

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**ASPECTOS OPERACIONAIS DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE
ÓLEO DE COCO BRUTO EM REATORES UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA
EM SÍLICA MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO**

Autora: Juliana Lisboa Santana

Orientadores: Prof^ª. Dra. Cleide Mara Faria Soares.

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima.

ARACAJU-SE, BRASIL

FEVEREIRO DE 2016

ASPECTOS OPERACIONAIS DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE COCO BRUTO EM REATORES UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM SÍLICA MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO

Juliana Lisboa Santana

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovada por:

Prof.^a Dr.^a Cleide Mara Faria Soares (UNIT)
Orientadora

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima (UNIT)
Orientador

Dr.^a Maria Elisabete Machado (IQ/UFRGS)
Membro

Prof.^a Dr.^a Eliane Bezerra Cavalcanti (PEP/UNIT)
Membro

Prof.^a Dr.^a Rebeca Y. C. Padilla (PEP/UNIT)
Membro

ARACAJU, SE – BRASIL

FEVEREIRO DE 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

- S231a Santana, Juliana Lisboa
Aspectos operacionais da reação de transesterificação de óleo de coco bruto em reatores utilizando lipase imobilizada em sílica modificada com líquido iônico prótico. / Juliana Lisboa Santana ; orientação [de] Prof^a. Dr^a. Cleide Mara Faria Soares ; Prof. Dr. Álvaro Silva Lima , . – Aracaju: UNIT, 2016.
102 p: il.
- Dissertação (Mestrado de Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2016.
Inclui bibliografia.
- 1.Reator PBR. 2. Transesterificação enzimática. 3. Líquido iônico. I. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.) II. Lima, Álvaro Silva (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 665.353.6

Ficha catalográfica: Rosângela Soares de Jesus CRB/5 1701

*Este trabalho dedico aos pais, Newton e
Jeane, que sempre estiveram ao meu
lado, apoiando e principalmente
acreditando em mim.*

*“Se a gente não pensar que quer sempre mais, fatalmente
terá sempre menos. O homem só fracassa quando desiste
de tentar: todos os dias eu me levanto para vencer.”*
(Aristóteles)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela vida, sempre presente ao meu lado, protegendo-me a cada dia.

Aos meus pais, Newton e Jeane, pelo amor incondicional e educação que me foi proporcionada, obrigada pela confiança depositada.

Ao meu irmão, Junior, pelo apoio e amor. E a todos os meus familiares que torceram e torcem por mim, pelos momentos de alegrias e por auxiliarem na minha educação.

Ao Edmundo pelo amor, confiança, incentivo e paciência nos momentos difíceis, ao longo de todos estes anos juntos, obrigada pela oportunidade de crescermos juntos.

Aos meus orientadores Cleide Soares e Álvaro Lima pelos ensinamentos, paciência, dedicação, carinho, oportunidade, obrigada pela confiança no meu trabalho.

Aos professores do PEP pelo ensinamento compartilhado. Em especial a prof^a Eliane Bezerra por todo carinho, paciência e sabedoria passada a mim.

As amigas que o mestrado me apresentou, Gabrielle e Marília, obrigada por todas as nossas conversas, conselhos, risadas, companheirismo, amizade.

Aos meus companheiros de laboratório pelas gargalhadas, alegria, companheirismo, brincadeiras e por tornarem os meus dias mais felizes. Todos de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais essa etapa. Em especial a Nayara, Adriana e Andreia pela amizade, confiança e toda a ajuda.

As minhas alunas de iniciação científica, Juliana e Jamily, por toda ajuda, sem vocês a conclusão desta etapa teria sido mais difícil.

A UNIT e ITP pelo apoio e estrutura proporcionada.

A CAPES e FAPITEC pelo auxílio financeiro.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

Juliana Lisboa Santana

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

ASPECTOS OPERACIONAIS DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE COCO BRUTO EM REATORES UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM SÍLICA MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO

Juliana Lisboa Santana

Os biocatalisadores imobilizados podem ser aplicados em diferentes tipos de reatores, destacando o reator de leito de fixo (PBR), pela possibilidade de reutilização da enzima e a razão entre o substrato e enzima ser mais baixa do que nos reatores bateladas. A transesterificação enzimática é o processo mais viável para produção de ésteres etílicos, porém o maior desafio é a viabilidade econômica, desta forma a utilização de matérias-primas de baixo custo, tais como os óleos brutos, é de fundamental importância. A utilização do óleo de coco bruto na reação de transesterificação é promissora, uma vez que é produzido em larga escala no nordeste brasileiro. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de coco bruto e etanol, utilizando lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte de sílica modificada com líquido iônico prótico (LIP) em reator de fluxo contínuo, avaliando a influência do LIP na distribuição do tempo de residência (DTR) e na transferência de massa. Na DTR a influência do LIP foi notado o aumento do tempo médio de residência, 14,94 para 25,76 min, respectivamente sílica controle e sílica modificada. O aumento na DTR devido a modificação da sílica com LIP indicou o potencial do uso da lipase imobilizada em sílica em reator PBR. A influência do LIP na modificação da sílica também foi positiva na transferência de massa, aumentando o coeficiente de transferência de massa, consequentemente aumentando o efeito de difusão do substrato no biocatalisador imobilizado. Na reação de transesterificação do óleo de coco bruto e etanol, foram avaliados os parâmetros reacionais, temperatura e razão molar, para o reator batelada e o reator PBR, e a vazão volumétrica para o reator PBR. A máxima conversão de ésteres etílicos foi quando utilizado o biocatalisador imobilizado em sílica modificada com LIP, tanto para o reator de leito fixo de $42 \pm 1,62$ % para $52 \pm 1,75$ % (40 °C, razão molar 1:7 e vazão volumétrica 0,15 mL/min) quanto para o reator batelada de $60 \pm 0,92$ % para $72 \pm 1,01$ % (40 °C e razão molar 1:10).

Palavras-chave: Reator PBR, transesterificação enzimática, líquido iônico.

Abstract of the dissertation presented to the Process Engineering graduate program of University Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

OPERATIONAL ASPECTS OF TRANSESTERIFICATION REACTION CRUDE
COCONUT OIL IN REACTORS USING IMMOBILIZED LIPASE IN SILICA MODIFIED
WITH PROTIC IONIC LIQUID

Juliana Lisboa Santana

The immobilized biocatalysts can be applied in different types of reactors highlighting the fixed bed reactor (PBR), for the possibility of reuse of the enzyme and the ratio between substrate and enzyme is lower than in batch reactors. The enzymatic transesterification is the most viable process for ethyl esters production, but the biggest challenge is the economic viability, so the use of low cost raw materials such as crude oil, is of fundamental importance. The use of crude coconut oil in the transesterification reaction is promising, since it produced on a large scale in the Brazilian northeast. Thus, the objective of this work was the synthesis of ethyl esters from crude coconut oil and ethanol, using lipase *Burkholderia cepacia* immobilized on silica support modified with protic ionic liquid (PIL) in PBR reactor, evaluating the influence of PIL in residence time distribution (RTD) and mass transfer. In the RDT is PIL influence was voted the increase in the mean residence time, 14.94 to 25.76 min, respectively silica control and modified silica. The increase in RTD due to the modification of silica with PIL indicated the potential use of the immobilized lipase on silica PBR reactor. The effect of PIL on silica modification was also positive in mass transfer by increasing the mass transfer coefficient, increasing the diffusion effect between the substrate and the immobilized biocatalyst. In the transesterification reaction the crude coconut oil and ethanol were evaluated the reactional parameters, temperature and molar ratio, for the batch reactor and the reactor PBR, and the volumetric flow rate to the PBR reactor. The maximum conversion of ethyl esters was used as the biocatalyst immobilized on silica modified with LIP for both the fixed bed reactor, of $42 \pm 1,62$ % of $52 \pm 1,75$ % (40 °C, molar ratio 1:7, flow rate $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), to the batch reactor, of 60 ± 0.92 % for 72 ± 1.01 % (40 °C and molar ratio 1:10).

Keywords: PBR reactor, enzymatic transesterification, ionic liquid.

Sumário

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	1
---------------------------	----------

CAPÍTULO II

2. OBJETIVO	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos específicos	4

CAPÍTULO III

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Biodiesel.....	5
3.2. Principais matérias-primas para produção de biodiesel.....	7
3.2.1. Óleos vegetais.....	7
3.2.1.1. Óleo de coco.....	9
3.2.2. Álcool.....	10
3.3. Produção de biodiesel por transesterificação	11
3.4. Biorreatores	13
3.4.1. Reator de tanque agitado	13
3.4.2. Reator de fluxo contínuo	14
3.4.2.1. Distribuição de Tempo de Residência	18
3.5. Biocatálise	19
3.5.1. Lipases	21
3.5.2. Enzimas Imobilizadas.....	22
3.6. Suporte de imobilização	24
3.7. Métodos de imobilização	26
3.8. Aditivos: Líquidos Iônicos.....	27

CAPÍTULO IV

ARTIGO I	32
ARTIGO II.....	63

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES.....	80
------------------------	-----------

CAPÍTULO VI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
---	-----------

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS	83
--------------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Produção de biodiesel na União Europeia.....	6
Figura 2: Produção de biodiesel no Estados Unidos.	6
Figura 3: Produção de biodiesel no Brasil..	7
Figura 4: Matérias-primas utilizadas na reação de transesterificação com vista a produção de biodiesel no Brasil.....	8
Figura 5: Processo da reação de transesterificação para a produção de biodiesel.	12
Figura 6: Reator de leito fixo simples.....	15
Figura 7: Reator de tanque agitado em fluxo contínuo e reator de leito fixo em série..	16
Figura 8: Reator de leito fixo em série.....	17
Figura 9: Reator reator de leito fixo com reciclo..	18
Figura 10: Publicações entre os anos de 2000-2013 encontrados na Web of Science utilizando o termo “biodiesel e lipase”.....	21
Figura 11: Principais técnicas de imobilização de enzimas.	26

ARTIGO I

Figure 1. Experimental apparatus of the system for transesterification reaction. (1a) Thermostatic bath to 313 K; (1b) Thermostatic bath to 288 K; (2) Peristaltic pump; (3) Magnetic stirrer; (4) Substrate reservoir; (5) Condenser; (6) PBR.....	39
Figure 2. Conversion ethyl esters in the time between 24 - 96 h at 313 K, molar ratio 1:7 and flow rate $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, for BCL on control silica and BCL on modified silica.....	44
Figure 3. Determination of dye concentration versus time for control silica and modified silica.....	46
Figure 4. Comparison between the curves of the DTR with the theoretical curves for control silica or modified silica.....	48
Figure 5. Mass transfer coefficient versus temperature of the reaction. Constituted by BCL on control silica or BCL on modified silica, in the conditions flow rate of $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and molar ratio of 1:7 (coconut oil and ethanol).....	50
Figure 6. Mass transfer coeficiente versus flow rate of the reaction. Constituted by BCL on control silica or BCL on modified silica, in the follows conditions: 303 K and molar ratio 1:7 (coconut oil : ethanol).....	52

Figure S.1. Concentration versus absorbance of the tracer.....	59
---	----

ARTIGO II

Fig. 1. Schematic design of the PBR reactor. (1) Peristaltic pump; (2) Heating plate; (3) Recipient containing substrate; (4) Condenser; (5) PBR reactor; (6) Thermostatic bath.....	69
---	----

Fig. 2. Conversion to ethyl esters using BCL on silica modified with PIL, in stirred tank batch reactor and PBR reactor. Follows conditions: 40 °C, flow rate 0.15 mL.min ⁻¹ and time 72 h constant and varying molar ratio.....	72
--	----

Fig. 3. Conversion to ethyl esters utilizando using IB silica modified with PIL, in batch reactor, with molar ratio 1:10 constant and PBR reactor, with molar ratio 1:7, flow rate 0.15 mL.min ⁻¹ and time 72 h constant, ranging temperature.....	73
--	----

Fig. 4. Conversion to ethyl esters in transesterification reaction using coconut oil and BCL on silica modified with PIL in PBR reactor, with molar ratio 1:7, time 72 h and temperature 40 °C constant, ranging flow rate.....	75
--	----

Fig. 5. Reuse BCL on silica modified with LIP for 4 days in transesterification reaction using coconut oil:ethanol, at temperature 40 °C, flow rate 0.15 mL min ⁻¹ and molar ratio 1: 7.....	76
--	----

LISTA DE TABELA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Teor de óleo em algumas oleaginosas cultivadas no Brasil.....	9
Tabela 2: Composição de ácido graxo do óleo de coco.....	10
Tabela 3: Principais vantagens e desvantagens da reação de transesterificação de óleos vegetais com vista a obtenção de biodiesel.....	12
Tabela 4: Comparação da catálise básica, ácida e enzimática.....	20
Tabela 5: Lipases imobilizadas comercialmente utilizadas na produção de biodiesel.....	23
Tabela 6: Origem, vantagens e desvantagens dos suportes para imobilização.	25

ARTIGO I

Table I: Parameters to determine the mass transfer coefficient.....	43
Table II: Three moments of RTD control silica and silica modified with LIP.....	46
Table III: Mass transfer coefficient varying the molar ratio of substrate.....	51
Tabela S.1. Dimensionless numbers in function the temperature the reaction, constituted by BCL on control silica (IB control) and BCL on modified silica (IB modified silica), with flow rate and molar ratio constant.....	60
Tabela S.2. Dimensionless numbers in function the flow rate the reaction, constituted by BCL control silica (control silica) and BCL on modified silica (IB modified silica), with temperature and molar ratio constant.....	61
Tabela S.3. Dimensionless numbers in function the molar ratio the reaction, constituted by , constituted by BCL on control silica (IB control) and BCL on modified silica (IB modified silica), with flow rate and temperature constant.....	62

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

A tendência mundial de desenvolvimento de tecnologias sustentáveis tem contribuído para o surgimento da química verde, que dirigiu pesquisa mundial para o desenvolvimento de processos industriais novos, melhores e sustentáveis. Dentre estes processos, os biocombustíveis são considerados uma alternativa sustentável em substituição aos combustíveis fósseis (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Uma das alternativas na obtenção de biocombustíveis, é o estudo de rotas alternativas, tais como, na reação de transesterificação, que ocorre entre um óleo vegetal e etanol para produzir ésteres etílicos. A indústria de biocombustível se torna economicamente viável, quando está associada ao uso de matérias-primas de baixo custo.

O Brasil possui diversidade edafoclimática em todo o seu território, garantindo o cultivo e produção de várias culturas, tais como soja, girassol, coco, entre outros (CREMONEZ, *et al.*, 2015). Entretanto, os óleos vegetais comestíveis possuem elevado custo, desta forma, a busca por óleos vegetais não comestíveis, brutos e residuais, torna o processo de transesterificação economicamente viável (DEKA e BASUMATARY *et al.*, 2011). A utilização do óleo de coco bruto é uma alternativa para obter uma produção de baixo custo, por ser produzido em larga escala no nordeste brasileiro e não ser refinado. Além de aumentar a velocidade da reação de síntese de ésteres etílicos, por ter na sua composição, principalmente, ácido láurico (GUARTE *et al.*, 1996; TUPUFIA *et al.*, 2013). Frequentemente o álcool mais utilizado é o metanol na produção de ésteres etílicos, pelo seu baixo valor, entretanto o etanol também é utilizado, porém em menor proporção, apesar do mesmo ser menos tóxico e ser considerado mais renovável, como também ter uma boa produção no nordeste brasileiro, tornando o processo economicamente viável (YUSUF, *et al.* 2011).

A transesterificação de óleos vegetais ocorre na presença de um catalisador químico (ácido ou básico) ou enzimático. O catalisador enzimático apresenta diversas vantagens sobre o catalisador químico, entre elas a recuperação do produto final e a utilização de temperaturas moderadas (GULDHE *et al.*, 2015). As vantagens das rotas por via enzimática referem-se a possibilidade da introdução de processos ecologicamente compatíveis e sustentáveis, enquanto a principal desvantagem é ainda o elevado custo das enzimas. A recuperação da enzima, o melhoramento na estabilidade operacional é importante, desta forma, a imobilização da enzima

se tornou um sistema alternativo para a realização de uma produção em escala industrial com maior produtividade (LOTTI *et al.*, 2015; ES *et al.*, 2015).

A utilização da lipase imobilizada na transesterificação se dá pelo fato de atuarem em condições brandas e por apresentarem pequena produção de subprodutos (ZHAO *et al.*, 2015). Porém em alguns métodos utilizados para a imobilização da enzima pode ocorrer a desnaturação da mesma, e uma alternativa para que isso não ocorra é a utilização de aditivos afim de proteger a configuração da enzima proporcionando uma melhora na estabilidade da enzima. Alguns dos biocatalisadores imobilizados com maior eficiência catalítica descritos na literatura, são obtidos por meio da modificação física, química e morfológica dos suportes, a partir do uso de aditivos. O desenvolvimento destes suportes para a imobilização proporciona melhora na estabilidade operacional em processos contínuos e descontínuos em diversos estudos, desta forma desperta-se o interesse industrial destes biocatalisadores imobilizados em suportes modificados com o uso de diferentes aditivos (CARVALHO *et al.*, 2015a).

Desde 2000 até o momento, resultados promissores são descritos na literatura quando utilizada a sílica modificada como suporte na reação de transesterificação de 1,3 % para 46,5 % (SOUZA *et al.*, 2013) e de 51,9 % para 98,69 % (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Nos primeiros estudos foram verificados efeitos positivos e negativos na modificação da superfície da sílica com uso de polietilenoglicol (PEG), compostos de poli-hidroxil, albumina, gelatina, sorbitol, glicerol ou triacilgliceróis (CARVALHO *et al.*, 2015a). A partir destes resultados descritos na literatura podemos afirmar a necessidade da continuidade de estudos relacionados ao uso de diferentes aditivos em processos contínuos, além dos já estabelecidos em batelada. E também deve-se verificar o potencial do óleo de coco bruto nas reações de transesterificação. O grupo de pesquisa em biocatálise da Pós-Graduação de Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes (UNIT) desenvolve trabalhos relacionados a produção de biodiesel em reatores operando em regime batelada em processo convencional e não convencional, utilizando o óleo de babaçu, entretanto ainda não foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica modificada com líquido iônico prótico em processo contínuo. O sistema contínuo oferece maiores vantagens técnicas em relação ao sistema batelada, uma das alternativas para a aplicação de novos biocatalisadores modificados com líquido iônico é o controle dos parâmetros reacionais, no reator sistema contínuo, utilizados na produção de ésteres etílicos com vista a produção de biodiesel. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar o uso de lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por ligação covalente em sílica modificada com líquido

iônico prótico em reator batelada e reator de leito fixo na reação de transesterificação do óleo de coco bruto e etanol com vistas a obtenção de biodiesel.

Capítulo II

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os aspectos operacionais da reação de transesterificação de óleo de coco bruto e etanol em reator de tanque agitado e leito fixo utilizando lipase imobilizada em suporte mesoporoso de sílica modificado com líquido iônico prótico na síntese de ésteres etílicos com vistas a obtenção de biodiesel.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a distribuição do tempo de residência (DTR) no reator de leito fixo para a sílica controle e a sílica modificada com o líquido iônico prótico;
- ✓ Avaliar a transferência de massa na reação de transesterificação em reator de leito fixo;
- ✓ Avaliar os parâmetros reacionais (temperatura, vazão volumétrica e razão molar) da reação de transesterificação para reator de tanque agitado e leito fixo;
- ✓ Avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados para a produção de ésteres etílicos em reator de leito fixo, e;
- ✓ Comparar os aspectos operacionais da reação de transesterificação em reator de tanque agitado e leito fixo.

Capítulo III

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os principais temas relacionados ao trabalho desenvolvido. Inicialmente será realizada uma breve abordagem sobre o cenário do biodiesel, em seguida suas principais matérias-primas e o processo de produção pela reação de transesterificação. Além das principais configurações de reatores utilizados e o processo de produção via catálise enzimática.

3.1. Biodiesel

O biodiesel (ésteres etílicos ou metílicos) é um combustível alternativo produzidos quimicamente por reação entre um óleo vegetal com um álcool. De acordo com o Programa Nacional de Proteção e Uso do Biodiesel (PNPB), o biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. Quando estimulados por um catalisador, reage quimicamente com álcool. As Resoluções nº 7/08, 14/12, 45/14, da Agência Nacional de Petróleo (ANP) define o biodiesel como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da reação de transesterificação e ou/esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico, parte integrante destas Resoluções.

A principal vantagem na utilização do biodiesel é a menor emissão de gases causadores do efeito estufa, como o enxofre, em comparação com o que acontece com diesel de petróleo, os valores diminuem em 50% na produção de monóxido de carbono e 60% de fuligem, menos toxicidade e isenção de enxofre. Ao mesmo tempo, a ausência de enxofre reduz a viscosidade do produto a níveis compatíveis com o parâmetro padrão (CREMONEZ *et al.*, 2015). A Europa se tornou o principal mercado produtor de biodiesel no mundo. Na Figura 1, observa-se um crescimento progressivo na produção do biodiesel, dando destaque a Alemanha, que sempre manteve-se como um grande produtor de biodiesel, seguido da França, Espanha, Itália, percebendo que a partir de 2008, a diferença de produção entre a Alemanha e os outros países

diminuíram e a partir de 2001, houve uma pequena queda na sua produção de biodiesel em toda a Europa.

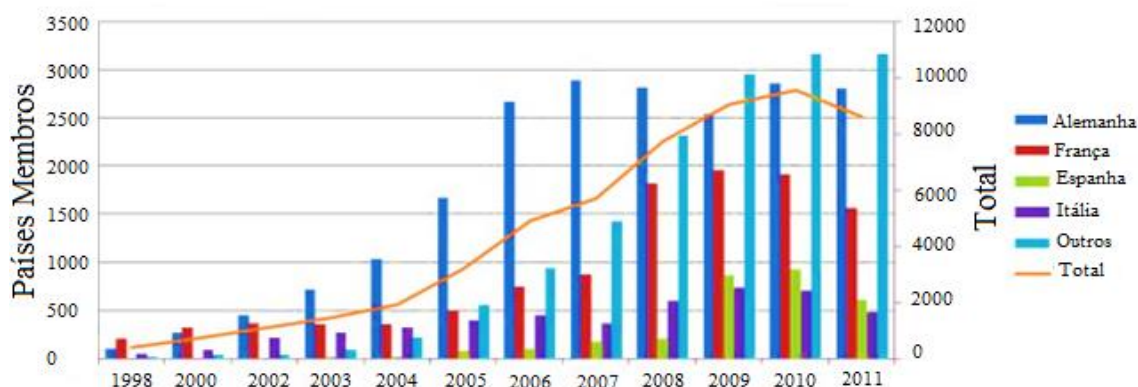


Figura 1: Produção de biodiesel na União Europeia. Adaptado de EBB, 2014

Nos Estados Unidos, a produção de biodiesel destacou-se pela sua crescente evolução a partir de 2010, no qual a produção triplicou, e se manteve estável no ano seguinte, como pode ser observado na Figura 2.

