

Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera (GDEH)

*Produção de Biodiesel a partir de óleos vegetais
virgens e usados, comparando transesterificação
básica e enzimática*

André da Silva Lopes Simas

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, para obtenção do Grau de Mestre em Bioenergia.

Lisboa
2008

Ficha Técnica

A presente dissertação foi preparada no âmbito do Protocolo existente entre a Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL e o Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação - Lisboa.

Orientado por:

Doutor Nuno Lapa (Professor Auxiliar da FCT-UNL)

Doutora Ana Cristina Oliveira Justino (Investigadora Auxiliar do INETI)

Índice

Agradecimentos.....	1
Dedicatórias.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Simbologia e Anotações.....	5
Índice de Figuras.....	6
Índice de Tabelas.....	8
<u>Capítulo 1- Introdução</u>	11
1.1 Óleos orgânicos, vegetais e similares.....	16
1.1.2 Óleos alimentares e o seu uso.....	20
1.1.2.1 Alterações registadas nos óleos alimentares, sob processos de fritura.....	21
1.1.3 Quantitativos de óleos orgânicos usados no contexto português.....	22
1.2 Historial da utilização de óleos e seus derivados para a combustão nos motores Diesel.....	24
1.3 O panorama do biodiesel na Europa.....	26
1.3.1 Biodiesel em Portugal.....	28
1.4 A produção de biodiesel - os processos.....	30
1.4.1 Transesterificação ácida.....	35
1.4.2 Transesterificação alcalina.....	35
1.4.3 Transesterificação usando condições supercríticas.....	37
1.4.4 Transesterificação usando catalisadores heterogéneos.....	37
1.4.5 Transesterificação enzimática.....	38
1.5 Características gerais do biodiesel.....	40
1.6 Vantagens e desvantagens decorrentes do uso do biodiesel.....	42
<u>Capítulo 2- Materiais e Métodos</u>	45
2.1 Materiais.....	46
2.1.1 Matérias- primas.....	46
2.1.2 Reagentes e catalisadores.....	46
2.1.3 Equipamentos.....	47
2.2 Metodologias de caracterização de amostras de óleos e biodiesel.....	48
2.2.1 Preparação das amostras	48
2.2.2 Determinação da quantidade total de matéria em suspensão (contaminação total).....	49
2.2.3 Avaliação da estabilidade à oxidação.....	50

2.2.4	Determinação do índice de acidez.....	50
2.2.5	Determinação do índice de iodo.....	51
2.2.6	Determinação do índice de peróxido.....	52
2.2.7	Determinação do índice de saponificação.....	54
2.2.8	Determinação da quantidade de água presente na amostra.....	55
2.2.9	Preparação de ésteres metílicos de ácidos gordos para posterior análise por cromatografia.....	55
2.2.9.1	Análise Cromatográfica.....	56
2.2.10	Determinação dos teores em mono, di e triglicéridos e glicerol livre e total, num biodiesel.....	57
2.2.11	Determinação da massa volúmica.....	58
2.2.12	Determinação da viscosidade cinemática.....	59
2.3	Metodologias de determinação da concentração enzimática.....	59
2.3.1	Doseamento da enzima imobilizada.....	60
2.3.2	Doseamento da enzima solúvel.....	61
2.4	Metodologias de Produção de Biodiesel (B100).....	62
2.4.1	Transesterificação química por catálise básica.....	62
2.4.1.1	Produção de biodiesel a partir de óleo de colza.....	62
2.4.1.2	Produção de biodiesel a partir de óleo de soja.....	64
2.4.1.3	Produção de biodiesel a partir de óleo usado.....	64
2.4.2	Influência do processo de secagem no teor em água e na estabilidade à oxidação do biodiesel.....	65
2.4.3	Transesterificação por catálise enzimática.....	66
2.4.3.1	Desenho composto central (a 4 variáveis) para produção de biodiesel, a partir de óleo de colza, usando enzimas.....	67
2.4.3.2	Escolha da enzima para posteriores ensaios de transesterificação.....	69
2.4.3.3	Determinação das melhores condições reaccionais.....	69
2.4.3.4	Produção de biodiesel a partir de óleo de soja.....	70
2.4.3.5	Produção de biodiesel a partir de óleo usado.....	70
2.4.3.6	Produção de biodiesel a partir de óleo de girassol.....	70
<u>Capítulo 3- Resultados e Discussão.....</u>		72
3.1	Caracterização dos óleos vegetais.....	73
3.1.1	Caracterização do óleo de colza.....	73
3.1.2	Caracterização do óleo de soja.....	74
3.1.3	Caracterização dos óleos alimentares usados.....	75
3.2	Transesterificação básica de diferentes óleos vegetais.....	76
3.2.1	Transesterificação do óleo de colza.....	77
3.2.2	Transesterificação do óleo de soja.....	78

3.2.3 Transesterificação de óleos usados.....	79
3.3 Desenho composto central (a 3 variáveis) para optimização das condições de secagem do biodiesel.....	82
3.3.1 Relação entre as condições de secagem e a estabilidade à oxidação.....	87
3.4 Transesterificação enzimática de óleos vegetais.....	88
3.4.1 Escolha da enzima.....	88
3.4.2 Desenho composto central (a 4 variáveis) para produção de biodiesel por via enzimática.....	90
3.4.2.1 Determinação das melhores condições reaccionais.....	99
3.4.3 Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo de soja.....	105
3.4.4 Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo usado.....	108
3.4.5 Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo de girassol.....	112
<u>Capítulo 4- Discussão Global</u>	113
<u>Capítulo 5- Conclusões</u>	117
<u>Capítulo 6- Sugestões de trabalhos futuros</u>	120
<u>Capítulo 7- Bibliografia</u>	123
<u>Capítulo 8- Anexos</u>	126

Agradecimentos

Quero deixar aqui expresso o meu agradecimento a todos aqueles que de uma forma directa ou indirecta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho final que culmina o meu mestrado em Bioenergia.

Tenho, por este motivo, de começar por agradecer antes de mais ao Coordenador do Mestrado em Bioenergia, o Professor Doutor Santos Oliveira, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL, pela partilha dos seus conhecimentos e igualmente pelo seu apoio, incentivo, disponibilidade e amizade com que sempre me tratou. Quero igualmente agradecer ao Doutor António Joyce, Director do Departamento de Energias Renováveis (DER), por ter aceite o meu estágio nos laboratórios da Unidade de Biomassa do DER, agradecimento igualmente extensível à Doutora Fernanda Rosa, Directora da Unidade de Biomassa do DER.

Um especial agradecimento à minha orientadora Doutora Ana Cristina Oliveira, do Departamento de Energias Renováveis do INETI, pela orientação deste meu estágio, pelo seu grande apoio, incentivo, dedicação, disponibilidade e conhecimentos que me transmitiu e igualmente pela sua gentileza e pela amabilidade com que sempre me tratou. Quero igualmente agradecer ao Professor Doutor Nuno Lapa, meu professor durante o mestrado e meu coordenador de dissertação na faculdade, pelos seus conhecimentos, cordialidade, incentivo, disponibilidade e orientação. Não posso deixar de agradecer igualmente aos restantes professores que me acompanharam durante o ano curricular do mestrado; à D. Lurdes, da secretaria do GDEH, assim como aos colegas que comigo interagiram e colaboraram, em especial à minha querida amiga Ana Rita Brás. Um agradecimento a todos da Unidade de Biomassa do DER, do INETI, em especial à Doutora Paula Passarinho e à Doutora Paula Marques, pela disponibilidade, ajuda e pelas oportunas sugestões; à Eng. Maria Helena, à D. Graça Conceição pela simpatia e sempre pronta disponibilidade para ajudar; à D. Natércia e à D. Céu, sempre com um sorriso e sempre prontas a limpar todo o material que sujei...e foi muito, muito mesmo! Um agradecimento à Eng. Elvira Oliveira, do DEECA/LCC, pelas análises de densidade e viscosidade. Um especial agradecimento a todos os colegas e amigos que fiz durante a minha permanência no DER, com quem muito aprendi e convivi ao longo destes 2 anos, em especial à Dora, ao Xavier, ao Paulo, ao Roberto, à Ana Melo, à Ana Marques, ao Sebastião e ao Tiago. Também um especial agradecimento à Inês Santos, Rita Bancaleiro e Marisa Santos pela sua simpatia, cumplicidade, incentivo e paciência em me aturar! E por fim um grande e muito especial agradecimento a toda a minha família, por me ter apoiado e incentivado, em especial à minha Mãe e ao meu Pai, pelo seu incondicional apoio, carinho, incentivo, dedicação e sacrifício demonstrados ao longo de toda a minha vida!

Dedicatórias

Quero dedicar este trabalho à minha família, em especial à minha mãe e sobrinha!

À minha mãe pelo seu incondicional apoio, carinho, amor, incentivo e dedicação!

À minha sobrinha porque o seu sorriso enternecedor e radioso representa tudo o que é bom e auspicioso, lembrando que o futuro é uma promessa por cumprir!

Resumo

Este trabalho visa o estudo da produção, à escala laboratorial, de biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, comparando as transesterificações por catálise alcalina e enzimática. Vários óleos foram caracterizados a fim de determinar as suas propriedades, nomeadamente as que possam ter mais influência no biodiesel a partir deles produzido.

Foi realizada a transesterificação alcalina destes óleos, em condições previamente optimizadas por outros autores, tendo-se obtido um teor em ésteres de 98,6% com o óleo de colza, de 94% com o óleo de soja e de 87,5% a 94% com os óleos usados.

Para a transesterificação enzimática foram testadas várias lipases, tendo-se seleccionado a enzima imobilizada *Lipozyme TL IM*. O processo enzimático de produção de biodiesel a partir de óleo de colza foi optimizado, através de um desenho composto central a 4 variáveis, tendo-se determinado como melhores condições, uma temperatura de 37°C, a adição de 0,06% (m/m) de enzima pura, uma razão molar óleo/metanol de 1/5 e a adição de 15% (m/m) de água, que conduzia a um teor teórico em ésteres na ordem dos 99%. Nestas condições, o teor em ésteres experimental obtido utilizando o óleo de colza foi de 86,7%. Quando se utilizou o óleo de soja e óleos usados de fritura, em condições análogas, obteve-se um teor em éster de 87,5% e de 79,6%, respectivamente, valores inferiores, em cerca de 10 %, em relação aos obtidos com a transesterificação básica, também em condições de sistema descontínuo.

Do estudo realizado pode-se concluir que a catálise química se apresentou mais favorável, quer em termos de tempo de reacção quer de separação de fases, do que o processo enzimático. O facto da recuperação do biocatalisador não ter sido possível, devido ao granulado enzimático se desfazer, foi mais um factor que contribuiu para que o processo enzimático, desenvolvido neste trabalho, não se apresente como uma alternativa economicamente viável aos processos tradicionais de produção de biodiesel.

Abstract

The aim of this work was the study of biodiesel production, at lab scale, by alkaline and enzymatic transesterification using virgin and frying oils.

Different oils were characterized in terms of some parameters that have influence in the transesterification reaction and also in the quality of the final product.

The alkaline transesterification of the oils was carried out, in conditions previously optimized by other authors, allowing to obtain a biofuel with an ester content of 98.6% with rapeseed oil, 94% with soybean oil and 87.5% to 94% with used frying oils.

For the enzymatic transesterification several lipases have been tested, and the immobilized enzyme *Lipozyme TL IM* was selected for further studies. The enzymatic production of biodiesel from rapeseed oil was optimized through a central composite design of four variables. A reaction temperature of 37°C, an enzyme addition of 0.06% (w/w), an oil/methanol molar ratio of 1/5 and a water addition of 15% (w/w) were the best conditions expected to generate a final product containing approximately 99% of esters. However, at these conditions, the experimental ester content obtained using rapeseed oil was 86.7%. In similar experiments with soybean oil and used frying oil, 87.5% and 79.6% of esters were, respectively, achieved. These yields were about 10% lower than those obtained by alkaline transesterification, also in discontinuous system conditions.

It is possible to conclude from this study that the chemical alkaline transesterification was more favourable than the enzymatic transesterification, not only on the point of view of the reaction time, but also on the point of view of the separation of phases. Also the fact that the biocatalyst was not able to be recovered, due to the desaggregation of the granules, allowed to consider the enzymatic transesterification not economically viable when compared with the traditional processes.

Simbologia e Anotações

- ARESP - Associação da Restauração e Similares de Portugal;
B100 - Biodiesel a 100 %;
B3 - Mistura combustível de gasóleo com 3 % de biodiesel;
DG - Diglicérido;
FAME - Fat acid metil ester (éster metílico de ácidos gordos – o vulgar biodiesel);
FFAs - Free fatty acids (ácidos gordos livres);
Horeca - Sector que abrange os estabelecimentos de hotelaria, restauração e cafetaria;
INETI - Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação;
IPA, Lda - Empresa “Inovação de Projectos em ambiente, Lda”;
ISP - Imposto sobre produtos petrolíferos e energéticos;
M ou m - Massa do composto;
MG - Monoglicérido;
m/m - massa/massa;
MSTFA - N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida;
n.d. - não determinado (não foi realizado ensaio para quantificação);
OGM - Organismo geneticamente modificado (transgénico);
PNE - Plano Nacional Energético;
PM - Peso molecular;
RME - Éster metílico de colza;
tep - tonelada equivalente de petróleo;
TG - Triglicérido;
v.n.d - valor não detectado (não foi detectado pelo aparelho).

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema dos três tipos de glicéridos em que R1, R2 e R3 representam grupos alquila constituídos por átomos de carbono e de hidrogénio (Felizardo, 2003).....	17
Figura 2 - Esquema de um éster.....	17
Figura 3 - Produção de Biodiesel na União europeia a partir de 1992 até 2004 (http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro167b.pdf).....	27
Figura 4 - Reacção de transesterificação de um triglicérido (triacilglicerol).....	31
Figura 5 - Fluxograma do processo de síntese de biodiesel via transesterificação química alcalina (Junior <i>et al.</i> , 2005).....	33
Figura 6 - Reactor com biodiesel de colza (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior).....	77
Figura 7 - Ampola de decantação com biodiesel de soja (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior).....	79
Figura 8 - Reactor com biodiesel de OAU (1º lote) (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior).....	80
Figura 9 - Ampola de decantação com B100 do OAU do 2º lote (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior).....	80
Figura 10 - Biodiesel de óleo alimentar usado (1º lote) - “seco” (à esquerda) e “sem secagem” (à direita).....	84
Figura 11 - Efeito conjugado da pressão e da temperatura na quantidade de água esperada na amostra de biodiesel, após 35 minutos de secagem no rotavapor.....	84
Figura 12 - Efeito conjugado da temperatura e do factor tempo, na quantidade de água esperada, à pressão constante de 185 mbar, no rotavapor.....	85
Figura 13 - Efeito conjugado da pressão e do factor tempo de secagem, sobre a quantidade de água esperada, à temperatura constante de 55°C, no rotavapor.....	86
Figura 14 - Recta de calibração da solução padrão de albumina de soro de boi.....	88
Figura 15 - Percentagem de transesterificação obtida ao longo do tempo, usando as várias enzimas, nas condições do ponto médio (T =37,5°C; L= 70 mg; A= 6g; R= 5:1).....	89
Figura 16 - Efeito conjugado da temperatura e da quantidade de lipase (assumindo a quantidade fixa no sistema de 8,76 g de metanol e 6 g de água, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos.....	93
Figura 17 - Efeito conjugado da temperatura e da quantidade de metanol (assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de lipase e 6 g de água, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos.....	94
Figura 18 - Efeito conjugado da temperatura e da quantidade de água (assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de proteína e 8,76 g de metanol, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos	95
Figura 19 - Efeito conjugado da quantidade de proteína e de metanol (assumindo uma temperatura de 38°C e a quantidade de 6 g de água, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos	96
Figura 20 - Efeito conjugado da quantidade de água e metanol (assumindo uma temperatura de 38°C e a quantidade de proteína de 70 mg, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos	98
Figura 21 - Tubo de centrifugação com a solução final da transesterificação do ensaio 4 (tabela 55): (A) antes da centrifugação; (B) depois da centrifugação.....	104
Figura 22 - (A) Erlenmeyer com os grânulos enzimáticos (intactos); (B) Erlenmeyer com solução transesterificada, sendo visível os grânulos enzimáticos desfeitos, no fundo.....	105
Figura 23 - Erlenmeyers com as soluções finais da transesterificação dos ensaios 2, 14 e 12 (respectivamente 53,4%, 96% e 87,8% de FAMES) (tabela 40), após algum tempo de repouso.....	105
Figura 24 - Erlenmeyers com as soluções finais da reacção de transesterificação dos ensaios 2, 1 e 4 (tabela 55), respectivamente da esquerda para direita.....	106
Figura 25 - Tubo de centrifugação com a amostra final da transesterificação do ensaio 1 (tabela 55), depois da centrifugação.....	107

Figura 26 - Tubos de centrifugação com as amostras finais da transesterificação dos ensaios 1, 2 e 3 (tabela 56), depois da centrifugação.....	108
Figura 27 - Erlenmeyers com as soluções finais da reacção de transesterificação dos ensaios 1, 2 e 3 (tabela 58), respectivamente da esquerda para direita.....	109
Figura 28 - Tubos de centrifugação com a solução final da transesterificação do ensaio 2 (A) e do ensaio 3 (B), depois da centrifugação (tabela 58).....	110
Figura 29 - Percentagem de ésteres da transesterificação enzimática do OAU da Cantina do INETI, com e sem tratamento prévio de filtração e secagem (dados da tabela 59).....	111
Figura 30 - Erlenmeyer com a solução resultante da transesterificação durante 24 horas, do óleo (seco) usado da Cantina do INETI (tabela 59)	111
Figura 31 - Frascos contendo amostras do produto final da transesterificação do OAU (3º lote), sem qualquer processo de lavagem, filtração ou centrifugação, ao fim de 1 semana em repouso. Ensaio (A) usando etanol (via catálise enzimática); ensaio (B) recorrendo à catálise enzimática (com metanol) e ensaio (C) recorrendo à catálise alcalina (com metanol).....	116
Figura 32 - Eppendorfs com amostras, após centrifugação, da transesterificação do óleo usado (3º lote), por via enzimática (A) e alcalina (B).....	116

