enzima. Assim, conclui-se que eventualmente é possível efectuar-se três reutilizações desta enzima. No entanto, isto só poderá ser possível tendo em atenção o processo de regeneração da enzima, bem como minimizar ao máximo as perdas de massa da enzima.

- O custo total relativo à produção de biodiesel por via enzimática usando reutilização da enzima foi de 34,85€/2,8 L produto e o custo total referente à sua caracterização foi de 93,27 €/2,8 L produto (excluindo custos com mão-de-obra e amortização de equipamentos). No entanto, a caracterização não é feita sobre a totalidade do biodiesel mas sim sobre amostras recolhidas em cada lote produzido.

Hoje em dia, o processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas a via enzimática tem despertado grande interesse na comunidade científica. Assim sendo e após optimização das condições de reacção no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática, conferindo-lhes características que tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais, este processo, uma vez optimizado, poderá apresentar vantagens muito interessantes em relação ao processo de transesterificação alcalina convencional como se demonstrou ao longo deste trabalho.

A facilidade de separação do catalisador e possibilidade de reutilização do mesmo, a obtenção de produtos com grau de pureza razoável (o uso de etanol absoluto na reacção de transesterificação parece favorecer a qualidade dos FAEE produzidos) e rendimentos de conversão elevados, foram alguns dos principais aspectos verificados.

No entanto a principal desvantagem do processo enzimático é essencialmente económica, contudo pode-se minimizar este aspecto através da reutilização sucessiva da enzima, tal como se verifica na execução do trabalho.

Assim, pelos aspectos salientados anteriormente, justifica-se o estudo do processo de produção de FAEE's por transesterificação do óleo de milho com etanol, usando enzimas suportadas (Lipozyme TL IM) como catalisador e procedendo-se à reutilização da enzima usada.

#### **4.2. Sugestões para trabalhos futuros**

Após o estudo realizado e tendo em conta as várias etapas abordadas na produção de biodiesel obtido quer por via química, quer por via enzimática, pode-se apontar possíveis sugestões para trabalhos futuros. Assim sendo, sugere-se:

- Testar outras enzimas alternativas à Lipozyme TL IM.
- Testar diferentes velocidades de agitação.

- Testar a produção em contínuo de FAEE, usando um leito fixo de enzima suportada.
- Testar a produção de FAEE a partir de óleos mais ácidos.
- Testar a produção de biodiesel metílico pela via enzimática.
- Estudar a cinética da reacção de transesterificação enzimática do óleo de milho a FAEE, de modo a poder avaliar qual o tempo de reacção para obter o melhor rendimento do processo.
- Aplicação de um software estatístico, para planear os ensaios com vista a otimizar a produção de biodiesel.

## 5. Referências bibliográficas

- [1] Schuchardt, U., Serchel, R., Vargas, R. M., 1998. Transesterification of vegetable Oils: a Review, *J. Bras. Chem. Soc.*, 9 (1): 199-210.
- [2] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Biodiesel>, consultado em 16/10/2009.
- [3] Gonzalez, W. A., Nunes, P. P., Ferreira, M. S., Reguera, F. M., Pastura, N. M. R., 2000. Biodiesel a partir de óleos vegetais. *Encontro de Energia no Meio Rural*, 3, Campinas.
- [4] Ma, F., Hanna, M., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70: 1-15.
- [5] Ramos, L. P., Wilhelm, H.M., 2005. Current status of biodiesel development in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124: 807-820.
- [6] Nascimento, M. G., Costa Neto, P. R., Mazzuco, L. M., 2001. Biotransformação de Óleos e Gorduras: Utilização de Lipases para obtenção de biocombustíveis. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 19: 28.
- [7] Wu, W. H., Foglia, T. A., Marmer, W. N., Phillips, J. G., 1999. Optimizing Production of Ethyl Esters of Grease Using 95% Ethanol by Response Surface Methodology. *J. Am. Oil. Soc.*, 76 (4): 517-521.
- [8] Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86:1059-1070.
- [9] Ramos, L. P., Domingos, A. K., Kucek, K. T., Wilhelm, H. M., 2003. Biodiesel: Um projecto de sustentabilidade económica e sócio-ambiental para o Brasil. *Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*, 31: 28-37.
- [10] <http://www.federasul.com.br/noticias/noticiaDetalhe.asp?idNoticia=9653&CategoriaNome=Comercio%20Exterior> consultado em 17/10/2009.
- [11] <http://www.portugalemgrande.com/> consultado em 14/11/2009.
- [12] Parente, E.J.S., 2003. *Biodiesel: Uma aventura tecnológica num País engraçado*. Fortaleza, 60pp.
- [13] Moretto, E., Fett, R., 1998. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela.
- [14] Barnwal, B. K., Sharma, M. P., 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9: 363-378.
- [15] Balat M., 2008. Modeling Vegetable Oil Viscosity. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 30 (20): 1856-1869.
- [16] Van Gerpen J., Shanks B., Pruszko R, 2004. *Biodiesel Production Technology*, NREL/SR-510-36244. Iowa State University. National Renewable Energy Laboratory, Colorado, 106pp.

- [17] Gonçalves, L. A. G., 1996. Implicações nutricionais de dietas lipídicas. *Óleos & Grãos*, 5: p.27.
- [18] Corte, B.J. e Oliveira, S.M.M., 2006. *Produção de biodiesel – Dossiê técnico*, Instituto de Tecnologia do Paraná.
- [19] Crestana, S., 2005. *Matérias-primas para produção do biodiesel: Priorizando alternativas*, São Paulo.
- [20] Neto R. C., Rossi F. S., Zagonel F., Ramos P., 2000. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo soja usado em frituras, *Química Nova*, 23 (4): 531-537.
- [21] [www.biodieseltesting.com](http://www.biodieseltesting.com), consultado em 02/12/2009
- [22] Campos, I., 2003. Biodiesel e Biomassa: duas fontes para o Brasil. *Revista de Ecologia do Século 21*, Rio de Janeiro, 80.
- [23] Meher, L. C., Vidya Sagar, D., Naik, S. N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review, *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 10: 248 – 268.
- [24] Fangrui, M.; Milford, A. H., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70: 1-15.
- [25] Marchetti, J. M., Miguel, V. U., Errazu, A. F., 2005. Possible methods for biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 11: 1300-1311.
- [26] Fukuda H., Kondo A., and Noda H., 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (5): 405-416.
- [27] Felizardo, P., Correia, M., Raposo, I., Mendes, J., Berkemeier, R., Bordado, J. M., 2006. Production of biodiesel from waste frying oil. *Waste Management*, 26: 487-494.
- [28] Paraizo A., Júnior E., Paraíso J., 2005. *Produção de Biodiesel*, Centro Tecnológico – CTC, Universidade Federal de Santa Catarina.
- [29] Leung, D.Y.C., Wu, X. e Leung, M.K.H., 2009. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, doi:10.1016/j.apenergy.2009.10.006.
- [30] Costa Neto, P.R., 2002. *Obtenção de ésteres alquílicos (Biodiesel) por via Enzimática a partir do Óleo de Soja*. Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC, Florianópolis.
- [31] Wolff A., Baggio B., Antunes F., 2008. *Produção enzimática de biodiesel*, Centro Tecnológico – CTC, UFSC, Florianópolis.
- [32] ISTC., 2006. *Feasibility report, small scale biodiesel production*. In: Center IST, editor. Waste Management and Research Center.
- [33] Liu X, He H, Wang Y, Zhu S, Piao X., 2008. Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst. *Fuel*, 87: 216–221.
- [34] Rashid U, Anwar F., 2008. Production of biodiesel through optimized alkaline catalyzed transesterification of rapeseed oil. *Fuel*, 87: 265–273.

- [35] Rashid U, Anwar F, Moser BR, Ashraf S., 2008. Production of sunflower oil methyl esters by optimized alkali-catalyzed methanolysis. *Biomass Bioenergy*, 32: 1202–1205.
- [36] Patil PD, Deng S., 2009. Optimization of biodiesel production from edible and nonedible vegetable oils. *Fuel*, 88: 1302–1306.
- [37] Bhatti HN, Hanif MA, Qasim M, Aatur R., 2008. Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*, 87: 2961–6.
- [38] Bambase E., Nakamura N., Tanaka J., Matsumura M., 2007. Kinetics of hydroxide-catalyzed methanolysis of crude sunflower oil for the production of fuel-grade methyl esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 273–280.
- [39] Brandão, K. S. R., Silva, F. C., Louzeiro, H. C., Souza, A. G., Conceição, M. M., Moura, K. R. M., 2005. *Otimização do Processo de Produção de Biodiesel Metílico e Etilico de Babaçu*. Departamento de Química, UFMA, São Luís.
- [40] Campbell, M. K., 1995. *Biochemistry*, 2 th; USA; Saunders Publishing College.
- [41] Gandhi, N.N., Mukherjee, K.D., 2001. Synthesis of designer lipids using papaya latex lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 271-277.
- [42] Oliveira, A.C., Rosa M. F., Aires-Barros M. R., Cabral, J. M. S., 2001. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 999-1005.
- [43] Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V., 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 119: 291–299.
- [44] Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M.J., 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9: 113–148.
- [45] Castro H.F., Mendes A.A., Santos J.C., Aguiar C.L., 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27: 146-156.
- [46] Chang, H-M, Liao, H-F, Lee, C-C and Shieh, C-J, 2005. Optimized Synthesis of Lipase-Catalyzed Biodiesel by Novozym 435. *J. of Chem. Technol. Biotechnol.*, 80: 307-312.
- [47] Wu, W. H., Foglia, T. A., Marmer W. N. and Phillips, J. G., 1998. Optimizing Production of Ethyl Esters of Grease Using 95% Ethanol by Response Surface Methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (4): 517-521.
- [48] Ferreira, P.J., Sousa, H.S., Caetano, N.S., 2008. *Biodiesel production from vegetable frying oil and ethanol using enzymatic catalysis*. In: *Biomass and Bioenergy Conference*, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal.
- [49] Shah, S., Sharma, S. e Gupta, M.N., 2004. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil, *Energy Fuels*, 18: 154-159.
- [50] Shah, S. e Gupta, M.N., 2008. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. *Chemistry Central Journal*, 2:1.