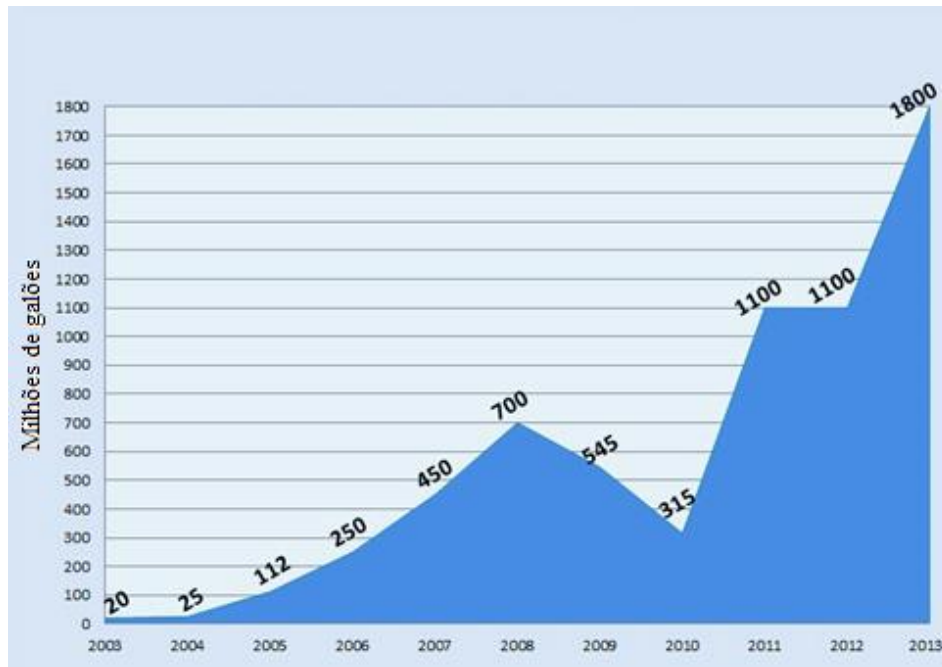


Figura 2: Produção de biodiesel no Estados Unidos. Adaptado de NBB, 2014.

No final de 2004 o Brasil lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), com objetivo de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. O Brasil tem

demonstrado o seu diferencial por ser adepto a esta prática, devido a sua alta produtividade de grãos que lhe permite obter grandes quantidades de óleos vegetais. Por esta razão o Brasil promulgou a Lei 11.097/2005, que estabelece a introdução do biodiesel na matriz energética do Brasil como uma mistura obrigatória para o diesel mineral, com isso, entre 2005 e 2007, a mistura de 2% de biodiesel no óleo diesel de petróleo (B2) foi autorizada pelo governo, que se tornou obrigatório em todo o país entre 2008 e 2010. A partir de 2010 a mistura de 5% de biodiesel no óleo diesel de petróleo tornou-se obrigatório (B5). A partir, da obrigatoriedade de se utilizar o biodiesel no diesel, é que percebe-se sua evolução no Brasil, como pode ser observado na Figura 3. Devido a essa mistura, ficou conhecido mundialmente a nomenclatura para identificar a concentração de biodiesel no diesel. No mercado de combustíveis existe quatro níveis de concentração: Puro (B100); Misturas (B20 – B30); Aditivos (B5) e Aditivo de lubricidade (B2) (CREMONEZ *et al.* 2015, BIODIESELBR, 2014).

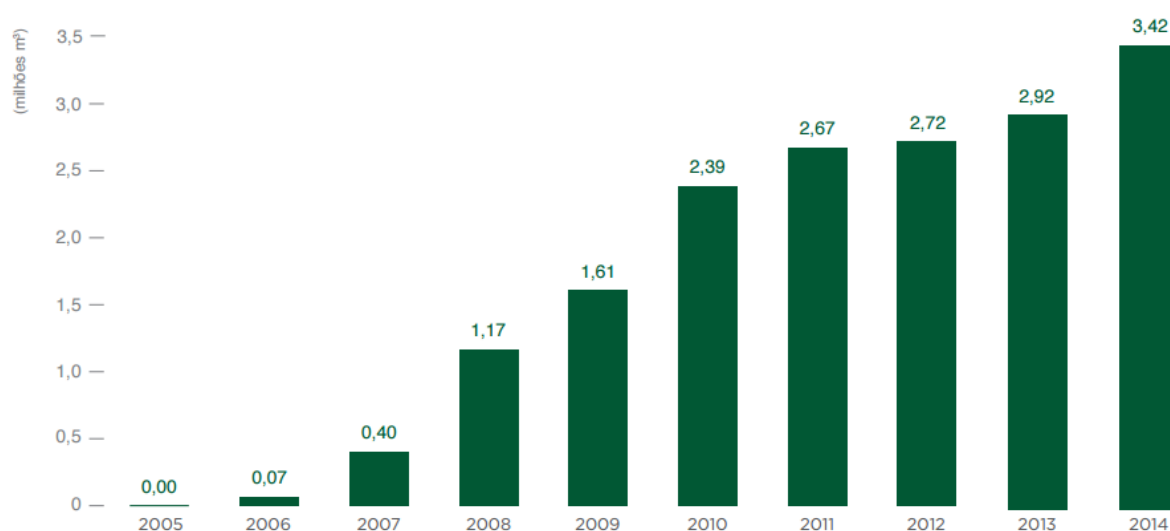


Figura 3: Produção de biodiesel no Brasil. Fonte: ANP, 2016.

3.2. Principais matérias-primas para produção de biodiesel

3.2.1. Óleos vegetais

A emprego de óleos vegetais nas mais diversas reações de transesterificação com vista a produção de biodiesel, tornou-se atrativa nos últimos anos. A sua utilização traz diversas vantagens, como sua origem renovável, baixo teor de enxofre, ser biodegradável, entre outros.

O Brasil é um país que contém inúmeras plantações de oleaginosas, com dimensões continentais, consequentemente, desfruta de uma diversidade de opções para produção de biodiesel. Estima-se que o Brasil possua na sua extensão territorial aproximadamente 200 espécies de oleaginosas com potencial para produção de biodiesel. A Figura 4 mostra as matérias primas mais utilizadas no Brasil para reação de transesterificação com vista a produção de biodiesel (GERIS *et al.*, 2007; ANP, 2014).

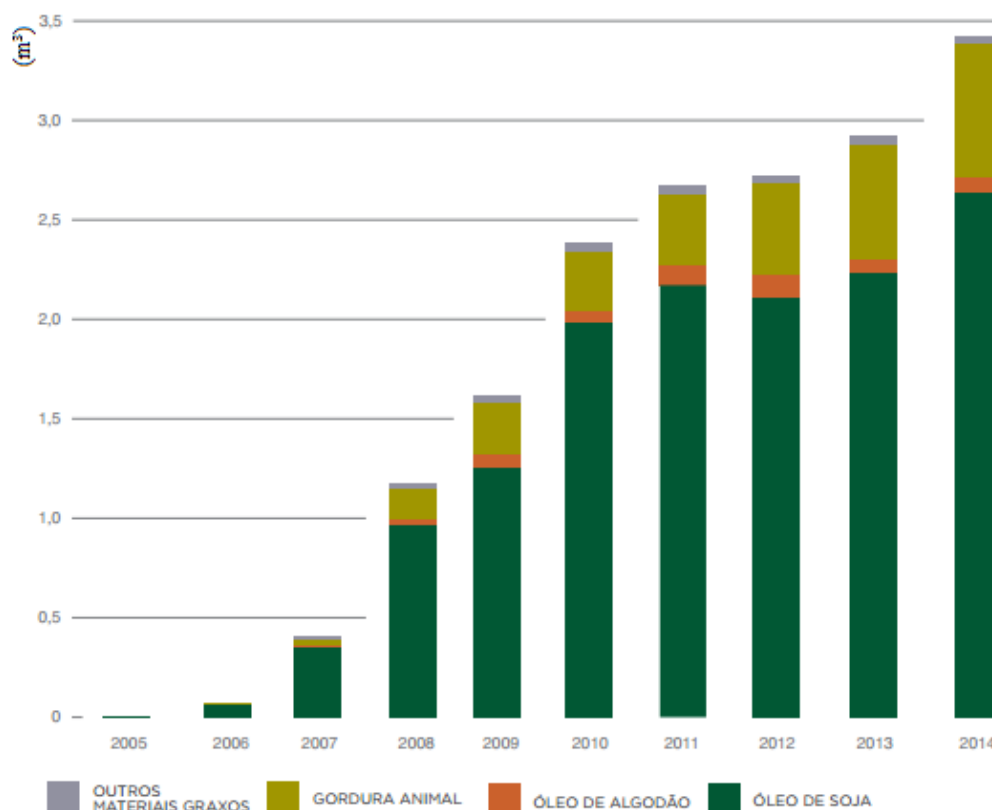


Figura 4: Matérias-primas utilizadas na reação de transesterificação com vista a produção de biodiesel no Brasil. Fonte: ANP, 2014.

Na composição de óleos vegetais, triglicerídeos são as substâncias predominantes, estes são formados de ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa e glicerol. O teor de óleo das principais cultivares de sementes oleaginosas do Brasil, que podem ser potencialmente usados na produção de biodiesel são mostrados na Tabela 1 (CREMONEZ, *et al.*, 2015).

Neste contexto, PNPB, visando a inclusão social de famílias rurais, adotou como prioridade o desenvolvimento de uma base para produzir sementes oleaginosas com elevada produtividade, portanto, dando todo suporte à produção de biodiesel, não só do ponto de vista econômico, mas também do ponto de vista social, pelo apoio ao agronegócio familiar (ANP).

Tabela 1: Teor de óleo em algumas oleaginosas cultivadas no Brasil. Fonte: CREMONEZ *et al.*, 2015.

Oleaginosas	Teor de óleo (%)
Soja	18
Pinhão manso	38
Canola	40
Girassol	52 - 35
Palma	55
Amendoim	56 - 44
Coco	65 - 60
Babaçu	66

3.2.1.1. Óleo de coco

O coqueiro (*Cocos nucífera L.*) é uma planta cultivada em 90 países aproximadamente, típico de clima tropical. Ascendente do Sudeste Asiático tendo como maiores produtores a Filipinas, Indonésia e Índia. No Brasil o coqueiro chegou provavelmente, em 1553 com a colonização portuguesa, nativa da ilha de Cabo Verde, que por sua vez, foram trazidas de plantações Indianas (JERONIMO, 2012). O estado de Sergipe apresenta grande potencial de produção de coco, por ser oriundo de cultivares de grande potencial de produção. O Platô de Neópolis é uma região de fruticultura irrigada no baixo Vale do Rio São Francisco, e o seu principal cultivar é o coco (MOTA, 2001).

Portanto, este cultivar apresenta potencial para o estudo de novas tecnologias como por exemplo a aplicação de rotas alternativas para a produção de biodiesel a partir desta oleaginosa. O Nordeste brasileiro é responsável por cerca de 73% da produção nacional de coco, gerando emprego e renda. O fruto do coqueiro é utilizado para a fabricação de produtos tais como, o leite de coco, coco ralado, óleo de coco, além de ser consumido in natura e possuir as partes do coqueiro e as fibras do coco empregadas no artesanato (MARINHO *et al.*, 2006).

Em geral, a composição do óleo de coco possui predominância de ácidos láurico (Tabela 2) (JIANG e TAN, 2012). O óleo de coco bruto destaca-se como uma nova fonte de matéria-prima para a reação de transesterificação, pelo alto elevado teor de óleo, fácil disponibilidade e

baixo custo, desta forma está sendo empregado nas reações de transesterificação (JIANG e TAN, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012; TUPUFIA *et al.*, 2013). Os ácidos graxos presentes no óleo de coco são compostos, predominantemente, por ácidos graxos saturados ($\pm 92,2\%$) e ácidos graxos insaturados (7,8 %) (MORETO e ALVES, 1986; CARVALHO *et al.*, 2015b). A principal diferença entre os ácidos graxos saturados e insaturados está nas ligações realizada pelo átomo de carbono, os saturados ocorrem apenas ligações simples entre o carbono e os demais átomos, enquanto que os insaturados realizam ligações duplas ou triplas (MORETO e ALVES, 1986). A presença do ácido láurico em grande quantidade no óleo de coco facilita a reação de transesterificação, por serem compostos de cadeia curta facilitando a interação entre o agente transesterificante e o catalisador (LIMA *et al.*, 2007).

Tabela 2: Composição de ácido graxo do óleo de coco (JIANG e TAN, 2012).

Ácido graxo	Composição (%)
Ácido Caprílico (C8)	7,7
Ácido Cáprico (C10)	6,4
Ácido Láurico (C12)	48,6
Ácido Mirístico (C14)	17,8
Ácido Palmítico (C16)	8,9
Ácido Esteárico (C18)	2,2
Ácido Oléico (C18:1)	6,8
Ácido Linoléico (C18:2)	1,6

3.2.2. Álcool

O metanol e etanol são os álcoois mais empregados, por serem de baixa massa molecular e de cadeia curta. O etanol é o álcool preferido nas reações de transesterificação em comparação com o metanol, por ser derivado de produtos agrícolas, de fontes renováveis e ecologicamente mais favorável ao meio ambiente. Álcoois secundários e superiores como propanol, butanol e álcool isoamílico também podem ser utilizados na síntese de biodiesel, gerando produtos com um maior ponto de fluidez. (DEMIRBAS, 2005; STAMENKOVIC *et al.*, 2011).

O metanol é o álcool mais aplicado na síntese de biodiesel na reação de transesterificação, por apresentar um valor de mercado relativamente baixo, e uma alta reatividade, fruto da sua cadeia carbônica curta e alta polaridade, gerando um alto rendimento em ésteres em pouco tempo de reação. Entretanto, é um álcool tóxico, venenoso e de origem fóssil (derivado do petróleo), características desfavoráveis ao processo (ROMERO *et al.*, 2011; FELTES *et al.*, 2011).

Por outro lado, o etanol obtido a partir da cana-de-açúcar, representa uma alternativa ao uso do metanol, já que o Brasil é o maior produtor mundial de etanol, portanto a rota etílica representa uma diminuição nos custos nas reações de transesterificação. Outra vantagem é a baixa toxicidade que ele apresenta e sua produção que ocorre a partir de fontes renováveis, que se dá por meio do processo de fermentação. (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; YUSUF *et al.*, 2011; ANP, 2014).

3.3. Produção de biodiesel por transesterificação

Existem inúmeras formas para a obtenção de biodiesel, tais como uso direto e mistura, micro emulsões, pirólise de óleo vegetal, esterificação e transesterificação. A transesterificação, também denominada de alcoólise, é o método mais comumente utilizado no processo de obtenção de biodiesel (FUKUDA, 2001, GERIS *et al.*, 2007).

A transesterificação de óleos com álcool oferece como principal produto o biodiesel e glicerina como subproduto. Na reação de transesterificação (Figura 5) a primeira etapa é a conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, a qual é seguida pela conversão em monoglicerídeos e monoglicerídeos a glicerol, obtendo uma molécula de éster de cada glicerídeo em cada passo. A transesterificação nada mais é que a troca de álcool a partir de um éster por um outro álcool, num processo semelhante ao da hidrólise, com a substituição da água pelo álcool. As variáveis operacionais mais relevantes que afetam o processo de transesterificação são: temperatura de reação, tempo de reação, pressão de reação, relação do álcool com o óleo, concentração e o tipo de álcool e catalisador (ABBASZADEH *et al.*, 2012).

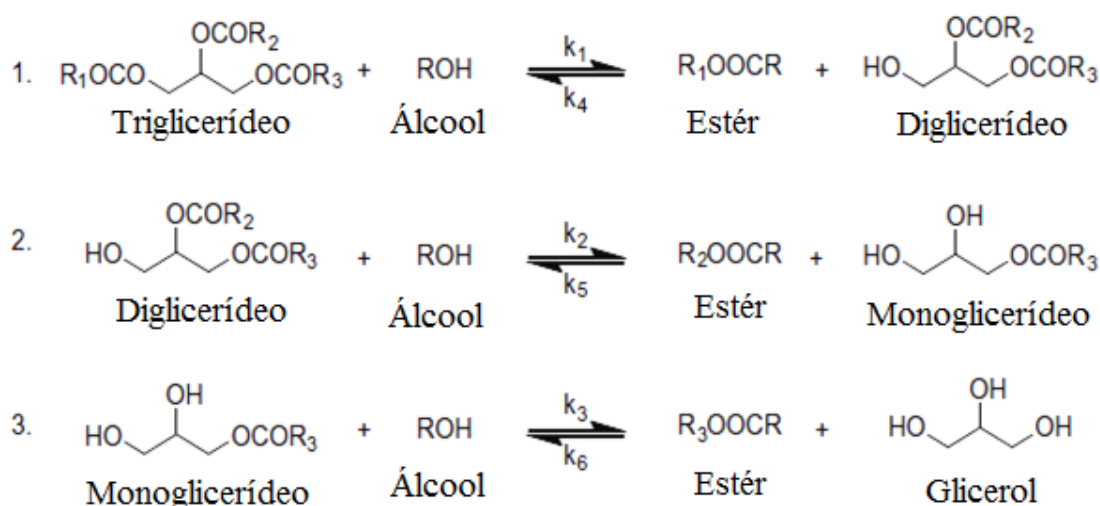


Figura 5: Processo da reação de transesterificação para a produção de biodiesel. Adaptado de CHRISTOPHER *et al.*, 2014.

A reação de transesterificação é reversível, a Tabela 3 mostra as principais vantagens da reação de transesterificação para a síntese de biodiesel. Contudo a presença do glicerol, produto formado na etapa final, leva à formação de um sistema bifásico, fazendo com que a reação reversa não ocorra ou possa ser considerada negligenciável. Embora, um excesso alcoólico costuma ser utilizado a fim de forçar a reação a ocorrer no sentido direto (ROMERO *et al.*, 2011).

Tabela 3: Principais vantagens e desvantagens da reação de transesterificação de óleos vegetais com vista a obtenção de biodiesel. Fonte: ATABANI *et al.*, (2012).

Vantagens	Desvantagens
Propriedades do combustível próximas ao diesel.	Baixo teor de ácido graxo livre e água (catálise alcalina).
Elevada eficiência de conversão.	Geração de poluentes (etapas de neutralização e lavagem).
Adequado para escala industrial e baixo custo.	Formação de subprodutos e dificuldade de separação dos produtos.
Reação rápida.	Elevado consumo de energia.

3.4. Biorreatores

Os biorreatores são equipamentos no qual ocorrem reações bioquímicas, no seu interior, devido à presença de enzimas livres ou imobilizadas (DUTTA, 2008). Atualmente existe diversos tipos de biorreatores, que podem ser empregados tanto na pesquisa como em escala industrial e em pesquisas utilizando a rota enzimática (POPPE *et al*, 2015; ZHAO *et al*, 2015). Diversas configurações de biorreatores são descritas na literatura em batelada e fluxo contínuo, como por exemplo:

- Biorreatores de tanque agitado;
- Biorreatores agitados pneumaticamente (Biorreatores pneumáticos);
- Biorreatores a membrana, e;
- Biorreatores com enzimas imobilizadas.

Na literatura encontra-se três tipos de configurações para reatores enzimáticos, tais como reatores de tanque agitado (regime batelada) e reatores fluxo contínuo no qual está dividido em reatores de coluna de leito fixo (no qual a enzima imobilizada é o recheio do reator, enquanto a solução de substrato é bombeada pelo seu interior) e de coluna de leito fluidizado (em que a enzima imobilizada é mantido em suspensão por meio de reciclagem da solução de substrato bombeado) (POPPE *et al.*, 2015).

A escolha do tipo de biorreator a ser utilizado no processo depende de uma série de fatores, tais como: tipo do método de imobilização, natureza do substrato, requisitos operacionais da reação (vazão volumétrica, razão molar, temperatura), cinética da reação, superfície catalítica por unidade de volume de reator, características de transferência de massa externa e interna, facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração, facilidade de construção e custo do biorreator. Uma das alternativas dos biorreatores é a sua utilização em fluxo contínuo.

3.4.1. Reator de tanque agitado

Os reatores de tanque agitado são geralmente os mais utilizados em processos com enzimas em solução ou enzimas imobilizadas, no qual os biocatalisadores são dispersos no substrato, sendo misturados por agitadores mecânicos (POPPE *et al.*, 2015). São reatores mais simples, constituído basicamente com um medidor de temperatura e controle de agitação,

apresentando baixo volume de produção, tendo que ser limpo ao fim de cada reação (ZHAO *et al.*, 2015).

Estes tipos de reatores requerem longos tempos de reação, desta forma, há necessidade de adição de alguns ou todos componentes, além disso o processo utilizando reator batelada proporciona a coleta de dados sobre o processo (RÓS *et al.*, 2010) Entretanto, com o longo tempo de reação pode haver uma diminuição na produção devido à perda de atividade enzimática, que pode ocorrer pela alta tensão de cisalhamento das partículas do biocatalisador ocasionada pela agitação mecânica (YAAKOB *et al.*, 2013).

Os reatores de tanque agitado têm sido os mais usualmente relatados na literatura utilizando as lipases imobilizadas na reação de transesterificação a partir de óleo bruto ou óleo residual (RIBEIRO *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012; TUPUFIA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014) Entretanto os reatores de fluxo contínuo apresenta vantagens, pela fácil separação do biocatalisador do substrato e reutilização do biocatalisador (ZHAO *et al.*, 2015)

3.4.2. Reator de fluxo contínuo

O sistema fluxo contínuo apresenta vantagens quando comparado com o sistema em regime batelada, por exemplo maior eficácia no controle dos parâmetros de reação e a mistura de reagentes, um menor custo na otimização das condições de reação, maior eficiência energética, menor número de operações unitárias durante o isolamento do produto, entre outros. A transesterificação enzimática pode ser realizada mais rapidamente e mais econômica em reatores contínuos do que em reatores em regime batelada segundo diversos autores (ITABAIANA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011; POPPE *et al.*, 2015).

O reator de leito fixo (PBR) é um dos mais utilizado, com diversas vantagens, tais como, reutilização da enzima sem a necessidade de uma separação prévia; adequada para longo prazo e escala industrial de produção, diferentemente de um reator de tanque agitado no qual os grânulos da enzima imobilizada ficariam suscetível a quebra devido da tensão de cisalhamento mecânico, além disso é mais rentável do que a operação em batelada, a razão entre o substrato e a enzima é inferior do que nos reatores em regime batelada convencionais, resultando assim em um desempenho de reação mais elevada na maioria dos casos (HALIM *et al.* 2009).

As reações em fluxo contínuo podem ser caracterizadas pelo uso de uma variedade de diferentes configurações de reatores tubulares, em que o biocatalisador e o meio reacional flui

pelo reator. Neste caso, o tempo de reação é determinado pela taxa de fluxo e o volume do reator, que caracteriza o tempo de residência (POPPE *et al.*, 2015).

DORS *et al.* (2012), realizou a reação de transesterificação do óleo de palma utilizando um reator tubular contínuo (Figura 6), com volume total de 11 mL. Para a reação foi utilizada a lipase *Peusodomas fluorescens*, imobilizada em suporte de sílica-PVA, óleo de palma e etanol (razão molar 1:9) e terc-butanol ou triton X -100 (como solvente), uma temperatura de 50°C e vazão de 1,5 mL/h, obtendo uma máxima conversão de ésteres etílicos de $87,6 \pm 2,5\%$.

CHATTOPADHYAY e SEN (2013) utilizaram um reator de tanque agitado integrado com dois reatores de leito fixo em série (Figura 7), com volume de 140 mL (cada reator), em um sistema isento de solvente, melhorando assim a conversão nos reatores PBR. Para a reação foi utilizado um biocatalisador imobilizado por uma metodologia descrita por eles (CHATTOPADHYAY E SEN, 2012), no qual eles denominaram de “IIT-SARKZYME”, utilizou uma razão molar de 1:1 de óleo e metanol, temperatura 37°C e vazão 0,47 mL/min e obteve uma conversão de 72%.