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos ácidos gordos (Stern <i>et al.</i> , 1983).....	18
Tabela 2 - Composição percentual dos principais ácidos gordos saturados e insaturados, de alguns óleos e gorduras (http://www.ccet.ufrn.br/~duarte/nomenclatura_acidos_carboxilicos.pdf).....	19
Tabela 3 - Diferentes origens e modos de obtenção de óleos e gorduras (Parente, 2003).....	20
Tabela 4 - Vários subsectores da FIOVDE (Guia Técnico do Sector dos óleos Vegetais, Derivados e Equiparados, 2001).....	22
Tabela 5 - Estimativas de produção de óleos alimentares usados apresentadas por várias fontes, expressas em toneladas/ano (IPA, 2004).....	23
Tabela 6 - Calendarização da substituição de combustíveis fósseis por combustíveis alternativos, expressa em %, de acordo com a Directiva 2003/30/UE (Rosa, 2005).....	27
Tabela 7 - Panorama na União Europeia (UE ₂₅) relativamente ao biodiesel (adaptado de “ http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro167b.pdf ”).....	27
Tabela 8 - Produtividade média nacional, comparativa (Rosa, 2005).....	28
Tabela 9 - Capacidade nacional instalada, em 2007, de produção de biodiesel, a partir de matéria-prima importada (Rosa, 2007).....	29
Tabela 10 - Empresas nacionais produtoras de biodiesel a partir de óleos usados, dados de 2007 (Rosa, 2007).....	29
Tabela 11 - Consumo de combustível em território nacional continental (unidade em tonelada), segundo dados da DGGE (http://www.dgge.pt).....	30
Tabela 12 - Comparação da transesterificação alcalina via metílica e etílica, (Parente, 2003; Freitas <i>et al.</i> ; 2007; http://www.ciagri.usp.br/~simpol/downloads/10%20ULF%20UNICAMP.pdf).....	33
Tabela 13 - Propriedades de alguns ésteres metílicos de óleos vegetais (Joyce <i>et al.</i> , 2002; http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/biodiesel_32.asp ; http://www.acsoja.org.ar/mercsoja2006/Contenidos/Foros/usosind_03.pdf).....	40 e 41
Tabela 14 - Principais falhas dos motores a diesel, com uso de biodiesel de baixa qualidade (Felizardo, 2003).....	41 e 42
Tabela 15 - Emissões de poluentes das misturas de biodiesel com diesel normal (http://www.ivig.coppe.ufrj.br/doc/biodiesel.pdf).	44
Tabela 16 - Comportamento do óleo de colza e respectivo éster metílico (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).....	44
Tabela 17 - Parâmetros estudados, em desenho composto central, para optimização da secagem de biodiesel.....	65
Tabela 18 - Planeamento dos ensaios relativos aos níveis -1/+1 e à expansão -1,682/+1,682, assim como os respectivos valores a ensaiar.....	66
Tabela 19 - Parâmetros estudados, no desenho composto central, para optimização do sistema reaccional de transesterificação enzimática.....	67
Tabela 20 - Planeamento para os ensaios relativos aos níveis -1/+1 e à expansão -2/+2, assim como os respectivos valores a ensaiar.....	68
Tabela 21 - Planeamento dos ensaios do desenho composto central, incluindo a expansão, com os respectivos valores.....	68 e 69
Tabela 22 - Valores dos parâmetros de caracterização do óleo de colza, do 1º lote (lote de Janeiro de 2006) e do 2º lote (lote de Março de 2007).....	73
Tabela 23 - Composição, em percentagem, dos principais ácidos gordos do óleo de colza.....	74
Tabela 24 - Valores dos parâmetros de caracterização do óleo refinado de soja “ <i>Valouro</i> ”.....	75
Tabela 25 - Composição, em percentagem, dos principais ácidos gordos do óleo de soja.....	75
Tabela 26 - Valores dos parâmetros de caracterização dos OAU do 1º lote (Março de 2006), 2º lote (Março de 2006) e 3º lote (Agosto de 2007).....	76
Tabela 27 - Composição, em percentagem, dos principais ácidos gordos dos OAUs.....	76
Tabela 28 - Valores dos parâmetros de caracterização do B100 de colza, proveniente do 1º lote (Janeiro de 2006).....	78
Tabela 29 - Transesterificação química de óleo de soja (<i>Valouro</i>).....	79
Tabela 30 - Valores dos parâmetros de caracterização do biodiesel de óleos usados do 1º lote (Março de 2006), 2º lote (Março de 2006) e 3º lote (Agosto de 2007).....	81
Tabela 31 - Transesterificação química de óleo usado do 3º lote (Cantina do INETI).....	82

Tabela 32 - Valores dos teores em água e correspondente percentagem de água retirada, em cada ensaio, comparando com o valor inicial de 2591 ppm.....	82 e 83
Tabela 33 - Respostas segundo o Algoritmo de <i>Yates</i> , para a secagem do biodiesel.....	83
Tabela 34 - Efeito conjugado da temperatura e da pressão, ao fim de 35 minutos, sobre a quantidade de água esperada na amostra de biodiesel.....	84
Tabela 35 - Efeito conjugado da temperatura e do factor tempo, à pressão constante de 185 mbar, sobre a quantidade de água esperada na amostra de biodiesel.....	85
Tabela 36 - Efeito conjugado da pressão e do factor tempo, à temperatura constante de 55°C, sobre a quantidade de água esperada.....	86
Tabela 37 - Valores dos teores em água e da estabilidade à oxidação de cada sequência, definida em desenho composto central.....	87
Tabela 38 - Enzimas e respectivas concentrações.....	89
Tabela 39 - Percentagem de transesterificação obtida ao longo do tempo, usando as várias enzimas, nas condições definidas no ponto médio do desenho composto central.....	89
Tabela 40 - Valores relativos à percentagem de metil-ésteres de colza, em função das condições reaccionais definidas em desenho composto central.....	91
Tabela 41 - Respostas segundo o Algoritmo de <i>Yates</i> , para a transesterificação enzimática.....	92
Tabela 42 - Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de proteína, assumindo a quantidade fixa no sistema de 8,76 g de metanol e 6 g de água, durante 15 horas.....	93
Tabela 43 - Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de metanol, assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de proteína e de 6 g de água, durante 15 horas.....	94
Tabela 44 - Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de água, assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de proteína e de 8,76 g de metanol, durante 15 horas.....	95
Tabela 45 - Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da quantidade de proteína e metanol, assumindo uma temperatura de 38°C e uma quantidade de 6 g de água, durante 15 horas.....	96
Tabela 46 - Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da quantidade de água e metanol, assumindo uma temperatura de 38°C e a quantidade de proteína de 70 mg, durante 15 horas.....	97
Tabela 47 - Percentagem de transesterificação, tendo em conta a variação do parâmetro temperatura, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.....	99
Tabela 48 - Percentagem de transesterificação tendo em conta a variação do parâmetro proteína, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.....	100
Tabela 49 - Percentagem de transesterificação tendo em conta a variação do parâmetro metanol, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.....	101
Tabela 50 - Percentagem de transesterificação tendo em conta a variação do parâmetro água, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.....	101 e 102
Tabela 51 - Condições iniciais optimizadas em desenho composto central, para 50 g de óleo (colza).....	102
Tabela 52 - Condições optimizadas após uma nova manipulação em desenho composto central para 50 g de óleo (colza).....	102
Tabela 53 - Percentagem de transesterificação, do óleo de colza, ao longo do tempo.....	103
Tabela 54 - Percentagem de transesterificação do óleo de colza (50 g), ao fim de 15 e 20 horas.....	104
Tabela 55 - Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do óleo de soja (<i>Valouro</i>).....	106
Tabela 56 - Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do óleo de soja <i>Valouro</i> , variando a quantidade de lipase e água.....	107
Tabela 57 - Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do OAU proveniente da Cantina do INETI.....	108
Tabela 58 - Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do OAU proveniente da Cantina do INETI, usando metanol e etanol.....	109
Tabela 59 - Condições da transesterificação enzimática de óleo usado (Cantina do INETI) e resultados sequenciais da transesterificação, com e sem filtração e secagem.....	110

Tabela 60 - Resultados da transesterificação enzimática, durante 15 horas, com a enzima solúvel <i>TL 100L</i> , tendo como variável independente o pH da solução adicionada.....	112
Tabela 61 – Comparação entre a transesterificação via alcalina (hidróxido de sódio) e enzimática (http://ramses.ffalm.br/falm/dbt/professores/sachs/Bioquimica%20I/enzimas2.pdf ; http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2005_2/enzimas/enzimas.ppt).....	115

Capítulo 1

Introdução

Durante milhares de anos o Homem utilizou as ditas energias renováveis, com especial predominância no aproveitamento da energia dos recursos hídricos, eólico e, sobretudo, no aproveitamento da biomassa para combustão, de uma forma directa ou indirecta. Pode dizer-se que a energia se tem revelado ao longo dos tempos, um dos mais determinantes factores de desenvolvimento económico e social, tornando-se assim um factor extremamente decisivo em muitos aspectos da vida das sociedades.

Com o advento da Revolução Industrial, no século XVIII, a procura por energia aumentou substancialmente com vista a manter o ritmo crescente da industrialização, que forçosamente exigia mais energia e matérias primas. A própria sociedade modificou-se e passou ela própria a requerer um crescente consumo energético para assegurar um igualmente crescente desenvolvimento e bem estar. Forçosamente este progresso fez-se à custa de uma procura desenfreada pelos chamados recursos energéticos não renováveis, uma vez que estes eram facilmente obtidos e extraídos e, sobretudo, possuíam uma elevada densidade energética que suplantava as formas energéticas mais “tradicionalis” e ditas renováveis. O carvão afigurou-se como a força motriz da Revolução Industrial, tendo-se dado progressivamente lugar de primazia, a partir da segunda metade do século XIX, ao petróleo. Já no século XX o petróleo assumiu o protagonismo energético, passando a ser considerado como o ouro negro.

Os recursos energéticos renováveis que nos primórdios haviam sido a principal força motriz das civilizações, foram claramente suplantados pelo petróleo, gás natural e carvão, todos eles recursos não renováveis. É necessário referir que a designação “não renovável” é parcialmente correcta, pois os combustíveis atrás mencionados todos eles derivaram de biomassa e, actualmente, ainda está em progresso a formação de mais petróleo, gás natural e carvão. Simplesmente são processos geológicos que demoram vários milhões de anos (na ordem dos 100 a 300 milhões de anos) e, portanto, assume-se que estes recursos são “não renováveis”, pelo menos à escala humana, pois o seu consumo suplanta claramente a sua formação, pelo que rapidamente estes mesmos recursos se esgotarão (<http://osverdestapes2.googlepages.com/carbono>).

Os recursos energéticos não renováveis, para além de possuírem um horizonte temporal bastante limitado, afiguram-se como formas de obtenção de energia bastante agressivas para o ambiente, no que toca à sua extracção, refinação e utilização energética, provocando significativos impactes ambientais, sobretudo ao nível de poluição atmosférica. Para além dos aspectos atrás mencionados, estes recursos estão assimetricamente distribuídos mundialmente, o que gera uma grande dependência de muitos países relativamente a outros e, frequentemente, cria focos de tensão e de instabilidade a nível político, económico e social, e comumentemente constituem o embrião de focos belicistas de menor ou maior escala. Por

estas razões os recursos energéticos renováveis constituem uma fonte bastante viável, segura e promissora na obtenção de energia. Constituem recursos mais uniformemente distribuídos geograficamente, são ilimitados e menos agressivos para o ambiente. Deste modo, cada vez mais as energias renováveis assumem um papel estratégico e potencial no futuro energético, angariando igualmente novos fomentadores e utilizadores.

É importante referir que as tecnologias que fazem parte desta mudança já estão disponíveis há bastante tempo. O que faltava, em concreto, era uma clara vontade política e empresarial em relação às energias renováveis, pois sempre existiram, e ainda subsistem, pressões e “lobbies” relativamente aos combustíveis fósseis, que de certa forma boicota(va)m o avanço e a proliferação do recurso às fontes energéticas endógenas renováveis. Com a constatação das inequívocas alterações climáticas e com o despertar da consciência pública sobre as consequências nefastas que o uso intensivo dos combustíveis fósseis estão a ter na Ecosfera, o Mundo uniu esforços e com o Painel Intergovernamental para as Alterações Climáticas (PIAC), assumiu-se a partir de então uma postura mais congruente e decisiva em relação ao combate ao fenómeno do aquecimento global do planeta, um dos impactes mais gravosos do uso dos combustíveis fósseis.

Portugal, como país que assinou o Tratado de Quioto, assumiu responsabilidades perante os restantes parceiros mundiais, no que concerne ao controlo e implementação de medidas de redução da emissão de gases com efeito de estufa. Para além do compromisso ambiental, é necessário frisar que actualmente se verifica que a situação energética de Portugal se baseia numa excessiva dependência energética vinda do exterior. Cerca de 85 % da energia primária é importada e deriva, na sua esmagadora maioria, de fontes energéticas não renováveis (http://www.janusonline.pt/2006/2006_1_2_10.html). Mais concretamente, com base em dados de 2005, pode-se dizer que a dependência energética exterior nacional, nesse mesmo ano, cifrou-se nos 87,2 %, representando o consumo de petróleo cerca de 58,7% do consumo total de energia primária (<http://www.dgge.pt>). Pode-se igualmente acrescentar, com base em dados estatísticos da Direcção Geral de Energia e Geologia, que o consumo de energia final tem vindo a aumentar, tendo-se registado um aumento de 12,0% entre 2000/2005, verificando-se um aumento do consumo de 12,7% em relação ao petróleo, de 74,8% relativamente ao gás natural e de 19,2% em electricidade. Relativamente ao peso do consumo energético, o sector dos transportes foi e continua ainda a ser o mais representativo, com cerca de 35,4% do consumo energético, a indústria com cerca de 28,4%, o sector doméstico cerca de 16,5%, os serviços com cerca de 13% e 6,7% noutros sectores (onde se inclui a Agricultura, Pescas, Construção e Obras Públicas) (<http://www.dgge.pt>).

A dependência energética externa de Portugal é bastante significativa e assenta sobretudo nos combustíveis fósseis. Para agravar a situação, Portugal é inteiramente dependente da importação desses combustíveis, visto não haver exploração de gás natural e petróleo no nosso território, e as escassas minas de carvão estarem encerradas. Portugal é por isso um país fortemente influenciado pelas flutuações do preço dos combustíveis fósseis nos mercados externos, com a agravante de que infelizmente Portugal tem poucos recursos financeiros.

O que a Portugal falta em combustíveis fósseis endógenos é teoricamente compensado com um enorme potencial em termos de energias renováveis, mas infelizmente o aproveitamento das energias renováveis ainda está bastante subaproveitado.

A par da carência e problemática associada aos combustíveis fósseis, que ainda comanda a nossa economia e gestão energética, afigura-se um outro problema que também requer uma gestão cuidada e sustentada, quer sob o ponto de vista económico, quer ambiental, trata-se da gestão dos resíduos.

A gestão dos resíduos constitui ainda um dos “desafios” ambientais mais difíceis de concretizar, que o país enfrenta, pois apesar de haver legislação e compromissos, nomeadamente de índole internacional, relativamente à gestão dos resíduos, Portugal ainda apresenta várias fragilidades e ainda possui um longo caminho a seguir.

É necessário definir o conceito de resíduo, se bem que não haja uma definição única, nem uma única classificação para os diversos tipos de resíduos existentes. Em termos genéricos os resíduos são substâncias, produtos, ou objectos, que ficaram incapazes de utilização para os fins para que foram produzidos, ou são subprodutos de um processo de produção, transformação ou utilização e, em todos os casos, pressupõem que o detentor tenha ou queira desfazer-se deles.

Segundo a definição do Decreto Lei 310/95, da legislação portuguesa, considera-se resíduo “qualquer substância ou objecto de que o detentor se desfaz ou tem intenção ou obrigação de o fazer...”. Esta definição corresponde à transposição para o Direito Português, da Directiva 75/442/EEC da União europeia.

Existem diversas formas de classificar os resíduos, pelo que se poderá ter em conta a sua origem ou proveniência e/ou a sua natureza físico-química.

Infelizmente só em 1997, com o Decreto-Lei n.º 239/97, Portugal estabeleceu as linhas mestras ligadas à gestão de resíduos, designadamente a sua recolha, transporte, armazenamento, tratamento, valorização e eliminação, procurando minimizar os danos na saúde e no ambiente. Nesse diploma foram consagrados como objectivos gerais da gestão a preferência pela “prevenção ou redução da produção e nocividade dos resíduos, nomeadamente através da reutilização e da alteração dos processos produtivos, por via da

adopção de tecnologias mais “limpas”, bem como da sensibilização ambiental dos agentes económicos/productivos e dos consumidores”. Instituiu-se igualmente que a gestão de resíduos visa assegurar ao máximo a sua valorização, quer material, quer energética. Este paradigma, válido para a generalidade dos resíduos, coloca-se com maior acuidade no caso dos óleos usados, na medida em que, tratando-se também de um resíduo, a sua correcta gestão é uma condição indispensável para um desenvolvimento sustentável e de qualidade. Infelizmente apenas parte do total de óleos (incluindo os de origem vegetal, animal e mineral) utilizados em Portugal são recolhidos, sendo a maioria encaminhada para redes de esgotos, aterros ou despejada a céu aberto, em cursos de água ou em terrenos.

É necessário frisar que dentro do conjunto de óleos usados, tidos como resíduos, pode-se distinguir basicamente dois tipos:

Óleos minerais - óleos provenientes da refinação do petróleo e, portanto, compostos maioritariamente por hidrocarbonetos;

Óleos orgânicos – inclui os óleos vegetais, extraídos essencialmente de frutos e sementes oleaginosas, assim como os óleos de origem animal.

Os primeiros, devido à sua composição química, são considerados, após o seu uso, resíduos perigosos, constituindo, por isso mesmo, um perigo para a saúde humana e para a vida animal e vegetal. Deste modo, a gestão destes óleos segue uma metodologia diferente daquela que seguem os óleos vegetais e similares tidos como resíduos não perigosos (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).

Os óleos vegetais e similares, nomeadamente os que são usados em frituras a nível doméstico e industrial, estão enquadrados dentro da fracção da biomassa. Segundo a Directiva 2001/77/EC de 27 de Setembro de 2001, considera-se Biomassa “a fracção biodegradável de produtos e resíduos da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), da floresta e das indústrias conexas, bem como a fracção biodegradável dos resíduos industriais e urbanos”. Devido às suas propriedades, estes resíduos são considerados como potenciais combustíveis (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).

Devido às suas propriedades, a valorização dos óleos minerais usados e dos óleos orgânicos usados é diferenciada. Grande parte dos óleos minerais podem ser regenerados ou então usados em processos de incineração (valorização energética). Enquanto que os óleos orgânicos, com especial destaque para os óleos vegetais, “apenas” podem ser valorizados energeticamente, quer de uma forma directa em processos de incineração e queima, quer de forma indirecta, através do fabrico do designado biodiesel.