- [51] Shieh, C.J. Liao, H.F. e Lee, C.C., 2003. Biodiesel Fuel Production by the Transesterification Reaction of Soybean Oil Using Immobilized Lipase, *Bioresour. Technol.*, 88: 103-106.
- [52] Du, W., Xu, Y.Y., Liu, D.H., Li, Z.B., 2005. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 37: 68–71.
- [53] Nelson, L.A., Fogolia, T.A., Marmer, W.N., 1996. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 1191-1195.
- [54] Belafi-Bako, K., Kovacs, F., Gubicza, L., Hancsok, J., 2002. Enzymatic Biodiesel Production from Sunflower Oil by *Candida antarctica* Lipase in a Solvent-free System. *J. Biocat. Biotransf.*, 20: 437-439.
- [55] Demirbas, A., 2006. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energy Conversion and Management*, 47: 2271–2282.
- [56] Freedman B., Pryde E.H. and Mounts T.L., 1984. Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. *J. American Oil Chemists Society*, 61 (10): 1638-1643.
- [57] Zheng S., Kates M., Dube M.A., Mclean D., 2006. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. *Biomass and Bioenergy*, 30: 267–272.
- [58] Jia Huey Sim, Azlina Harun, Subhash Bhatia, 2009. Effect of Mass Transfer and Enzyme Loading on the Biodiesel Yield and Reaction Rate in the Enzymatic Transesterification of Crude Palm Oil. *Energy Fuels*, 23 (9): 4651–4658.
- [59] Dantas, M.B., Conceição, M.M., Souza, A.G., Santos, I.M.G. e Silva, F.C., 2006. Obtenção de Biodiesel através da Transesterificação do Óleo de Milho: Conversão em Ésteres Etílicos e Caracterização Físico-Química. In: *I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel*, Brasília.
- [60] Leung DY, Guo Y., 2006. Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. *Fuel Process Technol.*, 87: 883–890.
- [61] Eevera T., Rajendran K., Saradha S., 2009. Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. *Renew Energy*, 34: 762–765.
- [62] Encinar JM, González JF, Rodríguez JJ, Tejedor A., 2002. Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol. *Energy Fuels*, 16: 443–450.
- [63] Silva C., 2005. *Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol*. Dissertação na área de Química Inorgânica, São Paulo.

## 5.1 Lista de Normas Consultadas

- EN 14214:2003 - Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods
- EN ISO 3675:1998 - Crude petroleum and liquid petroleum products - Laboratory determination of density - Hydrometer method
- EN ISO 3104:1994 - Petroleum products - Transparent and opaque liquids - Determination of Kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity
- EN ISO 12937:2003 - Produtos petrolíferos - Determinação de água - Método de titulação Karl Fischer por coulometria
- EN 14111:2003 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of iodine value
- EN 14104:2003 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of acid value
- EN 14108:2003 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of sodium content by atomic absorption spectrometry
- EN 14109:2003 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of potassium content by atomic absorption spectrometry
- EN ISO 2160:1998 - Petroleum products - Corrosiveness to copper - Copper strip test
- EN ISO 3679:2004 - Determination of flash point - Rapid equilibrium closed cup method
- NP EN 116:2002 - Produtos petrolíferos - Determinação da temperatura limite de filtrabilidade, CFPP
- EN 14103:2003 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents
- NP 961:1979 - Gorduras e óleos comestíveis - Óleo de girassol



## A. Anexos

### A.1. Caracterização do óleo

Nesta fase inicial serão apresentadas três tabelas referentes às características do óleo de milho usado, nomeadamente em termos de viscosidade cinemática, índice de acidez e número de iodo, sendo também apresentados os exemplos de cálculo.

Tabela A1. 1 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectiva viscosidade cinemática determinada para o óleo de milho.

Ensaio	Tempos de escoamento obtidos (s)	Tempo de escoamento médio obtido (s)	Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)
Óleo de milho	134; 133; 132	133	36,27

Exemplo de cálculo da viscosidade cinemática para o óleo de milho:

$$v = K \times (t - \vartheta)$$

$$v = 0,2727 \times (133 - 0) = 36,27 \text{ mm}^2 / s$$

Tabela A1. 2 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução de hidróxido de sódio gasto e índice de acidez determinada no óleo de milho.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume de solução de hidróxido de sódio gasto (mL)	Índice de acidez (mg KOH/g)
Óleo de milho	20,731	1,00	0,26

Exemplo de cálculo referente à determinação do índice de acidez para o óleo de milho, segundo a norma NP903:

$$\frac{\text{mg KOH}}{g} = \frac{56,1 \times C \times V}{m_{\text{amostra}}}$$

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56,1 \times 0,0963 \times 1,00}{20,731} = 0,26 \text{ mg KOH / g}$$

Tabela A1. 3 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinado no óleo de milho.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume da solução de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)	Número de iodo (g iodo/100g)
Óleo de milho	0,1506	30,7	130

Exemplo de cálculo referente à determinação do número de iodo para o óleo de milho:

$$\frac{\text{g iodo}}{100 \text{ g FAEE}} = \frac{12,69 \times C \times (V_1 - V_2)}{m_{\text{amostra}}}$$

$$\text{Número iodo} = \frac{12,69 \times 0,0985 \times (46,4 - 30,7)}{0,1506} = 130 \text{ g iodo/100g}$$

## A.2. Caracterização do biodiesel

### A.2.1. Caracterização do biodiesel obtido por via química

De seguida será feita referência aos resultados e determinações efectuadas no biodiesel produzido por via química, ou seja, às características apresentadas no biodiesel, para posterior avaliação sobre a sua qualidade.

Assim sendo, a Tabela A2. 1 mostra o rendimento de conversão do óleo em biodiesel, por via metanólica e etanólica usando como catalisador hidróxido de potássio, bem como as massas de óleo de milho e de hidróxido de potássio usadas em cada ensaio e a massa de biodiesel obtido no processo.

Tabela A2. 1 – Valores da massa de óleo de milho, de catalisador hidróxido de potássio usados por via metílica e etílica, bem como o rendimento de conversão do processo.

Ensaio	Álcool absoluto	Óleo de milho (g)	Massa de hidróxido de potássio (g)	Biodiesel obtido (g)	Rendimento da conversão do óleo (%)
1	Metanol	300,1	3,0321	249,2	83,0
2	Metanol	300,1	3,0979	229,3	76,4
3	Metanol	300,0	3,0364	273,2	91,1
4	Etanol	300,5	3,0467	234,0	77,9
5	Etanol	300,7	3,0613	176,8	58,8
6	Etanol	300,0	3,0155	229,7	76,6

Exemplo de cálculo do rendimento de conversão para o ensaio 1:

$$\text{Rendimento conversão} = \frac{m \text{ biodiesel}}{m \text{ óleo}} \times 100$$

$$\text{Rendimento conversão} = \frac{249,2}{300,1} \times 100 = 83,0\%$$

Seguidamente a Tabela A2. 2 e a Tabela A2. 3, apresentam os resultados obtidos para cada um dos parâmetros estudados no biodiesel produzido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.

Tabela A2. 2 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel (massa volúmica, viscosidade cinemática, teor de água, índice de iodo e número de acidez), por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.

Ensaio	Massa volúmica (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)	Teor de água (mg/kg)	Número de iodo (g <sub>iodo</sub> /100g <sub>amostra</sub> )	Índice de acidez (mg KOH/g)
1	881	4,67	1020	126	0,30
2	880	4,43	824	122	0,28
3	884	5,04	960	123	0,49
4	875	5,68	1415	120	2,08
5	877	6,27	1655	118	1,12
6	886	7,72	1890	116	1,28

Tabela A2. 3 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel (teor de potássio, teor de sódio, corrosão ao cobre, CFPP e ponto de inflamação), por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.

Ensaio	Teor de potássio (mg/kg)	Teor de sódio (mg/kg)	Corrosão ao cobre	CFPP (°C)	Ponto Inflamação (°C)
1	2,1	12,0	Classe 1	-8	>150
2	2,1	11,0	Classe 1	-7	>150
3	2,3	11,0	Classe 1	-----	>150
4	1,8	10,0	Classe 1	+4	>150
5	1,8	10,0	Classe 1	-----	>150
6	1,8	10,0	Classe 1	-----	>150
Valor Ref <sup>a</sup> EN 14214	Na+K ≤ 5,0		Classe 1		> 120

De seguida apresentam-se três tabelas correspondentes à viscosidade cinemática, índice de acidez e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador, bem como exemplos de cálculos realizados.

Tabela A2. 4 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.