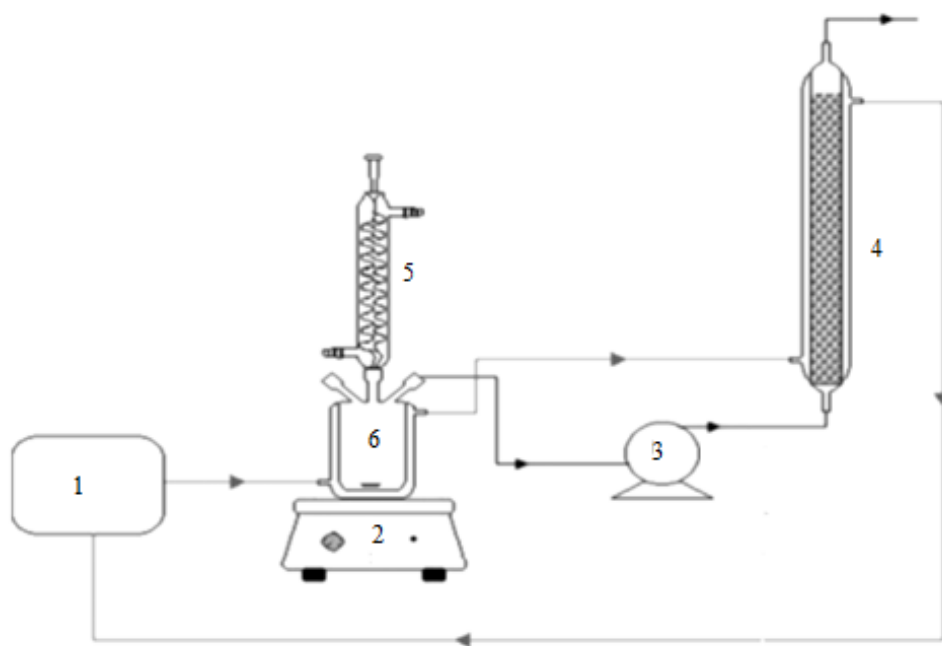


Figura 6: Reator de leito fixo simples. (1) Banho termostático; (2) Agitador magnético; (3) Bomba peristáltica; (4) Reator de leito fixo; (5) Condensador e (6) Reservatório do substrato. Adaptado de DORS *et al.*, 2012.

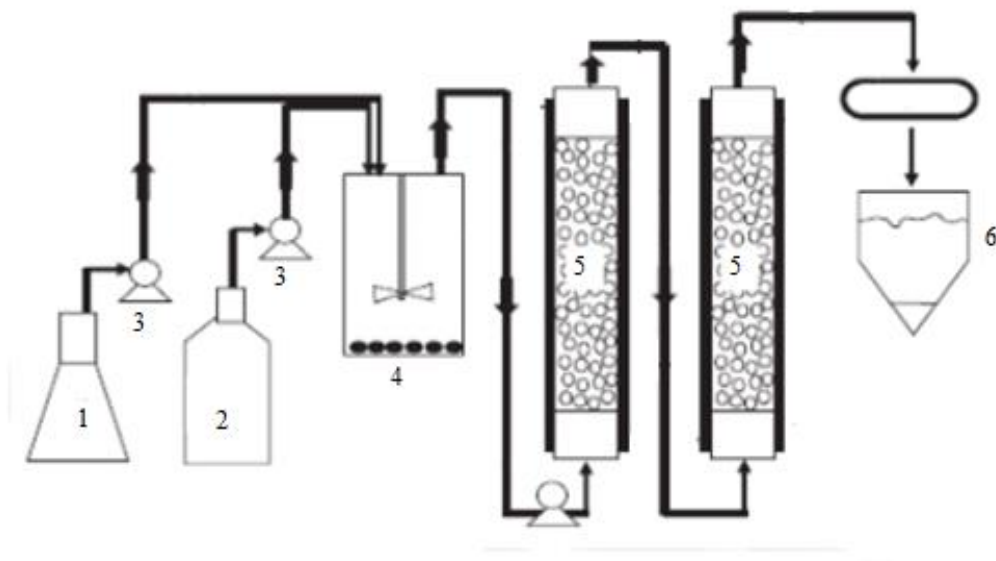


Figura 7: Reator de tanque agitado em fluxo contínuo e reator de leito fixo em série. (1) Reservatório de óleo; (2) Reservatório de álcool; (3) Bomba peristáltica; (4) Reator de tanque agitado em fluxo contínuo; (5) Reator de leito fixo e (6) Funil de separação. Adaptado de CHATTOPADHYAY e. SEN, 2013.

CHEN *et al.* (2009) utilizaram três reatores PBR, e na saída de cada reator separou o glicerol afim de reduzir a toxicidade do metanol na lipase. Na reação foi utilizada a lipase de *Candida sp* imobilizada em pano têxtil, em uma mistura de óleo de cozinha, metanol (razão molar 1:1), hexano (10% em relação ao óleo) como solvente e água (10% em relação ao óleo). A reação ocorreu a uma temperatura de 40°C, vazão de 1 mL/min e atingiu a conversão de 91%.

Afim de otimizar a reação, YOSHIDA *et al.* (2012) utilizou seis reatores PBR em séries (Figura 8), com volume de 53 mL (cada reator) e na saída de cada reator também separou o óleo do glicerol, para introduzir na coluna seguinte apenas o óleo e o metanol. Porém na reação ao invés de utilizar enzima foi utilizado a célula “*A. oryzae*” imobilizada em um reticulado de poliuretano, uma mistura de óleo de soja e canola, metanol e água com diversas razões molares. A reação ocorreu a temperatura ambiente, vazão de 24 mL/h e atingiu a conversão de 96,1%.

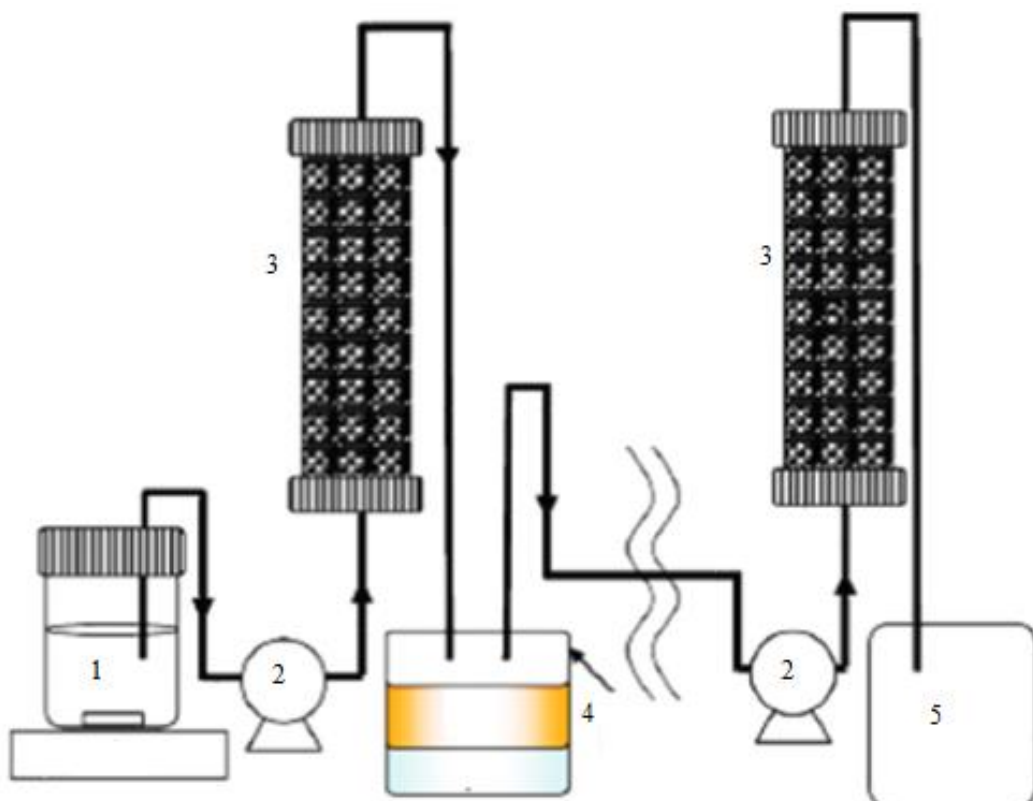


Figura 8: Reator de leito fixo em série. (1) Reservatório do substrato; (2) Bomba peristáltica; (4) Reservatório de separação e (5) Coleta. Adaptado de YOSHIDA *et al.*, 2012.

HAJAR *et al.* (2009), utilizou um PBR simples com apenas uma coluna, com volume de 17,66 mL, em um sistema fechado (com reciclo). O sistema foi constituído pela lipase *Cândida Antarctica* imobilizado comercialmente (Novozyme 435), com o substrato metanol e óleo de canola (razão molar 1:3), temperatura de 35°C, vazão de 6 mL/min e obteve a conversão de 97%.

Wang *et al.* (2011) utilizou um reator (Figura 9) com 3,2 cm de diâmetros, 20 cm de comprimento e volume de 40,19 mL, recheado com a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em biocompósitos de fibra de algodão, utilizando os seguintes parâmetros reacionais: 40°C, razão molar 6:3:1:0,2 (óleo de soja:metanol:água:n-hexano), vazão de 0,25 mL/min e obteve a conversão máxima de 75 % em 12 h de reação.

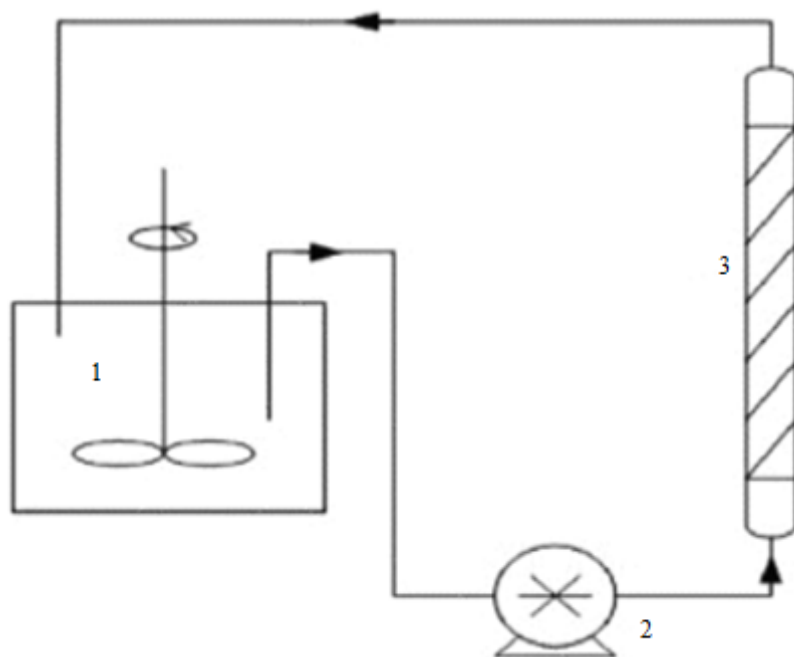


Figura 9: Reator de leito fixo com reciclo. (1) Reservatório do substrato; (2) Bomba peristáltica e (3) Reator de leito fixo. Adaptado de WANG *et al.*, 2011.

Os estudos citados mostram a diversidade de configurações de reatores de leito fixo que podem ser aplicados na reação de transesterificação utilizando enzimas imobilizadas, obtendo bons resultados a depender do tipo de enzima, suporte, método de imobilização e a reação de interesse. Para obter uma elevada conversão de ésteres é necessário realizar a caracterização do fluido no interior do reator, com objetivo de identificar caminhos preferenciais, zonas mortas e a dispersão que poderá ocorrer no substrato no interior do reator. Desta forma, o estudo da Distribuição do Tempo de Residência (DTR) é o método mais utilizado para conhecer o comportamento do fluido no interior do reator.

3.4.2.1. Distribuição de Tempo de Residência

A distribuição do tempo de residência (DTR) de um reator é uma característica da mistura que ocorre em reatores químicos. A primeira vez que a DTR foi proposta por MacMullin e Weber em 1935, para analisar o desempenho de reatores químicos, entretanto foi apenas quando Danckwerts, no início dos anos 50, organizou uma estrutura definindo a maioria das distribuições de interesse que a metodologia começou a ser utilizada (FOGLER, 2002).

O tempo de residência é o tempo em que as moléculas permanecem dentro do reator. Em um reator ideal de escoamento uniforme e em batelada, todas as moléculas que saem do reator permaneceram dentro dele exatamente o mesmo tempo. Porém em outros tipos de reatores, as moléculas permanecem em tempos diferentes dentro do reator, ou seja, há uma distribuição do tempo de residência dos átomos dentro do reator (FOGLER, 2002).

Os desvios de escoamento ideal podem ser causados pela formação de canais preferenciais do fluido, pela reciclagem do fluido ou pela criação de regiões de estagnação no reator. Em todos os processos, como trocador de calor, colunas de recheio ou reatores, este tipo de escoamento deve ser evitado, pois sempre diminui o desempenho da unidade (LEVENSPIEL, 2000).

Para reações que não são de primeira ordem é necessário mais do que a determinação da DTR. Para prever a conversão e a distribuição de produtos em tais sistemas, é necessário um modelo padrão de escoamento para o reator. Para modelar esses padrões é utilizado combinações e/ou modificações de reatores ideais que possam representar reatores reais, com essa técnica pode classificar um modelo sendo de um parâmetro (modelo de tanque em séries ou modelo de dispersão) ou de dois parâmetros (reator com desvio ou volume morto). A DTR é então utilizada para avaliar os parâmetros do modelo (FOGLER, 2002).

FENG *et al.* (2014) caracterizaram os regimes de fluxo em um reator de disco de pano rotativo utilizando enzima imobilizada em tecido de lã. A lipase utilizada foi a lipase *Pseudomonas fluorescens*. A caracterização foi realizada por meio da análise da distribuição do tempo de residência e estudos visuais utilizando corante, variando a velocidade da rotação e a taxa de fluxo. Comparando os resultados com um reator de disco rotativo e também com um reator de leito fixo rotativo. A DTR também foi utilizada para a modelagem de um reator a fim de obter uma maior conversão, utilizando a lipase imobilizada em tecido de lã como biocatalisador, em uma reação de hidrólise de tributirina.

3.5. Biocatálise

A reação de transesterificação de óleos vegetais e um tipo de álcool pode ser realizada na presença de um catalisador por via química e enzimática. A seleção apropriada do catalisador é um parâmetro importante para reduzir o custo de produção de biodiesel. Outro fator que afeta a seleção do tipo de catalisador é a quantidade de ácidos graxos (ABBASZADEH *et al.*, 2012).

A catálise enzimática mostra um elevado grau de pureza dos produtos, menor geração de efluentes, sem dificuldade na separação do produto, exige condições de reação moderadas, entre 30 – 45°C (exigindo um menor consumo de energia) e também a reutilização do biocatalisador quando imobilizado. A Tabela 4 traz uma comparação entre catalisadores básicos, químicos e enzimáticos (GULDHE *et al.*, 2015; ABBASZAADEH *et al.*, 2012), considerando as vantagens e desvantagens do uso destes agentes catalíticos, tais como no caso da catálise enzimática: temperaturas mais brandas, a conversão dependerá da eficiência catalítica de cada tipo de enzima para a reação de interesse, custo da enzima a depender do tipo de produto ou configuração do biorreator e a velocidade da reação.

Tabela 4: Comparação da catálise básica, ácida e enzimática.

	Catálise básica	Catálise ácida	Catalise enzimática
Temperatura	40-60°C	60-100°C	30-45°C
Rendimento do produto	Normal	Alta	Varia de acordo com a enzima
Custo do catalisador	Barato	Barato	Caro
Velocidade de reação	Rápida	Lenta comparando com a básica	Relativamente mais baixa que a básica e a ácida.

A literatura relata que a catálise enzimática possui etapas mais fáceis do que no processo químico durante a separação e a purificação. A reação de transesterificação com vista a produção de biodiesel a partir da rota enzimática é mais pura, em comparação com a rota química. Não há geração de efluentes líquidos na transesterificação enzimática o que torna o processo ambientalmente amigável. O produto obtido por catálise enzimática é, no entanto, caro por causa do custo elevado da enzima, por esse motivo a necessidade de sua imobilização e a utilização de óleos vegetais brutos, isto é sem refino. Por todos os motivos citados a catalise enzimática é considerada uma tecnologia mais verde na produção de biodiesel com a sua natureza ambientalmente correta e devido a pureza do produto final (GULDHE *et al.*, 2015).

A transesterificação catalisada por lipase utilizando óleo como matéria-prima é considerada como um dos biocatalisadores mais promissores para a produção de biodiesel. O uso de lipase tem se tornado alvo de pesquisa os últimos 10 anos, conforme observado na Figura

10, a partir do crescente aumento das publicações científicas, incluindo artigos, artigos de revisão, capítulos de livros, patentes e resumos em congressos (ZHAO *et al.*, 2015).

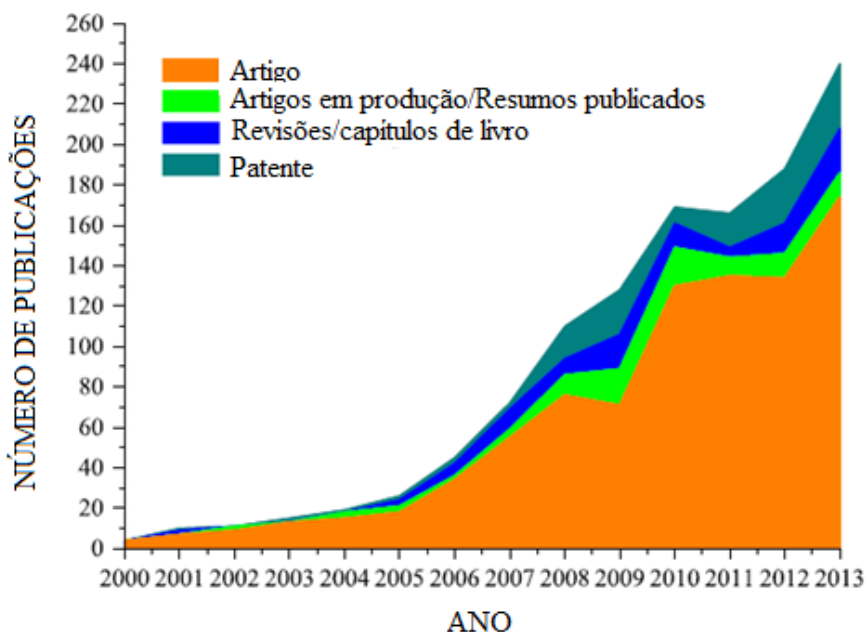


Figura 10: Publicações entre os anos de 2000-2013 encontrados na Web of Science utilizando o termo “biodiesel e lipase”. Adaptado de ZHAO *et al.*, 2015.

3.5.1. Lipases

Lipases são hidrolases do éster de triacilglicerol (EC 3.1.1.3), que catalisam a quebra de gorduras e óleos com subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoglicerois e glicerol. Estas propriedades permitem que sejam empregadas em diferentes reações bioquímicas, incluindo a esterificação, transesterificação, interesterificação, alcoólise, entre outras reações. O potencial de aplicação ilimitada de lipases é aparente na produção de biocombustíveis, compostos orgânicos sintéticos, detergentes, perfumes, cosméticos, couros, alimentos e rações (VILLENEUVE *et al.*, 2000; SALIHU e ALAM, 2015).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas. As lipases microbianas apresentam baixo custo quando comparadas aos demais tipos de enzimas para sua produção e fácil modificação das propriedades. Entretanto, somente algumas enzimas mostram-se aptas na síntese eficiente de biodiesel, e dentro deste grupo, um número restrito de enzimas consegue catalisar reações na presença ou ausência de solventes (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Entre as diversas características da lipase, estão a alta especificidade, estereoespecificidade, regiosseletividade e quimiosseletividade, sendo a característica hidrofílica ou hidrofóbica responsável por esta especificidade. Deste modo, as atividades são influenciadas facilmente por sua natureza, com propriedades e áreas de interface em que a ativação da enzima pode facilitar a chegada ao sítio ativo (superfície da enzima constituída de resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e um grupo não-protéico), sendo então responsável pela atividade biológica da enzima por meio dessa área de “ativação interfacial” (JAEGER e EGGERT, 2002)

Aplicações de lipases em processos industriais estão se tornando cada vez mais importantes. A técnica de imobilização de enzimas tem se tornado um dos processos que possuem a finalidade de manter a eficiência catalítica e a estabilidade operacional, desta forma em alguns casos os biocatalisadores imobilizados já são comercializados afim de substituir a catálise química, tais como: lipase *Pseudomonas cepacia* imobilizada em sol-gel-AK, lipase *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em sol-gel-AK e lipase *Candida rugosa* imobilizada em sol-gel-AK (SIGMA ALDRICH, 2016). Desta forma algumas lipases imobilizadas são utilizadas em reação de biotransformação, por serem mais tolerantes a força dos solventes, do calor e do cisalhamento, e muito mais fácil de recuperar do que as lipases livres (SOUZA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015).

3.5.2. Enzimas Imobilizadas

O termo "enzimas imobilizadas" refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região de espaço definido, com retenção da sua atividade catalítica, e que pode ser usada repetidamente e de forma contínua (GUISÁN, 2006). A imobilização é basicamente um processo no qual a enzima será fixada em um suporte apropriado, na qual a enzima fixa-se na superfície ou no interior do suporte.

O principal objetivo da imobilização é ter uma enzima estável e uma redução no custo do processo, já que as enzimas podem ser reutilizáveis. A enzima imobilizada tem diversas vantagens sobre a enzima livre para a aplicação em larga escala em diferentes reações, tais como: fácil separação substrato/produto e capacidade de reuso; maior adaptabilidade para operação contínuo, maior tolerância para os reagentes e produtos e atividade estável em uma ampla faixa de temperatura e pH (ZHANG *et al.*, 2012, ZHAO *et al.*, 2015).

No entanto, as lipases imobilizadas atualmente ainda apresentam várias desvantagens para as aplicações industriais, como: a perda de atividade enzimática durante a imobilização; elevado custo dos suportes; baixa estabilidade em sistemas óleo-água; e exigência de novos reatores para misturar bem e maximizando a conversão nas reações de transesterificação (ZHAO *et al.*, 2015).

Um dos principais interesses para se imobilizar enzimas é obter um biocatalisador que não afete a sua atividade e estabilidade durante o processo. Outro diferencial do processo de imobilização de enzimas é a aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica. Porém, a imobilização também tem limitações como a alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (GUISÁN, 2006).

Outra forma de obtenção da lipase imobilizada é comercialmente. Embora muitos processos tenham sido desenvolvidos, apenas algumas técnicas estão sendo comercializadas, com sucesso. O principal obstáculo para a técnica de transferência é o custo elevado de etapas de imobilização. Para reduzir custos, o suporte deve ser fácil de sintetizar ou comercialmente disponíveis a preços baixos. A Tabela 5 mostra algumas lipases imobilizadas comerciais utilizadas para a produção de biodiesel (ZHAO *et al.*, 2015), pode-se observar as mais variadas fontes de lipase imobilizadas em suportes hidrofóbicos ou hidrofílicos comercializadas por empresas da Europa e da Ásia.