O biodiesel não é mais do que um combustível renovável, biodegradável, sucedâneo do óleo diesel mineral. Este combustível é constituído por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos

de ácidos gordos, obtidos da reacção de transesterificação de triglicéridos, presentes nos óleos vegetais ou mesmo em gorduras animais, com um álcool de cadeia curta, geralmente o metanol ou o etanol (Knothe *et al.*, 2005).

Tendo em conta a situação energética portuguesa, nomeadamente a forte dependência sobretudo em relação aos combustíveis fósseis, e tendo também em conta os graves impactes ambientais que derivam do uso destes mesmos combustíveis, a valorização (energética) de resíduos torna-se uma medida premente a tomar. A valorização é uma medida de extrema importância na gestão dos resíduos, pois conduz a uma melhoria ambiental e de saúde pública, assim como tem repercussões a nível energético, nomeadamente. Trata-se de valorizar aquilo que eram considerados resíduos inúteis e nefastos, permitindo o seu aproveitamento e, conseqüentemente, reduzir a dependência relativamente aos combustíveis tradicionais (combustíveis fósseis), com as óbvias repercussões atrás mencionadas.

Para efeitos deste trabalho, uma especial atenção irá ser dada aos óleos orgânicos usados, provenientes dos processos de fritura. Este é um resíduo que, até há bem pouco tempo, era subaproveitado em Portugal, mas que poderá e deverá ser usado como matéria prima na obtenção do biodiesel, um sucedâneo ecológico e viável do diesel, permitindo deste modo diminuir os impactes ambientais derivados da má gestão do resíduo em si e obter um combustível “endógeno” e mais “amigo do ambiente”.

Ao aproveitarmos este resíduo estamos a gerir melhor e a minimizar três importantes problemas, um problema de gestão de resíduos, um problema energético e outro referente às emissões poluentes, que contribuem nomeadamente para as alterações climáticas.

1.1 Óleos orgânicos, vegetais e similares

A grande heterogeneidade dos lípidos justifica a existência de diversas classificações; uma delas, porventura a mais simples, agrupa os lípidos em três classes: lípidos simples, lípidos conjugados e lípidos derivados.

Os lípidos simples compreendem os glicéridos e as ceras, sendo que a esmagadora maioria dos lípidos, cerca de 97%, é constituída pela fracção dos glicéridos (Felizardo, 2003). Os glicéridos são o resultado de uma união entre uma molécula de glicerol e uma, duas ou três cadeias de ácidos gordos, sendo no fundo ésteres de glicerol. Caso o éster de glicerol possua apenas um ácido gordo, toma a designação de monoglicérido (MG), no caso de possuir duas cadeias de ácidos gordos é um diglicérido (DG), se possuir três é um triglicérido (TG), tal como é ilustrado na figura 1.

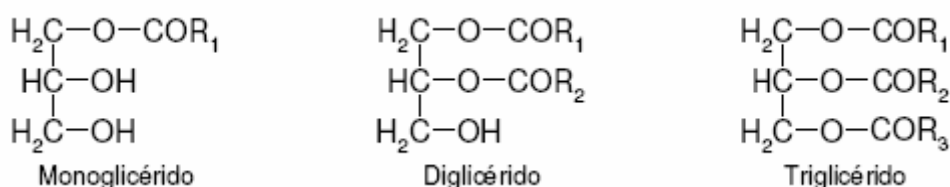


Figura 1 - Esquema dos três tipos de glicéridos em que R1, R2 e R3 representam grupos alquila constituídos por átomos de carbono e de hidrogénio (Felizardo, 2003).

Na maioria dos casos os glicéridos naturais são constituídos principalmente por triglicéridos, numa proporção geralmente aproximada de 95% para os triglicéridos e entre os 0,1 a 2% de diglicéridos e monoglicéridos (Felizardo, 2003).

Os triglicéridos são (tri)ésteres de glicerol (ou propanotriol) e ácidos gordos e são habitualmente designados por óleos ou gorduras, consoante se encontrem em estado líquido ou sólido, à temperatura ambiente (Morrison e Boyd, 1996). As ceras são igualmente ésteres, mas de monoálcoois de elevado peso molecular. Daqui se depreende que um éster seja uma molécula derivada da condensação de um álcool com um ácido. Na figura 2 é ilustrado um esquema de um éster, no qual a letra “R” representa a cadeia carbonada do ácido gordo e “R’”, a cadeia carbonada do álcool reagente.

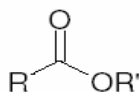


Figura 2- Esquema de um éster

Os ácidos gordos que compõem os ésteres podem ser saturados ou insaturados e, neste caso, possuem uma ou mais ligações duplas. A saturação ou insaturação, juntamente com o comprimento das respectivas cadeias (entre 8 a 24 átomos de carbono) varia consoante a origem de onde se extrai o óleo.

Os ácidos gordos são insolúveis na água devido ao facto da maior parte da molécula, formada por “CH₂”, ser hidrofóbica e somente o radical carboxílico ser hidrofílico. Esta particularidade química tem grande interesse, visto dependerem dela as propriedades físicas essenciais do óleo, como a viscosidade, o ponto de fusão, a estabilidade térmica e o índice de cetano, permitindo assim prever, à partida, o comportamento de um dado óleo.

Além dos óleos vegetais, extraídos essencialmente a partir de frutos e de sementes de oleaginosas, também existe outro material glicérido, como as gorduras de origem animal, que podem ser igualmente utilizadas e valorizadas, nomeadamente, na produção de biodiesel. Os óleos podem-se classificar em vários grupos, consoante os ácidos gordos que neles predominam. Os grupos mais importantes são os que se indicam na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos ácidos gordos (Stern *et al.*, 1983).

Ácidos gordos Saturados (ligações simples)	Ácidos gordos Insaturados
Grupo do ácido láurico (C₁₂H₂₄O₂) – inclui óleos com índices de iodo entre 5 e 30 (exemplo: óleo de coco); Grupo do ácido palmítico (C₁₆H₃₂O₂) – inclui o óleo de palma; Grupo do ácido esteárico (C₁₈H₃₆O₂) – são óleos igualmente saturados, com ligações simples.	Grupo do ácido oléico (C₁₈H₃₄O₂) – possuem apenas 1 dupla ligação e a maioria destes óleos tem um índice de iodo entre 80 e 110 (exemplo: azeite, amendoim, colza); Grupo do ácido linoleico (C₁₈H₃₂O₂) – inclui óleos com 2 duplas ligações e com um índice de iodo geralmente superior a 110 (exemplos: girassol, soja e algodão). Grupo do ácido linolénico (C₁₈H₃₀O₂) – inclui óleos com 3 duplas ligações.

A distinção dos óleos com base no seu grau de saturação ou insaturação e no tamanho das moléculas dos ácidos gordos que os constituem permite, de uma forma bastante simples, a sua classificação (Morrison e Boyd, 1996).

Os óleos que possuam um elevado teor de ácido linoleico e linolénico tendem a ser pouco resistentes à oxidação, sendo por isso mais facilmente biodegradados. Apresentam igualmente um menor índice de cetano, o que não favorece a sua capacidade de combustão.

Os óleos saturados do tipo palmítico e esteárico são pouco fluídos, mas são mais resistentes à oxidação; encontram-se normalmente no estado sólido, à temperatura ambiente e possuem, regra geral, um índice de cetano elevado (Ma e Hanna, 1999). A sua grande viscosidade, aliada à sua maior resistência à oxidação, fazem com que perdurem no ambiente e sejam de difícil remoção e limpeza, tendo de ser aquecidos até ao seu ponto de fusão para remoção ou posterior valorização (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).

Como no presente trabalho se utilizaram óleos de fritar, é necessário referir que a esmagadora maioria destes é de origem vegetal. Em Portugal, os óleos vegetais mais usados são os de girassol, soja e o azeite (INE, 2007).

O óleo de girassol, o mais usado em Portugal para os processos de fritura, é considerado um dos melhores óleos em termos nutricionais, devido, sobretudo, ao seu elevado conteúdo de ácido linoleico, que está associado a um elevado índice de iodo. Quanto mais elevado for o conteúdo de ácido linoleico, maior será o índice de iodo.

É igualmente importante referir que o óleo de soja tem uma composição média centrada em cinco ácidos gordos: o ácido palmítico, esteárico, oléico, linoleico e linolénico. Estes ácidos gordos, cuja proporção relativa é mantida sensivelmente constante após as reacções de transesterificação, compõem mais de 95% do teor de ácidos gordos deste óleo. Tal característica verifica-se igualmente para a grande maioria dos óleos orgânicos tanto de origem vegetal como animal (sendo estes uma minoria). No entanto, é necessário referir que a composição em ácidos gordos dos diferentes óleos e gorduras pode variar muito consoante a

fonte de onde são extraídos, pois depende de um grande número de factores como sejam a própria espécie e a variedade da planta, a natureza do solo onde cresceu, a altura do ano em que foi colhida e o clima a que esteve sujeita durante o seu desenvolvimento, entre outros factores. O mesmo se passa em relação às gorduras animais. Conforme a proveniência do óleo, variações na sua composição química são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos gordos presentes na estrutura (tabela 2).

Tabela 2 - Composição percentual dos principais ácidos gordos saturados e insaturados, de alguns óleos e gorduras (http://www.ccet.ufrn.br/~duarte/nomenclatura_acidos_carboxilicos.pdf).

	Pf °C	Razão Ins/sat	Saturados					Insaturados		
			Cápri. C10:0	Láuri. C12:0	Mirísti. C14:0	Palmíti. C16:0	Esteári. C18:0	Oléi. C18:1	Linolei. C18:2	Linoléni. C18:3
Gorduras animais										
Sebo (bovino)		1.0	-	-	3	24	19	43	3	-
Banha (suína)	30	1.3	-	-	2	26	14	44	10	-
Manteiga (bovina)	32	0.6	3	3	11	27	12	29	2	-
Gordura humana	15	0.9	2	5	8	25	8	35	9	-
Gordura de baleia	24	2.0	-	-	8	12	3	35	10	-
Óleo fígado bacalhau		1.1	-	-	8	17	-	22	5	-
Óleos Vegetais										
Óleo canola		15.7	-	-	-	4	2	62	22	10
Óleo coco		0.1	6	47	18	9	3	6	2	-
Óleo milho	-20	6.7	-	-	-	11	2	28	58	1
Óleo algodão	-1	2.8	-	-	1	22	3	19	54	1
Óleo linho		9.0	-	-	-	3	7	21	16	53
Azeite	-6	5.1	-	-	-	13	3	71	10	1
Óleo palma		1.0	-	-	1	45	4	40	10	-
Óleo semente de palma		0.2	4	48	16	8	3	15	2	-
Óleo amendoim	3	6.2	-	-	-	11	2	48	32	-
Óleo soja	-16	5.7	-	-	-	11	4	24	54	7
Óleo girassol	-15	7.3	-	-	-	7	5	19	68	1
Óleo linhaça	-24	10.0	-	-	-	6	3	19	24	47

PF °C = ponto de fusão (°C)

óleo de canola = óleo de colza

A análise da composição dos ácidos constitui o primeiro procedimento para a avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou de seus produtos de transformação e isto pode ser obtido através de vários métodos analíticos, nomeadamente através da cromatografia líquida de alta eficiência, da cromatografia em fase gasosa e da espectroscopia de ressonância magnética.

É ainda necessário distinguir entre os designados óleos brutos e refinados. Um óleo bruto é aquele que resulta da fase final de extracção, sem sofrer qualquer outro processo adicional.

Estes óleos poderão ser utilizados sob esta forma para alguns fins, embora normalmente sejam sujeitos a um processo de refinação antes da sua venda, passando então a designar-se por óleos refinados. Devido ao processo de refinação, a composição de um óleo refinado difere da de um óleo bruto ou cru, pois enquanto que neste se encontram várias substâncias como vitaminas lipossolúveis, lecitina, pigmentos, ceras, fitoesteróis e enzimas, no processo de refinação são retiradas quase todas essas substâncias. A vantagem da refinação é que ao eliminarem-se estas substâncias os óleos aumentam a sua estabilidade de oxidação e não se deterioram tão rapidamente, diminuindo igualmente a acidez e o ranço. Em contrapartida em termos nutricionais, os óleos refinados perdem parte do seu valor nutricional (http://www.endurancebrasil.com.br/port/tecnicas/oleo_na_dieta_dos_cavalos.php).

Da tabela 2 é possível constatar que se podem distinguir basicamente dois tipos de gorduras/óleos: as gorduras saturadas, que se encontram sobretudo em produtos de origem animal, e as não-saturadas ou insaturadas, que provêm sobretudo dos vegetais e do peixe.

Na tabela 3 explicitam-se os principais grupos de óleos orgânicos, as suas origens e o modo como geralmente são obtidos. Não é colocado o grupo dos óleos extraídos dos esgotos pois estes geralmente constituem uma mistura de óleos orgânicos com óleos minerais e, por isso, a sua separação e valorização é bastante difícil e por norma não é viável.

Tabela 3 - Diferentes origens e modos de obtenção de óleos e gorduras (Parente, 2003).

Grupo	Óleos e gorduras animais	Óleos e gorduras vegetais	Óleos residuais de frituras
Origem	Matadouros, frigoríficos industriais e curtumes	Culturas perenes e temporárias, nomeadamente de oleaginosas	Uso doméstico, comercial e industrial
Modo de obtenção	Extracção com água e vapor	Extracção mecânica, extracção por solvente e mista	Recolha em recipientes apropriados (oleões)

1.1.2 Óleos alimentares e o seu uso

Os únicos óleos e gorduras utilizados na confecção e na produção de alimentos e rações são de origem orgânica, sendo portanto de origem vegetal e/ou animal. São também estes óleos os únicos que podem dar origem ao designado biodiesel (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).

Na alimentação humana, os óleos têm vários “papéis”, conforme o uso a que se destinam. São usados como ingredientes em determinados alimentos, tais como maioneses, molhos, margarinas, etc. São empregues no tempero de determinados pratos, tais como saladas, etc, sendo igualmente utilizados no processamento de alimentos, em processos de fritura.

No âmbito deste trabalho, uma especial atenção será dada a óleos utilizados na alimentação humana, com particular incidência para os óleos que são usados nos processos de fritura por

imersão, uma vez que é um processo que utiliza óleos ou gorduras, sobretudo vegetais, como meio de transferência de calor. O “tempo de vida” de um óleo de fritar é condicionado pelo próprio óleo (origem), tempo de fritura e temperaturas atingidas, verificando-se, no entanto, que o tempo de utilização do mesmo varia, muitas vezes, de um estabelecimento para outro, principalmente pela falta de fiscalização que determine a troca do óleo usado. É vulgar a reutilização abusiva de óleos e muitas vezes a mesma põe em causa a saúde pública, uma vez que são reutilizados óleos e estes, devido ao seu uso prolongado e intenso (tempo de fritura e temperaturas atingidas), apresentam profundas modificações na sua estrutura química e nas suas propriedades físicas, podendo eventualmente apresentar componentes carcinogénicos (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm). Este uso recorrente de óleos que servem continuamente nos processos de fritura, deve-se à tentativa de se aumentar o “tempo de utilização” dos óleos, conduzindo a mais baixos custos de produção, aliada, por vezes, a uma falta de informação sobre as implicações na saúde pública.

1.1.2.1 Alterações registadas nos óleos alimentares, sob processos de fritura

É necessário referir que muitas vezes aos óleos e gorduras utilizados na alimentação são adicionadas substâncias e aditivos que visam melhorar o seu aroma, paladar, durabilidade e acidez ou alcalinidade. Acontece que após a utilização destes óleos na confecção de alimentos, por fritura, surgem, não intencionalmente, uma série de elementos que podem alterar as suas características. Os óleos podem ficar com partículas em suspensão, nomeadamente derivadas dos alimentos submetidos aos processos de fritura. Para além da contaminação com restos de partículas dos alimentos, a própria composição química do óleo, por efeitos térmicos, pode ser alterada, dependendo da temperatura atingida, do tempo de fritura e das características do próprio óleo (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).

Os óleos e gorduras sofrem reacções oxidativas hidrolíticas com o passar do tempo. Todavia, quando utilizados repetidamente em fritura por imersão, essas reacções tendem a ser mais céleres e intensas (Neto, 2002).

Nas reacções de hidrólise, os triglicéridos reagem com água dando origem ao glicerol e aos respectivos ácidos gordos seus constituintes. Por vezes, estas reacções ocorrem por catálise ácida ou alcalina, sendo que no caso da catálise alcalina, a reacção é designada por saponificação, devido à mistura de sais de sódio ou potássio (consoante a base) com ácidos gordos que formam o sabão (Felizardo, 2004).

No caso de reacções de oxidação, o oxigénio do ar reage espontaneamente com os ácidos gordos insaturados do óleo, sendo incorporado na molécula, dando origem a peróxidos (Felizardo, 2004).

Nos processos de fritura, as reacções de oxidação são particularmente mais significativas, sendo aceleradas pela alta temperatura do processo, e são as principais responsáveis pela modificação das características físico-químicas e, conseqüentemente, organolépticas do óleo (Maskan *et al.*, 2003). O óleo torna-se mais escuro, viscoso, a acidez aumenta e tende a desenvolver um odor desagradável, vulgarmente chamado de ranço. Efectivamente, é possível a “purificação” destes óleos, com materiais adsorventes, mas a mesma não é considerada viável sob o ponto de vista económico (Neto, 2002).

1.1.3 Quantitativos de óleos orgânicos usados no contexto português

Em Portugal, a Federação Industrial dos Óleos Vegetais, Derivados e Equiparados (FIOVDE), lida com a produção de óleos orgânicos (vegetais e animais) e com a sua valorização nas várias indústrias. Na tabela 4 ilustram-se os vários subsectores que compõem o sector dos Óleos Vegetais, Derivados e Equiparados (Guia Técnico do Sector dos óleos Vegetais, Derivados e Equiparados, INETI, 2001).

Tabela 4 - Vários subsectores da FIOVDE (Guia Técnico do Sector dos óleos Vegetais, Derivados e Equiparados, 2001).