Ensaio	Tempos de escoamento obtidos (s)	Tempo de escoamento médio obtido (s)	Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)
1	283; 282; 282	282,3	4,67
2	270; 266; 268	268,0	4,43
3	305; 304; 305	304,7	5,04
4	347; 346; 337	343,3	5,68
5	380; 378; 379	379,0	6,27
6	468; 466; 467	467,0	7,72

Exemplo de cálculo da viscosidade cinemática obtida para o ensaio 1:

$$v = K \times (t - v^0)$$

$$v = 0,01654 \times (282,3 - 0,03) = 4,67 \text{ mm}^2 / \text{s}$$

Tabela A2. 5 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume de solução de hidróxido de potássio gasto (mL)	Índice de acidez (mg KOH/g)
1	20,289	1,162	0,30
2	19,866	1,036	0,28
3	21,292	1,992	0,49
4	20,090	7,902	2,08
5	20,432	4,312	1,12
6	20,736	5,026	1,28

Exemplo de cálculo referente à determinação do índice de acidez para o ensaio 1:

A concentração da solução de hidróxido de potássio foi determinada da seguinte forma:

$$C' = \frac{1000 \times m_0}{122,1 \times V_0}$$

Sendo:

$m_0 = \text{massa de ácido benzóico usada (g)}$

$V_0 = \text{volume da solução de hidróxido potássio usada até ao ponto de equivalência (mL)}$

$$C' = \frac{1000 \times 0,15}{122,1 \times 13,012} = 0,0944 \text{ mol/L}$$

$$\frac{\text{mg KOH}}{\text{g}} = \frac{56,1 \times C' \times V}{m_{\text{amostra}}}$$

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56,1 \times 0,0944 \times 1,162}{20,289} = 0,30 \text{ mg KOH / g}$$

Tabela A2. 6 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via metílica e etílica, usando hidróxido de potássio como catalisador.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume da solução de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)	Número de iodo ( $\text{g}_{\text{iodo}}/100\text{g}_{\text{amostra}}$ )
1	0,1512	31,2	126
2	0,1321	33,5	122
3	0,1358	33,0	123
4	0,1306	33,9	120
5	0,1487	32,4	118
6	0,1434	33,1	116

Exemplo de cálculo referente à determinação do número de iodo para o ensaio 1:

$$\frac{\text{g iodo}}{100\text{g FAEE}} = \frac{12,69 \times C \times (V_1 - V_2)}{m_{\text{amostra}}}$$

Sendo que:

$V_1 = \text{volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada no ensaio do branco (mL)} = 46,4$

$C = \text{concentração exacta da solução padrão de tiosulfato de sódio usada (mol/L)} = 0,0985$

$$\text{Número iodo} = \frac{12,69 \times 0,0985 \times (46,4 - 31,2)}{0,1512} = 126 \text{ g iodo/100g}$$

### A.2.2. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática (1ª parte)

Nesta fase, testou-se a produção de FAEE a partir de etanol em diferentes purezas (70%, 96% e absoluto), e de uma enzima como catalisador, a Lipozyme TL IM.

A Tabela A2. 2 apresenta as condições experimentais usadas (pureza do etanol, razão molar álcool/óleo, razão mássica óleo/enzima, tempo de reacção e temperatura de reacção), na produção de FAEE por via enzimática usando etanol a 70, 96 e 100%.

Tabela A2. 7 – Condições estabelecidas no processo de produção de FAEE por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% e a 70% e Lipozyme TL IM como catalisador.

Condições	Ensaio					
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>
Pureza do Etanol	Absoluto	96%	70%	Absoluto	96%	70%
Razão molar álcool/óleo	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1	3:1
Razão mássica óleo/enzima	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1
Tempo de reacção (h)	24	24	24	48	48	48
Temperatura de reacção (°C)	35	35	35	35	35	35

Na tabela seguinte resumem-se as características do biodiesel obtido por via enzimática nas condições atrás mencionadas.

Tabela A2. 8 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel por via enzimática usando etanol absoluto, a 96% e a 70% e Lipozyme TL IM como catalisador.

Propriedade	Etanol absoluto		Etanol 96%		Etanol 70%	
	24 Horas	48 Horas	24 Horas	48 Horas	24 Horas	48 Horas
Massa volúmica (kg/m <sup>3</sup> )	888	892	890	890	892	897
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)	8,23	8,81	8,34	7,26	12,97	11,53
Teor de água (mg/kg)	1367	1960	2299	2437	3679	2721
Índice de iodo (g <sub>iodo</sub> /100g <sub>amostra</sub> )	85	88	88	88	86	89
Nº Acidez (mg KOH/g)	0,93	1,16	5,23	4,86	19,99	20,51
Rendimento da conversão do óleo (%)	90,96	87,96	94,00	85,00	74,81	70,96

Nas tabelas seguintes são apresentados os valores correspondentes ao rendimento, viscosidade cinemática, índice de acidez e número de iodo determinados no biodiesel obtido

por via enzimática, usando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador, nas condições atrás descritas.

Tabela A2. 9 – Valores da massa de óleo de milho, de massa de enzima, bem como o rendimento de conversão do processo obtido usando diferentes concentrações de etanol.

Ensaio	Óleo de milho (g)	Massa de enzima usada (g)	Biodiesel obtido (g)	Rendimento da conversão do óleo (%)
A <sub>1</sub>	200,1	5,7766	182	90,96
A <sub>2</sub>	200,0	5,6729	188	94,00
A <sub>3</sub>	200,5	5,7180	150	74,81
A <sub>4</sub>	200,1	5,6734	176	87,96
A <sub>5</sub>	200,0	5,6570	170	85,00
A <sub>6</sub>	200,1	5,7341	142	70,96

Tabela A2. 10 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

Ensaio	Tempos de escoamento obtidos (s)	Tempo de escoamento médio obtido (s)	Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)
A <sub>1</sub>	490; 502; 501	497,7	8,23
A <sub>2</sub>	509; 503; 501	504,3	8,34
A <sub>3</sub>	783; 782; 787	784,0	12,97
A <sub>4</sub>	537; 530; 531	532,7	8,81
A <sub>5</sub>	421; 476; 419	438,7	7,26
A <sub>6</sub>	695; 699; 697	697,0	11,53

Tabela A2. 11 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume de solução de hidróxido de potássio gasto (mL)	Índice de acidez (mg KOH/g)
A <sub>1</sub>	20,836	4,798	0,93
A <sub>2</sub>	19,848	25,708	5,23
A <sub>3</sub>	20,471	101,311	19,99
A <sub>4</sub>	19,795	5,660	1,16
A <sub>5</sub>	14,073	16,936	4,86
A <sub>6</sub>	19,959	101,332	20,51

Para a determinação do índice de acidez a concentração de hidróxido de potássio foi:

$$C_{KOH} = 0,0720 \text{ mol/L}$$

Tabela A2. 12 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto, a 96% e a 70%.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume da solução de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)	Número de iodo ( $g_{\text{iodo}}/100g_{\text{amostra}}$ )
A <sub>1</sub>	0,2129	20,2	85
A <sub>2</sub>	0,2066	20,1	88
A <sub>3</sub>	0,2105	20,3	86
A <sub>4</sub>	0,2087	20,1	88
A <sub>5</sub>	0,2062	20,2	88
A <sub>6</sub>	0,2073	19,9	89

Para a determinação do número de iodo foi usado:

$$V_1 = \text{volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada no ensaio do branco (mL)} = 34,5$$

$$C = \text{concentração exacta da solução padrão de tiosulfato de sódio usada (mol/L)} = 0,1001$$

### A.2.3. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática (2ª parte)

Após o estudo realizado anteriormente produziu-se, nesta fase do trabalho, FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo de reacção e a temperatura de reacção, sendo as condições dos ensaios as observadas na tabela seguinte.

Tabela A2. 13 – Condições estabelecidas no estudo do processo de produção de FAEE por via enzimática (Lipozyme TL IM) usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Condições	Ensaio						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>
Razão molar álcool/óleo	3:1	3:1	6:1	9:1	6:1	6:1	3:1
Razão mássica óleo/enzima	35,3:1	35,3:1	35,3:1	35,3:1	42,8:1	30:1	35,3:1
Tempo de reacção (h)	8	12	12	12	12	12	12
Temperatura de reacção (°C)	35	35	35	35	35	35	45

Exemplo de cálculo da determinação do volume de etanol absoluto a usar para razão molar álcool/óleo de 3:1

$$n_{\text{óleo}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{MM_{\text{óleo}}} = \frac{200}{874,8} = 0,2286 \text{ mol}$$

$$n_{\text{álcool}} = 0,2286 \times 3 = 0,6859 \text{ mol}$$

$$m_{\text{álcool}} = n_{\text{álcool}} \times MM_{\text{álcool}} = 0,6859 \times 46,07 = 31,5981 \text{ g}$$

$$V_{\text{álcool}} = \frac{m_{\text{álcool}}}{\rho_{\text{álcool}}} = \frac{31,5981}{0,7890} = 40,05 \text{ mL}$$

Exemplo de cálculo da determinação do volume de etanol absoluto a usar para razão molar álcool/óleo de 6:1

$$n_{\text{óleo}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{MM_{\text{óleo}}} = \frac{200}{874,8} = 0,2286 \text{ mol}$$

$$n_{\text{álcool}} = 0,2286 \times 6 = 1,3717 \text{ mol}$$

$$m_{\text{álcool}} = n_{\text{álcool}} \times MM_{\text{álcool}} = 1,3717 \times 46,07 = 63,1962 \text{ g}$$

$$V_{\text{álcool}} = \frac{m_{\text{álcool}}}{\rho_{\text{álcool}}} = \frac{63,1962}{0,7890} = 80,10 \text{ mL}$$

Exemplo de cálculo da determinação do volume de etanol absoluto a usar para razão molar álcool/óleo de 9:1

$$n_{\text{óleo}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{MM_{\text{óleo}}} = \frac{200}{874,8} = 0,2286 \text{ mol}$$

$$n_{\text{álcool}} = 0,2286 \times 9 = 2,0576 \text{ mol}$$

$$m_{\text{álcool}} = n_{\text{álcool}} \times MM_{\text{álcool}} = 2,0576 \times 46,07 = 94,7942 \text{ g}$$

$$V_{\text{álcool}} = \frac{m_{\text{álcool}}}{\rho_{\text{álcool}}} = \frac{94,7942}{0,7890} = 120,15 \text{ mL}$$

Exemplo de cálculo da determinação da massa de enzima para uma razão mássica óleo/enzima 30:1

$$m_{\text{enzima}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{\text{razão mássica}} = \frac{200}{30} = 6,67 \text{ g}$$

Exemplo de cálculo da determinação da massa de enzima para uma razão mássica óleo/enzima 35,3:1

$$m_{\text{enzima}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{\text{razão mássica}} = \frac{200}{35,3} = 5,67 \text{ g}$$

Exemplo de cálculo da determinação da massa de enzima para uma razão mássica óleo/enzima 42,8:1

$$m_{enzima} = \frac{m_{\text{óleo}}}{\text{razão mássica}} = \frac{200}{42,8} = 4,67 \text{ g}$$

De seguida apresenta-se uma tabela onde se resumem as características do biodiesel obtido por via enzimática nas condições acima mencionadas.