Tabela 5: Lipases imobilizadas comercialmente utilizadas na produção de biodiesel.

Nome comercial	Lipase	Suporte	Carácter hidrofóbico/hidrofílico	Produtor ou inventor
Novozym® 435	<i>Candida antarctica B</i>	Lewatit VP OC 1600	Média hidrofóbica	Novozymes (Dinamarca)
Lipozyme® RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	Duolite A568	Hidrofílica	Novozymes (Dinamarca)
Lipozyme® TL IM	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Grânulos de sílica	Hidrofílica	Novozymes (Dinamarca)
Lipase OS Amano IM	<i>Burkholderia cepacia</i>	Terra de diatomáceas	Hidrofílica	Amano (Japão)

3.6. Suporte de imobilização

O material do suporte e as propriedades das enzimas influenciam, significativamente as propriedades dos biocatalisadores imobilizados. Dentre os diversos parâmetros que impactam no processo de imobilização está o pH, a temperatura e a força iônica (ANTCZAK *et al.*, 2009). Estes fatores influenciam no desempenho do suporte, na conformação da enzima, na velocidade de transferência de massa, portanto, regem o comportamento da enzima imobilizada. Além disso, outros fatores devem ser considerados quando um biocatalisador é selecionado para uma reação específica como o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos. (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

As características do suporte são de fundamental importância na determinação do desempenho das lipases imobilizadas. A eficiência da lipase imobilizado no suporte, vai depender da área de contato, porosidade, há não solubilidade do suporte, entre outros. As propriedades físicas e químicas do suporte, devem ser analisadas para determinar o suporte que irá ser utilizado (CARVALHO *et al.*, 2015a; GUISÁN, 2006).

A morfologia, a distribuição e o tamanho dos poros, irá influenciar na eficiência da imobilização, como também nos efeitos difusionais que são causados pela transferência de massa entre o biocatalisador imobilizado e o substrato. Outro fato a ser analisado é o custo benefício da escolha do suporte, comparando-se também as vantagens e desvantagens da aplicação do biocatalisador em diferentes processos (CARVALHO *et al.*, 2015a).

Os suportes são classificados quanto a natureza (orgânico, inorgânico ou híbridos) e a porosidade (não poroso, microporoso, mesoporoso ou macroporoso). Porém, a classificação do suporte, não altera o biocatalisador imobilizado, uma vez que as técnicas de imobilização envolvem uma combinação de métodos básicos de ligação física e química (CARVALHO *et al.*, 2015a).

Uma grande variedade de materiais naturais e sintéticos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, têm sido investigados para efetuar imobilização de lipases. Os suportes inorgânicos, naturais ou sintéticos, são mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade em ampla faixa de pressões, temperaturas e valores de pH, rigidez, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano (CARVALHO *et al.*, 2015a; MILÉTIC *et al.*, 2012; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Os suportes porosos apresentam grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima que neste caso fica protegida das condições de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, na utilização deste suporte, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (GUISÁN, 2006).

Por outro lado, os suportes não porosos eliminam a resistência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores operando em contínuo (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). A Tabela 6 mostra as principais vantagens e desvantagens de suportes feitos destes materiais.

Tabela 6: Origem, vantagens e desvantagens dos suportes para imobilização.

<i>Suporte</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>	<i>Exemplo</i>
Inorgânico	Ótima estabilidade quando comparado com o orgânico	Abrasão pode ocorrer nos vasos de agitação	Sílica, cerâmica, etc.
Orgânico Natural	Boa compatibilidade com enzimas	Ligação Ruim	Polissacarídeos, celulose, ágar, amido, etc.
Orgânico Sintético	Adequação da estrutura a diversos tipos de catalisadores	Transferência de massa sólido-líquido, difusão limitada	Polímeros sintéticos: nylon, etc.

A sílica (SiO_2) é um dos suportes multifuncionais descritos na literatura, pelo seu grande potencial de aplicação na imobilização, principalmente por proporcionar a modificação da superfície, pelo uso de aditivos, por obter uma boa estabilidade térmica e mecânica. A sílica é descrita na literatura como natural ou sintética, meso ou macroporosa, cristalina ou amorfa (HARTMSNN e KOSTROV, 2013).

A sílica pode ser adquirida comercialmente ou também ser produzida por diferentes técnicas, sendo que a mais utilizada para imobilização de enzimas a sílica produzida pela

técnica sol-gel. Este método envolve a hidrólise, policondensação e a gelação de solventes apropriados, em condições de síntese, permitindo a coexistência de espécies orgânicas e inorgânicas no mesmo sistema (CARVALHO *et al.*, 2015a; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

3.7 Métodos de imobilização

Os métodos mais comuns de imobilização são classificados em enzimas ligadas a um suporte sólido ou encapsuladas dentro de um suporte de matriz polimérica (Figura 11). Estes métodos de imobilização foram empregados nos últimos anos para melhorar a estabilidade da lipase para a produção de biodiesel (TAN *et al.*, 2010; MORENO e GIRALDO, 2011).

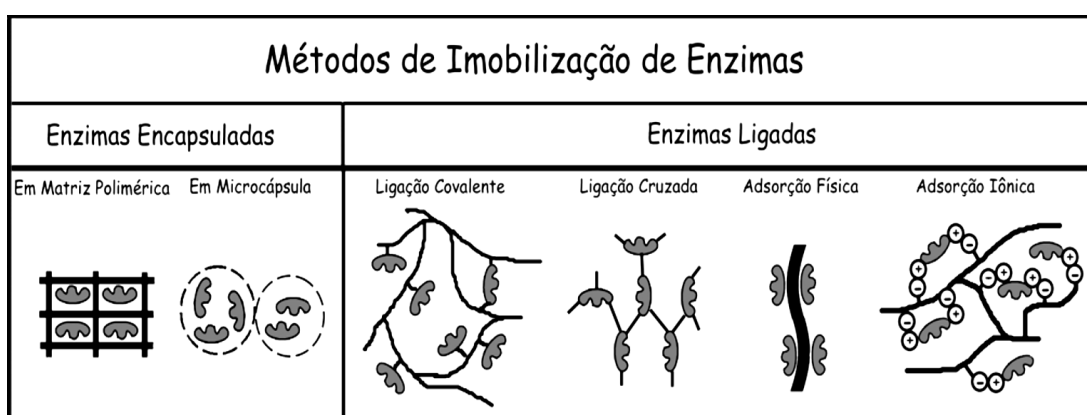


Figura 11: Principais técnicas de imobilização de enzimas. Fonte: CARDOSO *et al.*, 2009.

Apesar de existir uma grande quantidade de técnicas aplicadas na imobilização de enzimas, não há um método que possa ser aplicado para todas as enzimas, portanto, para cada tipo de enzima é necessário a escolha do tipo de suporte e o método de imobilização ideais afim de se obter estabilidade operacional e térmica para cada tipo de reação de interesse (CARDOSO *et al.*, 2009).

A técnica de adsorção física é o método mais simples. Neste método a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações fracas, como ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals ou hidrofóbicas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). O método de encapsulamento consiste em imobilizar a enzima no interior do suporte, entretanto pode ocorrer uma possível inativação da enzima durante o processo (BON *et al.*, 2008). A ligação covalente é um dos métodos mais utilizado na imobilização de enzimas, devido as ligações mais fortes entre a enzima e o suporte (ADLERCREUTZ, 2013).

3.7.1. Ligação Covalente

Neste método de imobilização a enzima é ligada covalentemente a um material insolúvel em água, por meio da reação entre os grupos funcionais da proteína e grupos reativos com o material ativado, ou seja, o método da ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte. Portanto enzimas imobilizadas desta forma são estáveis, isto é, não se dissociam do suporte na presença do substrato ou de soluções com elevada concentração iônica (SANTOS *et al.*, 2008, BON *et al.*, 2008).

A interação entre o suporte e a enzima pode ser obtida por ligação direta entre os componentes ou por meio de uma ligação intercalada de comprimentos diferentes, denominados espaçador. Na literatura encontra-se diversos tipos de agentes espaçadores, dentre eles a epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, etilenodiamina, glicidol entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011). A molécula do espaçador proporciona um grau de mobilidade superior à enzima imobilizada, de modo que a sua atividade pode, em certas circunstâncias, ser maior do que se estivesse diretamente unido ao suporte (ADLERCREUTZ, 2013).

Como vantagens, a imobilização covalente evita o fenômeno de dessorção, a diminuição da velocidade de desativação espontânea, além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biorreator. As ligações covalentes promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida a altas temperaturas. No entanto, apresenta como desvantagem a facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima, com subsequente redução da atividade catalítica (CARDOSO *et al.*, 2009).

Alguns estudos utilizaram suportes modificados com aditivos para a imobilização de enzimas, tais como a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada pelo método de encapsulamento, em suporte de sílica modificada com líquido iônico prótico (SOUZA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3.8. Aditivos: Líquidos Iônicos

Diversos suportes são descritos na literatura, porém para obtenção de características que influenciem positivamente a interação da enzima e uma matriz modificada algumas vezes

sugere-se o uso de aditivos para esta melhoria, como por exemplo líquido iônico. Esta melhoria pode ser realizada pela modificação na superfície do suporte, causada pelo uso de aditivos na sua preparação ou após, influenciando no aumento da área superficial e porosidade, disponibilizando grupamentos funcionais que auxiliaram na imobilização e proporcionando uma melhoria na estabilidade da enzima (SOUZA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A escolha do aditivo a ser utilizado, está ligado as mudanças que irão ocorrer nas características morfológicas do suporte e do biocatalisador imobilizado, como o aumento dos poros e, conseqüentemente, o aumento na difusão do substrato no sítio ativo da lipase imobilizada (CARVALHO *et al.* 2015a)

A utilização de líquidos iônicos (LI's) em todos os domínios das indústrias tem um excelente potencial devido às suas propriedades únicas, tais como baixa volatilidade, facilidade de síntese, entre outros. Os líquidos iônicos são usados como um aditivo no processo de imobilização afim de proteger a enzima da desativação e também são utilizados como modificadores da superfície morfológica do suporte (SOUZA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os LI's são utilizados na biocatálise como solventes verdes e agentes de modificação superficial da sílica. Estes solventes possuem propriedades mais limpas, como volatilidade relativamente baixa, ou seja, perto de zero. Porém o mais importante é a sua capacidade de dissolver seletivamente vários materiais orgânicos, inorgânicos e organometálicos, devido à sua polaridade sintonizável que pode ser concebido para fins específicos (MUHAMMAD *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2015a).

Os líquidos iônicos podem ser classificados em dois tipos: *Líquidos Iônicos Apróticos* constituídos principalmente de cátions orgânicos, no qual apresentam elevados custos dificultando sua aplicação industrial; e *Líquidos Iônicos Próticos* obtidos a partir de aminas, ácidos orgânicos e inorgânicos, no qual apresentam pelo menos um próton capaz de promover interações de hidrogênio, simples método de síntese e purificação, baixo custo, simplicidade de síntese, e diferentes aplicações o que favorece o interesse industrial (CARVALHO *et al.*, 2015a; BARBOSA *et al.*, 2014; ÁLVAREZ *et al.*, 2010).

A utilização dos líquidos iônicos próticos no procedimento de imobilização da lipase por encapsulamento é descrita na literatura. SOUZA *et al.* (2013) imobilizaram a lipase *Burkholderia cepacia* em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica de sol-gel modificados

com líquidos iônicos próticos com cadeias C₂, C₃, C₄ e C₅. O estudo mostrou que o rendimento da atividade enzimática foi maior, que 1000%, quando adicionado uma concentração de 1% de líquido iônico prótico, porém quando avaliado o rendimento da enzima imobilizada sem aditivo foi de apenas 43%. A maior recuperação de atividade foi observada na amostra, contendo o líquido iônico com o carácter mais hidrofóbico (LI-C5). Os resultados demonstram o efeito positivo, evidenciado pelos excelentes valores na recuperação da atividade, representando um aumento de 35 vezes em comparação com uma amostra sem o aditivo.

OLIVEIRA *et al.* (2014), analisaram os efeitos da lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em matriz de sol-gel utilizando líquido iônico prótico (LIP) (N-metil monoetanolamina) na reação de hidrólise e transesterificação de óleos vegetais. A lipase imobilizada utilizando LIP teve uma atividade hidrolítica igual a 428,58 U/g. A lipase imobilizada foi utilizada como biocatalisador na a reação de transesterificação em reator batelada, obteve a conversão máxima na reação de transesterificação utilizando óleo de babaçu foi de 51,9 % quando usando o biocatalisador controle (sem o uso de aditivo) e 98,69 % quando utilizado o biocatalisador imobilizado modificado com LI, com as seguintes condições reacionais: razão molar de 1:7 (óleo:etanol), temperatura de 40°C, agitação de 150 rpm e 96 h de reação.

Outro aditivo utilizado foi o polietileno glicol (PEG) em diferentes concentrações durante a imobilização por encapsulamento em sílica obtida pela técnica sol-gel da lipase *Burkholderia cepacia*. As concentrações utilizadas foram entre 0,5-3,0% de PEG 1500. O estudo mostrou que a atividade catalítica da enzima aumentou na presença do PEG, com concentração igual a 1%, a atividade da lipase foi de 89,91 U/g, enquanto que na ausência a atividade foi de 33,98 U/g. O mesmo efeito foi observado para o rendimento de atividade total recuperada (43,0-91,4%).

ZOU *et al.* (2014) imobilizou a lipase pancreática em sílica comercial modificada com LI. Neste estudo foi comparado o método de adsorção física com o método de ligação cruzada, no qual mostrou que a atividade enzimática pela adsorção física aumentou de 35% para 53% de sua atividade inicial após cinco ciclos. Para o método de ligação cruzada sua atividade inicial foi de 74,25% após 25 dias de armazenamento, enquanto as enzimas imobilizadas por adsorção mantiveram apenas 48% da sua atividade inicial.

HU, *et al.* (2012) imobilizaram a lipase *Burkholderia cepacia* em sílica mesoporosa modificada com LI's, com vários grupos funcionais, como alquilo, amino e carbóximo, com a finalidade de verificar os efeitos do pH sobre a atividade enzimática, a estabilidade térmica, a capacidade de reutilização, a estabilidade em solvente orgânico e parâmetros cinéticos. Obtiveram que na imobilização utilizando a sílica modificada com LI teve uma maior atividade específica e melhores estabilidades incluindo a estabilidade térmica, uma maior capacidade de reutilização e estabilidade em solventes orgânicos. As melhorias estão associadas com as mudanças na estrutura dos poros e em interações mais fortes da enzima com a superfície da sílica.

Capítulo IV

O capítulo IV está apresentado em forma de artigo científico (ARTIGO I e II), e estão organizados conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Este capítulo traz uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além das conclusões de cada etapa.

Artigo I – “Analysis of the performance of packed bed reactor using lipase immobilized in silica modified with protic ionic liquid: characterization and mass transport conditions”. Neste artigo avaliou-se o desempenho do reator de leito fixo, a partir do estudo da distribuição do tempo de residência (DTR) e do efeito do coeficiente de transferência de massa (k_c). Este artigo foi submetido ao periódico *Biotechnology and Bioengineering*.

Artigo II – “Transesterification of coconut oil and ethanol using *Burkholderia cepacia* lipase immobilized silica modified with ionic liquid in batch stirred tank and PBR reactor”. Neste artigo aplicou-se a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica modificada com líquido iônico prótico em reator batelada e reator de leito fixo, avaliando também os parâmetros reacionais, como temperatura, razão molar e vazão volumétrica. Este artigo será submetido ao periódico *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.

ARTIGO I

Analysis of the performance of packed bed reactor using lipase immobilized in silica modified with protic ionic liquid: characterization and mass transport conditions

Juliana Lisboa Santana¹, Juliana Marçal de Oliveira¹, Nayara Bezerra Carvalho¹, Silvana Matedi², Eliane Bezerra Cavalcanti¹, Álvaro Silva Lima¹, Cleide Mara Faria Soares^{1,*}

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Aracaju, SE, Brasil

² Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química, Rua Aristides Novis 2, Federação, Salvador, BA, Brasil

* Corresponding Author. Tel: + 55 79 79 91322592, FAX: + 55 79 55 7932182190

E-mail address: cleide.soares@pq.cnpq.br

SUMMARY

ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIALS AND METHODS	37
Materials	37
Preparation of the control support and modified with PIL	37
Immobilization by covalent binding method	38
Characterization in the IB and substrate.....	38
Ethyl esters synthesis.....	39
Ethyl esters quantification	39
Residence time distribution (RTD)	40
Theoretical Aspects	40
RESULTAS AND DISCUSSION.....	42
Characterization in the IB and substrate.....	42
Transesterification reaction.....	43
Residence time distribution (RTD)	45
Mass transfer coefficient.....	49
CONCLUSION	53
ACKNOWLEDGEMENTS	53

ABSTRACT

The packed bed reactor (PBR) are most used in large-scale production of different reactions, because of its easy operation and high efficiency. The transesterification is the most used method for obtain ethyl esters using enzymatic biocatalysts. The use of additives in the preparation of immobilized biocatalysts (IB) is alternative to improve operational stability. The objective this study was to evaluate the influence of modified silica with protic ionic liquid (PIL) immobilization by covalent binding of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) in PBR reactor in the transesterification reaction, from the characterization and mass transfer the system studied. The results showed that maximum conversion of ethyl esters was $42 \pm 1.62 \%$ at 96 h using IB control silica and $52 \pm 1.75 \%$ in 72 h using IB modified silica. The PIL also influence the analysis of Residence Time Distribution (RTD), with the mean time ranging from 14.94 (control silica) to 25 min (modified silica). The mass transfer increase the reaction parameters (temperature, flow rate and molar ratio) showed a positive effect on the mass transfer coefficient (k_c) varing from $0.95 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ to $2.39 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (IB on control silica) and $1.22 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ to $3.06 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (IB on modified silica).

Keywords: Packed bed reactor, Residence time distribution, Mass transfer, Ionic Liquid

INTRODUCTION

The enzymatic catalysis has its main advantage, make the manufacturing process more environmentally compatible and sustainable, on the other hand, the high cost of the enzyme makes the process impractical (Lotti et al. 2015). Thus, the immobilization of enzymes in heterogeneous supports, increases the process stability allowing reuse and its use in continuous reactors (Liese e Hilterhaus, 2013). Among the different methods of immobilization, the most used are: physical adsorption, covalent binding and encapsulation (Bon et al. 2008; Dalla-Vecchia et al. 2004; Sheldon e Pelt, 2013). The covalent binding is based on the formation of a strong binding between enzyme and support, that is, the amine grouping of the enzyme binds to the silanol grouping of silica by the spacer arm (epoxy group consisting of an oxygen atom attached to two carbon) provided by epichlorohydrin bifunctional agent (Santos et al. 2008). According to the literature enzymes immobilized by covalent binding method are stable, that is, the enzyme don't dissociate of the support in the presence of the substrate (Hartmann and Kostrov, 2013)

Further of the reactor configuration, the choice of the ideal support in the immobilization technique is fundamental, as it will provide an immobilized biocatalyst (IB) with an improved operational stability, during the reaction (Cardoso et al. 2009). Porous supports, such as silica, offer a great internal surface area (favoring the immobilization), further, it is possible the surface modification by the use of additives, such as ionic liquid (IL) (Carvalho et al. 2015; Guisan, 2006).

According Álvarez et al. (2010), the ionic liquids (IL's) are considered green solvents in the biocatalytic process, due to its unique properties such as thermal stability and low volatility. They are classified into aprotic ionic liquids (AIL) e protic ionic liquids (PIL). The PIL's are obtained from amines, organic and inorganic acids, are low cost and simplicity of

synthesis which favors the industrial interest (Álvarez et al. 2010; Carvalho et al. 2015). Until the time is reported in the literature the use of batch reactors for the study the influence of the use of silica modified for the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase in transesterification reaction (Oliveira et al. 2014; Souza et al. 2013).

Souza et al. (2013) immobilized *Burkholderia cepacia* lipase by the sol-gel technique using PIL N-methyl monoethanolamine. Immobilized biocatalyst were applied in the reaction transesterification, containing soybean oil and ethyl alcohol (ratio 1:15.2), 0.075 g water, temperature 308 K. The obtained result showed that maximum conversion of ethyl esters was 46.5 % in 72 h, for the IB with PIL, while the maximum conversion to ethyl esters for IB control was only 1.3 % in 48 h. However, Oliveira et al. (2014) obtained maximum conversion to biodiesel, 98 % in 96 h, using the same IB with PIL, but with different reaction parameters, temperature 313 K and molar ratio 1:7 (babassu oil and ethanol).

In literature, there are several configurations of reactors which can be used in reactions with immobilized enzymes. The most suitable configuration to be used will depend on to the type of reaction substrate, support, method immobilization used and reactor type (Balcão et al. 1996; Wang et al. 2011). In the ethyl esters biodiesel production process, in order to obtain biodiesel, the choice of reactor is associated with the conditions and the reaction kinetics, setting the flow characteristics and the operating mode of the reactor (Poppe et al. 2015). Due to the high efficiency, easiness of construction, operation and maintenance, the packed bed reactors (PBR) are the most used. When compared to the batch reactor, the PBR has many advantages, such as the easiness separation of the biocatalyst and substrate, possibility to operate over long periods (preventing loss of the enzyme productivity) and greater control of reaction parameters. Furthermore, provides high surface area and compact design (Itabaiana Jr et al. 2013; Poppe et al. 2015).

The characterization of the fluid inside the PBR is necessary to obtain information about the influence that the biocatalyst exerts on the reaction. The most widely used technique is the residence time distribution (RTD), which determines the conduct that carries fluid inside the reactor. This residence time depends on the fluid flow and directly influences the conversion rate of the reactions (Feng et al. 2014; Xi et al. 2015). Both thermophysical properties and behavior of the blend, affect the mass transfer. Thus, it is essential understanding the operating parameters, substrate properties, structure of the reactor, RTD and the flow behavior, for modeling optimization and the reactor design (Xi et al. 2015).

Therefore, this work has the objective apply the IB on silica control and modified in the transesterification reaction using a PBR reactor and to characterize and to determinate mass transfer coefficient of the system studied.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Burkholderia cepacia lipase (BCL) and Tetraethoxysilane (TEOS) (98%) were purchased from Sigma Aldrich and used as purchased without the need of an extra purification. Hexane (99%), ammonium hydroxide (28-38%), ethyl alcohol (99%), hydrochloric acid (> 36%), polyethylene glycol (PEG) 1500, epichlorohydrin (98%). Crude coconut oil purchased on the local market. The Federal University of Bahia (UFBA) provided the PIL (N-methyl-2-hydroxyethylammonium pentanoato). Toyobo textile industry of Brazil Limited provided the dye Disperse Blue C-2R.

Preparation of the control support and modified with PIL

The silica support was prepared by the sol-gel technique as described by Souza et al. (2013) with some modifications, in which the TEOS (30 mL) was dissolved in ethyl alcohol (36 mL) under inert nitrogen atmosphere and stirred at 100 rpm at 308 K. Furthermore, pre-hydrolyzing solution was slowly added (hydrochloric acid) and stirred for 90 min. Then, was

added 1% PIL (w.v⁻¹) to prepare the modified support and then hydrolyzing the solution (ammonium hydroxide (1 mL) and ethyl alcohol (6 mL)). Further, the mixture was allowed for rest for 60 min and then taken to the refrigerator for 24 h to complete polycondensation. Thus, the material was washed with hexane through a Soxhlet extractor (Nova Etica) for a period of 12 h and kept in a desiccator for 72 h.