	Subsector	Principais produtos
Sector dos Óleos Vegetais, Derivados e Equiparados	Fabricação de óleos vegetais brutos	Óleo de girassol, óleos de soja, farinhas para rações
	Refinação de óleos e gorduras	Óleos e azeites refinados
	Fabricação de margarinas e de gorduras alimentares similares	Margarinas, cremes para barrar, banhas
	Fabricação de sabões, detergentes e glicerina	Sabões, detergentes para loiça e roupa
	Fabricação de produtos de limpeza, polimento e protecção	Ceras, graxas, produtos de limpeza de chão, desengordurantes produtos de conservação da madeira
	Fabricação de perfumes, cosméticos e produtos de higiene	Produto para cuidar da pele, “champôs”, amaciadores, perfumes, “after-shaves”, dentífricos, cremes para a barba

Segundo o “Centro de Informação de Resíduos”, faltam dados sobre os verdadeiros quantitativos nacionais de óleos alimentares usados, assim como relativamente ao seu destino final. Com base nesta mesma fonte, segundo a Quercus, estima-se que serão produzidos anualmente em Portugal cerca de 125 mil toneladas deste resíduo, dos quais apenas 3000 serão recolhidos (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm). Todavia, salienta-se o facto de estes mesmos dados estarem certamente bastante desfasados da realidade, já que essa mesma

informação há vários anos que se mantém inalterada, não sendo sequer indicado o ano de referência. Deve ser no entanto referido que há outros estudos que apontam para outros valores quantitativos para esta fileira, sendo de salientar que, por vezes, as discrepâncias são assinaláveis uma vez que, usando metodologias diferentes, os resultados obtidos muitas vezes são dificilmente comparáveis (IPA, 2004). Com base em dados que constam no relatório “Linhas de Definição estratégica do Sistema de Gestão dos Óleos Alimentares Usados- 2004”, são apresentados 4 estimativas para os quantitativos de óleos alimentares usados, com base em 4 entidades independentes (tabela5).

Tabela 5 - Estimativas de produção de óleos alimentares usados apresentadas por várias fontes, expressas em toneladas/ano (IPA, 2004).

Fonte	Sector	Doméstico	HORECA	Industrial	Total (t/ano)
Quercus *		-	-	-	125 000
ARESP		-	51667	-	-
Pinto (2000) **		14660		540	15 200
IPA		48288	39508	540	88 336

* A Quercus explicita que os dados apresentados não são da própria instituição, mas o resultado das estimativas da Agência de Energia (IPA, 2004).

** Relatório de Ana Margarida Pinto- “Introduction of Biodiesel in Portugal” (2000)

Ainda uma outra abordagem pode ser feita com base em dados de 1998, do INE, das estatísticas referentes aos “Balanços de Aproveitamento de Gorduras e Óleos Vegetais Brutos em Portugal”. Estes dados apontavam para um consumo total anual de 22,1 kg de óleos alimentares por habitante do território nacional. Todavia considera-se que tem havido uma tendência de diminuição do consumo, numa média de 2 a 3%, ao ano (IPA, 2004). Considerando estes dados, relativamente ao ano de 2007, a capitação anual em Portugal terá sido na ordem dos 17 kg. Segundos dados do INE, de 2006, a população residente em Portugal, era de 10599095, cifrando-se em Portugal Continental um total de 10110271 habitantes (http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main). Em termos genéricos considerando um total arredondado de 10500000 residentes e uma capitação de 17 kg, os quantitativos de óleos alimentares usados, no território nacional, seriam na ordem das 178500 toneladas. Considerando que apenas se poderá considerar como efectivamente resíduos susceptíveis de valorização cerca de 45% do total de óleos consumidos, devido às várias perdas (cerca de 40% são incorporados nos alimentos e 15% constituem “perdas”, tais como fugas, óleo absorvido nos filtros de papel, etc (IPA, 2004)), o quantitativo teórico de óleos alimentares residuais será na ordem das 80325 t/ano. Este valor por si só representa já um significativo manancial de matéria-prima cuja gestão não tem sido a mais correcta, pois parte é utilizada na indústria das rações, e, infelizmente, outra parte (talvez a maior fracção),

destina-se a ser despejada nas redes de esgotos ou em terrenos. Infelizmente é prática corrente a eliminação destes óleos usados na rede de saneamento básico, quer pelas empresas que lidam diariamente com estes produtos, quer por parte dos próprios cidadãos, a nível doméstico. O sector doméstico representa cerca de 54% do total do consumo de óleos vegetais/produção de óleos usados, o sector HORECA cerca de 45%, sendo a fileira ligada à indústria, associada apenas a 1% (IPA, 2004).

O quantitativo real de óleos orgânicos usados não é, portanto, consensual e poderá até representar valores bastantes desfasados do contexto real actual português, uma vez que grande parte das empresas não divulga o verdadeiro quantitativo de resíduos de óleos orgânicos produzidos, por duas razões principais. Por um lado, prende-se com uma questão de impostos/tributação, pois uma maior produção de resíduos, é encarada como resultante de uma maior laboração e conseqüentemente de mais ganhos económicos. Por outro lado, encontram-se as questões de obrigatoriedade na gestão resíduos. Deste modo, torna-se difícil o estabelecimento de um balanço mais preciso dos quantitativos de produção de óleos e de produção de resíduos resultantes da sua utilização.

Em anexo, no final do trabalho, figuram algumas tabelas referentes ao panorama nacional relativo à produção, consumo e aprovisionamento de óleos e gorduras.

A maior parte das empresas ligadas à produção e refinação de óleos e outras gorduras e produtos similares, assim como empresas que produzem diariamente resíduos de óleos alimentares provenientes de processos de fritura (restaurantes, churrasqueiras, hotéis, roulotes de comida, fábricas de aperitivos e produtos fritos, etc), aliada a uma maior densidade populacional, encontra-se essencialmente na Zona Litoral e na Zona Centro, sobretudo na região da grande Lisboa e Vale do Tejo (INETI, 2001). Uma vez que é nestas zonas que se aglomeram os grandes focos populacionais e industriais associados aos sectores atrás referidos, compreende-se que o possível e desejável aproveitamento destes óleos para a produção de biodiesel, sob a forma da instalação de unidades industriais de produção, seja mais viável e aconselhável nas zonas onde se encontra a maioria do volume de matéria prima necessário. Aliado a este facto acresce o de ser igualmente nessas zonas que se encontram as unidades de produção e distribuição de gasóleo, ao qual o biodiesel poderá ser adicionado, assim como a maioria do mercado consumidor (INETI, 2001).

1.2 Historial da utilização de óleos e seus derivados para a combustão nos motores Diesel

Em 1895, Rudolf Christian Karl Diesel (1858-1913), um engenheiro francês de origem alemã, concebeu o motor de ignição por compressão, que mais tarde foi denominado, em sua

homenagem, de motor Diesel. Os primeiros motores do “tipo diesel” eram de injeção indirecta através de pré-câmaras, o que permitia uma maior versatilidade e tolerância quanto às características dos combustíveis. Tais motores eram alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais e até mesmo por óleo de peixe. Todavia, eram motores de baixos rendimentos e a qualidade das emissões seria hoje inaceitável, devido à sua carga poluente.

Curiosamente, durante a Exposição Mundial de Paris, em 1900, o motor diesel foi apresentado ao público, não funcionando com o diesel (óleo inorgânico, refinado do petróleo), mas sim funcionando com óleo de amendoim (Ma e Hanna, 1999).

O combustível específico denominado como “óleo diesel” surgiu somente com o advento dos motores diesel de injeção directa, sem pré-câmara. A disseminação desses motores deu-se na década de 1950, com a forte motivação dos seus maiores rendimentos, resultando em baixos consumos de combustível. Além dos baixos níveis de consumo específico, os motores diesel modernos são menos poluentes que os vulgares motores movidos a gasolina, à excepção da emissão de óxidos azotados.

Desde o seu início, os motores diesel estiveram sempre equacionados para poderem funcionar recorrendo a combustíveis líquidos orgânicos, nomeadamente a óleos vegetais e similares; no entanto, o desenvolvimento da indústria petrolífera de combustíveis permitiu ampliar a sua oferta e baixar os preços dos combustíveis derivados do petróleo tornando essa alternativa desinteressante, excepto em circunstâncias muito especiais, como as que ocorreram durante a Segunda Grande Guerra Mundial (1939-1945). De facto, a primeira patente de biodiesel, recorrendo a óleo de amendoim e metanol, foi feita no Japão, na década de 1940, seguida de outras três patentes norte-americanas, na década de 1950. Todavia é necessário referir que a reacção de esterificação de óleos e a posterior transesterificação dos ésteres, no fundo a criação do biodiesel, foi descoberta por E. Duffy e J.Patrik, em 1853, muito antes sequer de Rudolf Diesel ter inventado o motor diesel (Gomes, 2006).

A utilização do designado biodiesel, um sucedâneo ecológico e orgânico do diesel, apresenta inúmeras vantagens relativamente à utilização dos óleos vegetais em bruto. Os óleos vegetais apresentam rendimentos mais baixos e revelam alguns problemas, nomeadamente ao nível da viscosidade, obrigando a diluir o óleo em gasóleo ou a efectuar-se o arranque a gasóleo antes de se usar o óleo, directamente. Verifica-se igualmente que existe uma série de inconvenientes para o uso directo (a 100 %) de óleos vegetais e similares nos motores diesel actuais (Ma e Hanna, 1999; http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm): elevadas perdas de pressão no sistema de alimentação de combustível; formação de depósitos nos injectores e entupimento dos filtros de combustível; desgaste do motor, provocado pelos ácidos livres; espessamento do óleo do cárter e alterações significativas das propriedades do óleo de lubrificação; fumos; dificuldades

no arranque a frio; más condições de lubrificação dos sistemas de injeção de combustível, em particular a baixas temperaturas, e aumento do consumo.

A queima do óleo, no motor, revela-se bastante incompleta, deixando depósitos carbonosos e acumulação de gordura na zona superior da câmara de combustão, êmbolo e segmentos, podendo entupir o injecto, dificultando e limitando o normal funcionamento do motor. Estas limitações, desde logo, impuseram sérios condicionalismos à utilização directa destes óleos em motores Diesel, particularmente do tipo de injeção directa, os mais comuns actualmente. Contudo, quando se faz reagir um óleo vegetal com um álcool (metanol ou etanol), obtém-se um combustível que revela ser um bom substituto do diesel e dos óleos, pois apresenta melhores rendimentos e não apresenta os problemas que advêm da utilização directa de óleos vegetais e similares (Gomez *et al.*, 2000). Este combustível, que no fundo consiste num éster metílico ou etílico, conforme o álcool que é utilizado, é conhecido, na Europa, por biodiesel. Apesar de já ter um relativo longo historial, actualmente ainda se procedem a variados estudos relativamente a este combustível, quanto à utilização de matérias primas que lhe dêem origem e às tecnologias e vias produtivas, procurando melhorar todo o processo e o produto final.

1.3 O panorama do biodiesel na Europa

No contexto europeu, tal como na maioria do resto do Mundo, o biodiesel é geralmente sintetizado recorrendo-se a óleos vegetais “virgens”, produzidos especificamente para o efeito (exemplo: colza, soja, girassol, etc.). No caso particular da União Europeia, desde 1992, esta opção teve origem, em grande medida, na necessidade de viabilização, para fins não alimentares, da terra arável colocada em pousio obrigatório (“set-aside”), por imposição da Política Agrícola Comum (Rosa, 2005). Deverá salientar-se, contudo, que actualmente, face à crescente procura de matéria-prima, já existem muitos campos de cultivo permanente e intensivo, inteiramente dedicados às culturas energéticas. A tendência é no sentido de aumentar ainda mais o número e a extensão de áreas dedicadas às designadas culturas energéticas.

A produção de oleaginosas e outras espécies vegetais, para produção de biocombustíveis tornou-se uma prática cada vez mais profusa no seio dos vários países da UE e surgiu para colmatar a necessidade, igualmente imposta no seio da UE, de diversificar as origens de obtenção de energia, nomeadamente recorrendo às fontes energéticas renováveis, nas quais a biomassa tem um papel cada vez mais significativo. Convém salientar que a nível europeu, de acordo com a Directiva 2003/30/UE, foi assumido que em 2020, os combustíveis rodoviários convencionais teriam que ser substituídos em 8% por biocombustíveis, segundo a calendarização apresentada na tabela 6. Todavia, este valor já foi alterado e passou para 10%.

Tabela 6 - Calendarização da substituição de combustíveis fósseis por combustíveis alternativos, expressa em %, de acordo com a Directiva 2003/30/UE (Rosa, 2005).

Ano	Biocombustível	Gás Natural	hidrogénio	Total
2005	2	-	-	2
2010	5,75	2	-	7,75
2015	7	5	2	14
2020	8	10	5	23

A produção/utilização de biocombustíveis, em particular de biodiesel, tem vindo a crescer na UE, desde 1990 (figura 3). Em 2005, os principais responsáveis pela produção de biodiesel foram a Alemanha (cerca de 50%) e a França. Como se pode ver na tabela 7, nos últimos 2 anos houve um elevado aumento no consumo de biodiesel na UE₂₅, tendo-se passado de um valor de 2,25 Mtep, em 2005, para aproximadamente 3,85 Mtep, em 2006.

Tabela 7 - Panorama na União Europeia (UE₂₅) relativamente ao biodiesel (adaptado de “http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro167b.pdf”).

Ano	Consumo de biodiesel (tep) *	Capacidade instalada (t)	Produção de B100 (t)
2004			1933400
2005	2245093	4228000	3184000
2006	3849210	6069000	

* 1 tonelada de B100 corresponde a 0,9 tep

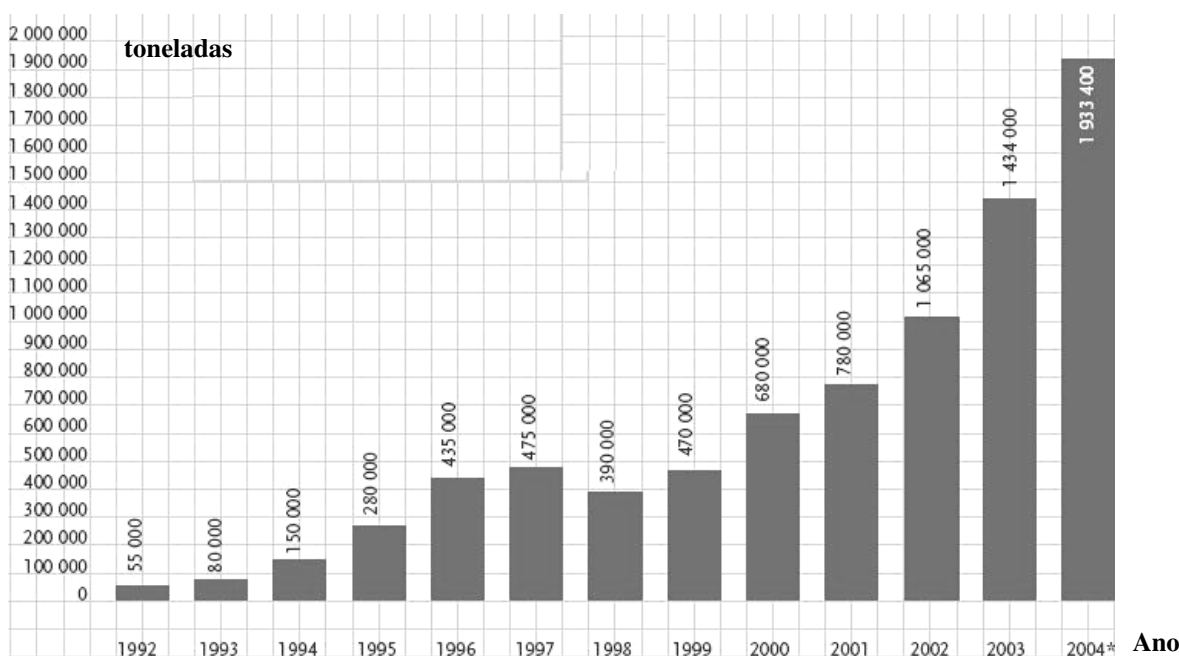


Figura 3 - Produção de Biodiesel na União Europeia a partir de 1992 até 2004 (http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro167b.pdf)

1.3.1 Biodiesel em Portugal

Enquanto a indústria de produção de biocombustíveis apresenta já uma significativa maturação e dimensão em diversos países, nomeadamente entre os nossos parceiros da União Europeia, Portugal, embora dando passos cada vez mais rápidos e significativos neste domínio, ainda mostra alguma timidez e significativo atraso em relação a vários outros parceiros europeus.

O nosso país encontra-se condicionado pela baixa produtividade da maioria das culturas com potencial energético (tabela 8), nomeadamente na produção de oleaginosas, assim como por uma ausência de excedentes de matéria-prima, que aliás é insuficiente para a necessidade industrial nacional, nomeadamente de cariz alimentar (INETI, 2002).

Tabela 8 - Produtividade média nacional, comparativa (Rosa, 2005).

Cultura	País	Portugal	França e Alemanha	Espanha
Girassol		0,8 t/ha	2,4 t/ha	1,1 t/ha
Colza		1 t/ha	3,3 t/ha	

Acresce-se que também não são devidamente e extensamente aproveitados os terrenos em pousio, por imposição da PAC, que poderiam ser utilizados para produção de culturas com fins energéticos. Em concreto, relativamente às oleaginosas, no nosso país este tipo de cultura é de todo insuficiente para assegurar as necessidades nacionais em termos de óleos. Deste modo são importadas significativas quantidades, quer de sementes para extracção de óleo, quer do próprio óleo (http://www.ine.pt/ine/acess/pub_detalhe.jsp?boui_aux=6209833). O biodiesel em Portugal está a ser produzido, na sua maioria, actualmente, a partir de óleos virgens, o que faz com que o país dependa e continue forçosamente a depender de fornecimento de matéria-prima importada e da flutuação dos seus preços no mercado internacional. Assim a aposta na reutilização de óleos orgânicos será, sem dúvida alguma, uma boa aposta, se forem estabelecidas estruturas logísticas necessárias e adequadas. No panorama nacional, existem já diversas empresas a operar no sector do biodiesel e existe um contínuo e crescente interesse nesta vertente. Entre as empresas já a operar na produção a partir de óleos virgens estão a Iberol, a Torrejana, a Prio (Martifer) e a Biovegetal, embora haja outros grupos igualmente interessados (tabela 9). Em termos de empresas a operar com óleos usados e gorduras animais destacam-se a Dieselbase, a Socipole, Space e a Biological, havendo outras empresas igualmente interessadas neste sector, destacando-se a Sunergy, Valouro e Avibon (Gomes, 2006). As tabelas 9 e 10 ilustram o panorama de produção de biodiesel a nível nacional.