Tabela A2. 14 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Propriedade	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>
Massa volúmica (kg/m <sup>3</sup> )	889	890	890	890	892	890	892
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)	12,57	8,95	9,15	13,18	10,45	8,09	9,03
Teor de água (mg/kg)	558	962	1966	1637	388	8297	6844
Índice de iodo (g <sub>iodo</sub> /100g <sub>amostra</sub> )	102	104	92	99	96	102	102
Nº Acidez (mg KOH/g)	0,98	0,90	0,60	0,52	0,54	0,76	1,09
Rendimento da conversão do óleo (%)	73,46	95,30	98,95	94,60	84,00	87,50	83,55

Apresentam-se de seguida quatro tabelas correspondentes ao rendimento obtido, viscosidade cinemática, índice de acidez e número de iodo determinados no biodiesel produzido por via enzimática, usando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador e etanol absoluto, nas condições acima descritas.

Tabela A2. 15 – Valores da massa de óleo de milho, de massa de enzima, bem como o rendimento de conversão do processo por via enzimática usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Ensaio	Óleo de milho (g)	Massa de enzima usada (g)	Biodiesel obtido (g)	Rendimento da conversão do óleo (%)
B <sub>1</sub>	200,1	5,6426	147,0	73,46
B <sub>2</sub>	200,0	5,6708	190,6	95,30
B <sub>3</sub>	200,0	5,6646	197,9	98,95
B <sub>4</sub>	200,0	5,6782	189,2	94,60
B <sub>5</sub>	200,0	4,6823	168,0	84,00
B <sub>6</sub>	200,0	6,6783	175,0	87,50
B <sub>7</sub>	200,0	5,6874	167,1	83,55

Tabela A2. 16 – Valores do tempo de escoamento obtidos e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Ensaio	Tempos de escoamento obtidos (s)	Tempo de escoamento médio obtido (s)	Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)
B <sub>1</sub>	761; 760; 759	760,0	12,57
B <sub>2</sub>	540; 542; 542	541,3	8,95
B <sub>3</sub>	553; 552; 555	553,3	9,15
B <sub>4</sub>	797; 796; 798	797,0	13,18
B <sub>5</sub>	631; 631; 633	631,7	10,45
B <sub>6</sub>	489; 490; 488	489,0	8,09
B <sub>7</sub>	548; 544; 546	546,0	9,03

Tabela A2. 17 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume de solução de hidróxido de potássio gasto (mL)	Índice de acidez (mg KOH/g)
B <sub>1</sub>	21,9258	4,174	0,98
B <sub>2</sub>	21,9020	3,828	0,90
B <sub>3</sub>	19,0405	2,204	0,60
B <sub>4</sub>	21,1442	2,126	0,52
B <sub>5</sub>	20,5389	2,154	0,54
B <sub>6</sub>	21,3480	3,160	0,76
B <sub>7</sub>	21,7278	4,622	1,09

Para a determinação do índice de acidez, a concentração de hidróxido de potássio foi:

$$C_{KOH} = 0,0917 \text{ mol/L}$$

Tabela A2. 18 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando etanol absoluto e variando a razão molar álcool/óleo, a razão mássica óleo/enzima, o tempo e a temperatura de reacção.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume da solução de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)	Número de iodo ( $\text{g}_{\text{iodo}}/100\text{g}_{\text{amostra}}$ )
B <sub>1</sub>	0,1968	30,6	102
B <sub>2</sub>	0,2120	29,0	104
B <sub>3</sub>	0,1823	33,2	92
B <sub>4</sub>	0,2047	30,4	99
B <sub>5</sub>	0,1983	31,4	96
B <sub>6</sub>	0,2126	29,3	102
B <sub>7</sub>	0,2095	29,6	102

Para a determinação do número de iodo foi usado:

$V_1 = \text{volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada no ensaio do branco (mL)} = 46,5$

$C = \text{concentração exacta da solução padrão de tiosulfato de sódio usada (mol/L)} = 0,0992$

#### A.2.4. Caracterização do biodiesel obtido por via enzimática (3ª parte)

Na fase final do trabalho, após determinação das condições óptimas na gama de condições testadas, foi feita a produção de biodiesel por via enzimática, efectuando-se a reutilização de enzima Lipozyme TL IM, segundo as condições mencionadas na tabela seguinte.

Tabela A2. 19 – Condições utilizadas no processo de produção de FAEE por via enzimática efectuando reutilizações da enzima.

Condições usadas	
Pureza do álcool	Etanol absoluto
Enzima	Lipozyme TL IM
Razão molar álcool/óleo	6:1
Razão mássica óleo/enzima	35,3:1
Tempo de reacção (h)	12
Temperatura de reacção (°C)	35

De seguida serão apresentadas duas tabelas onde se resumem as características do biodiesel obtido por via enzimática nas condições anteriormente mencionadas.

Tabela A2. 20 – Valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel obtido por via enzimática, usando várias reutilizações da enzima.

Propriedade	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub> '	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>1</sub> ''	R <sub>2</sub> ''	R <sub>3</sub> ''	R <sub>1</sub> '''	R <sub>2</sub> '''	R <sub>3</sub> '''	R <sub>1</sub> ''''	R <sub>2</sub> ''''	R <sub>3</sub> ''''
Poder calorífico (MJ/kg)	40,4	40,4	40,4	40,1	40,2	40,2	40,0	40,1	40,0	40,0	40,0	39,9	39,9	39,7	39,9
Massa volúmica (kg/m <sup>3</sup> )	890	890	890	890	892	890	894	896	892	900	896	902	904	912	908
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)	10,82	10,63	10,18	21,00	18,00	21,93	22,91	24,54	25,09	25,63	27,27	26,72	27,96	27,54	27,86
Teor de água (mg/kg)	1964	1930	1974	1645	1754	1638	1400	1700	1600	1700	1100	900	956	800	854
Índice de iodo (g <sub>iodo</sub> /100g <sub>amostra</sub> )	91	91	92	92	91	92	92	91	92	111	112	113	128	119	125
Nº Acidez (mg KOH/g)	0,62	0,67	0,64	0,64	0,67	0,72	0,96	1,11	1,07	1,24	1,27	1,23	1,65	1,62	1,53
Corrosão ao cobre	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1	Classe 1
Ponto Inflamação (°C)	>190	>190	>190	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150
Rendimento conversão do óleo (%)	90,79	93,70	96,65	87,60	85,95	91,60	87,72	84,15	80,56	85,80	76,93	77,57	71,90	70,75	69,87

Tabela A2. 21 – Média dos valores obtidos relativos aos parâmetros de caracterização do biodiesel obtido por via enzimática, usando várias reutilizações da enzima.

	R	R'	R''	R'''	R''''
Rendimento conversão do óleo (%)	93,7	88,4	84,1	80,1	70,8
Poder calorífico (MJ/kg)	40,4	40,2	40,0	40,0	39,8
Massa volúmica (kg/m <sup>3</sup> )	890	891	894	899	908
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)	10,54	20,31	24,18	26,54	27,79
Teor de água (mg/kg)	1956	1679	1567	1233	870
Índice de iodo (g <sub>iodo</sub> /100g <sub>amostra</sub> )	91	92	92	112	124
Teor de esteres % (m/m)	70,4	67,4	66,9	66,3	56,8

Apresentam-se de seguida cinco tabelas correspondentes ao rendimento do processo, viscosidade cinemática, índice de acidez, número de iodo e teor de ésteres determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador e etanol absoluto, e efectuando-se as sucessivas reutilizações da enzima.

Tabela A2. 22 – Valores da massa de óleo de milho, de massa de enzima, bem como o rendimento de conversão do processo por via enzimática usando sucessivas reutilizações.

Ensaio	Óleo de milho (g)	Massa de enzima usada (g)	Biodiesel obtido (g)	Rendimento da conversão do óleo (%)
R <sub>1</sub>	200,0	5,6812	181,6	90,8
R <sub>2</sub>	199,9	5,6746	187,3	93,7
R <sub>3</sub>	200,0	5,6786	193,3	96,6
R <sub>1</sub> '	200,3	5,6487	175,5	87,6
R <sub>2</sub> '	200,7	5,6553	172,5	85,9
R <sub>3</sub> '	200,2	5,6587	183,4	91,6
R <sub>1</sub> ''	201,9	5,5745	177,1	87,7
R <sub>2</sub> ''	201,6	5,5843	169,6	84,1
R <sub>3</sub> ''	202,2	5,5598	162,9	80,6
R <sub>1</sub> '''	200,0	5,4797	171,6	85,8
R <sub>2</sub> '''	200,0	5,4776	153,9	76,9
R <sub>3</sub> '''	200,0	5,4943	155,1	77,6
R <sub>1</sub> ''''	200,0	5,3665	143,8	71,9
R <sub>2</sub> ''''	200,0	5,3716	141,5	70,7
R <sub>3</sub> ''''	200,0	5,3724	139,7	69,9

Tabela A2. 23 – Valores do tempo de escoamento médio obtido e respectivas viscosidades cinemáticas determinadas no biodiesel obtido por via enzimática usando sucessivas reutilizações.