Immobilization by covalent binding method

The prepared support was used for the immobilization of lipase *Burkholderia cepacia* according to the methodology described by Paula et al. (2007). The support was treated with a sodium phosphate buffer pH 7.5 (10 mL per gram of support) and epichlorohydrin (2.5 % v/v) stirring for 2 h at 298 K. Further, the solution was washed with buffer and distilled water, and then was allowed to dry in an oven (333 K) for 20 h. Then, the treated support was soaked in hexane (10 ml per gram of treated support) and taken the stirring (170 rpm) for 2 h at 298 K. Further, BCL was added (0.250 g per g support treated) with solution of polyethylene glycol (PEG molecular weight 1500) (0.020 g PEG diluted in 4 ml of ultra-pure water) and stirred for 2 h. The immobilized lipase was carried to a refrigerator for 20 h and then passed through a washing process with hexane and kept in a desiccator for 48 h.

Characterization in the IB and substrate

The Brunauer-Emmett-Teller analysis (BET) was conducted to determine surface area and pore volume for the control silica and modified with PIL and also IB on control silica and IB on modified silica. The dynamic viscosity and the density the substrate (coconut oil and ethanol) and only coconut oil were determined in Stabing Viscometer (Model SVM 3000) in the conditions to study (temperature and molar ratio).

Ethyl esters synthesis

Reactions were carried out in a glass jacketed PBR (Figure 1) reactor with external diameter of 2.4 cm, internal diameter of 1 cm, 10 cm height and a total volume of approximately 7.85 mL. The PBR reactor was connected to a water recirculation bath to maintain the temperature at 313 K. Then, the column was filled with an immobilized biocatalyst (IB) and the substrate (raw coconut oil and ethyl alcohol, 1:7) was left in a stirred alimentation tank with controlled temperature by a hot plate. The continuous ascendant flow was pumped by a Milan's peristaltic bomb (209 model), with flow of $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

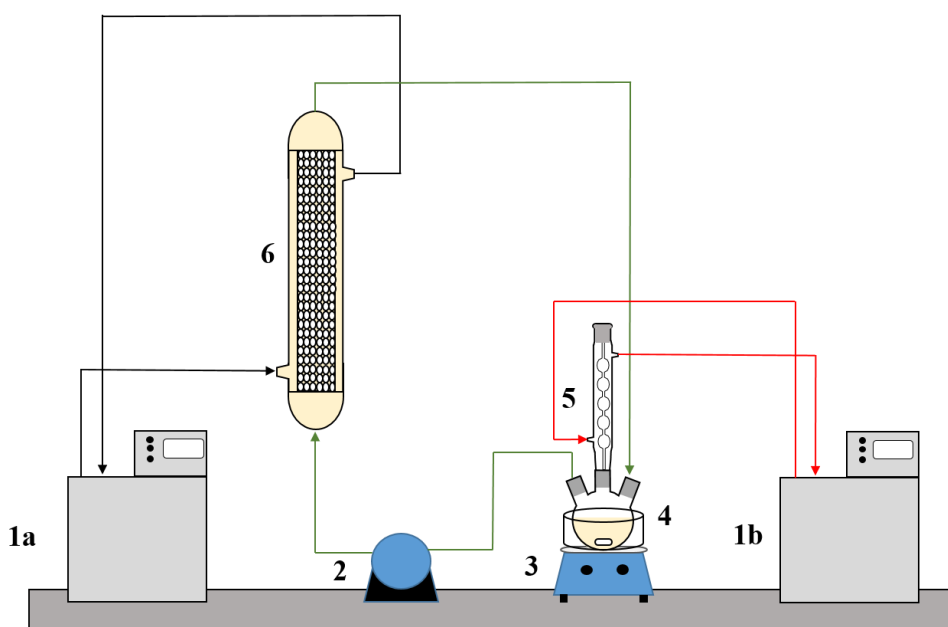


Figure 1. Experimental apparatus of the system for transesterification reaction. (1a) Thermostatic bath to 313 K; (1b) Thermostatic bath to 288 K; (2) Peristaltic pump; (3) Magnetic stirrer; (4) Substrate reservoir; (5) Condenser; (6) PBR.

Ethyl esters quantification

The ethyl esters composition was measured by a gas chromatograph (Agilent Technologies – 7820A) with an automatic injector and mass detector (Agilent Technologies – 5975, MSD series), equipped with a Supelcowax 10 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). For the samples injection in the chromatograph, 0.01 g of the samples were diluted with hexane in a

volumetric flask (10 mL), furthermore, 200 µL of the samples and 200 µL of the internal standard solution (methyl heptadecanoate) were diluted in hexane another volumetric flask (2 mL). The column temperature initially maintained at 130 °C, with a heating ramp of 20 °C.min⁻¹ to 220 °C, 0.5 °C.min⁻¹ up to 222 °C and 20 °C.min⁻¹ to 250 °C with a total time of 14.9 min of analysis.

Residence time distribution (RTD)

In the determination of residence time, initially, was carried out a scan in a Varian spectrophotometer (Cary 50 Bio), in order to determine the dye's wavelength (605 nm). Then, measurements were conducted at different dye concentrations diluted in the substrate, with the purpose of building a calibration curve of absorbance as a function of dye concentration. After the curve built, the RTD test was ready start. The test took place at 313 K, flow rate of 0.15 mL.min⁻¹, using a dye solution with a concentration of 1 mg.mL⁻¹. Samples were collected every 5 min and read on the spectrophotometer, in order to determine the parameters of RTD.

Theoretical Aspects

The RTD parameters can be described according to Fogler (2002), in which the function of the RTD could be obtained by Equation 1:

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (1)$$

where $C(t)$ is the dye concentration at time t . The mean residence time was obtained by the Equation 2, being compared with the theoretical average time (Equation 3) according to established by Levenspiel (2000):

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t)dt \quad (2)$$

$$\tau = \frac{V}{v} \quad (3)$$

where V corresponds to the volume of void space in the reactor and v the used flow. The variance and skewness were determined by equations 4 and 5, respectively:

$$\sigma^2 = \int_0^\infty (t - t_m)^2 \cdot E(t) dt \quad (4)$$

$$\sigma^3 = \frac{1}{\sigma^{3/2}} \int_0^\infty (t - t_m)^3 E(t) dt \quad (5)$$

With the parameters of RTD determined, the function RTD Normalized (θ) was obtained instead of the function RTD $E(\theta)$, with θ parameter defined by Equation 6, and then, obtaining the dimensionless function DTR (Equation 7).

$$\theta = \frac{t}{t_m} \quad (6)$$

$$E(\theta) = t_m E(t) \quad (7)$$

Through the obtained DTR parameters was chosen axial dispersion model for closed-closed reactor, to determine the dispersion number (D/uL) (Equation 8), where in the dispersion number is the reciprocal of the Peclet number.

$$\sigma_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{t_m^2} = \left(\frac{2}{Pe_r} \right) - \left(\frac{2}{Pe_r^2} \right) [1 - e^{-Pe_r}] \quad (8)$$

In order to analyze the mass transfer effect were performed theoretical calculations, in order to estimate the mass transfer coefficient. Mass transfer correlations are reported in the literature to assist in the determining the mass transfer coefficient.

According to Seguin et al. (1996), Sherwood number (Sh) (Equation 9) relates the particle Reynolds number (Re_p) (Equation 10) with the Schmidt number (Sc) (Equation 11), considering a spherical porous particles.

$$Sh = 0,7 \cdot Re_p^{0,37} \cdot Sc^{0,5} \quad (9)$$

$$Re_p = \frac{\rho \cdot U \cdot d_p}{\mu} \quad (10)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{AB}} \quad (11)$$

where, ρ corresponds the specific mass of the substrate, U interstitial velocity of the substrate, d_p diameter of the particle, μ dynamic viscosity of the substrate and D_{AB} diffusivity substrate (Treybal, 1989), Equation 12.

$$D_{AB} = \frac{117,3 \times 10^{-18} \times (\varphi \times M_o)^{0.5} \times T}{\mu_o \times v_e^{0.6}} \quad (12)$$

where, φ corresponds to the association factor (1.5) (Treybal, 1989), M_o molecular weight of the coconut oil, T temperature (K), μ_o dynamic viscosity of the substrate and v_e is the molar volume of ethyl alcohol.

The mass transfer coefficient is the relation of the number of Sh to the diffusivity and the diameter of the catalyst particle (Equation 13).

$$k_c = \frac{Sh \cdot D_{AB}}{d_p} \quad (13)$$

RESULTAS AND DISCUSSION

Characterization in the IB and substrate

The physical characterizations were conducted by BET method, determining the surface area and pore volume of the support and IB's and the results confirmed the modification the support with the use the PIL. There was increase surface area from 799.5 (control silica) to 853.3 m².g⁻¹ (modified silica) and pore volume from 0.57 (control silica) to 1.02 cm³.g⁻¹ (modified silica), when added PIL in the production of support.

According to Dai et al. (2000) conventional sol-gel synthesis involves the hydrolysis and condensation of the tetraalkylorthosilicates to form gels when used solvent (such as PIL). The vapor pressure prevents the evaporation of the solvent and its high ionic strength increases the aggregation rate. However, both the IB's, dimensions of the surface area determined were similar, 349.4 (IB on control silica) and 371.9 m².g⁻¹ (IB on modified silica). Though, the volume pores of the BCL on silica control (0.35 cm³.g⁻¹) was less than the BCL on silica modified (0.67 cm³.g⁻¹), supposedly by the presence of spacer arm provided by epichlorohydrin that linked the lipase on the surface and in the pores the support at the time of immobilization.

To assist in the characterization and determination of the mass transfer coefficient the packed bed reactor, besides the characterization of IB was necessary determine the viscosity

and density the substrate. The parameters necessary to study the system were described in Table I.

Table I: Parameters to determine the mass transfer coefficient.

Parameters	Data
Transversal area of reactor (m ²)	7.85 x 10 ⁻⁴
Particle diameter (m)	9.29 x 10 ⁻⁴
Substrate dynamic viscosity (g.m ⁻¹ .s ⁻²)	4.24 x10 ⁻³
Temperature (K)	313
Density of substrate (g.m ⁻³)	837100
Interstitial velocity (m.s ⁻¹)	BCL on control silica 1.06 x10 ⁻⁵
	BCL on modified silica 1.99 x10 ⁻⁵
Molecular mass of oil (kg.kmol ⁻¹)	698,21
Oil dynamic viscosity (kg.m ⁻¹ .s ⁻²)	2.41 x10 ⁻⁶
Molar volume of ethanol (m ³ .kmol ⁻¹)	0.05837
Porosity	BCL on control silica 0.3
	BCL on modified silica 0.16
Flow rate (m ³ .s ⁻¹)	2.5 x10 ⁻⁹

Transesterification reaction

In this study, the transesterification reaction from coconut oil and ethyl alcohol were carried in closed system, with reaction times between 24 - 96 h for the BCL on control silica and silica modified with PIL. The conversions for both IBs shown in Figure 2. For the transesterification using BCL on control silica, the conversion achieved between from 29 ± 1.00 - 42 ± 1.62 % to the maximum conversion time of 96 h. However, when using the BCL on silica modified, the conversion varing 35 ± 1.51 – 52 ± 1.75 % to the maximum conversion in 72 h reaction. The higher conversion when the BCL in modified silica was used, due to the change that occurred in the surface area by the presence of the PIL and the increase in pore size (Carvalho et al. 2015). Thus, the substrate remained in contact with the BCL on modified silica for a longer time.

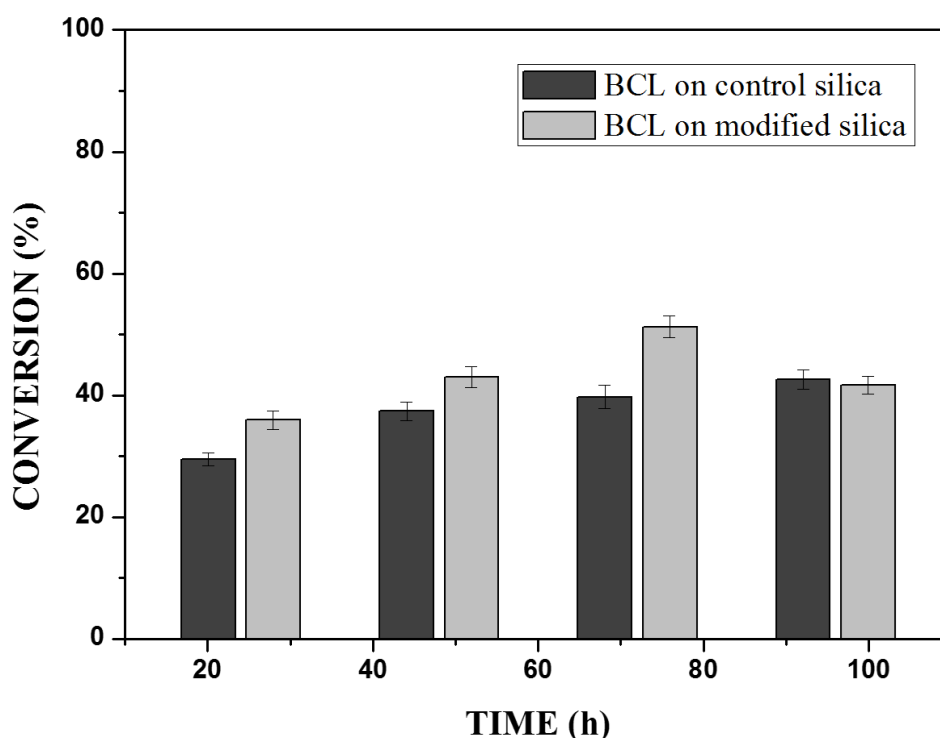


Figure 2. Conversion ethyl esters in the time between 24 - 96 h at 313 K, molar ratio 1:7 and flow rate 0.15 ml.min⁻¹, for BCL on control silica and BCL on modified silica.

The literature presents studies using PBR reactor in a closed system. According to Wang et al. (2011), the maximum conversion of 75% obtained with 72 h of reaction, using a reactor of 3.2 cm internal diameter and 20 cm height. The reactor was packed with *Pseudomonas cepacia* lipase immobilized on nanoparticles composites of Fe₃O₄ at 313 K, molar ratio of 6:3:1:0.2 (soybean oil:methyl alcohol:water:n-hexane) and flow rate of 0.25 ml.min⁻¹. On the other hand, Hajar et al. (2009) achieved maximum conversion of 97 % using the same reactor, 10 cm high and 1.5 cm in internal diameter, packed with commercial immobilized lipase Novozymes 435 at 298 K, molar ratio of 1:3 (rapeseed oil:methyl alcohol) and flow rate of 6 mL min⁻¹.

However, the characterization of the PBR reactor is necessary, for any chemical reaction, in order to know of the IB influence on the behavior of the substrate inside the reactor (Fogler, 2002). In the characterization of the reactor, it is essential to determine the mass transfer coefficient (k_c) and dimensionless numbers (Re_p , Sc e Sh). In this way, both requirements are indispensable in the construction of a biochemical process in which will assist in construction an ideal reactor and consequently in the obtaining maximum conversion of the desired final product.

Residence time distribution (RTD)

The characterization of the PBR was realized using the transesterification reaction parameters. The RTD occurred by the pulse test, in order to investigate the behavior inside the reactor when packed with control silica control and silica modified with PIL. It was initially constructed the calibration curve to help the determination of the RTD, which obtained a linear correlation (Figure S.1) coefficient (R^2) of 0.9935 and equation of the line equal to $y = 3.6474 x - 0.0164$. From this equation, was constructed a graphical profile (Figure 3), concentration vs. time for both fillings, which helped in the calculation of average time, variance and skewness of the substrate (Table II) by means of the equations (2), (4) and (5).

Through the curves (Figure 3) was possible integrate the area under the graph curve, determining the denominator of Equation 1, for control silica $\int_0^{\infty} C(t)dt = 12.14 \text{ mg.min.mL}^{-1}$ and for silica modified with PIL $\int_0^{\infty} C(t)dt = 12.77 \text{ mg.min.mL}^{-1}$. Defining, thus, the mass of the dye at the end of analysis for control silica (1.8 mg) and silica modified with PIL (1.9 mg), these values were higher than the mass of the injected dye (1.8 mg), considering the long tail shaft near zero and the experimental error, that can occur, these are values acceptable for this type of test.

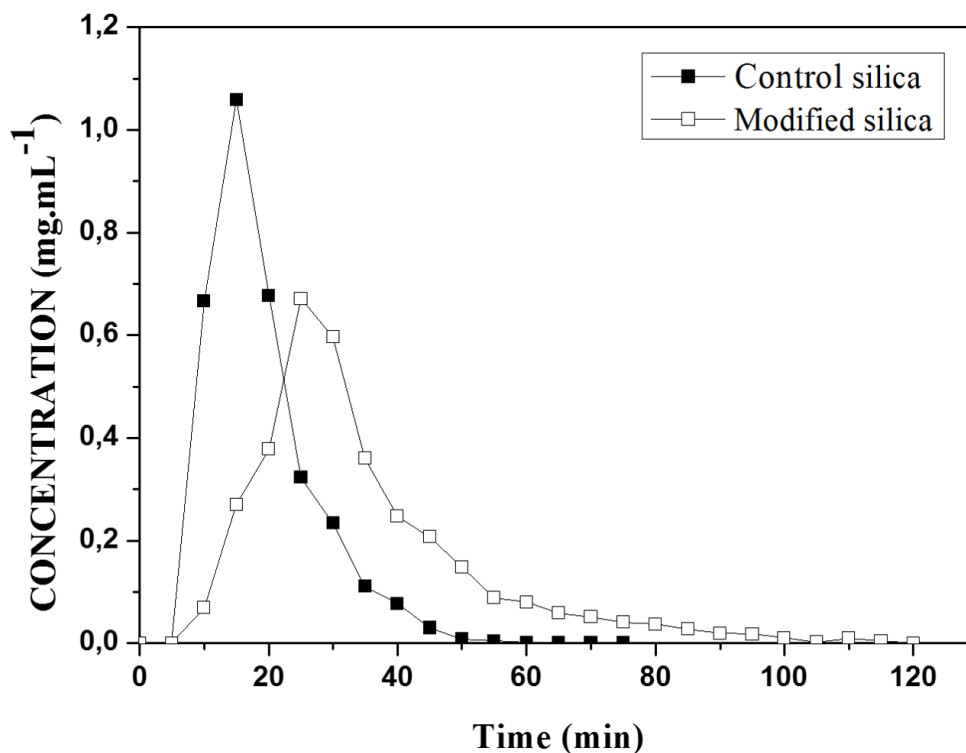


Figure 3. Determination of dye concentration versus time for control silica and modified silica.

The increase in the mean time on silica with PIL occurred due to the change in the surface caused by the PIL, which influences the increase in surface area, pore size and consequently the porosity. In this way, the substrate has a large contact area to be navigate in inside the reactor (Bon et al 2008; Carvalho et al. 2015). The experimental value of the average time can compared with the theoretical mean time Equation (3) and was 12.48 min for silica control and 22.48 min for the silica modified with PIL (Table II), considering a difference between the values of average time of 19 and 14 %, respectively.

Table II: Three moments of RTD control silica and silica modified with LIP.

Silica	Mean time (t_m) (min)	Mean time theoretical (τ) (min)	Variance (σ^2) (min ²)	Skewness (σ^3) (min ²)
Control	14.94	12.48	68.89	47.86
Modified with PIL	25.76	22.48	310.68	154.83

Mean time values higher than those that were obtained in this study are reported in the literature, but should lead into account the flow rate and reactor configuration used during test. Silva et al. (2014) obtained the t_m 7 h for PBR reactor with internal diameter 1.6 cm and 5.5 cm long, with a flow rate $0.013 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. While, Sen and Chattopadhyay, 2013 found mean time of 53 min for PBR reactor 2 cm internal diameter and 45 cm height using a flow rate of $0.74 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

The influence of PIL is also noted in the values of the variance (68.89 to 310.68 min^2) and asymmetry (47.86 to 154.83 min^2), indicating the dispersion suffered by the substrate inside the reactor. Is noticed that when using the silica modified with PIL, the dispersion occurs in a more spread way, in other words, further away from the form that a fluid would travel inside of an ideal reactor. According to Fogler (2002), the higher the value of the variance and skewness, the greater the dispersion occurred in the fluid. Thus, the determination the variance will assist in the comparison with the theoretical curves. The reactor dispersion number was determined by Equation 8, in which it is the inverse Peclet (Pe). Obtained the number dispersion of the control silica 0.1 and the modified silica 0.15

To compare with literature, the RTD function ($E(t)$) is replaced by a normalized function (Equation 7), in other words, becomes a dimensionless function, in order to obtain a chart listing of $E(\theta)$ with θ function, for both the fillers (Fogler, 2002; Levenspiel, 2000). According to Fogler (2002), the analysis of RTD is fundamental in the analysis of reactors, but does not provide a complete description of the flow for a particular reactor or a system of reactors. When analyzed not ideal reactors, only RTD is not sufficient for evaluating the reactor performance, therefore, it is necessary to obtain more information, such as choosing an adequate model in order to adequately characterize the reactor.

In this study, the selected model was the dispersion considering closed vessels. According to Levenspiel (2000), should be take into consideration before choosing the model,

the non-appearance of double peaks in the graph of the RTD function, the non-appearance of long tails, dispersion number less than 1. From these considerations and of the comparison of the experimental data with the theoretical curve (Figure 4), it was possible to state that the dispersion model can be used without any interference, in which the experimental data set to the selected template and the number of dispersion for both conditions is below 1.

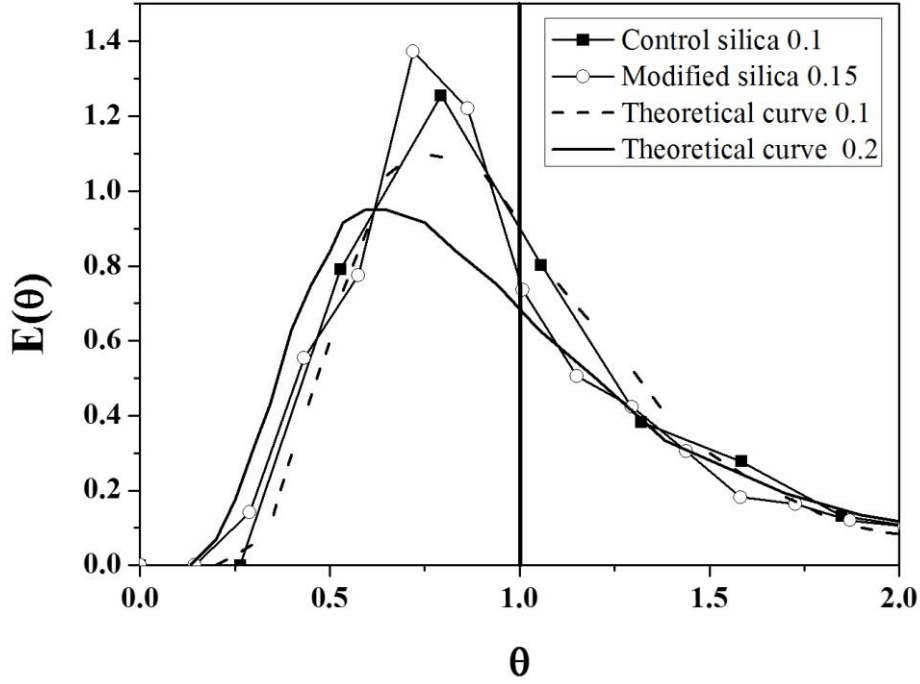


Figure 4: Comparison between the curves of the RTD with the theoretical curves for control silica or modified silica.