Tabela 9 - Capacidade nacional instalada, em 2007, de produção de biodiesel, a partir de matéria-prima importada (Rosa, 2007).

Empresa	Capacidade produtiva (t/ano)
Iberol	100 000 + 20 000
Torrejana Biocombustíveis	40 000 x 2
Prio combustíveis	100 000
Biovegetal	100 000
Tagol	100 000
Enersis	25 000
Ares Lusitani	1 t/dia

Tabela 10 - Empresas nacionais produtoras de biodiesel a partir de óleos usados, dados de 2007 (Rosa, 2007).

Empresas	Capacidade de produção	Observações
Dieselbase	3 t/dia	A produzir
Space	3000 t/ano	A produzir
Socipole	5000 t/ano	A produzir
Sunergy Fuels	5000 t/ano	A produzir
Valouro (gorduras animais)	3000 t/ano	Em licenciamento
Avibom (gorduras animais)	3000 t/ano	Em licenciamento

Salienta-se que o biodiesel produzido a partir de óleos usados de fritura está a ser usado, essencialmente, em frotas cativas e particulares, enquanto que o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais puros está a ser vendido às companhias distribuidoras de combustíveis, para mistura com gasóleo (Rosa, 2005).

Em relação à meta portuguesa de substituição de combustíveis fósseis rodoviários, o objectivo inicial para 2010 era de 5,75% derivar de biocombustíveis (Rosa, 2005). Todavia, Portugal assume-se como um país que está a apostar na recuperação em relação ao seu atraso ao nível das energias renováveis, e, actualmente, o Plano Energético Nacional pretende atingir, no horizonte de 2010, relativamente à fileira dos biocombustíveis rodoviários, a meta dos 10% (Porfírio, 2007). Partindo do pressuposto de se atingir esta audaciosa meta, as quantidades de biodiesel necessário para a cumprir passariam a cifrar-se em cerca de 690000 t/ano, e as de bioetanol em cerca de 235000 (Porfírio, 2007). Assim sendo se percebe que a capacidade instalada, assente na sua esmagadora maioria na matéria-prima de óleos virgens, não poderá sustentar esta meta. Há projectos de substituir, significativamente, os designados biocombustíveis de 1ª geração, por biocombustíveis de 2ª geração, permitindo aumentar substancialmente a produção desta fileira. Estes novos biocombustíveis são produzidos directamente a partir da fracção sólida de biomassa vegetal ou animal (Biomass to liquid - BTL), usando processo biológicos (bioetanol) ou através de gaseificação a altas temperaturas e pressão (Porfírio, 2007).

O consumo nacional total de gasóleo (rodoviário, colorido e de aquecimento) e de fuel, em 2005, cifrou-se acima das 7000000 toneladas (tabela 11).

Tabela 11 - Consumo de combustível em território nacional continental (unidade em tonelada), segundo dados da DGEG (<http://www.dgge.pt>).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Gasóleo rodoviário	4210092	4519473	4605085	4596662	4725430	4705017
Gasóleo colorido	369963	422958	447596	324269	321963	308502
Gasóleo p/ Aquec.	-	-	-	156743	200643	223540
Fuel	3015758	3033999	3404723	2125234	1928811	2433896

Atendendo ao crescente aumento da procura e às novas metas propostas para o consumo de biocombustíveis na vertente rodoviária, acrescentando, igualmente, o sector energético, em concreto o fuel e gasóleo de aquecimento, as potencialidades de crescimento da fileira do biodiesel são ainda mais significativas. Todavia, dois problemas bastante prementes condicionam, de algum modo, o crescimento da produção de biodiesel. Por um lado, a já referida baixa disponibilidade nacional de matérias-primas, por outro, as questões burocráticas ligadas ao licenciamento e a apoios e incentivos governativos, sobretudo ao nível da isenção do ISP. Em relação à legislação nacional, relativamente aos biocombustíveis, é necessário referir o Decreto-lei n.º66/2006 de 22 de Março, que aborda a isenção dos biocombustíveis do ISP, e que estabeleceu que a isenção entre 2006 até 2010, deverá corresponder respectivamente a 2% (2006), 3% (2007) e 5,75% (de 2008 até 2010), relativamente à percentagem anual de gasolina e do gasóleo rodoviário consumido no ano anterior. Concede, todavia, total isenção aos pequenos produtores dedicados, reconhecidos ao abrigo do Decreto-lei 62/2006 (http://www.diramb.gov.pt/data/basedoc/TXT_LN_27584_1_0001.htm). Por sua vez, a portaria n.º 1391-A/2006, de 12 de Dezembro, estabeleceu para o ano de 2007, a quantidade máxima de biocombustíveis passíveis de isenção do ISP e definiu os critérios de concessão da isenção (<http://www.iapmei.pt/iapmei-leg-03.php?lei=5048>). Em função do evoluir da situação empresarial e política, novas portarias vão sendo esperadas, em virtude da necessária adequação e actualização legislativa.

1.4 A produção de biodiesel - os processos

Para efeitos deste trabalho apenas serão explicitadas as várias metodologias de produção de biodiesel de 1ª geração. Este biocombustível é assim designado porque foi o primeiro tipo de biodiesel a ser produzido, envolvendo reacções de transesterificação para a sua síntese. O designado biodiesel de 2ª geração é um biocombustível mais avançado e igualmente promissor, que resulta de reacções de hidrogenação de óleos.

Tal como já foi anteriormente referido, o biodiesel é um biocombustível sucedâneo do diesel. Em termos químicos, este combustível é composto por ésteres metílicos ou etílicos, conforme o álcool usado (metanol ou etanol, respectivamente) durante a reacção de transesterificação. Segundo a “National Biodiesel Board”, entidade Norte-Americana responsável pelo controlo e utilização do biodiesel nos EUA, o biodiesel é o derivado monoalquil-éster de ácidos gordos de cadeia longa, provenientes de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (<http://www.biodiesel.org>).

É conveniente explicar em que consiste a esterificação e mais propriamente a transesterificação.

Esterificação – os álcoois reagem com os ácidos orgânicos e inorgânicos para formar derivados, designados vulgarmente por ésteres. Esta reacção é lenta, podendo necessitar de vários dias para se completar, mas pode ser acelerada pela presença de iões H^+ que exercem uma acção catalítica. Por outro lado, é uma reacção reversível e, portanto, limitada pela reacção inversa, que se denomina hidrólise.

Transesterificação ou alcoólise – os óleos são essencialmente constituídos por triglicéridos (triésteres) resultantes da esterificação de ácidos gordos pelo glicerol. As reacções de esterificação que consistem na conversão de um éster de ácido gordo noutro éster do mesmo ácido, são designadas por transesterificação. Assim, a transesterificação consiste em fazer reagir os triglicéridos, na presença de um catalisador, com um monoálcool que irá substituir o glicerol, formando-se então três moléculas de éster a partir de cada molécula de triglicérido, tal como ilustra a figura 4.

Salienta-se que em termos estritamente estequiométricos são apenas necessárias 3 moles de álcool por cada mole de óleo para originar 3 moles de ésteres de ácidos gordos e 1 mole de glicerol (figura 4). No entanto, na prática, utiliza-se um excesso de álcool de forma a deslocar o equilíbrio químico no sentido da síntese dos ésteres (Ma e Hanna, 1999). Geralmente a razão molar álcool:óleo, em catálise alcalina, a via mais usualmente empregue, é de 6:1.

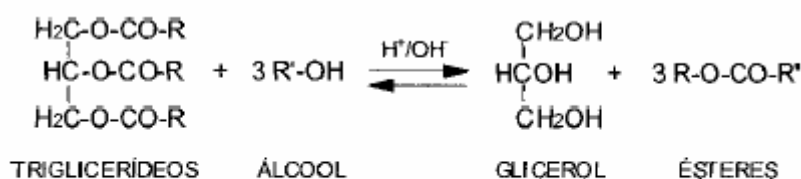


Figura 4 - Reacção de transesterificação de um triglicérido (triacilglicerol)

R representa a cadeia carbonada dos ácidos gordos e **R'**, a cadeia carbonada do álcool. H^+/OH^- representa o catalisador ácido ou alcalino, respectivamente.

A reacção de transesterificação é a etapa da conversão, propriamente dita, do óleo ou gordura em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos, que constituem o biodiesel.

Este último processo tem sido usado desde há muito tempo para se obter componentes para cosméticos, sabões, aditivos alimentares e outros produtos, a partir de óleos e gorduras. Deste modo, a produção de biodiesel não é efectivamente um processo inteiramente novo, uma vez que recorre a processos químicos já conhecidos. O processo visa simplesmente a obtenção primordial de um produto combustível e não a glicerina como ocorria no passado. É necessário referir que se o processo de recuperação (pelo menos parcial) do catalisador e o aproveitamento dos subprodutos (glicerina) for optimizado, a produção de biodiesel pode ser obtida com custos bastante competitivos com o preço comercial do óleo diesel. É necessário ter em conta que, enquanto combustível, o biodiesel necessita de apresentar algumas características técnicas que são extremamente importantes: a reacção de transesterificação deve ser completa, implicando uma total ausência de ácidos gordos livres remanescentes, e o biocombustível deve ser de elevada pureza, sempre que possível sem traços de glicerina, água, catalisador e álcool. No caso do glicerol, este é um subproduto da reacção, enquanto que a água é o resultado de uma secagem incompleta, sendo a presença de catalisador e álcool indicativos de um excesso destes elementos e/ou uma reacção incompleta.

Salienta-se que os álcoois mais adequados para a transesterificação são os de cadeia curta, tal como o metanol, o etanol, o propanol, o butanol e o álcool amílico. Todavia destes, o metanol e o etanol são os mais amplamente utilizados, sendo que o metanol é o mais vulgarmente utilizado por razões económicas e inerentes ao processo. De facto, o metanol é geralmente mais barato que o etanol e é “isento” de água, possuindo igualmente uma cadeia mais curta e uma maior polaridade. As suas características anidras reduzem a possibilidade de reacções de hidrólise, contrárias à transesterificação. As suas reduzidas dimensões favorecem uma mais rápida e melhor reacção com os triglicéridos, enquanto que a elevada polaridade facilita a posterior separação entre os ésteres e a glicerina (Felizardo, 2004). Todavia, sob o ponto de vista ambiental, o uso do etanol é mais vantajoso, uma vez que se obtém por processos fermentativos de biomassa, sendo, portanto, do ponto de vista de emissões, considerado como neutro. Acresce-se a esta particularidade o facto do etanol não ser tóxico, ao contrário do metanol. O metanol obtém-se, geralmente, a partir de fontes não renováveis, mais concretamente do petróleo e gás natural, devendo todavia frisar-se que pode ser obtido recorrendo a biomassa, por destilação, não sendo contudo um processo muito usual (Parente, 2003).

A tabela 12 corresponde a uma síntese de comparação entre a transesterificação usual via metílica e etílica.

Tabela 12 - Comparação da transesterificação alcalina via metílica e etílica, (Parente, 2003; Freitas *et al.*, 2007; <http://www.ciagri.usp.br/~simplol/downloads/10%20ULF%20UNICAMP.pdf>).

Condições usuais médias	Vias alcoólicas utilizadas	
	metílica	etílica
Quant. de álcool necessário por 1000 l de B100 produzido	90 kg	130 kg
Preço médio do álcool	baixo	elevado
Temperatura de reacção	60°C	85°C
Tempo de reacção	45 min	90 min
Propriedades usuais		
Conversão de óleo para B100	97,5%	94,3%
Glicerina total no B100	0,87%	1,4%
Viscosidade, a 40°C	3,9 a 5,6	7,2% superior ao éster metílico
Separação da glicerina	- complexa	+ complexa
Potência em comparação com o diesel	2,5% menor	4% menor
Consumo em relação ao diesel	10% maior	12% maior

O processo mais usualmente empregue na produção do biodiesel está sinteticamente representado no fluxograma da figura 4.

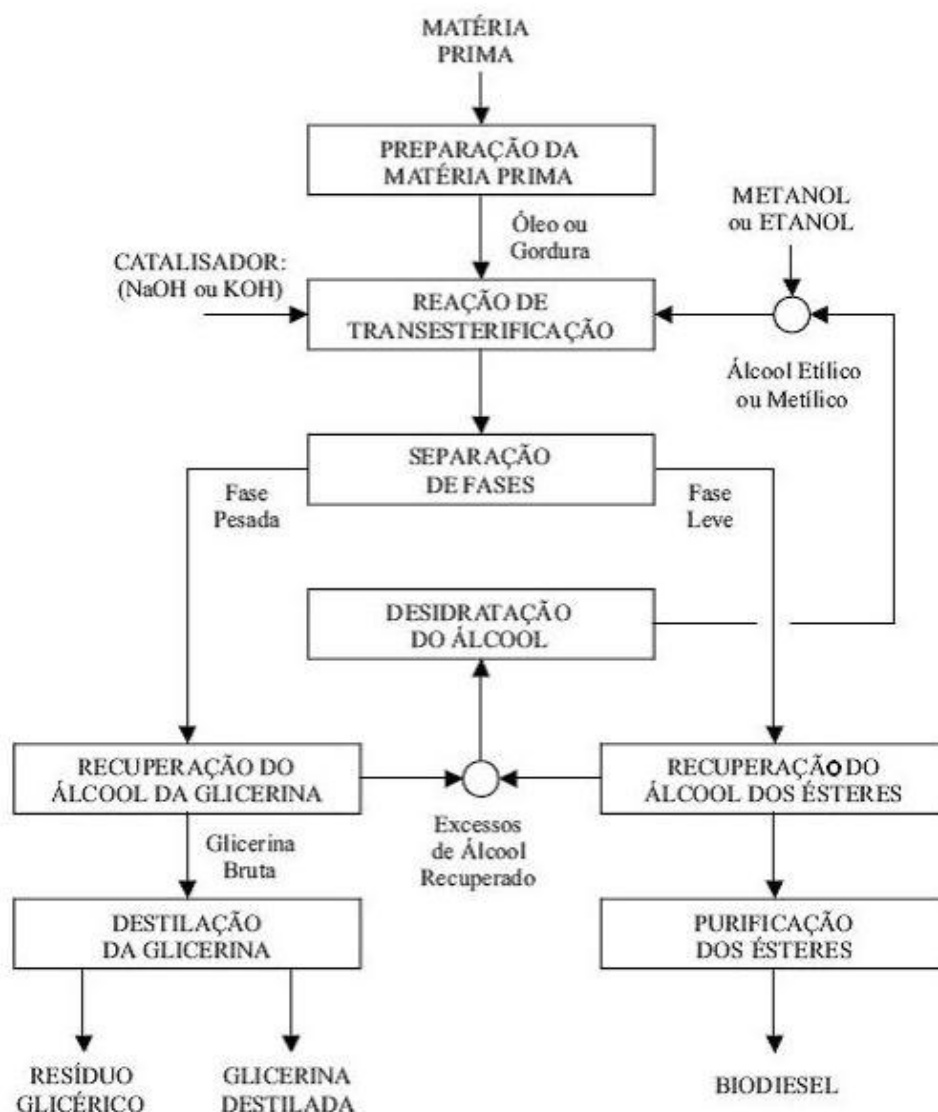


Figura 5 - Fluxograma do processo de síntese de biodiesel via transesterificação química alcalina (Junior *et al.*, 2005)

Assim, a primeira etapa consiste na preparação da matéria prima, mais concretamente do óleo ou da gordura, que deverá ser processada de forma a que esteja nas melhores condições para a reacção de transesterificação, para assim alcançar a maior taxa de conversão possível. A matéria prima deverá ter teores reduzidos de água e acidez. A água promove reacções de hidrólise, causando a saponificação em condições alcalinas, produzindo-se sabões. A saponificação não só consome o catalisador, mas também causa a formação de emulsões, as quais criam dificuldade na separação e purificação do biodiesel (Zhang *et al.*, 2003). Em relação à acidez, esta deverá ser mínima pois consome catalisador, caso este seja alcalino, promovendo igualmente reacções de saponificação. No que concerne, ainda, à água, tanto o catalisador como o álcool necessitam de ser anidros (<0,1% de humidade) (http://www.ipt.br/atividades/servicos/chat/files/biodiesel_jgrp.pdf). As formas de abaixar a acidez vão desde a neutralização e lavagem, passando pela destilação dos ácidos gordos ou o uso de esterificação prévia com uso de catalisadores ácidos, o que garante o máximo de uso da matéria oleosa (http://www.ipt.br/atividades/servicos/chat/files/biodiesel_jgrp.pdf).

A segunda etapa do processo é conhecida como etapa de conversão e consiste na reacção de transesterificação, na qual ocorre a transformação dos óleos e gorduras em ésteres, constituintes do biodiesel. A fim de maximizar todo o processo usam-se condições reaccionais apropriadas e, normalmente, o uso de catalisadores é empregue, para acelerar a alcoólise.

Segue-se uma terceira etapa, em que ocorre a separação de fases. Obtendo-se os ésteres a partir da fase leve, cuja purificação ocorre por um processo de lavagem, seguida de centrifugação e desumidificação, resultando no produto conhecido por biodiesel. Este deve obedecer às normas estabelecidas para o biodiesel como combustível. O subproduto da reacção de transesterificação é o glicerol, também designado por glicerina. O glicerol bruto obtido a partir da fase mais densa, é submetido a um processo de destilação, eliminando-se os seus constituintes voláteis e o álcool residual. A purificação do álcool é realizada por destilação, obtendo-se o álcool desidratado, que pode ser reutilizado.

A glicerina apresenta um elevado valor comercial, caso esteja na forma purificada, constituindo assim uma mais valia em termos ambientais e económicos, ajudando a rentabilizar o processo da produção do biocombustível (Parente, 2003).

Existem diversas metodologias de produção de biodiesel, desde as mais comuns usando a via química alcalina e/ou ácida, até às mais recentes usando biocatalizadores enzimáticos ou condições supercríticas (Oliveira, 2004). Nas secções seguintes será feita uma breve descrição das mesmas.

1.4.1 Transesterificação ácida

A transesterificação ácida, como o seu nome indica, utiliza ácidos como catalisadores da reacção. Os catalisadores ácidos mais usados são o ácido sulfúrico, o ácido clorídrico e ácido trifluoroacético (Oliveira, 2004).

O rendimento obtido nestes processos é muito elevado (podendo alcançar os 99%), mas a reacção é lenta, sendo necessárias temperaturas elevadas, por vezes até 100°C, e mais de 3 horas para alcançar o referido rendimento (Felizardo, 2003). A grande vantagem deste tipo de transesterificação verifica-se quando a matéria-prima apresenta uma elevada concentração de ácidos gordos livres, como acontece em muitos óleos usados de fritura.