<b>Ensaio</b>	<b>Tempo de escoamento médio obtido (s)</b>	<b>Viscosidade cinemática (mm<sup>2</sup>/s)</b>
R <sub>1</sub>	39,67	10,82
R <sub>2</sub>	38,98	10,63
R <sub>3</sub>	37,33	10,18
R <sub>1</sub> '	77,01	21,00
R <sub>2</sub> '	66,01	18,00
R <sub>3</sub> '	80,42	21,93
R <sub>1</sub> ''	84,01	22,91
R <sub>2</sub> ''	89,99	24,54
R <sub>3</sub> ''	92,01	25,09
R <sub>1</sub> '''	93,99	25,63
R <sub>2</sub> '''	100,00	27,27
R <sub>3</sub> '''	97,98	26,72
R <sub>1</sub> ''''	102,53	27,96
R <sub>2</sub> ''''	100,99	27,54
R <sub>3</sub> ''''	102,16	27,86

Sendo que na determinação da viscosidade cinemática foi usado um viscosímetro capilar com uma constante de calibração de:

$$K = 0,2727 \text{ mm}^2 / \text{s}^2$$

Tabela A2. 24 – Valores da massa de amostra usada, volume de solução gasto de hidróxido de potássio e índice de acidez determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando sucessivas reutilizações.

Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume de solução de hidróxido de potássio gasto (mL)	Índice de acidez (mg KOH/g)
R <sub>1</sub>	20,2843	2,392	0,62
R <sub>2</sub>	20,5348	2,618	0,67
R <sub>3</sub>	20,1034	2,446	0,64
R <sub>1</sub> '	19,9843	2,433	0,64
R <sub>2</sub> '	21,0345	2,683	0,67
R <sub>3</sub> '	20,4954	2,810	0,72
R <sub>1</sub> ''	20,4392	3,728	0,96
R <sub>2</sub> ''	20,3946	4,309	1,11
R <sub>3</sub> ''	20,1834	4,106	1,07
R <sub>1</sub> '''	20,7432	4,887	1,24
R <sub>2</sub> '''	20,1844	4,877	1,27
R <sub>3</sub> '''	20,1746	4,726	1,23
R <sub>1</sub> ''''	20,1263	6,305	1,65
R <sub>2</sub> ''''	19,9237	6,136	1,62
R <sub>3</sub> ''''	19,9151	5,789	1,53

Para a determinação do índice de acidez a concentração de hidróxido de potássio foi:

$$C_{KOH} = 0,0938 \text{ mol / L}$$

Tabela A2. 25 – Valores da massa de amostra usada, volume gasto de solução de tiosulfato de sódio e número de iodo determinados no biodiesel obtido por via enzimática, usando sucessivas reutilizações.

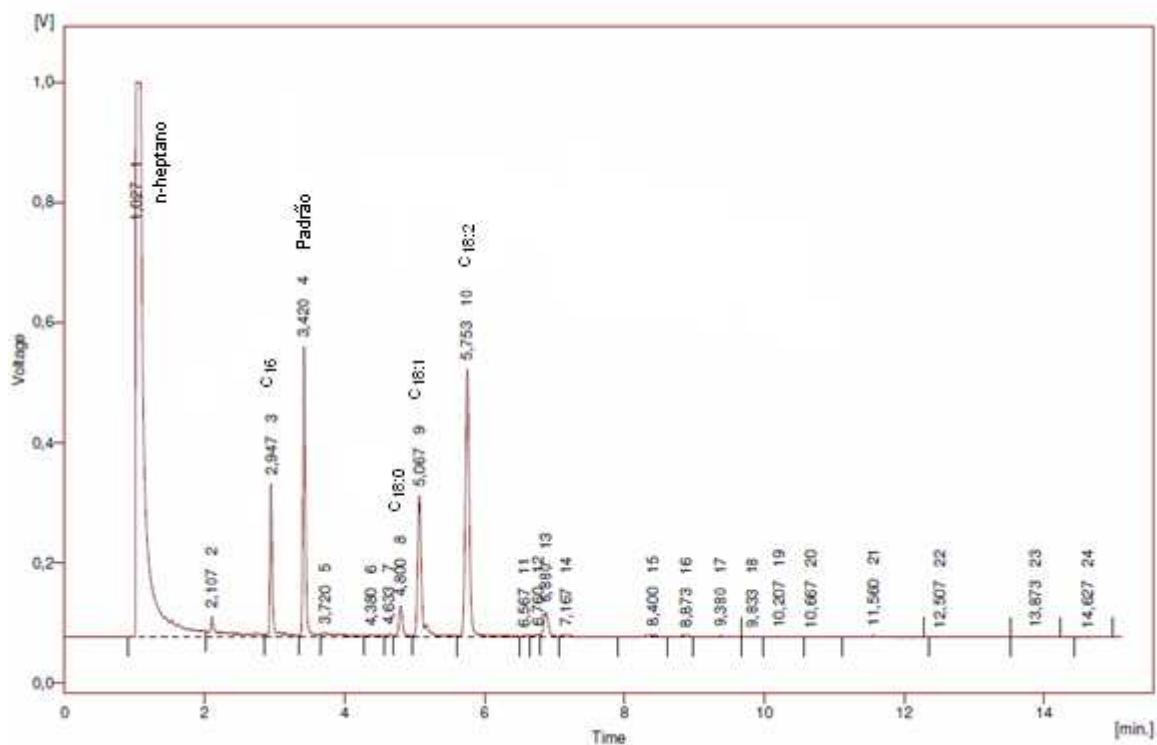
Ensaio	Massa de amostra pesada (g)	Volume da solução de tiosulfato de sódio usada na amostra a titular (mL)	Número de iodo ( $\text{g}_{\text{iodo}}/100\text{g}_{\text{amostra}}$ )
R <sub>1</sub>	0,1976	29,1	91
R <sub>2</sub>	0,2047	28,6	91
R <sub>3</sub>	0,1988	29,0	92
R <sub>1</sub> '	0,2013	28,8	92
R <sub>2</sub> '	0,2115	28,1	91
R <sub>3</sub> '	0,2135	27,9	92
R <sub>1</sub> ''	0,1998	28,9	92
R <sub>2</sub> ''	0,1991	29,0	91
R <sub>3</sub> ''	0,1993	28,9	92
R <sub>1</sub> '''	0,1988	25,9	111
R <sub>2</sub> '''	0,2016	25,5	112
R <sub>3</sub> '''	0,2100	24,7	113
R <sub>1</sub> ''''	0,2021	23,0	128
R <sub>2</sub> ''''	0,1989	24,6	119
R <sub>3</sub> ''''	0,2004	23,6	125

Para a determinação do número de iodo foi usado:

$V_1$  = volume da solução padrão de tiosulfato de sódio usada no ensaio do branco (mL) = 43,4

$C$  = concentração exacta da solução padrão de tiosulfato de sódio usada (mol/L) = 0,0996

De seguida são apresentados os cromatogramas referentes à determinação do teor de ésteres para as várias amostras analisadas.



Result Table - Calculation Method Uncal

Reten. Time	Area [mV.s]	Height [mV]	Area % [%]	Height % [%]	W05 [min]
1,027	7856,772	922,733	57,5	36,9	0,11
2,107	324,255	33,287	2,4	1,3	0,04
2,947	662,178	254,643	4,8	10,2	0,04
3,420	1208,089	482,965	8,8	19,3	0,04
3,720	122,213	5,877	0,9	0,2	0,35
4,380	32,444	2,589	0,2	0,1	0,29
4,633	22,634	4,868	0,2	0,2	0,07
4,800	195,554	51,454	1,4	2,1	0,06
5,067	956,740	235,318	7,0	9,4	0,06
5,753	1824,353	445,790	13,3	17,8	0,07
6,567	9,020	1,143	0,1	0,0	0,15
6,760	18,596	3,834	0,1	0,2	0,08
6,880	197,308	41,134	1,4	1,6	0,08
7,167	45,006	2,647	0,3	0,1	0,11
8,400	40,159	3,103	0,3	0,1	0,13
8,873	21,768	1,997	0,2	0,1	0,13
9,380	25,992	1,141	0,2	0,0	0,25
9,833	7,864	0,603	0,1	0,0	0,27
10,207	15,616	0,790	0,1	0,0	0,29
10,667	13,272	0,660	0,1	0,0	0,08
11,560	26,042	3,199	0,2	0,1	0,03
12,507	17,755	0,541	0,1	0,0	0,17
13,873	15,586	1,045	0,1	0,0	0,18
14,627	11,193	0,858	0,1	0,0	0,19
Total	13670,411	2502,221	100,0	100,0	

Figura A2. 1 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra em que se usou enzima “fresca”.