Through the dispersion model and the fact that the reactor radius is much smaller than his length, the radial concentration gradient could be ignored safely. The substrate concentration along the reactor described by Equation 14.

$$-U \frac{dC_A}{dz} = k_c \times S_B (C_A - C_A^S) \quad (14)$$

where, U corresponds the interstitial velocity of the substrate, k_c is the mass transfer coefficient (Equation 13) (Fogler, 2002), S_B is the surface area of the control silica and modified silica, C_A is the mass concentration of the substrate, C_A^S is the concentration of the substrate on the control silica and modified silica, and Z represents position along the reactor.

Mass transfer coefficient

Mass transfer coefficient (k_c) to the coconut oil and ethanol using BCL on control silica or modified silica in the transesterification reaction in PBR was estimated based on the correlation between the Reynolds numbers (Re_p), Sherwood (Sh), Schmidt (Sc) and diffusividade (D_{AB}), described in additional information. The mass transfer coefficient was evaluated in three different forms, for modifying the properties of the substrate, ranging the temperature (303 – 333 K) and molar ratio (1:7 – 1:12), and increased flow rate (0.15 – 1.0 mL.min⁻¹).

Firstly, was evaluated the influence of temperature (303-333 K) (Figure 5) in the transesterification reaction, keeping the volumetric flow rate (0.15 mL.min⁻¹) and molar ratio of substrate (1:7) constant. The variation of k_c 0.95×10^{-4} to 1.53×10^{-4} m.s⁻¹ (BCL on silica control) and 1.22×10^{-4} to 1.96×10^{-4} m.s⁻¹ (BCL on modified silica) is related to the number of Re_p . The increasing temperature 303 to 333 K, increased the number of Re_p 1.44 to 3.43 (BCL control silica) and 2.69 to 6.43 (BCL on modified silica).

The elevated temperature lowers the viscosity and density of the substrate, therefore increases the Re_p , increasing the diffusion rate of the substrate, which occurs more easily at high temperatures. Stressing that the use of the modified silica in the LIP of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by covalent binding decreased diffusional resistance of the substrate in the active site of the lipase. This behavior is similar to study by Tran et al. (2014) evaluating the k_c sunflower oil in methanol (1:4) and 10% water in relation the mass of oil, varying the temperature (298 - 333 K), obtained a result of an increase in k_c of 8.22×10^{-10} to 3.81×10^{-7} m.s⁻¹.

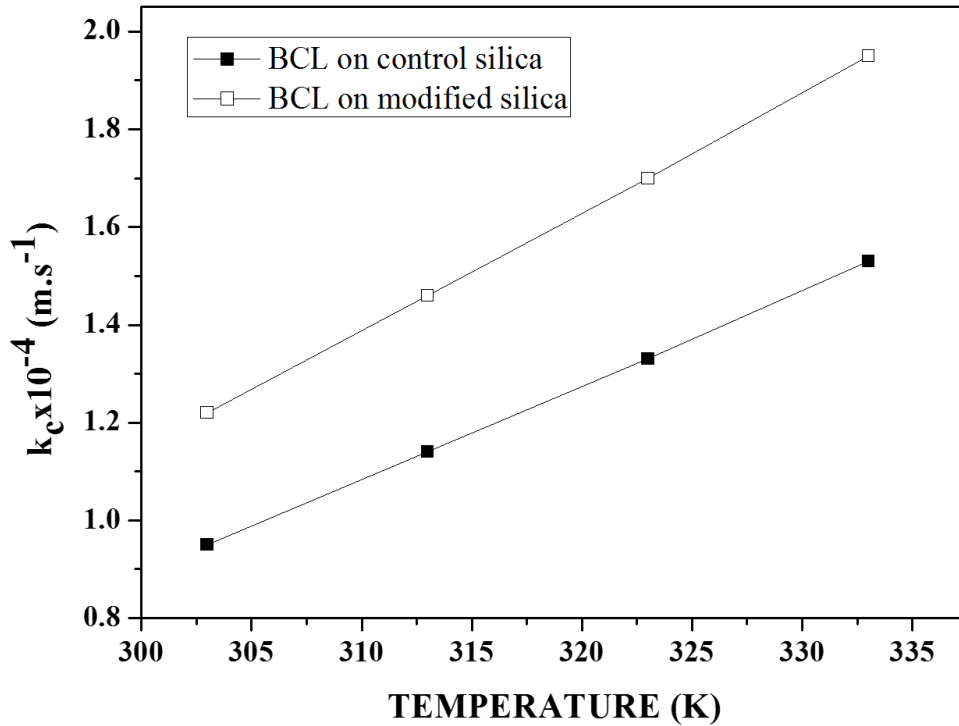


Figure 5: Mass transfer coefficient versus temperature of the reaction. Constituted by BCL on control silica or BCL on modified silica, in the conditions flow rate of 0.15 mL min^{-1} and molar ratio of 1:7 (coconut oil and ethanol).

The mass transfer coefficient, was also evaluated for the change in substrate concentration. The influence of the molar ratio in the mass transfer variation can observed in Table III. It perceived that the influence on k_c is practically inexistent, both the BCL control silica (1.14×10^{-4} to $1.10 \times 10^{-4} \text{ ms}^{-1}$) as for the BCL modified silica (1.46×10^{-4} to $1.40 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$). In this case the value of D_{AB} ($2.7 \times 10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) remained constant as it characteristic property of the substrate, varying only the parameters such as viscosity and density.

According to the literature, for the production of ethyl esters batch and continuous reactor, the variation of the molar ratio influencing in converting ethyl esters (Oliveira et al. 2014; Ribeiro et al. 2012). In this work, was evaluate too the molar ratio of substrate in the

transesterification of coconut oil and ethanol using *Burkholderia cepacia* lipase immobilized silica modified with ionic liquid in PBR. However, in packed bed reactor the mass transfer coefficient was estimated little around $1.1 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ for BCL on control silica and $1.4 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ for BCL on modified silica. In this study it was noted that the increase in concentration led to an increase in the mass transfer coefficient for both IB.

Table III: Mass transfer coefficient varying the molar ratio of substrate.

Molar ratio	BCL on control silica	BCL on modified silica
	$k_c \times 10^{-4} (\text{m.s}^{-1})$	$k_c \times 10^{-4} (\text{m.s}^{-1})$
1:7	1.14	1.46
1:9	1.11	1.42
1:10	1.10	1.41
1:12	1.10	1.40

Figure 6, with increasing the Reynolds number, the k_c increased for both fillings, in this case, the variation is a function of interstitial velocity Reynolds of the substrate, which is associated with the flow. The increasing speed enhances the transport of molecules, increasing the mass transfer rate. This behavior is consistent with that described in the literature. Thus, the variation the flow rate increases the transport rate, conducted by molecular diffusion in the substrate, but the increase in the pore the substrate interstitial velocity decreases the residence time within the PBR, causing a decrease in the concentration of ethyl esters (Chang et al. 2009; Halim et al. 2009; Tran et al. 2014; Wang et al. 2011).

A study by Meunier et al. (2015) to transesterification reaction em reator in fixed bed reactor, showed that the increase of the flow rate 2.3×10^{-8} to $33.3 \times 10^{-8} (\text{m}^3.\text{s}^{-1})$, increased the dimensionless numbers and consequently k_c ranging from 0.79×10^{-4} e $1.67 \times 10^{-4} (\text{m.s}^{-1})$ when used to Lipase PS “Amano” SD immobilized Celite R632. Park et al. (2008) also studied the influence of flow rate in the system and obtained the increase in the flow rate increasing k_c 0.27×10^{-7} to $2.7 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$.

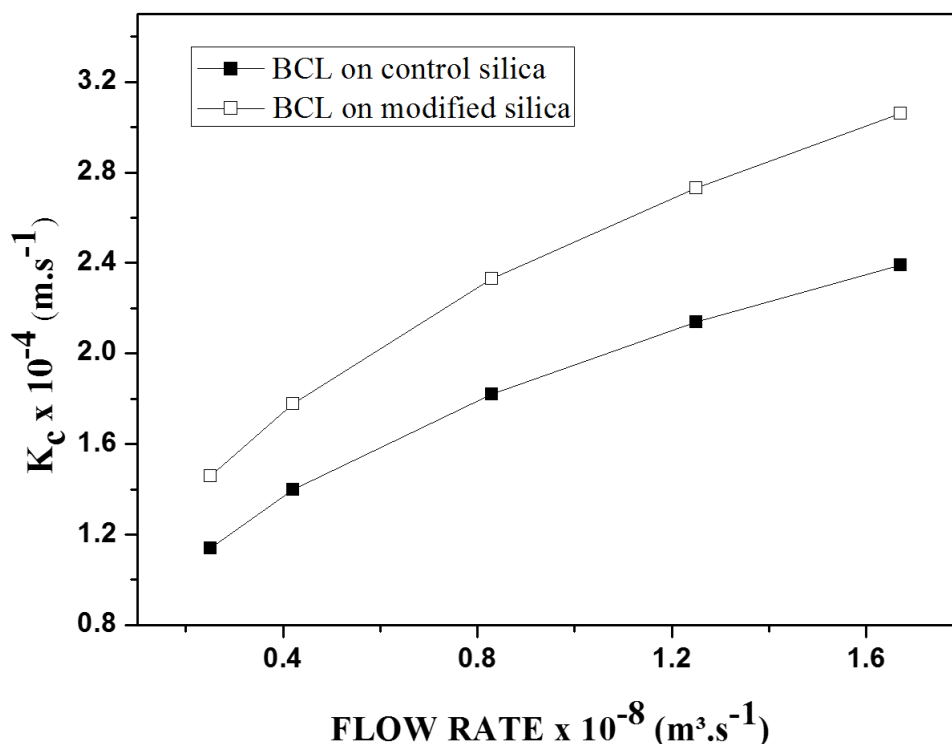


Figure 6: Mass transfer coefficient versus flow rate of the reaction. Constituted by BCL on control silica or BCL on modified silica, in the follows conditions: 303 K and molar ratio 1:7 (coconut oil : ethanol).

Note that the mass transfer coefficient was higher when using the IB modified silica in all cases. The effect of diffusion is limited by the capacity of the substrate has diffuse in the pores to achieve the enzyme on mesoporous supports (Jaladi et al. 2009). In study that the pore volume to control silica was lower than the modified silica, the same was not true for the BCL on control silica or BCL on modified silica. Since the pore volume for BCL control silica was higher than the BI modified silica, possibly by the formation of multilayer lipase on the surface of the control silica.

Differently from the BI modified silica, the lipase bound to the support, both on the surface and in the pores the silica, the increase in diameter of the pores the support caused by the presence of PIL (3.02 nm for control silica and 4.17 nm for modified silica). Thus, the lipase

accumulated on the silica surface has reduced diffusivity of the substrate, facilitating increasing conversion of ethyl esters in the transesterification reaction of 42 to 52%, because of the presence of a larger amount of lipase on the surface the pores.

CONCLUSION

The present study has as main objective to evaluate influence of PIL in the silica and IB, applied in the characterization of reactor and fluid in the transesterification reaction. The results obtained were:

- In the transesterification reaction, the maximum conversion was achieved for the BCL on modified silica with PIL, obtaining of 52 % conversion ethyl esters at 72 h, while for the BCL on control silica, maximum conversion was 42 % at 96 h;
- The presence of PIL influenced in the characteristics of the reactor, increasing the average time and axial dispersion model can be applied to both;
- The increase of the temperature, flow rate and molar ratio influenced positively in the mass transfer;
- The k_c was greater for the modified silica, due to the increase surface area and porosity, consequently, increased the mass transfer between the IB and substrate.

The results showed that the PIL influenced in the realized study, by modification caused in the morphological structure of the biocatalyst, increasing surface area for 349.4 (IB control silica) and 371.9 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ (IB modified silica), also increasing pore volume for 0.35 $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ (IB control silica) and 0.67 $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ (IB modified silica).

ACKNOWLEDGEMENTS

CNPq, CAPES and FAPITEC/SE by the financial support.

REFERÊNCIAS

- Álvarez VH. Mattedi S. Martin-Pastor M. Aznar M. Iglesias M. 2010. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid Phase Equilib.* 299:42–50.
- Balcão VM. Paiva AL. Malcata FX. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb. Technol.* 18:392-416.
- Bon EPS. Ferreira MA. Corvo ML. 2008. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.* Rio de Janeiro: Interciência. 506.
- Cardoso CL. Moraes MC. Cass QB. 2009. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. *Quim. Nova.* 32(1):175-187.
- Carvalho NB. Lima AS. Soares CMF. 2015. Use of modified silicas for lipase immobilization. *Quim. Nova.* 38(3):399-409.
- Chang C. Chen. JH. Chang CJ. Wu TT. Shieh CJ. 2009. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. *New Biotechnol.* 26 (3/4):187-192.
- Chattopadhyay S. Sen R. 2013. Development of a novel integrated continuous reactor system for biocatalytic production of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 147:395–400.
- Christopher LP. Kumar H. Zambare VP. 2014. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Appl. Energy.* 119:497-520.
- Dai S. Ju YH. Gao HJ. Lin JS. Pennycook SJ. Barnes CE. 2000. Preparation of silica aerogel using ionic liquids as solvents. *Chem. Commun.* 243–244.
- Dalla-Vecchia R. Nascimento MG. Soldi V. 2004. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova.* 27(4):623-630.

- Feng X. Patterson DA. Balaban M. Emanuelsson EAC. 2014. Characterization of liquid flow in the spinning cloth disc reactor: Residence time distribution, visual study and modeling. Chem. Eng. J. 235:356–367.
- Fogler HS. 2002. Elements of chemical reaction engineering. 3rd ed. New Jersey, Eua: PHPTR. xvii, p 967.
- Guisan JM. 2006. Immobilization of enzyme and cell. 2° ed. New Jersey, Eua: Humana Press, xiv, p. 449.
- Guldhe A. Singh B. Mutanda T. Permaul K. Bux F. 2015. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. Renewable Sustainable Energy Rev. 41:1447–1464.
- Hajar M. Shokrollahzadeh S. Vahabzadeh F. Monazzami A. 2009. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. Enzyme Microb. Technol. 45:188 –194.
- Halim SFA. Kamaruddin AH, Fernando WJN. 2009. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. Bioresour. Technol. 100:710 –716.
- Hartmann M. Kostrov X. 2013. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. Chem. Soc. Rev. 42:6277 – 6289.
- Itabaiana Jr I. Miranda LSM. Souza ROMA. 2013. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. J. Mol. Catal. B: Enzym. 85–86:1–9.
- Jaladi H. Katiyar A. Thiel SW. Gulians VV. Pinto NG. 2009. Effect of pore diffusional resistance on biocatalytic activity of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SBA-15 hosts. Chem. Eng. Sci. 64:1474 – 1479.
- Levenspiel O. 2000. Chemical reaction engineering: An Introduction To The Design Of Chemical Reactors. New York: John Wiley & Sons. p 501.

- Liese A. Hilterhaus L. 2013. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev.* 42:6236-6249.
- Lotti M. Pleiss J. Valero F. Ferrer P. 2015. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnol. J.* 10:22–30.
- Meunier SM. Rajabzadeh AR. Williams TG. Legge RL. 2015. Methyl Oleate Production in a Supported Sol–Gel Immobilized Lipase Packed Bed Reactor. *Energy Fuels.* 29:3168–3175.
- Oliveira MVS. Rós PCM. Mattedi S. Castro HF. Soares CMF. Lima AL. 2014. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Sci. Technol.* 36:445-451.
- Paula AV. Urioste D. Santos J.C. Castro HF. 2007. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 82:281-288.
- Poppe JK. Fernandez-Lafuente R. Rodrigues RC. Ayub MAZ. 2015. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 33:511–525.
- Ribeiro LMO. Santos BCS. Almeida RMRG. 2012. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. *Biomass Bioenergy.* 47:498-503.
- Santos JC. Paula AV. Rocha CGF. Nunes GFM. Castro HF. 2008. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane–polyvinyl alcohol prepared by sol–gel technique and their potential for immobilizing enzyme. *J. Non-Cryst. Solids.* 354:4823–4826.
- Seguin D. Montillet A. Brunjail D. Comiti J. 1996. Liquid-solid mass transfer in packed beds of variously shaped particles at low Reynolds numbers: experiments and model. *Chem. Eng. J.* 63:1-9.

- Sheldon RA. Pelt SV. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42:6223-6235.
- Silva WC. Teixeira LF. Carvalho AKF. Mendes AA. Castro HF. 2014. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. *J. Ind. Eng. Chem.* 20:881–886.
- Simões S. Ramos L. Freitas L. Santos JC. Zanin GM. Castro HF. 2015. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. *Biofuel Res. J.* 6: 242-247.
- Souza RL. Faria ELP. Figueiredo RT. Freitas LS. Iglesias M. Mattedi S. Zanin GM. Santos OAA. Coutinho JAP. Lima AS. Soares CMF. 2013. Protic ionic liquido as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme Microb. Technol.* 52:141-150.
- Todero LM. Bassi JJ. Lage FAP. Corradini MCC. Barboza JCS. Hirata DB. Mendes AA. 2015. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on polymethacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38:1601-1613.
- Tran DT. Lin YJ. Chen CL. Chang JS. 2014. Modeling the methanolysis of triglyceride catalyzed by immobilized lipase in a continuous-flow packed-bed reactor. *Appl. Energy.* 126:151–160.
- Treybal RE. 1980. *Molecular Diffusion in fluids. Massa-Transfer Operations.* McGraw-Hill: New York, 21-44.
- Wang X. Liu X. Zhao C. Ding Y. Xu P. 2011. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. *Bioresour. Technol.* 102:6352–6355.
- Xi T. Chen Q. You C. 2015. Flow characteristics of biomass particles in a horizontal stirred bed reactor: Part I. Experimental measurements of residence time distribution. *Powder Technol.* 269:577–584.

Supplementary

Material

Article I

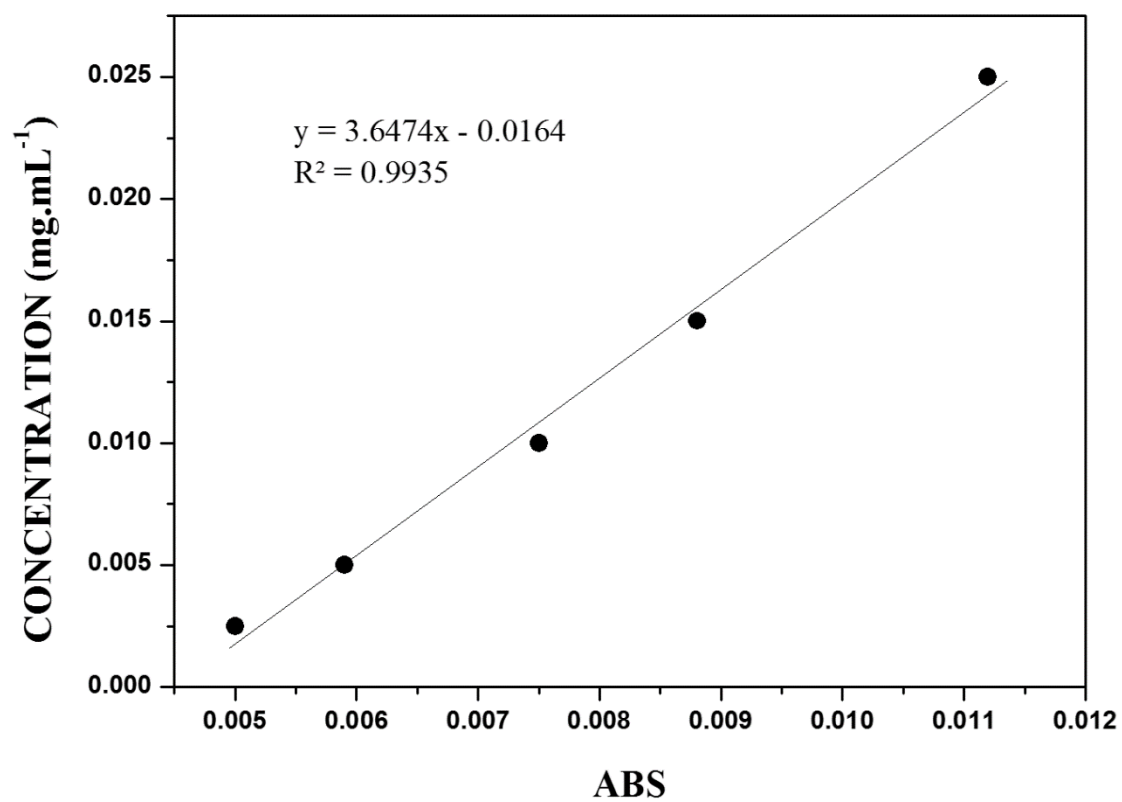


Figure S.1: Concentration versus absorbance of the tracer.

Tabela S.1: Dimensionless numbers in function the temperature the reaction, constituted by BCL on control silica (IB control) and BCL on modified silica (IB modified silica), with flow rate and molar ratio constant.

Immobilized Biocatalyst	Parameters for equation 13							Re _p	Parameters for equation 11				D _{AB} x10 ⁻⁶ (m ² .s ⁻¹)	Sc	Sh	K _c x10 ⁻⁴ (m.s ⁻¹)					
	T (K)	μ _{substrate} (kg.ms ⁻²)	ρ (g.m ⁻³)	d _p x10 ⁻⁴ (m)	ε	A x10 ⁻⁴ (m ²)	Q x10 ⁻⁹ (m ³ .s ⁻¹)		μ _{oil} x10 ⁻⁶ (kg.ms ⁻²)	φ	M _{oil} (kg.kmol ⁻¹)	V _{etanol} (m ³ .kmol ⁻¹)									
IB control silica	303	0.0058	845200	9.2	0.3	7.85	2.5	1.44	3.6	1.5	698.21	0.058	1.8	0.0039	0.050	0.95					
	313	0.0042	837100					1.95	2.4				2.7	0.0019	0.039	1.14					
	323	0.0031	828700					2.68	1.7				4.0	0.0009	0.031	1.33					
	333	0.0024	820200					3.43	1.3				5.5	0.0005	0.026	1.53					
IB modified silica	303	0.0058	845200		0.16			7.85	2.5				2.69	3.6	1.5	698.21	0.058	1.8	0.0039	0.064	1.22
	313	0.0042	837100										3.65	2.4				2.7	0.0019	0.050	1.46
	323	0.0031	828700										5.02	1.7				4.0	0.0009	0.040	1.71
	333	0.0024	820200										6.43	1.3				5.5	0.0005	0.033	1.96

Tabela S.2: Dimensionless numbers in function the flow rate the reaction, constituted by BCL control silica (control silica) and BCL on modified silica (IB modified silica), with temperature and molar ratio constant.