A razão molar, geralmente empregue, de álcool:óleo é de 30:1, estando o limite de temperaturas entre os 55° e os 80°C. A fracção de catalisador na mistura, geralmente, está compreendida entre os 0,5 a 1 % (m/m) (Branco *et al.*, 2007).

Outro aspecto relevante é que a catálise ácida pode servir-se de óleos crus, reagindo directamente com o álcool acidificado, em vez de óleo refinado, como na catálise básica, ou seja, permite que a extracção e transesterificação possam ocorrer no mesmo processo, desempenhando o álcool, dois papéis: o de solvente extractor e de reagente da esterificação (Duarte *et al.*, 2006).

1.4.2 Transesterificação alcalina

Como o próprio nome indica, este tipo de transesterificação utiliza bases como catalisadores, sendo usual a utilização de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio, usando-se também carbonatos, como o de sódio e potássio (Oliveira, 2004; Felizardo, 2003). Também é referido o uso de alcóxidos como o metóxido e o etóxido de sódio, o propóxido de sódio e o butóxido de sódio, entre outros, sabendo-se que os mesmos resultam da dissolução de bases em soluções alcoólicas, formando-se o referido alcóxido e água (Oliveira, 2004). Os alcóxidos, nomeadamente o metóxido de sódio, são os catalisadores mais activos, conduzindo a rendimentos bastante elevados num reduzido tempo de reacção, pouco mais de 30 minutos. No entanto, estes catalisadores são desactivados pela água, pelo que necessitam que os teores de água no álcool e no óleo sejam muito baixos.

A utilização dos hidróxidos de sódio e potássio como catalisadores é uma boa alternativa aos alcóxidos, apesar de serem menos activos e terem o inconveniente de produzirem água na sua reacção com o álcool, o que leva à ocorrência da hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos gordos livres, com as inerentes complicações já anteriormente explicadas. Todavia, é possível alcançar as mesmas conversões, necessitando-se apenas de

aumentar a quantidade de catalisador utilizado, além de ter de se utilizar matéria prima o mais anidra possível (Felizardo, 2003).

Os catalisadores carbonatados permitem obter rendimentos significativos, embora inferiores à catalise básica usando hidróxidos, apresentando, como principal vantagem, a redução da formação de sabão, pois a reacção do álcool com o catalisador dá origem a um bicarbonato em vez de água, o qual não hidrolisa os ésteres. No entanto, a utilização deste tipo de catalisador apresenta ainda baixas condições de reprodutibilidade (Felizardo, 2003).

A transesterificação alcalina, usando hidróxidos ou alcoóxidos, é aquela que mais usualmente utilizada na produção de biodiesel, uma vez que é, aproximadamente, 4000 vezes mais rápida do que a ácida, usando a mesma quantidade de catalisador (Fukuda *et al.*, 2001). A esta propriedade soma-se o facto de a catálise alcalina geralmente utilizar uma razão molar álcool:óleo de 6:1, enquanto que para uma catálise ácida, a razão pode alcançar os 30:1 (Oliveira, 2004). Todavia, por vezes a transesterificação ácida, embora mais lenta, é mais vantajosa quando os óleos possuem elevados teores de ácidos gordos e água. Quando tal acontece, por vezes, faz-se uma catálise mista, na qual a catálise se inicia ácida, ocorrendo a esterificação dos ácidos gordos livres, levando à sua diminuição, podendo então seguir-se uma catálise alcalina, aumentando o rendimento em ésteres (Fukuda *et al.*, 2001).

Considera-se que o valor máximo aceitável de ácidos gordos livres para uma catálise estritamente básica é de 3% m/m. Com percentagens mais elevadas iriam ocorrer muitas reacções de saponificação, diminuindo a eficiência da conversão.

De todos estes catalisadores alcalinos, aquele que é mais usualmente utilizado é o hidróxido de sódio, somando-se às suas vantagens técnicas/logísticas o seu reduzido preço enquanto catalisador. Geralmente, as bases utilizadas, sobretudo o hidróxido de sódio, são empregues numa razão compreendida entre os 0,5 a 1% (m/m) em relação à massa de óleo. Em relação à temperatura, as melhores condições para conversão situam-se entre os 55°C e os 70°C (Branco *et al.*, 2007).

Os principais inconvenientes centram-se no facto de a reacção ser fortemente endoenergética, aliada à grande interferência/sensibilidade com a água e ácidos gordos presentes, que promove reacções de saponificação, além disso pode ocorrer que o catalisador alcalino possa ficar no meio sendo necessário a sua eliminação, implicando, igualmente, um tratamento posterior dos efluentes alcalinos.

1.4.3 Transesterificação usando condições supercríticas

Através da catálise sob condições supercríticas é possível obter ésteres idênticos aos de uma catálise alcalina, com uma taxa de conversão maior, praticamente na ordem dos 100%, e num período de tempo muito mais curto, rondando os 4 minutos (Branco *et al.*, 2007).

Neste processo, a matéria-prima reage com o álcool a alta pressão (na ordem dos 45 MPa) e temperatura (na ordem dos 350°C), fazendo com que a mistura vaporize, proporcionando homogeneidade, fazendo com que hipoteticamente o solvente supercrítico assuma uma natureza hidrofílica, com baixa constante dielétrica. Deste modo, os triglicerídeos apolares podem ser bem solvatados pelo fluido supercrítico, formando um sistema unifásico álcool/óleo. A não utilização de catalisadores químicos torna mais fácil a separação dos produtos em relação à catálise química, além de ser aparentemente indiferente ao teor de água e ácidos gordos presentes. Porém, apresenta algumas desvantagens devido às altas temperaturas e pressões requeridas, além de grandes quantidades de metanol, rondando uma razão molar álcool:óleo de 42:1. Deste modo, actualmente, ainda é apenas uma tecnologia em estudo, não havendo grande competitividade económica (Branco *et al.*, 2007).

1.4.4 Transesterificação usando catalisadores heterogéneos

Considera-se que um catalisador é heterogéneo ou de contacto se o mesmo se apresentar numa fase diferente da dos reagentes (Ramos *et al.*, 2005). Deste modo, pelo menos teoricamente, permite uma mais fácil separação do catalisador após o final da reacção (<http://www.ciagri.usp.br/~simpol/downloads/10%20ULF%20UNICAMP.pdf>). A utilização da catálise homogénea recorrendo aos hidróxidos tem sido a mais amplamente utilizada, contudo apresenta o problema da difícil separação do catalisador no final da reacção e acarreta, ainda, alguns problemas de saponificação. Devido a este facto, os catalisadores heterogéneos têm vindo a ser estudados como uma alternativa para diminuir os custos, simplificar e reduzir impactos no processo de separação, pois podem ser mantidos num leito fixo ou quando misturados com os reagentes podem ser separados dos produtos finais através de processos simples, como a filtração (<http://www.ciagri.usp.br/~simpol/downloads/10%20ULF%20UNICAMP.pdf>). Contudo, o uso destes catalisadores, na sua maioria metálicos, tais como catalisadores de óxido de cobalto, a título de exemplo, ainda se encontram em fase laboratorial e necessitam, portanto de serem analisados nas suas várias vertentes, quer em termos de eficiência, quer de custo e impactes ambientais (Rocha *et al.*, 2006). Destaca-se, todavia, que a principal desvantagem deste tipo de catalisadores, em relação à catálise alcalina, é que requerem, à

partida, um maior tempo de reacção e temperaturas mais elevadas (<http://www.ciagri.usp.br/~simpol/downloads/10%20ULF%20UNICAMP.pdf>).

1.4.5 Transesterificação enzimática

Tal como o nome indica a transesterificação enzimática utiliza enzimas como catalisadores da reacção. Enzimas são compostos orgânicos, geralmente de natureza proteica, que devido a serem sintetizados por seres vivos, são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reacções, que ocorrem, normalmente, sob condições suaves, à temperatura ambiente e a pH próximo da neutralidade.

Cada enzima catalisa, geralmente, uma única reacção química ou um conjunto muito restrito de reacções intimamente relacionadas, pelo que a formação de produtos secundários residuais raramente ocorre. A especificidade para com o substrato é muita elevada, sendo por vezes absoluta (Campos, 1998). Todavia a actividade enzimática é, geralmente, muito sensível às condições reaccionais, podendo conduzir à sua inactivação. Factores como a temperatura e o pH são extremamente relevantes, havendo deste modo valores óptimos e limites de tolerância, que influenciam a sua actividade. Alterações significativas de temperatura e/ou pH podem conduzir à inactivação por alteração da conformação enzimática (desnaturação), que como proteína é sensível a estes factores (Campos, 1998). Tal como ocorre para a maioria das reacções químicas, a velocidade das reacções com enzimas aumenta, geralmente, com a temperatura, dentro de um certo limite na qual elas são estáveis e mantêm a sua actividade. A termodesnaturação é dependente da quantidade de água associada com a proteína (Turner *et al.*, 2002). A concentração de substrato é igualmente um factor importante a ter em conta nas reacções enzimáticas, pois com um aumento dessa mesma concentração a velocidade reaccional aumenta até se atingir um máximo devido à saturação, mantendo-se, a partir de então, estável (Campos, 1998).

Como catalisadores, as enzimas têm várias acções, pelo que de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), estabeleceu-se uma nomenclatura na qual as enzimas são divididas em 6 classes (oxirredutases, transferases, liases, isomerases, ligases e hidrolases) e estas em várias subclasses. Embora existam várias classes de enzimas, face à natureza deste trabalho, um grupo enzimático dentro das hidrolases merece uma especial atenção, as lipases, que são enzimas hidrolíticas responsáveis pela hidrólise dos grupos ésteres (Neto, 2002). Além da hidrólise, as lipases podem também exercer actividade catalítica de interesterificação, esterificação, transesterificação, acidólise e glicerólise (Neto, 2002). Estas enzimas apresentam uma elevada especificidade pelo substrato, que supera, inclusivamente, a especificidade de todas as outras enzimas conhecidas (Duarte *et al.*, 2006).

Têm tido uma ampla utilização no sector alimentar, curtumes, cosmética e, actualmente, face às suas propriedades, têm sido estudadas com interesse na transesterificação de óleos, para produção de biodiesel, não havendo contudo, ainda, projectos implementados de carácter comercial. Contudo vários estudos têm vindo a ser realizados, referentes à optimização das condições de reacção (solvente, temperatura, pH, enzima, etc.) (Duarte *et al.*, 2006).

Existe uma vasta panóplia de lipases que podem ser utilizadas. A esmagadora maioria é de origem microbiológica (na sua maioria fungos). Entre as estirpes mais usadas citam-se a *Mucor miehei*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Geotrichum sp*, *Rhizopus sp*, *Aspergillus sp*, entre outros (Branco, 2007; http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/biodiesel_32.asp).

As enzimas podem ser utilizadas quer na forma aquosa (solúvel) ou não aquosa (imobilizada), podendo-se adicionar opcionalmente solventes na reacção de transesterificação. A função dos solventes é emulsionar as gorduras, transformando o sistema de duas fases num de fase única, o que facilita a acção catalítica (Oliveira, 2004).

Em geral, as lipases são activas numa ampla faixa de valores de pH, apresentando, contudo, os melhores valores na gama de pH 5 a 9, com um máximo, frequentemente, situado entre os 6 e 8. Em relação às temperaturas, estas também têm uma significativa amplitude, mas a maioria apresenta como melhores valores, temperaturas entre os 30 e os 40°C (Duarte, 2002).

A acção enzimática promove a hidrólise dos triglicéridos em glicéridos parciais e ácidos gordos livres, ocorrendo depois a formação dos ésteres com o álcool e os ácidos gordos livres.

(http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/biodiesel_32.asp). Deste modo, diferentemente da catálise alcalina, os ácidos gordos livres dos óleos podem ser facilmente convertidos em ésteres na catálise enzimática (http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/biodiesel_32.asp).

Apresenta ainda como vantagens, em relação à transesterificação alcalina, o facto de decorrer a temperaturas mais brandas, na sua maioria entre os 30° e os 40°C, não produzir produtos saponificados, a água não interferir prejudicialmente no processo, apresentar um rendimento aceitável, a recuperação de álcool ser fácil e não requerer lavagens do biodiesel. Por outro lado, apresenta como principais aspectos negativos o facto de requerer um elevado tempo de reacção, apresentar um rendimento inferior e o custo das enzimas ser elevado, só tornando viável o processo se houver uma recuperação das mesmas, caso contrário todo o processo fica comprometido (Duarte *et al.*, 2006; Branco, 2007). Convém mencionar, todavia, que muitas vezes as enzimas apresentam uma elevada instabilidade em solução, o que representa um obstáculo à recuperação do biocatalisador após a sua utilização (Duarte, 2006). Para permitir uma mais fácil recuperação e estabilidade do catalisador enzimático é necessário imobilizá-lo, porque só deste modo é possível a sua recuperação eficaz e a sua reutilização. A imobilização

de enzimas consiste no confinamento das mesmas num determinado material, existindo vários métodos de imobilização, entre os quais o mais usual é a vertente da imobilização física, na qual a lipase fica retida ou microencapsulada no interior de um gel insolúvel, de fibras porosas ou materiais adsorventes (Neto, 2002). O suporte físico de imobilização aumenta a estabilidade da enzima e facilita a sua utilização por longos períodos sem renovação do biocatalisador. Outra técnica consiste na imobilização não da enzima em si (extracelular), mas sim nas células suas produtoras, geralmente usando como suporte partículas porosas, as BSP (Biomass Support Particles). A escolha do suporte é dependente de diversas características que são importantes nas suas aplicações industriais. Entre esses factores está a resistência microbiológica, estabilidade térmica, durabilidade química e funcional, carácter hidrofóbico/hidrofílico, facilidade de regeneração, capacidade de carga e o baixo custo. Geralmente são usadas como matrizes de imobilização vidros porosos e seus derivados, matrizes de diatomáceas, carvão activado, celulose, silicatos, polietileno e derivados, agarose, alginato, agar, etc (Neto, 2002).

1.5 Características gerais do biodiesel

O biodiesel é um (bio)combustível e, como tal, tem a propriedade de, ao reagir com um outro elemento, o oxidante (o oxigénio), desencadear uma reacção exotérmica. Quimicamente é uma mistura de vários ésteres de ácidos gordos, cuja proporção depende do óleo que lhe serviu como matéria-prima. Apesar de haver algumas diferenças a nível qualitativo e quantitativo na amálgama de ésteres presentes nos vários tipos de biodiesel, que, como foi referido, varia em função do tipo de óleo (tabela 2), as características físicas e químicas do biodiesel são, geralmente, bastante similares entre si, independentemente da natureza da matéria prima e do agente de transesterificação. Há, contudo, algumas excepções como, por exemplo, o biodiesel oriundo do óleo de mamona, no Brasil, que foge um pouco dessa regra no que diz respeito à viscosidade (Parente, 2003).

Em seguida encontra-se a tabela 13, que ilustra algumas das principais propriedades de alguns ésteres metílicos de óleos vegetais, resultantes de transesterificação alcalina.

Tabela 13 - Propriedades de alguns ésteres metílicos de óleos vegetais (Joyce *et al.*, 2002; http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio32/biodiesel_32.asp; http://www.acsoja.org.ar/mercosoja2006/Contenidos/Foros/usuarios_03.pdf).

Propriedade	Diesel	FAME de Palma	FAME de Colza	FAME de Girassol	FAME de Soja	FAME de Linhaça
Densidade a 15° C (g/l)	825	874	882	885	884 (20°C)	891
Viscosidade a 40 ° C (mm ² /s)	2,31	4,4	4,2	4	4,08 (37,8°C)	3,7

Tabela 13 – (continuação)

Propriedade	Diesel	Éster metílico de Palma	Éster metílico de Colza	Éster metílico de Girassol	Éster metílico de Soja	Éster metílico de Linhaça
Poder calorífico (MJ/l)	35,5	32,4	32,8	32,8	33,5	33
Índice de cetano	>48	59-70	51-59,7	61,2	45 a 56	52,5
Ponto de colmatação do filtro frio (Verão) (° C)	5	-	- 8	- 4	-	-
Índice de iodo		52	114	129	131	183
C (%)	86,6	76,3	77,8	77,2	77,2	77,5
H (%)	13,4	12,4	12,3	11,9	11,9	11,6
O (%)		11,3	9,9	10,9	10,9	10,6
S (%)	0,17	-	-	-	-	-

Como combustível, o biodiesel destina-se a ser queimado em motores diesel e como tal deverá ter certas características e especificações (que constam no EN 14214), pois caso contrário poderá comprometer o bom funcionamento do motor. Os problemas mais comuns que podem ocorrer neste tipo de motores, relativamente com a utilização de biodiesel, encontram-se na tabela 14. Os maiores problemas que surgem da utilização intensiva e continuada de biodiesel nestes motores, quando o biodiesel não é de qualidade suficiente, são derivados dos ácidos orgânicos, água, peróxidos e produtos de polimerização, muitas vezes formados pela oxidação, sendo responsáveis pelo ataque de peças do motor, reduzindo o seu tempo de vida (Felizardo, 2003). Deste modo, a qualidade do biodiesel é fundamental, definindo o modo de funcionamento e o tempo de vida de um motor, sendo imprescindível assegurar um produto de boa qualidade.

Tabela 14 - Principais falhas dos motores a diesel, com uso de biodiesel de baixa qualidade (Felizardo, 2003).

Características do combustível	Efeito	Falha
Metil ésteres de ác. gordos	Causa corrosão e rupturas dos elastómeros	Fuga de combustível
Metanol livre	Corrói alumínio e zinco; baixa o ponto de inflamação	corrosão
Catalisador (alcalino)	Compostos de Na e K; partículas sólidas	Entupimento dos injectores
Água dissolvida no combustível	Formação de ác. gordos	Entupimento dos filtros
Água livre em mistura	Corrosão; permite a existência de bactérias; aumenta a condutividade eléctrica	Corrosão e formação de depósitos
Glicerina livre, mono, di e triglicéridos	Corrói metais não ferrosos; ensopa os filtros de celulose; sedimentação em parte móveis	Entupimento dos filtros e coquefação nos injectores
Ácidos gordos livres	Promove a corrosão do Zn; formação de sais de ác. gordos e de outros compostos orgânicos	Corrosão; entupimento dos filtros e formação de depósitos

Tabela 14 – (continuação)

Características do combustível	Efeito	Falha
Alta viscosidade	Gera excessivo calor, localmente nas bombas de distribuição; maior tensão entre componentes	Falhas em bombas e baixa atomização do combustível
Impurezas sólidas	Problemas de lubricidade	Reduzido tempo de serviço
Produtos de envelhecimento		
Ácidos corrosivos (fórmico e acético)	Corrói todas as partes metálicas	Corrosão
Produtos de polimerização	Formação de depósitos	Entupimento de filtros, formação de depósitos

Na Europa, os padrões técnicos de qualidade para o biodiesel estão estabelecidos pelas Normas EN 14214, enquanto que os Estados Unidos se regem pelas Normas ASTM D-6751 (Gomes, 2006). Existem igualmente normas de cariz técnico que regulamentam as metodologias adequadas para determinação qualitativa e quantitativa das várias propriedades do biodiesel, normas essas que foram utilizadas e seguidas na realização dos ensaios experimentais neste trabalho (ver secção “2.2 - Metodologias de caracterização de amostras de óleos e biodiesel”). Assim sendo, um biodiesel, para ser aceite e comercializado no espaço da UE, deverá cumprir todas as especificações impostas pela Norma 14214, que pode ser consultada na secção dos anexos.