Exemplo de cálculo da determinação de ésteres para esta situação:

$$C_{\text{Ésteres}} = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$$

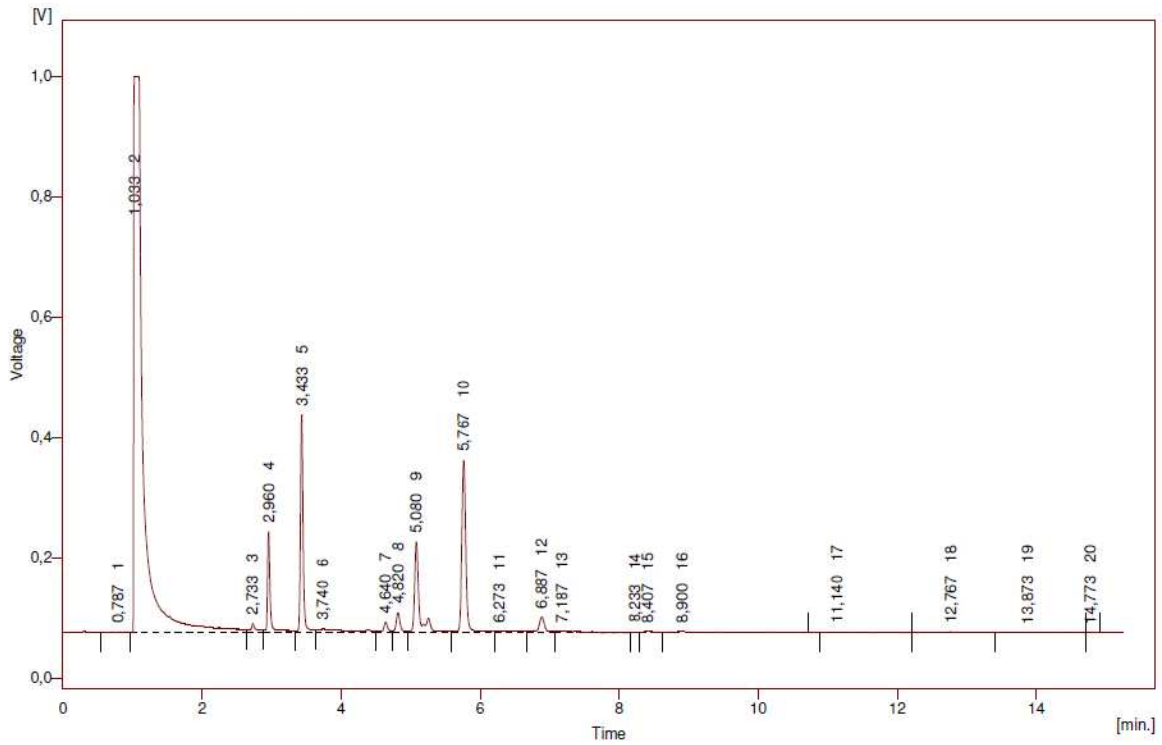
Em que:

$$C_{EI} = \frac{\text{massa metil heptadecanoato}}{V_{\text{solução metil heptadecanoato}}} = \frac{494,5}{50} = 9,89 \text{ (mg / mL)}$$

$$V_{EI} = 2 \text{ (mL)}$$

$$m = 107,1 \text{ (mg)}$$

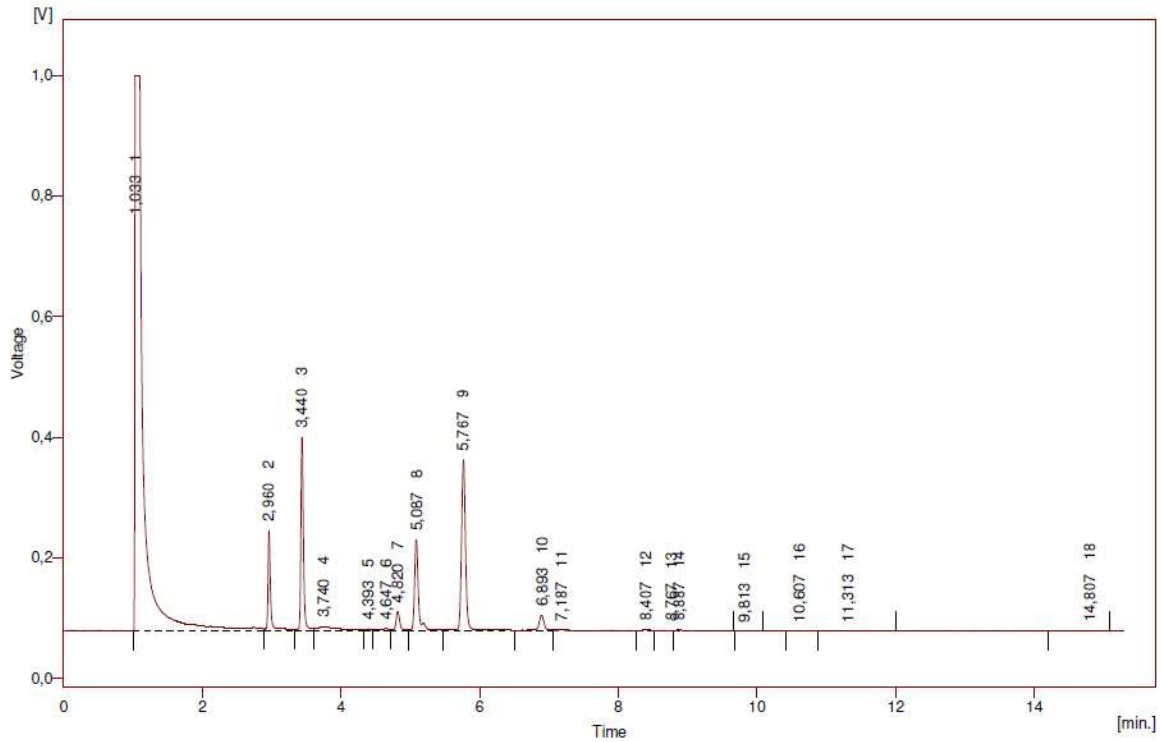
$$C_{\text{Ésteres}} = \frac{(13670,411 - 7856,772) - 1208,089}{1208,089} \times \frac{9,89 \times 2}{107,1} \times 100\% = 70,41\%$$



Result Table - Calculation Method Uncal

Reten. Time	Area [mV.s]	Height [mV]	Area % [%]	Height % [%]	W05 [min]
0,787	8,804	0,604	0,1	0,0	0,15
1,033	8577,349	923,721	67,0	46,2	0,11
2,733	83,401	14,875	0,7	0,7	0,05
2,960	467,936	167,324	3,7	8,4	0,04
3,433	954,140	361,750	7,5	18,1	0,04
3,740	176,972	5,671	1,4	0,3	0,42
4,640	80,603	17,218	0,6	0,3	0,06
4,820	134,181	32,866	1,0	1,6	0,07
5,080	708,014	150,745	5,5	7,5	0,06
5,767	1172,376	285,909	9,2	14,3	0,07
6,273	41,896	2,244	0,3	0,1	0,46
6,887	151,513	25,879	1,2	1,3	0,08
7,187	73,018	2,220	0,6	0,1	0,24
8,233	6,650	1,074	0,1	0,1	0,13
8,407	22,860	2,108	0,2	0,1	0,15
8,900	66,736	1,733	0,5	0,1	0,20
11,140	19,405	0,536	0,2	0,0	0,25
12,767	26,198	1,326	0,2	0,1	0,05
13,873	26,097	0,707	0,2	0,0	0,23
14,773	2,600	0,352	0,0	0,0	0,09
Total	12800,749	1998,863	100,0	100,0	

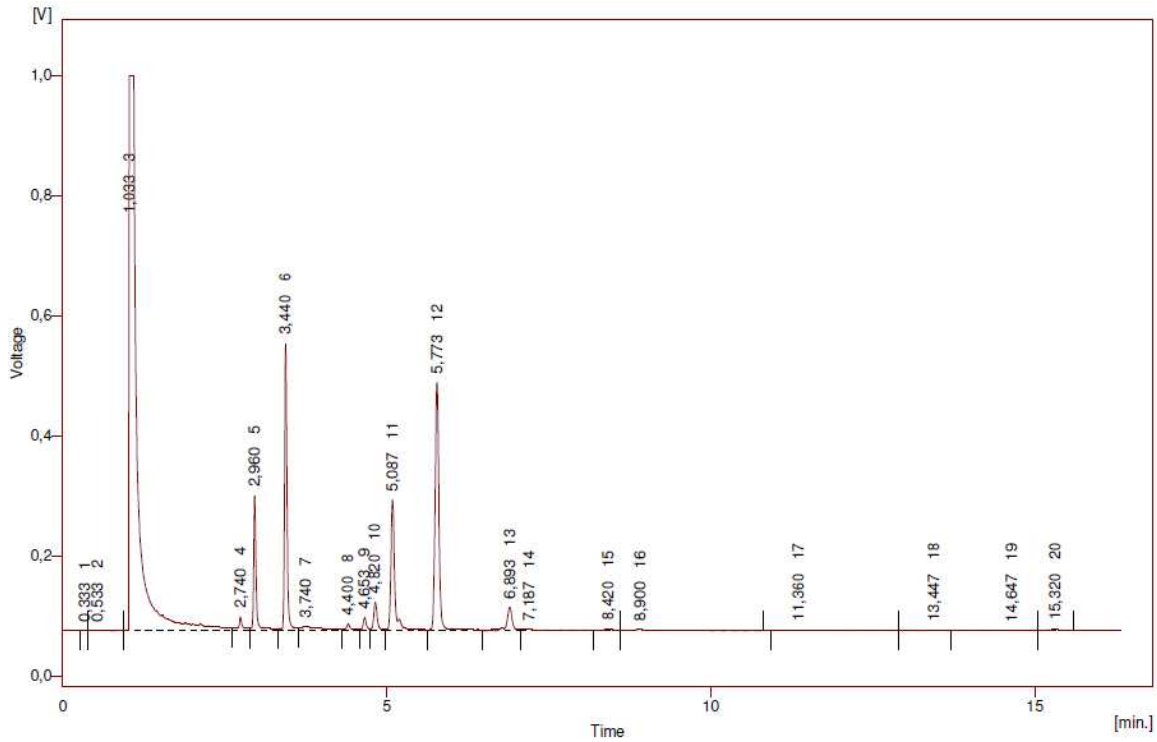
Figura A2. 2 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à primeira reutilização da enzima.