Immobilized Biocatalyst	Parameters for equation 13						Re _p	Parameters for equation 12		Sh	K _c x10 ⁻⁴ (m.s ⁻¹)		
	Q x10 ⁻⁸ (m ³ .s ⁻¹)	μ _{substrate} (kg.ms ⁻²)	ρ (g.m ⁻³)	d _p x10 ⁻⁴ (m)	ε	A x10 ⁻⁴ (m ²)		D _{AB} x10 ⁻⁶ (m ² .s ⁻¹)	Sc				
IB control silica	0.25	0.0042	837100	9.2	0.3	7.85	0.25	2.7	0.0019	0.039	1.14		
	0.42						0.42			0.048	1.40		
	0.83						0.83			0.062	1.83		
	1.25						1.25			0.073	2.14		
	1.67						1.67			0.082	2.40		
IB modified silica	0.25				0.16		0.16			3.65	0.050	1.46	
	0.42									6.13	0.061	1.79	
	0.83									12.11	0.080	2.33	
	1.25									18.25	0.094	2.74	
	1.67									24.38	0.105	3.06	

Tabela S.3: Dimensionless numbers in function the molar ratio the reaction, constituted by , constituted by BCL on control silica (IB control) and BCL on modified silica (IB modified silica), with flow rate and temperature constant.

Immobilized Biocatalyst	Parameters for equation 13							Re _p	Parameters for equation 12		Sh	k _c x10 ⁻⁴ (m.s ⁻¹)				
	Razão molar	μ _{substrate} (kg.ms ⁻²)	ρ (g.m ⁻³)	d _p x10 ⁻⁴ (m)	ε	A x10 ⁻⁴ (m ²)	Q x10 ⁻⁹ (m ³ .s ⁻¹)		D _{AB} x10 ⁻⁶ (m ² .s ⁻¹)	Sc						
IB control silica	1:7	0.0042	837100	9.2	0.3	7.85	2.5	2.7	2.7	0.0018	0.039	1.14				
	1:9	0.0032	832000							0.0014	0.038	1.11				
	1:10	0.0030	829900							0.0013	0.037	1.10				
	1:12	0.0028	827800							0.0012	0.037	1.10				
IB modified silica	1:7	0.0042	837100		0.16					7.85	2.5	2.7	2.7	0.0018	0.050	1.46
	1:9	0.0032	832000											0.0014	0.048	1.42
	1:10	0.0030	829900											0.0013	0.048	1.41
	1:12	0.0028	827800											0.0012	0.048	1.40

ARTIGO II

Transesterification of coconut oil and ethanol using *Burkholderia cepacia* lipase immobilized silica modified with ionic liquid in batch stirred tank and PBR reactor

Juliana Lisboa Santana¹, Juliana Marçal de Oliveira¹, Jamily Santos do Nascimento¹, Nayara Bezerra Carvalho¹, Maria Elisabete Machado², Silvana Matedi³, Laisa Canielas Krause², Álvaro Silva Lima¹, Cleide Mara Faria Soares^{1,*}

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Aracaju, SE, Brasil

² Universidade Tiradentes, Núcleo de Estudo em Sistemas Coloidais – NUESC, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, Aracaju, SE, Brasil

³ Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química, Rua Aristides Novis 2, Federação, Salvador, BA, Brasil

* Corresponding Author. Tel: + 55 79 79 91322592, FAX: + 55 79 55 7932182190

E-mail address: cleide.soares@pq.cnpq.br

SUMMARY

ABSTRACT.....	65
INTRODUCTION.....	66
MATERIALS AND METHODS	67
Materials	67
Support synthesis.....	68
Immobilization by covalent bonding method	68
Synthesis of ethyl esters batch reactor.....	68
Synthesis of ethyl esters PBR reactor.....	69
Analysis ethyl esters	70
RESULTS AND DISCUSSION	70
Synthesis of ethyl esters batch reactor or PBR reactor.....	70
Effect of molar ratio	72
Effect of temperature.....	72
Flow rate effect in PBR reactor.....	74
Catalyst Reusability.....	75
CONCLUSION	76
ACKNOWLEDGEMENTS	77

ABSTRACT

The use of immobilized biocatalysts (IB) in the transesterification reaction, using batch stirred tank reactor (BSTR) and packed bed reactor (PBR) is very much advantageous to various configurations of reactors. The objective of this study was to compare the performance of batch reactor and PBR, assessing the reaction parameters, with temperature (30 - 60 °C), molar ratio (1:7-1:10) and flow rate (0.15-0.75 mL.min⁻¹), for both reactors. Using *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on modified silica protic ionic liquid (PIL). The batch reactor best performance, was with the maximum conversion of esters 72 % at 40 °C, molar ratio 1:10 in time of 72 h. While the reactor PBR reaches maximum conversion of ethyl esters of 52 %, 40 °C, molar ratio 1:7, flow rate 0.15 mL.min⁻¹ by 72 h. The improved performance of the batch reactor, occurred by the glycerol accumulation in the lower part of the PBR reactor, thus decreasing the catalytic activity of the immobilized lipase.

Keywords: Ionic Liquid, Packed bed reactor, Transesterification, Coconut oil

INTRODUCTION

The increase in energy consumer is directly linked to population growth and globalization, by making it increasingly prized [1]. Thus, biofuels arise as a renewable alternative, highlighting the biodiesel (ethyl esters) to emit a lesser quantity of greenhouse effect gases, utilize renewable sources and be produced by enzyme catalysis [2,3].

Enzymatic catalysts have advantages over chemical catalysts, such as easy product recovery, use of moderate conditions in the process, catalyst reusability and use less energy [4,5]. The cost of the process can be improved by means of lipase immobilization techniques, which maintains the catalytic efficiency and operational stability, enabling their reuse or use in continuous reactors [6,7].

The choice of support is of importance fundamental because it influenced in the properties of the immobilized biocatalyst. The silica has a high potential as support in immobilization, by allowing the surface modification with additives, increasing the porosity and contact surface [8]. Additives, such as ionic liquid (IL), possess unique properties, being classified into aprotic ionic liquids (AIL) e protic Ionic Liquids (PIL) [7-9]. According Álvarez et al. [9], the PIL's are low cost and simplicity of synthesis, which favors the industrial interest.

The most used process for the synthesis of ethyl esters is transesterification reaction [10]. Production is generally catalyst in batch reactors type of batch stirred tank reactor (BSTR), to obtaining a high conversion to the esters, although there is a range of reactor configurations. The packed bed reactor (PBR) is the most used at industrial scale. Compared to the batch reactor, the PBR obtains a larger surface area having a higher productivity in industrial processes [5,11]. According to Guldhe et al. [3] conversion ethyl esters depends on various factors such as the temperature, the molar ratio of the reagents, flow rate, immobilization techniques, type reactor, etc.

However, the production of ethyl esters only becomes viable by the availability of raw materials, environmentally friendly and low cost the production, so there is a wide variety of raw materials that can be used in the production of esters, such as edible oil, non-edible oils, crude oil, waste oils and other [12]. Actually, crude oils have gained prominence by its high triglyceride content, easy availability and low cost. Crude coconut oil has a high concentration of fatty acid, minimizes undesirable reactions such as saponification, in addition to reducing the production cost by not having to go through fur refining process [13].

The production of ethyl esters using immobilized biocatalysts (IB) in silica modified PIL has been described in the literature, Souza et al. [7] and Oliveira et al. [14] used *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) immobilized by encapsulation method, as biocatalyst, in the transesterification reactions in batch reactor. Thus, this work have objective to compare use BCL on silica modified with PIL in BSTR and PBR reactor, in transesterification reaction using coconut oil and ethanol, to evaluate the reaction parameters (temperature, molar ratio, flow rate and reuse).

MATERIALS AND METHODS

Materials

For the carried experiments were used commercial lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) (1317.16 U.mg⁻¹) and Tetraethoxysilane (TEOS) (98%) was purchased from Sigma Aldrich. Hydrochloric acid (> 36%), ammonia (28-38%), ethanol (99%), hexane (99%), polyethylene glycol (PEG) 1500, epichlorohydrin (98%), crude coconut oil purchased on the local market. The PIL pentanoate N-methyl-2-hydroxyethyl was provided the Federal University of Bahia (UFBA).

Support synthesis

Production the support was obtained by sol-gel technique previously established by Souza et al. [7] with some modifications, can be described as: 30 mL in TEOS was dissolved 36 mL in ethanol under inert nitrogen atmosphere and stirred at 100 rpm at 35 °C. Was slowly added the pre-hydrolyzing solution (hydrochloric acid) and stirred for 90 min at 35 °C. Furthermore, 1% PIL (v/v) was added to prepare the modified support and then hydrolyzing solution (ammonium hydroxide and ethyl alcohol 1:6) was added. The mixture was allowed for rest by 60 min. Then taken to the refrigerator for 24 h until complete polycondensation. The material was washed with hexane through a Soxhlet extractor (New Ethics) for a period of 12 hours and taken desiccator by 72 h.

Immobilization by covalent binding method

The immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* was realized according methodology described by Paula et al. [15]. The support was treated with a sodium phosphate buffer pH 7.5 and epichlorohydrin by 2 h, at ambient temperature. After, the treated support was washed with buffer pH 7.5 and distilled water, and taken to stove the 60 °C by 20 h. Then, the treated support was soaked in hexane and taken the stirring by 2 h, at ambient temperature. The lipase was added with solution of PEG 1500 and stirred by 2 h. The immobilized lipase was carried to a refrigerator by 24 h, washed with hexane and dried in vacuum. Reserved in a desiccator by 48 h.

Synthesis of ethyl esters Batch Stirred Tank Reactor

The reactions for the synthesis of ethyl esters were carried out in batch reactor at 100 rpm, using biocatalysts immobilized (IB) by covalent binding, Applicator separately, containing 3 g of substrate which consists of coconut oil and ethanol (1:7) and 20 % (m/m) of biocatalyst to the total weight of the substrate. Reactions were performed at 40 °C for a period

of 96h. And were analyzed of the time course of the transesterification reaction. Yet was evaluated of effect molar ratio (1:7 – 1:12) and temperature (30 – 60 °C).

Synthesis of ethyl esters PBR reactor

The reactions were performed in PBR reactor (internal diameter 1 cm, height 10 cm, total volume of approximately 7.85 mL) connected to a circulating water bath to keep the temperature at 40 °C (Fig. 1), with reaction time between 24 – 96 h. First, the column was filled with approximately 3 g of IB and the substrate was continuously pumped through the column up flow, with the assistance of peristaltic pump Milan (model 209), used flow rate 0.15 mL.min⁻¹. The substrate of coconut oil and ethanol (1:7) was maintained in the feed tank with magnetic stirring and temperature controlled by a heating plate [16].

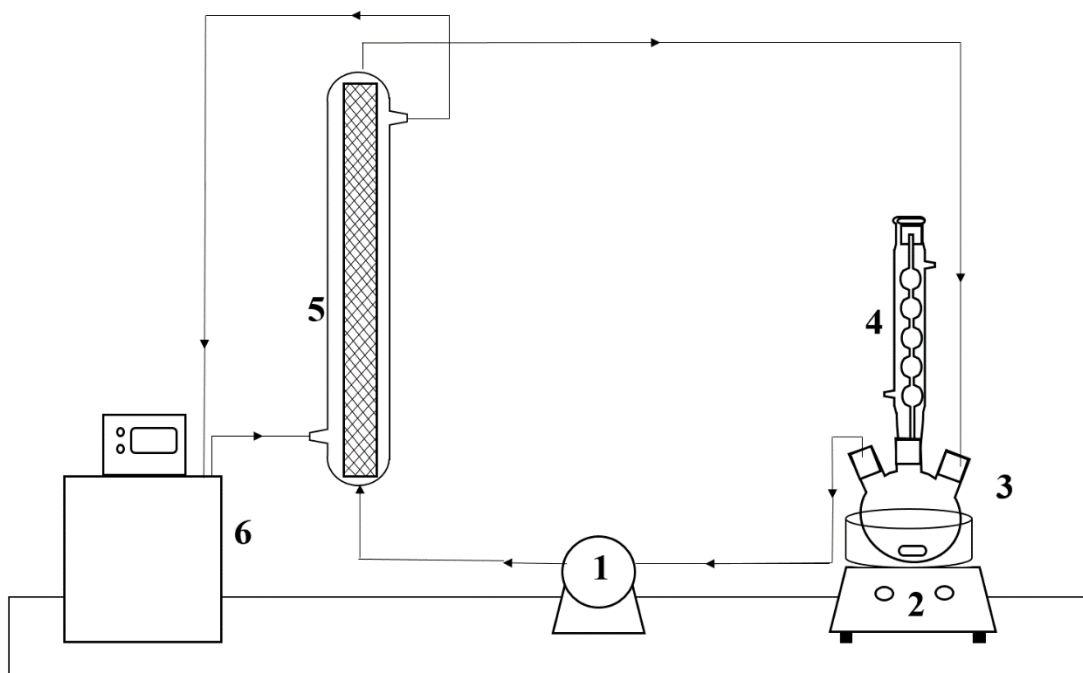


Fig. 1. Schematic design of the PBR reactor. (1) Peristaltic pump; (2) Heating plate; (3) Recipient containing substrate; (4) Condenser; (5) PBR reactor; (6) Thermostatic bath.

Were analyzed of time course of the transesterification reaction between 24 to 96 h. Yet was evaluated flow rate , between 0,15 – 0,75 mL.min⁻¹, molar ratio (1:7 – 1:12), temperature (30 -60 °C) and reuse by 4 days.

Ethyl esters analysis

Analyses of esters composition were performed by GC gas chromatograph (SHIMADZU – 2010), with mass detector FID (Flame Ionization Detector) equipped with a DB – WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25µm). The column temperature initially maintained at 100 °C with heating ramp 10 °C.min⁻¹ until temperature 250 °C. For the samples injection in the chromatography 0.01 g of the sample were diluted with hexano in a volumetric flask 10 mL. Furthermore, 200 µL of the sample and 200 µL of the internal standard solution (methyl heptadecanoate) were diluied in another volumetric flask 2 mL.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of ethyl esters batch stirred tank or PBR reactor

The application of immobilized lipases in biotechnological processes assists the development of new processes on a commercial scale, increasing productivity, furthermore also favors its use in bioreactors with different configurations [17,18]. Literature shows that the conversion of ethyl esters is affected on various factors by reactor configuration, temperature, molar ratio of reagents, flow rate and other factors [3].

Thus, these factors were studied in the transesterification reaction catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in control silica and silica modified with PIL. Initially, the transesterification reactions, for both reactors, were conducted using the immobilized biocatalysts (IB) on control silica or silica modified with PIL, in a time interval between 24 - 96 h, temperature (40 °C) and the molar ratio (1:7) constant. The flow rate (0.15 mL.min⁻¹) was constant in the PBR reactor.

Maximum conversion the ethyl esters, in batch stirred tank reactor, was obtained 60 % in 24 h reaction when used IB on silica control and 62 % in 72 h reaction when used IB on silica modified with PIL. However, maximum conversion the ethyl esters, in PBR, was 46 % in 96 h when used IB on silica control and 51 % in 72 h reaction [16], when used IB on silica modified with PIL. It is observed that maximum conversions were obtained with the IB on silica modified, as expected, which may be attributed to the presence of the PIL [7,14]

Kalantari et al. [19] used *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on mesoporous silica-coated magnetite cluster nanocomposites particles, in the transesterification reaction of soybean oil with methanol (1:6), with constant magnetic agitation of 150 rpm, reaching maximum conversion of 43 %, in 24 h. While, in the PBR reactor, Wang et al. [20] realized the transesterification reaction, using a mixture of soybean oil, distilled water, methanol, and n-hexane (6:3:1:0.2), at 40 °C, flow rate 0.15 mL.min⁻¹ and with *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on Fe₃O₄ nanoparticle biocomposite catalyst, obtained maximum conversion 74 %, in 12 h reaction.

These results are in accordance with previous study reported, for both reactors. The low conversion of ethyl esters in the transesterification reaction was possibly due to the presence of antioxidants, phospholipids, impurities and a high acid value, characteristics of crude vegetable oils which have not undergone refining process or degumming, as the crude coconut oil used in the transesterification reaction of this study, thus affecting the conversion of esters [21,22]. The conversion lower obtained in PBR reactor can be have for the effect the glycerol exercised in the lipase [23]. In the PBR reactor, the glycerol can accumulate at the bottom of the reactor due to higher viscosity. For be hydrophilic and insoluble in oil, the glycerol is absorbed in the surface lipase resulting in the loss of activity the IB [24].

Effect of molar ratio

In this study, the molar ratio ranges from 1:7 to 1:12 (Fig. 2.), the reactions were performed at 40 °C, in time 72 h and IB on silica modified PIL. In PBR reactor, the flow rate was maintained at 0.15 mL.min⁻¹. When used the batch reactor, conversion the ethyl esters ranged between 55 - 72%. Obtaining maximum conversion in the molar ratio 1:10 in 72 h of reaction. While, for the reactor PBR, the maximum conversion of the ethyl esters ranged between 37 – 52 %, for the molar ratio of 1: 7 at 72 h of reaction.

The molar ratio between oil and ethanol is an important parameter to influence the conversion rate of esters, in which, excess of alcohol can inhibit enzyme activity, inactivating catalytic activity in transesterification reaction [25]. However, the study carried out in batch reactor showed that excess alcohol influenced positively in the reaction. Similar results are reported in the literature, showing that the excess of ethanol does not inactivated the lipase activity during the reaction [14,25].

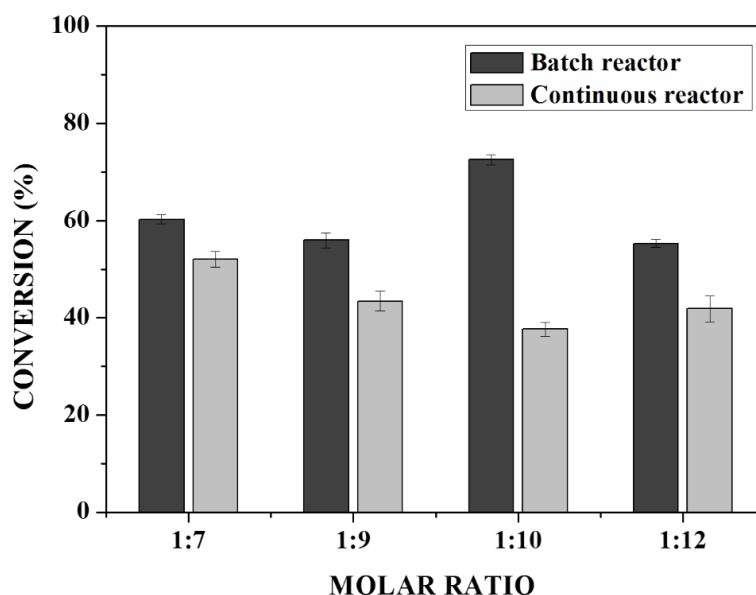


Fig. 2. Conversion to ethyl esters using BCL on silica modified with PIL, in stirred tank batch reactor and PBR reactor. Follows conditions: 40 °C, flow rate 0.15 mL.min⁻¹ and time 72 h constant and varing molar ratio.

Different from what occurred in the PBR reactor, the maximum conversion was reached in lower molar ratio, possibly the excess ethanol inhibiting the catalytic activity of lipase. In transesterification reaction, lower alcohols (methanol and ethanol) have a negative impact on the stability of the lipase in which the inhibitory effect of the alcohols on the activity of lipases decreases with increasing molecular weight the alcohol [26,27].

Effect of temperature

Another important parameter that influence on esters synthesis is temperature. Fig. 3 shows the influence of temperature on reactions to both reactors, varying the temperature between 30 - 60 °C.

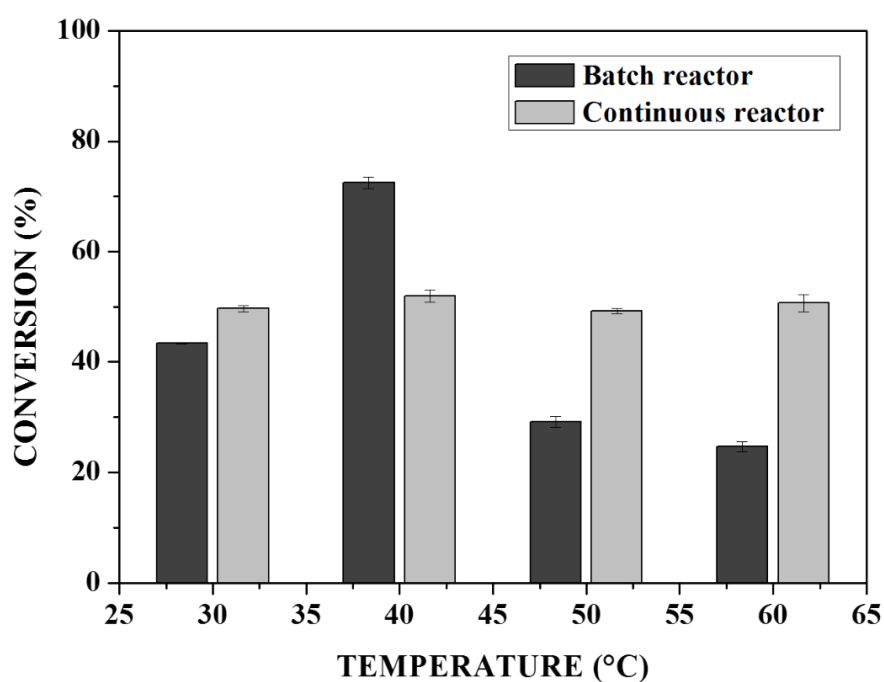


Fig. 3. Conversion to ethyl esters utilizing IB silica modified with PIL, in batch reactor, with molar ratio 1:10 constant and PBR reactor, with molar ratio 1:7, flow rate 0.15 mL.min⁻¹ and time 72 h constant, ranging temperature.

In the batch reactor temperature was assessed using the molar ratio 1:10, which was the maximum conversion reached when has evaluated the influence of the molar ratio (Fig. 2.) in time 72 h. The conversions esters ranged between 24 - 72%, with maximum conversion at 40 °C. In PBR reactor, the temperature was studied in the molar ratio 1: 7 (Fig. 2). The conversions esters remained stable, ranging from 49 - 52%, with the maximum conversion reached at 40 ° C, as also occurred in the batch reactor.

In several lipases to optimal temperature varies between 30 and 55 °C. In literature, studies have shown that *Burkholderia cepacia* lipase (this study) when applied in the transesterification reaction, get the best results in the same temperature range (30 - 60 °C) performed in this study, for both types of reactors [14,28,29].

Flow rate effect in PBR reactor

In PBR reactors in addition to the molar ratio and temperature, the flow rate is an important parameter to influence to the conversion of ethyl esters [20,28,30,31]. This study was performed at flow rate ranging between 0.15 - 0.75 mL.min⁻¹, with temperature (40 ° C), molar ratio (1: 7) and time (72 h) constant.

Fig. 4 shows the influence of flow rate on the conversion of ethyl esters. The conversion ranged between 30 – 52 %, in which the maximum conversion was flow rate reached at 0.15 mL.min⁻¹ flow rate, but can to observe that the conversion rate in the flow rates were 0.15 and 0.25 mL.min⁻¹ very close and could be considered equal.