Para além do biodiesel ser um combustível para transporte, usado puro ou em mistura com o diesel mineral, pode igualmente ser usado como combustível para aquecimento (Zhang *et al.*, 2003). Convém mencionar que o biodiesel, quando é empregue de forma pura, sem mistura com diesel, é designado pela sigla B100, pelo que consoante a percentagem com que é usado e misturado no diesel toma a designação “BX”, em que “X” corresponde à percentagem de biodiesel na mistura. Actualmente, a *Galp* comercializa uma mistura do tipo B3.

1.6 Vantagens e desvantagens decorrentes do uso do biodiesel

O biodiesel, como qualquer outro produto, apresenta aspectos positivos e negativos. Contudo, considera-se que as vantagens decorrentes do seu uso são significativamente superiores e como tal apresenta-se como um combustível de futuro e (mais) “amigo do ambiente”.

Trata-se de um combustível renovável e as suas vantagens podem dividir-se, basicamente, em quatro vertentes: a vertente ambiental, a técnica, a social e económico-política.

Sinteticamente, em relação à vertente ambiental, permite a redução da maioria dos poluentes emitidos, excepto os NO_x, comparativamente com o diesel mineral, além de não ser tóxico e ser biodegradável e renovável. A nível técnico, o biodiesel tem uma combustão mais completa que o diesel e apresenta uma maior lubricidade, o que favorece o funcionamento do motor.

Acresce-se o facto de o biodiesel apresentar um maior ponto de inflamação, o que diminui o risco de explosão associado ao transporte e armazenamento do combustível (Oliveira, 2004). A nível social, permite a criação de mais emprego nos sectores de investigação, técnico/produção, agrícola e logístico associados, gerando igualmente mais riqueza e maior dinamização e descentralização de pólos de produção e desenvolvimento. A nível político, permite uma maior independência energética do exterior, estando igualmente associado às vantagens económicas daí decorrentes, uma vez que permite uma maior manutenção/retenção de receitas, diminuindo ainda encargos ambientais decorrentes da eliminação/tratamento de resíduos e das emissões poluentes.

Todavia, há aspectos menos favoráveis que são apontados ao biodiesel. É necessário referir que consoante se trate de um metil-éster ou etil-éster, o balanço de emissões é diferente, porque se pode considerar o etil-éster, na sua combustão, como sendo de emissão zero de CO₂, por recorrer a um álcool biológico, ao contrário do biodiesel que utiliza metanol, um álcool que deriva do petróleo. Contudo, salienta-se que mesmo assim, o biodiesel independentemente da matéria-prima e do agente de transesterificação é menos poluente. Em termos de emissões, o biodiesel apresenta um valor superior, relativamente ao diesel, em relação aos óxidos azotados, cetonas e aldeídos (Felizardo, 2004). Outro aspecto negativo apontado é que pode, de alguma forma, promover a desmatção, para a criação de novos campos de cultivo de oleaginosas, e pode criar um défice de culturas alimentares ao fazer um desvio de matéria para o sector energético, conduzindo igualmente a uma subida dos preços no sector alimentar. Nesta vertente, o uso de óleos alimentares residuais, embora com um peso simbólico, pode e deve ser tomado em conta. Um outro problema associado ao biodiesel prende-se com a qualidade do mesmo, pois caso não esteja dentro das normas de qualidade poderá, inclusivamente, prejudicar o motor, componentes plásticos e a pintura, devido, nomeadamente, à acção dos ácidos gordos livres. Acresce-se o facto que devido ao seu ligeiro menor poder calorífico, em relação ao diesel convencional, o consumo é maior, sensivelmente 12% superior, havendo igualmente uma diminuição da potência do motor, na ordem dos 4 % (Oliveira, 2004). Outro aspecto que condiciona o profuso uso do biodiesel é o facto de o diesel se apresentar ainda a preços geralmente mais competitivos. Contudo, este aspecto irá esbater-se ao longo do tempo, sobretudo devido à constante subida de preço do crude, actualmente ultrapassando a barreira dos 100 dólares (tendo já alcançado os 140 dólares), e a diminuição dos preços associados à produção dos biocombustíveis.

Em baixo, figura uma pequena tabela (tabela 15) onde se ilustram as principais diferenças registadas ao nível de emissões, entre as várias misturas de biodiesel, comparativamente ao

diesel mineral, e uma outra (tabela 16) onde é apresentado uma comparação entre o diesel normal, o óleo (virgem) de colza e o respectivo éster metílico (biodiesel de colza).

Tabela 15 - Emissões de poluentes das misturas de biodiesel com diesel normal (<http://www.ivig.coppe.ufrj.br/doc/biodiesel.pdf>).

<i>Poluente</i>	Efeito do uso de Biodiesel	B100	B20	B10	B5
	redução (R) versus aumento (A) (relativamente ao diesel)	Percentual (%)			
Gases de efeito de estufa	R	78	15	7,5	3,75
Enxofre	R	98	19	9,5	4,95
Material particulado	R	50	10	5	2,5
NOx	A	13	2,5	1,3	0,65

Tabela 16 - Comportamento do óleo de colza e respectivo éster metílico (http://www.netresiduos.com/cir/index_a.htm).

Resultados ponderados	diesel	Óleo de Colza	Éster metílico de Colza
Potência (kW)	18,66	18,37	18,64
Rendimento efectivo (%)	32,5	30,3	31,7
Monóxido de carbono (g/kW)	7,99	12,31	2,73
Hidrocarbonetos inqueimados	1,62	4,35	1,43
Óxidos de Azoto (g/(kW.h))	4,59	4,89	5,31
Partículas (índice de Bosch)	2,1	1,5	0,9

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Matérias- primas

As matérias-primas utilizadas para a síntese de biodiesel foram óleos vegetais virgens, nomeadamente, de colza, de soja e de girassol, e óleos alimentares usados (provenientes de frituras).

Foram utilizados dois lotes de óleo de colza, provenientes de dois fornecedores distintos e em datas distintas. O primeiro lote, que foi utilizado nos primeiros ensaios, começou a ser usado em Janeiro de 2006, e, após esse óleo ter sido todo utilizado, fez-se uso, nos últimos ensaios (já em 2007), de um outro lote de óleo de colza.

O óleo de soja utilizado era da marca alimentar “*Valouro*”, sendo 100 % de soja (refinado) e com a indicação de que provinha de OGM.

O óleo de girassol utilizado era refinado, da marca alimentar “AAA”.

Os óleos alimentares usados tiveram diferente proveniência. Nos dois primeiros ensaios utilizou-se uma mistura de vários óleos usados provenientes de vários lotes. O terceiro óleo alimentar usado foi proveniente da Cantina do INETI e datava de Agosto de 2007.

2.1.2 Reagentes e catalisadores

Na caracterização das amostras (recorrendo às metodologias descritas na secção 2.2) e na síntese de biodiesel por transesterificação alcalina, foram utilizados os seguintes reagentes:

- n-heptano (pureza 99 %, Merck);
- Óxido de cálcio em pó (pureza entre 96 a 100 %);
- Iso-octano;
- Metanol (pureza 99,8 %);
- Sulfato de sódio anidro comercial, em pó;
- Hidróxido de potássio (pureza mínima de 86 %);
- Éter etílico (pureza 99,5 %);
- Etanol Absoluto (pureza 99,5 %);
- Fenolftaleína;
- Ácido Clorídrico;
- Hidróxido de sódio em pellets (pureza mínima 98 %);
- Solução metanólica de trifluoreto de boro (20 %);
- Cloreto de sódio (pureza 99,97 %);
- Ácido acético (pureza mínima de 99,8%);
- Clorofórmio (pureza 98,5 %);

- Iodeto de potássio (pureza mínima de 99,5 %);
- Tiosulfato de sódio aquoso (concentração 0,1 mol);
- Amido extra puro;
- Metil heptadecanoato (pureza 99,7 %);
- Solução aquosa de *Wijs*.

Na determinação concentração/quantidade da enzima presente, quer na forma imobilizada, quer na forma solúvel, para posterior utilização na síntese de biodiesel recorrendo à transesterificação enzimática, utilizaram-se os seguintes reagentes:

- Solução de hidróxido de sódio 1 N
- Carbonato de sódio anidro (pureza 99,8 %);
- Tartarato duplo de sódio e potássio;
- Sulfato de cobre anidro (pureza mínima 98 %);
- Reagente de Folin-Ciocalteu.

Em termos de enzimas (catalisadores) testadas e utilizadas nos vários ensaios de transesterificação enzimática, recorreu-se à utilização das seguintes lipases:

- *Lipozyme TL IM* (lipase imobilizada);
- *Lipozyme RM IM* (lipase imobilizada);
- *Novozym 435* (lipase imobilizada);
- *Lipozyme TL100L* (enzima solúvel);

As amostras das enzimas foram gentilmente cedidas pela Empresa Novozymes (ficha técnica de cada enzima, em anexo).

2.1.3 Equipamentos

Nos vários ensaios utilizaram-se vários materiais e equipamentos, tanto para a caracterização dos vários parâmetros dos óleos, do biodiesel e do teor enzimático, bem como na síntese do próprio biodiesel.

Segue-se uma listagem do material utilizado:

- Rotavapor R110 (com controlo de rotação e temperatura), da marca Sotel;
- Rotavapor R200 (com controlo de pressão, rotação, tempo e temperatura), da marca Büchi;
- Aparelho para determinação da estabilidade à oxidação, Rancimat modelo 743, da marca Metrohm;
- Centrífuga, Eppendorf Centrifuge 5415 D;
- Centrífuga, marca Precision;
- Centrífuga (com controlo de rotação e temperatura), modelo Avanti J-25I, marca Beckman;
- Aparelho de determinação de pH, marca Inolab (WTW);

- Espectrofotómetro, modelo U-2000 Hitachi;
- Placa de agitação marca Velp Scientific;
- Cromatógrafo gasoso, modelo Varian CP-3800;
- Aparelho Karl Fisher, para determinação da quantidade de água, modelo KF Coulometer, marca Metrohm;
- Balança de precisão (margem de erro: 0,1 mg), modelo Mettler Toledo;
- Estufas, marca Memmert;
- Banho termostatizado, marca Selecta;
- Incubadora com agitação (com controlo de rotação e temperatura), marca Brunswick scientific;
- Incubadora com agitação (com controlo de rotação e temperatura), marca Lab Line Instruments Orbit;
- Placa de aquecimento, marca Heidolph;
- Reactor para produção de biodiesel, marca Biolafitte BL06/1, com 5 L de capacidade;
- Reactor para produção de biodiesel, marca Setric Genie Industrial, com 2 L de capacidade;
- Montagem para refluxo
- Filtros GFC, de 0,8 e 0,2 micras (μm);
- Densímetros 0,900-0,950 g/cm^3 e abaixo destes valores;
- Viscosímetros de 100 e 200 mm^2/s ;
- Material corrente de laboratório.

2.2 Metodologias de caracterização de amostras de óleos e biodiesel

Neste capítulo são descritos sumariamente os métodos utilizados na realização dos vários ensaios experimentais de caracterização de amostras de óleos e biodiesel.

2.2.1 Preparação das amostras

Foi necessário proceder-se a uma secagem prévia dos óleos para que depois se pudesse fazer alguns ensaios de caracterização, nomeadamente a determinação do índice de iodo e a preparação dos ésteres metílicos de ácidos gordos a partir dos óleos, para posterior análise por cromatografia. Este tratamento de secagem foi realizado segundo a Norma Internacional ISO 661:2003, usando-se para tal o agente desumidificante sulfato de sódio anidro. O procedimento baseia-se em:

1. Homogeneizar a amostra a estudar;
2. Por cada 10 gramas de amostra (óleo/gordura) adicionar entre 1 a 2 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4);

3. Levar a amostra à estufa, a 50°C (no máximo), durante 1 hora;
4. Após este processo, efectuar a filtração da amostra a fim de retirar o agente desumidificante (sulfato sódico anidro). Efectuar a filtração, usando papel de filtro (simples), dentro da estufa, a 50°C;

Após este tratamento as amostras estão aptas a serem caracterizadas.

A nível industrial, geralmente, não se faz este tratamento preliminar de secagem para o biodiesel, pois um biodiesel de qualidade ao sair da unidade de produção já sofreu um processo sequencial de desumidificação pelo que, segundo a norma europeia EN 14214, deverá apresentar valores de água reduzidos (abaixo dos 500 ppm). Contudo, houve várias amostras de metil ésteres, neste trabalho, que foram sujeitas a este procedimento de secagem.

2.2.2 Determinação da quantidade total de matéria em suspensão (contaminação total)

Um dos parâmetros a ser determinado, quer nos óleos, quer no biodiesel, é a quantidade de matéria em suspensão. Este parâmetro foi analisado segundo a norma europeia NF EN 12662, todavia a metodologia foi adaptada pelo DER/INETI, para esse fim.

Em conformidade com a norma dever-se-á:

1. Pesar cerca de 200 g, caso a amostra a analisar seja de biodiesel, ou cerca de 50g se a amostra for de óleo (devendo a amostra já estar preparada de acordo com a metodologia descrita no tópico 2.2.1);
2. Colocar um filtro de 0,8 µm, para análises de biodiesel, ou GFC, para análise de óleos, numa estufa a 110°C, durante 45 minutos;
3. Após a ida à estufa, colocar o filtro no excicador, durante 45 minutos, ao fim dos quais se efectua a pesagem na balança de precisão;
4. Ao mesmo tempo que o filtro está no excicador, colocar a amostra a analisar numa estufa a 40°C, durante 30 minutos;
5. Efectuar a filtração sob vácuo, tendo o cuidado de humedecer previamente o filtro com heptano. O heptano fora antecipadamente filtrado, usando um filtro de 0,2 µm;
6. Por fim, lavar o erlenmeyer que continha a amostra, com heptano, a fim de arrastar todas as partículas, filtrando igualmente;
7. No fim da filtração, efectuar a secagem do filtro a 110°C, durante 45 minutos, seguido de mais 45 minutos no excicador, ao fim dos quais se procede à determinação do peso do filtro (com as impurezas).

A determinação da quantidade de impurezas presentes na amostra efectua-se subtraindo ao peso do filtro pós-filtração o peso do filtro antes da filtração.

$$\text{Quantidade de impurezas (mg)} = \text{massa do filtro após a filtração (mg)} - \text{massa do filtro limpo (mg)}$$

$$\text{Percentagem de impureza existente} = \text{quantidade de impurezas (kg)} \times 100 / \text{massa da amostra (kg)}$$

$$\text{Quantidade total de matéria em suspensão (mg/kg)} = \text{massa de impurezas (mg)} / \text{massa da amostra (kg)}$$

Segundo a EN 14214, a quantidade total de matéria em suspensão num biodiesel é designada de “contaminação total”, sendo expressa em mg/kg, devendo este valor ser inferior a 24 mg/kg.

2.2.3 Avaliação da estabilidade à oxidação

A estabilidade à oxidação foi avaliada tanto para os óleos como para o biodiesel, sendo um parâmetro bastante importante uma vez que traduz a estabilidade química dos óleos e do biodiesel durante o seu contacto com o ar.

A estabilidade à oxidação foi determinada num aparelho Rancimat, avaliando o período de indução em ensaio, controlado, de oxidação acelerada a 110°C, segundo a norma europeia NF EN 14112. O período de indução corresponde ao intervalo de tempo, em horas, que decorre entre o início da medição e o momento em que se começam a formar rapidamente produtos de oxidação. Um biodiesel de qualidade deverá apresentar, segundo a norma EN 14214, uma estabilidade mínima de oxidação de 6 horas.

2.2.4 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez é um dos parâmetros a ter em conta na análise de um biodiesel, sendo que a metodologia seguida enquadra-se na que está regulamentada na norma portuguesa NP-903, para gorduras e óleos alimentares.

Foram realizados ensaios para determinação do índice de acidez tanto dos óleos como no biodiesel deles procedente.

Este método consiste na neutralização dos ácidos gordos livres contidos numa amostra e determina-se através da massa de hidróxido de potássio, expressa em miligramas, necessária para neutralizar os ácidos gordos livres contidos numa grama da amostra, podendo esta ser de óleo, gordura ou biodiesel. Segundo a norma EN 14214, o índice de acidez de um biodiesel não poderá ultrapassar os 0,5 mg KOH/g. Em conformidade com a metodologia, deverá proceder-se da seguinte forma:

Preparação dos reagentes:

Mistura dissolvente- misturar igual volume de etanol absoluto e de éter etílico (varia a quantidade conforme o número de amostras a tratar) e depois neutralizar a solução com uma

solução de hidróxido de potássio (KOH) [0,1N], usando a solução de fenolfateína, como indicador.

Solução aquosa de hidróxido de potássio [0,1N]- dissolver 0,281g de KOH em água destilada, num volume de 50 ml. Estes valores poderão ser alterados conforme os volumes necessários. É necessário padronizar esta solução com ácido clorídrico 0,1N, de modo a confirmar a normalidade da solução de KOH.