Result Table - Calculation Method Uncal

Reten. Time	Area [mV.s]	Height [mV]	Area % [%]	Height % [%]	W05 [min]
1,033	7886,508	920,613	68,8	48,0	0,11
2,960	427,346	165,507	3,7	8,6	0,04
3,440	618,901	320,641	7,1	16,7	0,05
3,740	146,972	6,698	1,3	0,3	0,33
4,393	14,348	2,598	0,1	0,1	0,13
4,647	28,493	3,687	0,2	0,2	0,07
4,820	121,608	31,851	1,1	1,7	0,06
5,087	587,481	150,774	5,1	7,9	0,06
5,767	1153,690	283,248	10,1	14,8	0,07
6,893	146,101	25,884	1,3	1,3	0,07
7,187	46,363	1,810	0,4	0,1	0,15
8,407	12,801	1,847	0,1	0,1	0,10
8,767	7,725	0,673	0,1	0,0	0,25
8,887	21,307	1,164	0,2	0,1	0,15
9,813	6,307	0,419	0,1	0,0	0,08
10,607	10,004	0,533	0,1	0,0	0,29
11,313	17,107	0,472	0,1	0,0	0,26
14,807	11,859	0,378	0,1	0,0	0,11
Total	11464,920	1918,796	100,0	100,0	

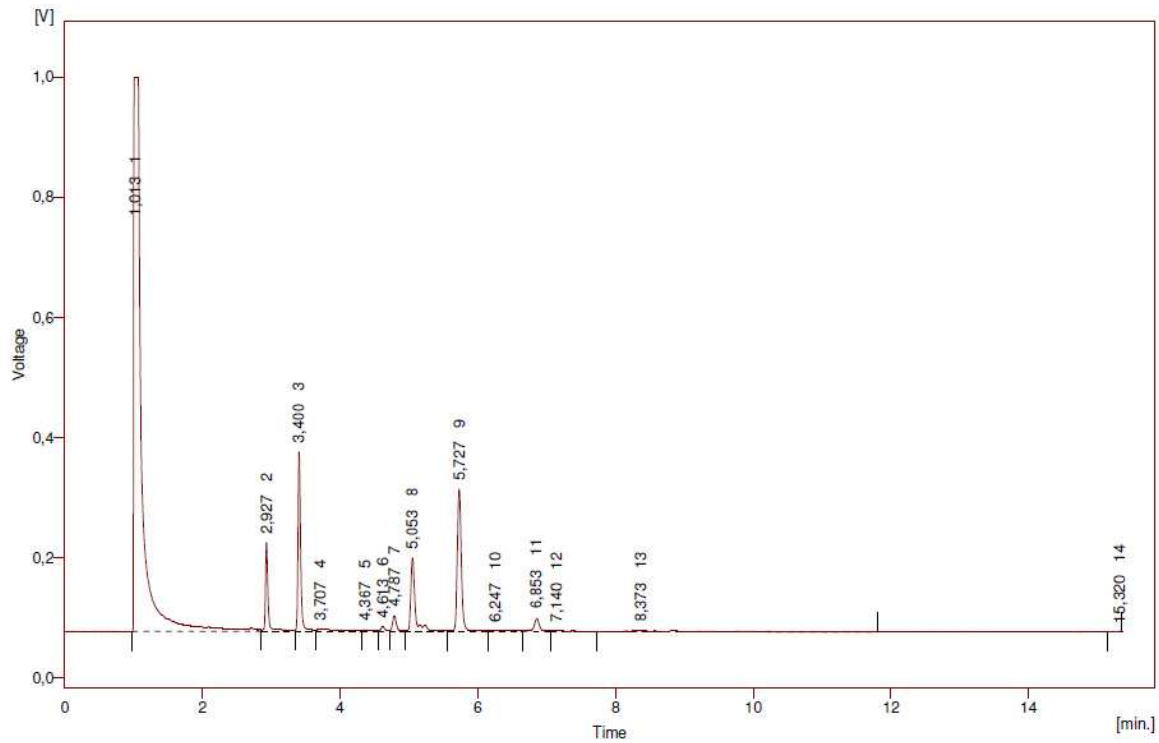
Figura A2. 3 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à segunda reutilização da enzima.



Result Table - Calculation Method Uncal

Reten. Time	Area [mV.s]	Height [mV]	Area % [%]	Height % [%]	W05 [min]
0,333	1,066	0,256	0,0	0,0	0,07
0,533	5,823	0,438	0,0	0,0	0,07
1,033	8232,924	924,430	59,7	38,3	0,11
2,740	105,961	22,991	0,8	1,0	0,04
2,960	613,970	224,471	4,5	9,3	0,04
3,440	1262,861	477,708	9,2	19,8	0,05
3,740	154,681	7,021	1,1	0,3	0,37
4,400	57,187	10,287	0,4	0,4	0,06
4,653	78,042	20,519	0,6	0,8	0,06
4,820	182,169	47,182	1,3	2,0	0,06
5,087	903,053	216,938	6,5	9,0	0,06
5,773	1722,261	412,933	12,5	17,1	0,07
6,893	227,659	38,743	1,7	1,6	0,08
7,187	61,322	2,595	0,4	0,1	0,15
8,420	22,684	2,551	0,2	0,1	0,10
8,900	61,671	1,662	0,4	0,1	0,16
11,360	35,210	0,872	0,3	0,0	0,15
13,447	15,273	0,897	0,1	0,0	0,21
14,647	24,969	0,552	0,2	0,0	0,21
15,320	20,918	1,545	0,2	0,1	0,23
Total	13789,704	2414,593	100,0	100,0	

Figura A2. 4 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à terceira reutilização da enzima.



Result Table - Calculation Method Uncal

Reten. Time	Area [mV.s]	Height [mV]	Area % [%]	Height % [%]	W05 [min]
1,013	7448,205	921,679	69,2	51,3	0,10
2,927	397,494	147,708	3,7	8,2	0,04
3,400	783,059	298,978	7,3	16,6	0,05
3,707	91,802	3,616	0,9	0,2	0,37
4,367	24,970	2,789	0,2	0,2	0,12
4,613	35,524	8,240	0,3	0,5	0,06
4,787	104,870	26,153	1,0	1,5	0,07
5,053	550,186	122,440	5,1	6,8	0,06
5,727	974,911	236,754	9,1	13,2	0,07
6,247	29,452	1,500	0,3	0,1	0,29
6,853	129,580	21,887	1,2	1,2	0,08
7,140	34,960	1,764	0,3	0,1	0,16
8,373	157,183	2,007	1,5	0,1	0,15
15,320	2,349	0,240	0,0	0,0	0,03
Total	10764,544	1795,754	100,0	100,0	

Figura A2. 5 – Cromatograma referente à determinação de ésteres obtido para a amostra correspondente à quarta reutilização da enzima.

### A.3. Custos laboratoriais de produção do biodiesel por via enzimática

Inicialmente começou-se por efectuar uma estimativa dos custos de produção de FAEE nas condições optimizadas (para reutilização da enzima), ou seja, em termos energéticos, consumo de água e de reagentes necessários (excluindo custos com mão-de-obra ou amortização de equipamentos), sendo que nesta fase se produziu por cada ensaio 0,19 L de biodiesel e/ou 2,8 L no total. Assim sendo, nas tabelas seguintes resumem-se esses custos.

Tabela A3. 1 – Consumo energético dos equipamentos e respectivos custos usados na produção de FAEE por via enzimática.

Etapa	Equipamento	Potencia (kW)	Tempo de operação (horas/ensaio)	Consumo (kW.h)	Custo/ensaio (€)	Nº de ensaios	Custo Total (€)
Reacção	Resistência	1,05	12	12,60	1,260	5	6,3000
	Placa de agitação multiposições	0,65	12	7,80	0,780	5	3,9000
Condensação	Manta de aquecimento	0,275	0,25	0,07	0,007	15	0,0344
Filtração do biodiesel	Bomba de vácuo	0,22	0,5	0,11	0,011	15	0,0550
Filtração na lavagem da enzima	Bomba de vácuo	0,22	0,08	0,02	0,002	12	0,0092
Filtração na lavagem com terra diatomáceas	Bomba de vácuo	0,22	0,25	0,06	0,006	15	0,0275
<b>Total</b>					<b>2,06</b>		<b>10,33</b>

Tabela A3. 2 – Custos de reagentes e material consumidos na produção de FAEE por via enzimática.

Reagentes/material	Preço	Quantidade/ensaio	Custo/ensaio (€)	Nº de utilizações	Custo Total (€)
Óleo	2,49 €/L	0,217 L	0,5413	15	8,1196
Enzima	88,1 €/kg	0,006 kg	0,4995	3	1,4984
Etanol absoluto	7,2 €/L	0,080 L	0,5760	15	8,6400
Glicerina	2,5 €/L	0,059 L	0,1487	15	2,2298
Terra de diatomáceas	25,2 €/kg	0,002 kg	0,0504	15	0,7560
Álcool isopropílico	3 €/L	0,040 L	0,1200	12	1,4400
Papel de filtro	0,03 €/filtro	3 filtros	0,0900	14	1,2600
<b>Total</b>			<b>2,03</b>		<b>23,94</b>

Tabela A3. 3 – Consumo de água e respectivos custos determinados na produção de FAEE por via enzimática.