Similar results are reported in the literature, Chang et al. [31] has evaluated the flow rate (0.1 to 1.0 mL.min⁻¹) in PBR reactor (volume 4.15 mL) in the transesterification reaction of refined soybean oil and isopropanol using a *Candida antartica* lipase immobilized on acrylic resin. The study showed that the highest conversion (76.98 %) was reached in the flow rate 0.1 mL.min⁻¹. Similarly, Chen et al. [30] evaluated the flow rate of between (0.1 - 0.5 mL.min⁻¹)

in PBR reactor (volume 4.15 mL), in the transesterification reaction of refined soybean oil and methanol using a *Candida antartica* lipase immobilized on acrylic resin, the maximum conversion was obtained (81 %) flow rate 0.1 mL.min⁻¹.

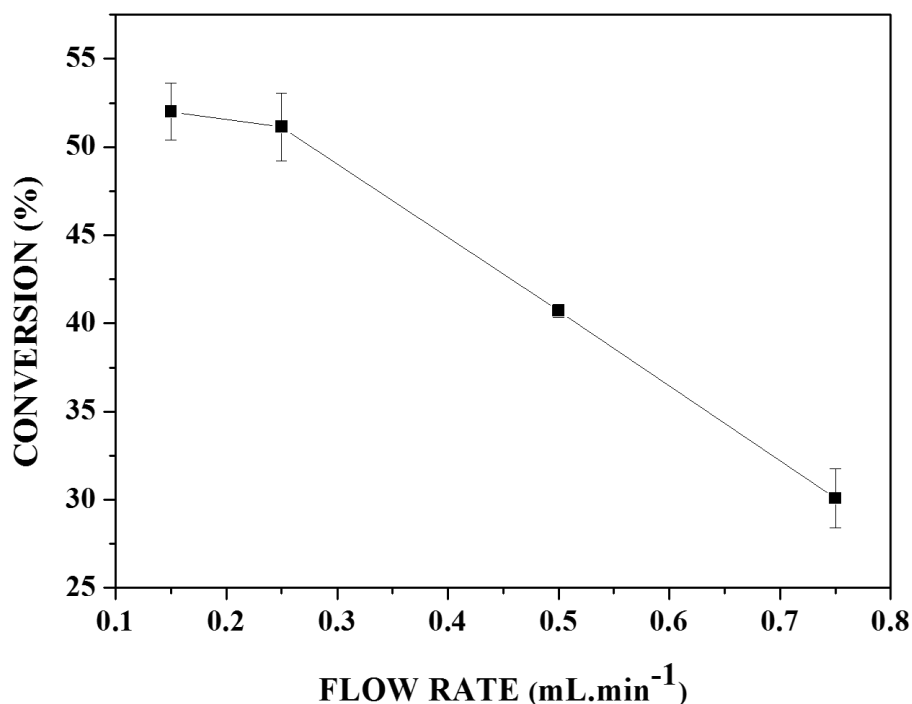


Fig. 4. Conversion to ethyl esters in transesterification reaction using coconut oil and BCL on silica modified with PIL in PBR reactor, with molar ratio 1:7, time 72 h and temperature 40 °C constant, ranging flow rate.

Potential Catalyst Reusability in PBR reactor

Potential of reusability in PBR reactor was investigated at four day (Fig. 5.), every day a new substrate was provided. The analysis were realized in optimal conditions of study, 0.15 mL.min⁻¹, 40 °C and molar ratio 1:7. The IB presented a good operational stability during the four days, without decreasing the production of ethyl esters.

Salum et al [32] evaluated the stability of the lipase from *Burkholderia cepacia* solid state fermentation in PBR reactor using soybean oil and ethanol (molar ratio 1: 3) at 50 ° C,

flow rate 1.5 mL min⁻¹ for 9 cycles in 47 h, it was observed that the conversion of ethyl esters was stable for 3 cycles. Meunier et al [33] investigated for 5 days stability of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in sol-gel and supported on Celite, applied in PBR reactor to production methyl oleate. Observed that on day one the concentration of methyl oleate was considerably lower than in the subsequent days, which remained stable at the 2, 3 and 4 days, starting to lose activity in 5 day.

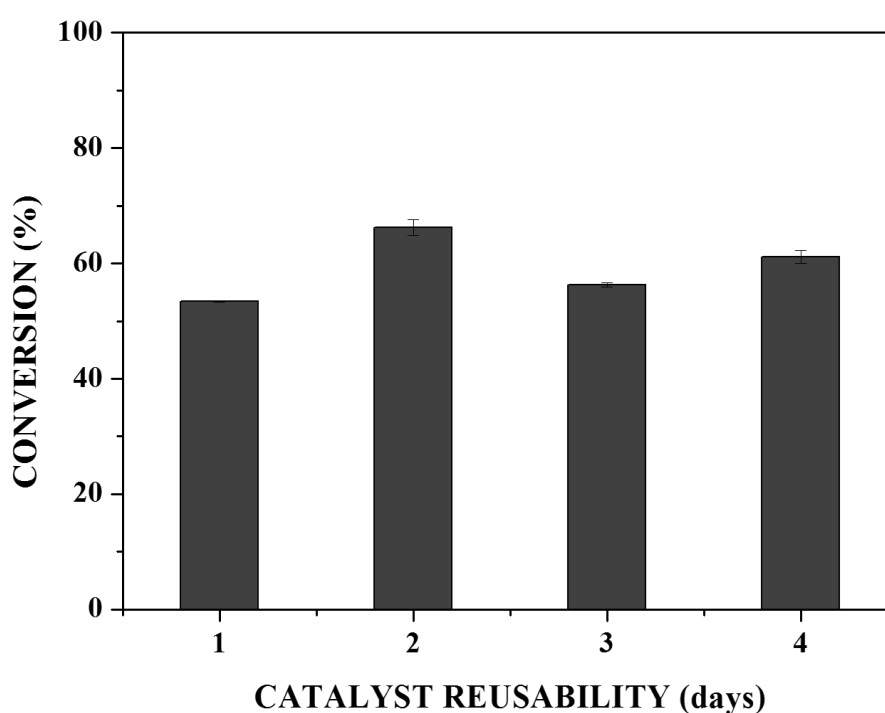


Fig. 5. Reuse BCL on silica modified with LIP for 4 days in transesterification reaction using coconut oil:ethanol, at temperature 40 °C, flow rate 0.15 mL min⁻¹ and molar ratio 1: 7.

CONCLUSION

The batch stirred tank reactor obtained the maximum conversion ethyl esters (62 %) greater than the PBR, in follows conditions: 40 °C, molar ratio 1:7, reaction time 72 h. For PBR was obtained the maximum conversion ethyl esters the same parameters. For both reactors obtained the maximum conversion the ethyl esters at 40 °C, but at different molar ratios, batch

reactor 1:10 and the PBR reactor 1:7. Besides temperature and mole ratio, the PBR reactor was evaluated how much the flow rate, at which shown that the maximum conversion was obtained at lower flow rates (0.15 and 0.25 mL.min⁻¹). Therefore in this study can be observe potential the use ethyls esters using crude coconut oil due the results good obtained.

ACKNOWLEDGEMENTS

CNPq, CAPES and FAPITEC/SE by the financial support.

REFERENCES

- [1] CB. Teixeira, JVM. Junior, GA. Macedo, Renewable Sustainable Energy Rev. 33 (2014) 333–343.
- [2] SK. Narwal, R. Gupta, Biotechnol. Lett, 35 (2013) 479–490.
- [3] A. Guldhe, B. Singh, T. Mutanda, K. Permaul, F. Bux, Renewable Sustainable Energy Rev. 41 (2015) 1447–1464.
- [4] M. Aarthy, P. Saravanan, MK. Gowthaman, C. Rose, NR. Kamini, Chem. Eng. Res. Des. 92 (2014) 1591–1601.
- [5] X. Zhao, F. Qi; C. Yuan, W. Du, D. Liu, Renewable Sustainable Energy Rev. 44 (2015) 182–197.
- [6] Z. Zhou, M. Hartmann, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 3894-3912.
- [7] RL. Souza, ELP. Faria, RT. Figueiredo, LS. Freitas, M. Iglesias, S. Mattedi, GM. Zanin, OAA. Santos, JAP. Coutinho, AS. Lima, CMF. Soares, Enzyme Microb. Technol. 52 (2013) 141-150.
- [8] NB. Carvalho, AS. Lima, CMF. Soares, Quim. Nova. 38 (2015) 399-409.
- [9] VH. Álvarez, S. Mattedi, M. Martin-Pastor, M. Aznar, M. Iglesias, Fluid Phase Equilib. 299 (2010) 42–50.

- [10] R. Geris, NAC. Santos, BA. Amaral, IS. Maia, VD. Castro, JRM. Carvalho, *Quim. Nova.* 30 (2007) 1369-1373.
- [11] VM. Balcão, AL. Paiva, FX, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 392-416.
- [12] MR. Avhad, JM. Marchetti, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 50 (2015) 696–718.
- [13] SC. Tupufia, YJ. Jeon, C. Marquis, AA. Adesina, PL. Rogers, *Fuel Process. Technol.* 106 (2013) 721–726.
- [14] MVS. Oliveira, PCM. Da Rós, S. Mattedi, HF. Castro, CMF. Soares, AS. Lima, *Acta Scientiarum. Technology.* 36 (2014) 445-451.
- [15] AV. Paula, D. Urioste, JC. Santos, HF. Castro, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 281-288.
- [16] JL. Santana, JM. Oliveira, NB. Carvalho, S. Mattedi, EB. Cavalcanti, AS. Lima, CMF. Soares. *Biotechnol. Bioeng.* (2016) enviado.
- [17] JK. Popper, R. Fernandez-Lafuente, RC. Rodrigues, MAZ. Ayub, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 511.
- [18] X. Deng, Z. Fang, YH. Liu, *Energy Convers. Manage.* 51 (2010) 2802.
- [19] M. Kalantari, M. Kazemeini, A. Arpanaei, *Biochem. Eng. J.* 79 (2013) 267–273.
- [20] X. Wang, X. Liu, C Zhao, Y. Ding, P. Xu. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 6352–6355.
- [21] S. Michelin, FM. Penha, MM. Sychoski, RP. Scherer, H. Treichel, A. Valerio, M. Di Luccio, D. Oliveira, JV. Oliveira. *Renewable Energy.* 76 (2015) 388-393.
- [22] W. Yuan, AC. Hansen, Q. Zhang. *Fuel.* (2005) 943-950
- [23] V. Dossat, D. Combes, A. Marty, *Enzyme Microb. Technol.* 25 (1999) 194–200.
- [24] DE. Stevenson, RA. Stanley, RH. Furneaux, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 478-484.
- [25] LMO. Ribeiro, BCS. Santos, RMRG. Almeida, *Biomass Bioenergy.* 47 (2012), 498-503.

- [26] Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara, Y. Tominaga, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 17 (2002) 133–142.
- [27] PM. Nielsen, J. Brask, L. Fjerbaek, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110 (2008) 692–700.
- [28] DT. Tran, YJ. Lin, CL. JS. Chang, *Appl. Energy.* 126 (2014) 151–160.
- [29] AF. Hsu, KC. Jones, TA. Foglia, WN. Marmer, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 749-752.
- [30] HC. Chen, HY. Ju, TT. Wu, YC. Liu, CC. Lee, C. Chang, YL. Chung, CJ. Shieh, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2010) 1-6.
- [31] C. Chang, JH. Chen, CJ. Chang, TT. Wu, CJ. Shieh, *New Biotechnol.* 26 (2009) 187-192.
- [32] TFC. Salum, P. Villeneuve, B. Barea, CI. Yamamoto, LC. Côcco, DA. Mitchell, N. Krieger, *Process Biochem.* 45 (2010) 1348–1354.
- [33] SM. Meunier, AR. Rajabzadeh, TG. Williams, RL. Legge, *Energy Fuels.* 29 (2015) 3168–3175.

Capítulo V

CONCLUSÕES

Nesta dissertação verificou-se a obtenção de ésteres etílicos em reator de tanque agitado em regime batelada e reator de fluxo contínuo, as quais os resultados foram apresentados utilizando dois artigos. E as principais conclusões foram:

ARTIGO I

- A máxima conversão atingida na reação de transesterificação em fluxo contínuo foi quando utilizou-se o biocatalisador imobilizado em sílica modificada com líquido iônico prótico obtendo 52 % de conversão de ésteres etílicos no tempo reacional de 72 h. temperatura de 40 °C e razão molar 1:7.
- O líquido iônico prótico influenciou na distribuição do tempo de residência, aumento o tempo médio de 14,94 (sílica controle) para 25,76 min (sílica modificada), aumentando a área de contato entre o substrato e o biocatalisador;
- O líquido iônico influenciou positivamente na transferência de massa, quanto modificado os parâmetros reacionais (temperatura, razão molar, vazão volumétrica).

ARTIGO II

- A maior conversão de ésteres etílicos a partir da reação de transesterificação de óleo de coco bruto e etanol quando comparado ao reator de leito fixo, foi quando utilizou a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica modificada com líquido iônico prótico, em reator de tanque agitado em regime batelada;

- A razão molar para a obtenção da conversão máxima de ésteres etílicos foram 1:10 e 1:7, respectivamente, reator de tanque agitado em regime batelada e reator de leito fixo;
- O estudo da variação da temperatura para ambos os reatores, mostrou que a conversão máxima de ésteres etílicos foi obtida na temperatura de 40 °C;
- No reator de leito fixo, o aumento da vazão volumétrica diminuiu a conversão de ésteres etílicos. Uma vez que o aumento da vazão diminui o tempo de permanência do substrato no interior do reator, diminuindo o tempo de contato com o biocatalisador imobilizado.

Portanto os resultados desta dissertação indicam a necessidade de estudos complementares na reação de transesterificação do óleo de coco bruto e etanol em ambos reatores com vista na obtenção de biodiesel.

Capítulo VI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Utilizar a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada pela técnica de encapsulamento no reator de leito fixo e comparar com a lipase imobilizada pela técnica de ligação covalente;
2. Avaliar a influência de solvente (terc-butanol) na reação de transesterificação;
3. Comparar os resultados obtidos na melhor condição da reação de transesterificação, utilizando a lipase imobilizada pela técnica de encapsulamento com os valores obtidos neste trabalho;
4. Verificar a influência do glicerol em reatores de fluxo contínuo, identificando-se mecanismos no fluxo contínuo afim de minimizar a inibição da lipase imobilizada pelo glicerol;
5. Realizar a reação de transesterificação no reator de leito fixo em série, para ambos os biocatalisadores.

Capítulo VII

REFERÊNCIAS

- ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative Review. *Energy Conversion and Management*, v. 63, p. 138–148, 2012.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Review*, v. 42, p. 6406-6436, 2013.
- ÁLVAREZ V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTORD, M.; AZNARB, M.; IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid Phase Equilib*, v. 299, p. 42–50, 2010.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.
- ANP. Anuário Estatístico Brasileiro Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, disponível em: <http://anp.gov.br/?pg=73222&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&142887457476>, consultado em, 03/03/16.
- ATABANI, A. E; SILITONGA, A. S; BADRUDDIN, I.A; MAHLIA, T. M.I; MASJUKI, H. H; MEKHILEF, S.A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 2070-2093, 2012.
- BARBOSA, A. S.; SILVA, M, A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A.S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. Imobilização de lipase por encapsulação em sílica Aerogel. *Química Nova*, v. 37, nº. 6, p. 969-976, 2014.
- BIODIESELBR, disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel.htm>, consultado em, 16/09/14.
- BON, E. P. S.; FERREIRA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, c2008. xxxvii, 506 p. ISBN 9788571931893.

- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 32, p. 175-187, 2009.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*, v. 38, p. 399-409, 2015a.
- CARVALHO, A. K. F.; FARIA E. L. P.; RIVALDI, J. D.; ANDRADE, G. S. S.; OLIVEIRA, P. C. CASTRO, H. F. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 67, p. 287–294, 2015b.
- CHATTOPADHYAY, S.; SEN, R. A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 749–757, 2012.
- CHATTOPADHYAY, S.; SEN, R. Development of a novel integrated continuous reactor system for biocatalytic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 395–400, 2013.
- CHEN, Y.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P.; WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 668–673, 2009.
- CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, v. 119, p. 497-520, 2014.
- CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; NADALETI, W. C.; ROSSI, E.; FEIDEN, A.; CAMARGO, M. P.; CREMONEZ, F. E.; KLAJN, F. F. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 425-428, 2015.
- DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004.
- DEKA, D. C.; BASUMATARY, S. High quality biodiesel from yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 1797-1803, 2011.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 31, p. 466-487, 2005.
- DORS, G.; FREITAS, L.; MENDES, A. A.; FURIGO JR, A.; DE CASTRO, H. F. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packedbed reactor. *Energy & Fuels*, v. 26, p. 197-203, 2012.

- DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. New Delhi: Ane Book India, 2008, Cap. 2. P. 8-49.
- EBB, disponível em: <http://www.ebb-eu.org/>, consultado em 16/09/2014.
- ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A, C. Principles, techniques, and applications of biocatalysts immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*. v, 99, p. 2065–2082, 2015.
- FELTES, M.M.C; OLIVEIRA, D.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, J. V. An overview of enzyme-catalyzed reactions and alternative feedstock for biodiesel production. *Alternative Fuel*, Croácia: InTech, Cap. 2, p. 21-46, 2011.
- FENG, X.; PATTERSON, D. A.; BALABAN, M.; EMANUELSSON, E. A. C. Characterization of liquid flow in the spinning cloth disc reactor: Residence time distribution, visual study and modeling. *Chemical Engineering Journal*. v. 235, p. 356–367, 2014.
- FOGLER, H. S. Distribuições de Tempos de Residência para Reatores Químicos. In: FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**, 3^a Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. Cap. 13. p. 744-802.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n.5, p. 405-416, 2001.
- GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*. v. 30, p. 1369-1373, 2007.
- GUARTE, R. C.; MUHLBAUER, W.; KELLERT, M. Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil. *Postharvest Biology and Technology*, v. 9, p. 361- 372, 1996.
- GUISAN, J. M. **Immobilization of and cell**. 2nd ed. New Jersey, Eua: Humana Press, c2006. xiv, 449 p. (Methods in Biotechnology 22) ISBN 1588292908.
- GULDHE, A., SINGH, B., MUTANDA, T., PERMAUL, K., BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447–1464, 2015.
- HAJAR. M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packe d-b e d reactor with use of Novozym 435 plus loofa. *Enzyme and Microbial Technology*. v.45, p. 188–194, 2009.

- HALIM, S.F.A; KAMARUDDIM, A.H.; FERNANDO, W. I. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresources Technology*, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.
- HARTMANN, M; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6277—6289, 2013.
- HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*. v. 47, p. 2291–2299, 2012.
- ITABAIANA JR, I.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 85–86, p. 1–9, 2013.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p. 390-397, 2002.
- JERONIMO, C. E. M. **Tecnologias limpas aplicadas a gestão dos resíduos do coco**. Revista Qualidade Emergente (3) 20-29, 2012.
- JIANG, J. J.; TAN, C. S. Biodiesel production from coconut oil in supercritical methanol in the presence of cosolvent. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 43, p. 102–107, 2012.
- LEVENSPIEL, O. O modelo de dispersão. **Engenharia das reações químicas**. 1º Ed. São Paulo. Edgard Blucher, 2000, Cap. 13. p. 246 – 270.
- LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS JR., J. R.; MOURA, E. M.; C. MOURA, V. R. Biodiesel de Babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. *Química Nova*, v. 30 (3), p. 600-603, 2007.
- LOTTI, M.; PLEISS, J.; VALERO, F.; FERRER, P. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnology Journal*. v. 10, p. 22–30, 2015.
- MARINHO, F. J. L.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D.; HOLANDA, J. S.; E FERREIRA NETO, M. **Cultivo de coco 'Anão Verde' irrigado com águas salinas**. Pesquisa agropecuária brasileira (41) 1277-1284, 2006.
- MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin

- affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, p. 109–115, 2011.
- MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 126–135. 2012.
- MORENO-PIRAJÁN, J. C.; GIRALDO, L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian. Journal of Chemistry*, v. 4, p. 55–62, 2011.
- MORETTO, E., ALVES. R. Óleos e Gorduras Vegetais, Editora da UFSC, Florianópolis, 1986.
- MOTA, D. M. O. Trabalho temporário no projeto de fruticultura irrigada platô de Neópolis, SE. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, v.18, p.113-134, 2001.
- MUHAMMAD, N.; ELSHEIKH, Y. A.; MUTALIB, M. I. A.; BAZMI, A.A.; KHAN, R.A.; KHAN, H.; RAFIQ, S.; MAN, Z.; KHAN, I. An overview of the role of ionic liquids in biodiesel reactions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. v. 21, p. 1–10, 2015.
- NBB, disponível em: <http://www.biodiesel.org/>, consultado em 16/09/2014.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e Usadas na construção de biossensores. *Química Nova*, v. 32, p. 1195-1201, 2009.
- OLIVEIRA, M. V. S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M.F.; LIMA, A. L. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 36, p. 445-451, 2014.
- POPPE, J. K., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*, v. 33, p 511–525, 2015.
- RIBEIRO, L. M. O.; SANTOS, B. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. G. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. *Biomass and bioenergy*, v. 47, p. 498-503, 2012.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 398-408, 2009.

- ROMERO, R.; MARTINEZ, S. L.; NATIVIDAD, R. Biodiesel production by using heterogeneous catalysts. *Environmental Science*, Croácia: InTech, Cap. 1, 2011.
- RÓS, P. C. M.; FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, p. 443-451, 2013.
- SALIHUA, A.; ALAM, Z. Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, v. 50 p. 86-96, 2015.
- SANTOS, J. C.; MIJONE, P. D.; NUNES, G. F. M.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane-polyvinyl alcohol with different activating compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 61, p. 229-236, 2008.
- SIGMA ALDRICH, disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>, consultado em 04/01/2016.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Use of polyethylene glycol in the process of sol-gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. *J Therm Anal Calorim*, v. 117, p. 301-306, 2014.
- SOUZA, R.L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquido as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 141-150, 2013.
- STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel*. v. 90, p. 3141-3155, 2011.
- SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Lipase-catalysed transesterification of coconut oil with fusel alcohols in a solvent-free system. *Food Chemistry*, v. 134, p. 89-94, 2012.
- TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, v.28, p. 628-634, 2010.
- TEIXEIRA, C. B.; JUNIOR, J. V. M.; MACEDO, G. A. Biocatalysis combined with physical technologies for Development of a green biodiesel process, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p. 333-343, 2014.

- TUPUFIA, S. C.; JEON, Y.J.; MARQUIS, C.; ADESINA, A. A.; ROGERS, P. L. Enzymatic conversion of coconut oil for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, v. 106, p. 721–726, 2013.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of Chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.
- WANG, X.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6352–6355, 2011.
- YAAKOB, Z. A.; MOHAMMAD, M.; ALHERBAWI, M.; ALAM, Z.; SOPIAN, K. Overview of production of biodiesel from waste cooking oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 18, p. 184-193, 2013.
- YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N, NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Continuous production of biodiesel using whole-cell biocatalysts: Sequential conversion of an aqueous oil emulsion into anhydrous product. *Biochemical Engineering Journal*, v. 68, p. 7– 11, 2012.
- YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Convers Manag*, v. 52, p. 2741-2751, 2011.
- ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 61-70, 2012.
- ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182–197, 2015.
- ZOU, B.; SONG, C.; XU, X.; XIA, J.; HUO, S.; CUI, F. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. *Applied Surface Science*. v. 311, p. 62–67, 2014.