Coluna condensação	Caudal de água (m <sup>3</sup> /s)	Tempo operação (s)	Volume (m <sup>3</sup> )	Preço da água (€/m <sup>3</sup> )	Custo da água/ensaio (€)	Nº ensaios	Custo total (€)
	1,71×10 <sup>-5</sup>	900	0,0154	2,2	0,0339	15	0,5090
Tina de reacção	Volume água (m <sup>3</sup> )			Preço da água (€/m <sup>3</sup> )	Custo da água/ensaio (€)	Nº ensaios	Custo total (€)
	0,0064			2,2	0,0140	5	0,0702
<b>Total</b>					<b>0,05</b>		<b>0,58</b>

Exemplo de cálculo para determinação do volume de água necessária na etapa da condensação e na tina para a reacção de transesterificação:

$$V_{coluna} = Caudal \times T_{operação} = 1,71 \times 10^{-5} \times 900 = 0,0154 \text{ m}^3$$

$$V_{tina} = Altura_{H_2O} \times Largura \times Comprimento = 7 \times 30 \times 30,4 = 0,0064 \text{ m}^3$$

#### A.4. Custos laboratoriais referentes à caracterização do biodiesel obtido por via enzimática

De seguida será dado especial destaque aos custos energéticos e custos de consumo de reagentes na fase de caracterização do biodiesel. As tabelas que se seguem são exemplo disso.

Tabela A4. 1 – Reagentes usados na determinação do número de iodo e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações.

Reagentes	Preço	Quantidade/ensaio	Custo/ensaio (€)	Nº utilizações	Custo Total (€)
Ciclohexano	11,52 €/L	20 mL	0,2304	16	3,6864
Ácido acético	5,38 €/L	20 mL	0,1075	16	1,7203
Reagente Wijs	32,77 €/L	25 mL	0,8193	16	13,1088
Iodeto de potássio	52,80 €/kg	20 mL de solução 100 g/L correspondente a 2 g de iodeto de potássio	0,1056	16	1,6896
Água desionizada	0,24 €/L	150 mL	0,0360	16	0,5760
Tiosulfato de sódio	15,59 €/kg	30 mL de solução 0,1 mol/L correspondente a 0,75g de tiosulfato de sódio	0,0117	16	0,1871
<b>Total</b>			<b>1,31</b>		<b>20,97</b>

Exemplo de cálculo do custo total do reagente tiosulfato de sódio usado na determinação do número de iodo:

Como a solução de tiosulfato de sódio é de 0,1 mol/L e usou-se 30 mL para cada ensaio pode-se determinar qual foi a massa de tiosulfato de sódio usada para cada ensaio. Assim, vem:

$$Quantidade / ensaio = C_{solução} \times V_{solução} \times MM_{tiosulfato} = 0,1 \times 0,03 \times 248,18 = 0,75 \text{ g}$$

De seguida determina-se o custo/ensaio, bem como o custo total:

$$Custo / ensaio = 0,75 \times 0,01559 = 0,0117 \text{ €/ensaio}$$

$$\text{Custo total} = 0,0117 \times N^{\circ} \text{ ensaios} = 0,0117 \times 16 = 0,1871 \text{ €}$$

Tabela A4. 2 – Reagentes usados na determinação do índice de acidez e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações.

Reagentes	Preço	Quantidade/ensaio	Custo/ensaio (€)	Nº utilizações	Custo Total (€)
Éter diétilico	9,22 €/L	50 mL	0,4608	15	6,9120
Etanol 96%	3,12 €/L	50 mL	0,1560	15	2,3400
Ácido benzóico	10,88 €/kg	0,15 g	0,0016	1	0,0016
Hidróxido de potássio	8,16 €/kg	5 mL de solução 0,1 mol/L correspondente a 0,028 g de hidróxido de potássio	0,0002	15	0,0034
<b>Total</b>			<b>0,62</b>		<b>9,26</b>

Tabela A4. 3 – Reagentes usados na determinação do poder calorífico e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações.

Reagente	Preço	Quantidade/ensaio	Custo/ensaio (€)	Custo Total (€)
Água desionizada	0,24 €/L	2 L	0,4800	7,2000
<b>Total</b>			<b>0,48</b>	<b>7,20</b>

Tabela A4. 4 – Reagentes usados na determinação do teor de água e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações.

Reagentes Karl Fischer	Preço	Quantidade/ensaio	Custo/ensaio (€)	Nº utilizações	Custo Total (€)
Solvente RH	49,12 €/L	25 mL	1,2281	1	1,2281
Titrante 5	70,56 €/L	5 mL	0,3528	15	5,2920
<b>Total</b>			<b>1,58</b>		<b>6,52</b>

Tabela A4. 5 – Reagentes usados na determinação do teor de ésteres e respectivas quantidades por ensaio, bem como custos das suas utilizações.

Reagente	Preço	Quantidade/ensaio	Custo/ensaio (€)	Custo Total (€)
Metil heptadecanoato	0,48 €/mg	2 mL de uma solução correspondente a 20 mg de metil heptadecanoato	9,5616	47,8080
<b>Total</b>			<b>9,56</b>	<b>47,81</b>

Exemplo de cálculo do custo total do reagente metil heptadecanoato usado na determinação do teor de ésteres:

Como a solução de metil heptadecanoato é de 10 mg/mL e usou-se 2 mL para cada ensaio,

pode-se determinar qual foi a massa de metil heptadecanoato usada para cada ensaio. Assim, vem:

$$\text{Quantidade / ensaio} = 10 \times 2 = 20 \text{ mg}$$

De seguida determina-se o custo/ensaio, bem como o custo total:

$$\text{Custo / ensaio} = 20 \times 0,48 = 9,56 \text{ €/ensaio}$$

$$\text{Custo total} = 9,56 \times N^{\circ} \text{ ensaios} = 9,56 \times 5 = 47,81 \text{ €}$$

Tabela A4. 6 – Consumo energético dos equipamentos e respectivos custos usados na caracterização do biodiesel.

Equipamento	Potencia (kW)	Tempo de operação (horas/ensaio)	Consumo (kW.h)	Custo/ensaio (€)	Nº ensaios	Custo Total (€)
Doseador 715 Dosimat	0,0150	0,0833	0,0013	0,0001	15	0,0019
Coulómetro Karl Fischer	0,0150	0,0833	0,0013	0,0001	15	0,0019
Equipamento corrosão ao cobre	1,6100	3,0000	4,8300	0,4830	1	0,4830
Thermomix BM	2,1000	0,0833	0,1750	0,0175	15	0,2625
Equipamento ponto de inflamação (Rapid Tester S.3)	0,4600	0,1667	0,0767	0,0077	15	0,1150
GC 1000 DPC	2,3000	0,5000	1,1500	0,1150	5	0,5750
Bomba calorimétrica	0,0345	0,5000	0,0173	0,0017	15	0,0259
Calorímetro	0,1150	0,5000	0,0575	0,0058	15	0,0863
<b>Total</b>				<b>0,63</b>		<b>1,55</b>

Exemplo de cálculo do consumo energético e custo energético total para o GC 1000 DPC:

$$\text{Consumo energético} = \text{Potência} \times T_{\text{operação}} = 2,3 \times 0,5 = 1,15 \text{ KW.h}$$

$$\text{Custo energético} = 1,15 \text{ KW.h} \times 0,10 \text{ €/KW.h} = 0,115 \text{ €/ensaio}$$

$$\text{Custo energético total} = 0,115 \text{ €/ensaio} \times 5 \text{ ensaios} = 0,575 \text{ €}$$



### A.5. Características da enzima Lipozyme TL IM

- Identificação da substância/preparação

Nome do produto – Lipozyme TL IM

Nome Químico – Preparação enzimática

Utilização da substância / Preparação – Os preparados de enzimas da Novozymes são biocatalisadores utilizados numa diversidade de processos industriais do fabrico de alimentos

- Características do produto

Classe da enzima – Lipase

Actividade declarada – 250 IUN/g

Cor – Castanho claro

Forma física – Imobilizado Granulado

Densidade aproximada (g / ml) – 1,00

Organismo de produção – *Aspergillus oryzae*

Organismo dador – *Thermomyces lanuginosus*

Produzido por fermentação submersa de um microrganismo modificado geneticamente.

- Especificações do produto

	Limite Inferior	Limite Superior
Unidades Interestificação IUN (/g)	250	
Perdas por secagem 105 °C (%)	-	8,0
Fracção em peneiro de 16 mesh (%)	-	3,0
Fracção através de peneiro 48 mesh (%)	-	20
Contagem viável total (/g)	-	50000
Bactéria Coliforme (/g)	-	30
Enteropathogenic E.Coli (/25g)		não detectado
Salmonella (/25g)		não detectado

- Manuseamento e armazenagem

#### Manuseamento

Evitar a formação de pó e aerossóis

#### Assegurar ventilação adequada

Este produto está formulado para impedir a formação de poeiras. Porém, o manuseamento incorrecto pode liberar poeiras.

#### Armazenagem

Manter hermeticamente fechado em local seco e fresco. Temperatura 0-10°C (32°F-50°F)

- Considerações relativas à eliminação

Resíduos de desperdícios/produto não utilizado – Dispor em observação das definições da autoridade responsável local

Embalagens contaminadas – Destruição dos resíduos nas indústrias aprovadas de destruição dos resíduos

Outras Informações – Os códigos dos resíduos devem ser atribuídos pelo utilizador baseando-se na aplicação para a qual o produto foi utilizado

- Informação sobre regulamentação

Classificação e etiquetagem de acordo com a Directiva 1999/45/CEE.

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de tipo alimentar atribuídas pelo Comité Misto da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) e o Códex de Químicos Alimentares (Food Chemical Codex - FCC).