Método:

1. Pesar, para um erlenmeyer, 20g de uma amostra de biodiesel ou de óleo refinado, ou 10g caso o óleo seja usado e, provavelmente, possua uma elevada acidez;
2. Adicionar 100 ml da mistura dissolvente e 3 gotas de indicador;
3. Proceder à titulação com a solução de KOH [0,1N], até surgir uma cor rosa/vermelha persistente;

Índice de acidez (IA):

$$IA \text{ (mgKOH/g)} = (V_{\text{KOH}} \times N_{\text{KOH}} \times 56,11) / m$$

Sendo:

V – volume do titulante (ml);

m – massa da amostra (g);

N – normalidade da solução titulante;

56,11- corresponde à massa molar do hidróxido de potássio (KOH)

* - corresponde à massa molar do ácido oléico (282 g/mol)

Percentagem de ácidos gordos livres (ácido oléico) = $(V \times N \times 282^*) / (10 \times m)$

2.2.5 Determinação do índice de iodo

A determinação do índice de iodo foi efectuada tanto em amostras de óleos como de biodiesel, seguindo a metodologia regulamentada na norma europeia NF EN 14111. Esta metodologia consiste na reacção de um óleo ou biodiesel com uma solução de um halogéneo. O halogéneo, em excesso, vai converter posteriormente uma solução iodada em iodo livre, através de uma reacção de oxi-redução. A quantidade de iodo libertada é determinada por titulação com uma solução de tiosulfato de sódio. A quantidade de iodo que reagiu com a amostra é determinada por diferença em relação a um “ensaio branco” (ensaio sem a amostra), e permite determinar o grau de insaturação do óleo ou biodiesel. Entende-se por índice de iodo a quantidade do halogéneo, expressa em gramas de iodo, que reage com 100 g de amostra. Segundo a EN 14214 o índice máximo de iodo num biodiesel não poderá ultrapassar os 120. Em conformidade com a norma de determinação deste índice, dever-se-á proceder da seguinte forma:

Preparação dos reagentes:

Solução de iodeto de potássio – adicionar 10g de KI a 100 ml de água destilada (100g/l).

Indicador de cozimento de amido – adicionar 0,5g de amido a 30ml de água fria, e depois a 100 ml de água quente já a ferver. Depois disso a solução deve ainda ferver durante mais 3 minutos.

Solução de tiosulfato de sódio [0,1N] – Solução Titrisol (solução comercial para 0,1 mol), diluindo num litro de água destilada.

Solvente – igual quantidade de ciclohexano e de ácido acético glacial, dependendo o volume a preparar do número de amostras a analisar (cada amostra requer 20ml). Preparar na hotte.

Método:

As amostras deverão ter sido previamente secas (ver secção 2.2.1).

1. Pesar amostras de 0,13 a 0,15g e transferir para erlenmeyers de 500ml, com o auxílio de 20ml de solvente (processo efectuado na hotte);
2. Adicionar, de seguida, 25ml de reagente de *Wijs* (também na hotte);
3. Tapar o frasco erlenmeyer, agitar e colocar num local escuro durante 1 hora;
4. Após uma hora de repouso, adicionar 20 ml de solução de KI e 150 ml de água destilada;
5. Titular com a solução de tiosulfato de sódio, até a solução adquirir uma coloração amarela clara. Adicionar então 0,5 ml de indicador de cozimento de amido e continuar a titulação até desaparecer a coloração azul escura, sob agitação forte. O final da titulação corresponde a uma solução de uma cor branca.
6. Efectuar dois ensaios por amostra e um ensaio em branco.

Índice de iodo:

$$\text{Índice de Iodo (gI}_2\text{/100g)} = ((V_b - V_a) \times N \times 12,69) / m$$

Sendo:

V_b – volume do titulante gasto no branco (ml);

V_a – volume do titulante gasto com a amostra (ml);

N – normalidade da solução titulante;

m – massa da amostra (g);

2.2.6 Determinação do índice de peróxido

O índice de peróxido permite avaliar o grau de oxidabilidade de um óleo ou de um biodiesel, e a sua determinação seguiu a metodologia 965.33 descrita na “Official Methods of Analysis of the AOAC”.

Entende-se por índice de peróxido a quantidade de substâncias oxidantes (peróxidos) presentes na amostra, expressa em miliequivalentes (meq) de peróxido por quilograma de amostra, capaz de oxidar uma solução de iodeto de potássio.

Em conformidade com a norma de determinação deste índice, deverá proceder-se da seguinte forma:

Preparação dos reagentes:

Solução de saturada de iodeto de potássio- dissolver um excesso de KI em água destilada fervida. A quantidade deve ser suficiente para que por cada ensaio se utilize 0,5 ml desta solução.

Indicador de cozimento de amido – adicionar 0,5g de amido a 30ml de água fria, adicionando depois esta solução a 100 ml de água quente já a ferver, devendo ferver durante mais 3 minutos.

Solução de tiosulfato de sódio [0,1N] – Solução Titrisol (solução comercial para 0,1 mol) diluindo num litro de água destilada. Dever-se-á igualmente preparar uma solução mais diluída, com [0,01N]. Para tal, efectuar uma diluição de 1:10, usando água destilada fervida, mas fria.

Solução de ácido acético glacial e clorofórmio- misturar 3 partes de ácido acético com 2 partes de clorofórmio. Para cada amostra a analisar será necessário adicionar 20ml desta solução. Preparar na hotte.

Método:

1. Pesar em triplicado, para erlenmyers de 250 ml, tomas de 5g ($\pm 0,05$) de óleo ou biodiesel;
2. Adicionar 30 ml da solução de ácido acético glacial e clorofórmio, agitando de seguida, adicionando mais 0,5 ml da solução saturada de KI. Agitar e deixar repousar durante 1 minuto;
3. Adicionar 30 ml de água destilada e 0,5 ml de indicador;
4. Titular com tiosulfato de sódio [0,1N]. Caso o volume gasto seja inferior a 0,5 ml, dever-se-á repetir a titulação, usando a solução de [0,01N];
5. O final da titulação corresponde ao ponto em que a solução adquire uma coloração amarela clara;
6. Efectuar ainda um ensaio em branco, devendo o volume de titulante gasto ser inferior a 0,1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [0,1N]. No caso do branco, o final da titulação corresponde ao ponto em que a solução passa de uma coloração branca para transparente.

$$\text{Índice de peróxido (meq peróxido/kg)} = \frac{((V_a - V_b) \times N \times 1000)}{m}$$

Sendo:

V_b – volume do titulante gasto no ensaio do branco (ml);

V_a – volume do titulante gasto com a amostra (ml);

N – normalidade do tiosulfato de sódio;

1000- factor de conversão para kg;

m – massa da amostra (g)

2.2.7 Determinação do índice de saponificação

Entende-se por índice de saponificação, a massa de hidróxido de potássio, expressa em miligramas, que é necessária para transformar em sabões (sais de potássio) os ácidos gordos e triglicéridos presentes em 1 grama de amostra, quer seja óleo, gordura ou biodiesel.

O índice de saponificação permite determinar de forma expedita o peso molar da amostra. Esta particularidade é especialmente relevante em relação aos óleos, permitindo os cálculos estequiométricos necessários para as reacções de transesterificação química.

A determinação deste parâmetro seguiu a metodologia 920.160, descrita na “Official Methods of analysis of the AOAC”. Em conformidade com a norma, dever-se-á proceder da seguinte forma:

Preparação dos reagentes:

Solução alcoólica de hidróxido de potássio - juntar, num almofariz, 40 g de KOH e 45 g de óxido de cálcio (CaO), reduzindo a mistura a pó. De 1 litro de etanol absoluto, adicionar 100 ml ao almofariz e transferir para um balão volumétrico (de 1 litro), lavando o almofariz com várias porções de etanol, transferindo igualmente para o balão, acabando por perfazer até 1 litro. Agitar e inverter várias vezes ao longo do dia. No dia seguinte dever-se-á proceder à filtração.

Solução de ácido clorídrico [0,5 N] – usar solução padrão de Titrisol.

Método:

1. Pesar em triplicado, para balões esmerilados de 250 ml, tomas de 5 g de óleo ou biodiesel;
2. Adicionar 50 ml da solução alcoólica de KOH, agitando de seguida, um pouco;
3. Adicionar reguladores de ebulição e fazer uma destilação de refluxo durante 30 minutos. No final deixar arrefecer totalmente;
4. Titular com HCl [0,5 N], em presença do indicador de fenolftaleína, devendo a solução adquirir uma coloração amarelo límpido.
5. Fazer igualmente uma titulação de um “branco”.

Índice de saponificação (IS):

$$IS \text{ (mg KOH/g)} = ((V_b - V_a) \times N \times 56,1^*) / m$$

Peso molar médio (óleo) (PM):

$$PM \text{ (g/mol)} = (56000 \times 3) / IS$$

Sendo:

V_b – volume do titulante gasto no branco (ml);

V_a – volume do titulante gasto com a amostra (ml);

N – normalidade da solução titulante;

m – massa da amostra (g);

* - massa molar do hidróxido de potássio (56,1 g/mol)

2.2.8 Determinação da quantidade de água presente na amostra

Utilizou-se a metodologia de Karl-Fisher para determinar a quantidade de água presente nas várias amostras. Em concreto, utilizou-se o “aparelho Karl Fisher”, modelo 831 KF Coulometer, da Metrohm.

As amostras de óleos e de biodiesel foram todas analisadas neste aparelho, determinando-se a quantidade de água presente em cada amostra, em valores de ppm.

Segundo a EN 14214, um biodiesel deverá apresentar como valor máximo aceitável de água 499 ppm.

2.2.9 Preparação de ésteres metílicos de ácidos gordos para posterior análise por cromatografia

As amostras de óleo foram derivatizadas utilizando o método do trifluoreto de boro. A derivatização é feita para que depois se possa avaliar, quer qualitativamente quer quantitativamente, a composição do óleo em termos de ácidos gordos, através de cromatografia. A metodologia seguida foi a da norma EN ISO 5509, na qual se procede a uma saponificação dos glicéridos, com hidróxido de sódio em metanol, seguido da conversão dos sabões em ésteres metílicos, por reacção com um complexo metanólico de trifluoreto de boro. Em conformidade com a norma, deverá proceder-se da seguinte forma:

Preparação dos reagentes:

Solução metanólica de hidróxido de sódio [0,5M] - dissolver 2 g de NaOH em 100 ml de metanol.

Solução metanólica de trifluoreto de boro (20%) – solução comercial, que deverá estar sempre acondicionada em frigorífico.

Solução saturada de NaCl - dissolver NaCl, em excesso, em água destilada.

As amostras de óleo deverão estar previamente secas (metodologia descrita no tópico 2.2.1).

Método:

1. Pesar, em duplicado, para balões de destilação de 50 ml, tomas de amostra de 150 mg;
2. Adicionar 4 ml da solução metanólica de NaOH e reguladores de ebulição;
3. Preparar um banho termostatizado, a 80°C, numa hotte;
4. Preparar a coluna de destilação com refluxo;
5. Colocar o balão ligado à coluna, mergulhando-o no banho termostatizado a 80°C;
6. Quando entrar em ebulição, contar entre 5 a 10 minutos, agitando a cada minuto, até desaparecerem as gotas de matéria gorda;
7. Adicionar 5 ml de trifluoreto de boro e manter em ebulição por mais 3 minutos ;
8. Adicionar 3 ml de iso-octano, retirando de imediato o balão, ainda acoplado à coluna de destilação, do banho termostatizado;
9. Não retirando o balão da coluna de destilação, adicionar 10 ml de solução saturada de NaCl, retirando-se só depois o balão, adicionando de seguida mais 10 ml;
10. Agitar fortemente o balão, pelo menos durante 15 segundos, adicionando de seguida mais solução saturada de NaCl, até se atingir o nível base do pescoço do balão (ver-se-á a separação de fases, em que o iso-octano com os ésteres será o sobrenadante);
11. Após a separação de fases, retirar com uma pipeta o máximo da camada superior, tendo o cuidado de filtrar esta amostra, usando para tal uma pipeta Pasteur com algodão e sulfato de sódio anidro (para eliminar alguma água que haja).

Estando as amostras já derivatizadas e pretendendo-se fazer a análise em termos do teor em ésteres, deve-se adicionar à amostra recolhida (solução de iso-octano com os metil ésteres) padrão interno (PI) (metil heptadecanoato – pureza 99%), numa proporção de 30 mg de PI para 3 ml de amostra. Após a adição do PI, a amostra deverá ser homogeneizada, após o que estará apta a ser analisada cromatograficamente.

Segundo a normativa EN 14214, o biodiesel deverá apresentar um conteúdo em éster igual ou superior a 96,5%, em massa.

2.2.9.1 Análise Cromatográfica

Após a derivatização segue-se a análise cromatográfica, usando um cromatógrafo de fase gasosa. Através desta análise irá determinar-se, qualitativamente e quantitativamente, a composição do óleo, em termos de ácidos gordos.

O cromatógrafo deverá estar programado para fazer as análises de metil ésteres de ácidos gordos.

Na análise dos resultados obtidos, que figuram nos cromatogramas, é necessário ter atenção aos tempos de retenção e à área dos vários metil ésteres de ácidos gordos. Para avaliar qualitativamente e quantitativamente os vários metil ésteres obtidos e inferir, deste modo, a percentagem de transesterificação obtida, proceder-se-á da seguinte forma:

Conteúdo em ésteres (C) em percentagem:

$$C = \left(\frac{(\sum A) - A_{ei}}{A_{ei}} \right) \times \left(\frac{C_{ei} \times V_{ei}}{m} \right) \times 100$$

Sendo:

$\sum A$ - soma das áreas

A_{ei} - área do PI

C_{ei} - concentração do PI (mg/ml)

V_{ei} - volume do PI (ml)

ác - ácido gordo (cada tipo)

m - massa da amostra

Percentagem de cada ácido gordo:

$$\% \text{ do } \acute{\text{a}}\text{c} = (A_{(\text{do } \acute{\text{a}}\text{c})} \times 100) / \sum A$$

2.2.10 Determinação dos teores em mono, di e triglicéridos e glicerol livre e total, num biodiesel

É importante determinar, num biodiesel, os teores de glicerol, assim como dos mono, di e triglicéridos, uma vez que o glicerol é um contaminante, e quanto maiores os valores em glicéridos no biodiesel, menor terá sido o rendimento da transesterificação e, conseqüentemente, menor a qualidade do biodiesel. Estes parâmetros são avaliados por cromatografia gasosa, seguindo a norma europeia EN 14105, segundo a qual o glicerol e os glicéridos precisam de ser transformados em compostos silanizados mais voláteis.

Um biodiesel, segundo a EN 14214, deverá apresentar valores de glicerina livre inferiores a 0,02% (em massa) e de glicerina total inferiores a 0,25%, sendo que os valores máximos aceitáveis de mono, di e triglicéridos são de 0,8%, 0,2% e 0,2%, respectivamente.

A metodologia seguida permite avaliar os teores das substâncias a determinar, sendo que os limites de detecção se situam nos 200 ppm no caso dos glicéridos e 10 ppm para o glicerol livre.

Para possibilitar a análise cromatográfica, o glicerol e os glicéridos presentes na amostra a analisar deverão ser previamente derivatizados com piridina e MSTFA, usando-se, como padrão interno para o glicerol, uma solução de 1,2,4-butanotriol de 5 mg/ml, em piridina, e uma solução de tricaprina a 8 mg/ml, em piridina, como padrão interno para a determinação dos glicéridos. Anteriormente à análise cromatográfica deverá proceder-se a uma calibração com uma mistura de referência contendo glicerol, monooleína, dioleína e trioleína.

Teor de glicerol livre (GL):

$$GL (\% \text{ m/m}) = ((\bar{M}_g)/m) \times 100$$

Sendo:

\bar{M}_g = valor médio da massa de glicerol obtido nas leituras do cromatógrafo (mg)
m = massa da amostra de biodiesel (mg)

Teor de glicéridos (G):

$$G (\% \text{ m/m}) = ((\bar{M}_g)/m) \times 100$$

Sendo:

\bar{M}_g = valor médio da massa de cada glicérido obtido para a soma das áreas dos picos detectados na gama relativa a cada uma das classes destes compostos (mg). Sendo que a fórmula aplicada é igual para os três tipos de glicéridos simples (mono, di e triglicéridos)

Teor de glicerol total (GT):

$$GT (\% \text{ m/m}) = GL + 0,255 \times MG + 0,146 \times DG + 0,103 \times TG$$

Sendo:

GL = teor em glicerol livre (% m/m)
MG = teor em monoglicéridos (% m/m)
DG = teor em diglicéridos (% m/m)
TG = teor em triglicéridos (% m/m)

2.2.11 Determinação da massa volúmica

A massa volúmica, vulgarmente designada por densidade, é um importante parâmetro a avaliar tanto em óleos como em biodiesel.

Um biodiesel deverá apresentar, em termos de densidade, em relação à EN 14214, valores situados entre os 0,86 e os 0,9 g/cm³, a 15°C.

A metodologia seguida foi a que se encontra descrita na ISO 3675:1998. Nesta metodologia usa-se um densímetro, e em função do material, pondera-se qual o melhor densímetro a utilizar. Normalmente, para amostras de biodiesel, usa-se um densímetro abaixo do intervalo 0,9-0,95 g/cm³. No caso de amostras de óleos, poderá usar-se o densímetro de 0,9-0,95 g/cm³.

Em conformidade com a norma, deverá proceder-se da seguinte forma:

1. Encher, com a amostra pretendida, uma proveta de 500 ml;
2. Inserir o densímetro e registar o valor obtido, “lendo-se” pelo menisco;
3. Registar, igualmente, a temperatura da amostra, usando um termómetro;
4. Efectuar os cálculos, tendo em conta que é necessário ter em consideração a temperatura das amostras.

Massa volúmica (densidade):

$$M. \text{ volúmica a } 15^\circ \text{ C (g/cm}^3\text{)} = d + 0,0723 (T-15)$$

Sendo:

d =densidade medida à temperatura T

T = temperatura medida no ensaio (° C)

2.2.12 Determinação da viscosidade cinemática

A viscosidade é um importante parâmetro, uma vez que determina a lubricidade do combustível e condiciona o funcionamento do motor. Em concreto, a viscosidade é referida como a resistência de escoamento de um fluído, sob a acção da gravidade.

Em relação aos valores que o biodiesel deverá apresentar, em conformidade com a EN 14214, a viscosidade deverá estar compreendida entre os 3,5 e os 5 mm²/s, a 40°C. A metodologia seguida foi a que se encontra descrita na ISO 3104:1999.

Em relação ao biodiesel, o viscosímetro mais adequado é o de 100 mm²/s, enquanto que para os óleos é o de 200. Deverá ter-se em conta que cada viscosímetro possui uma determinada constante, que entrará nos cálculos.

Em conformidade com a norma, deverá proceder-se da seguinte forma:

1. Proceder à crivagem da amostra, usando um crivo de malha de 75 µm;
2. Fazer subir a amostra pelo lado mais fino do viscosímetro, enquanto se faz vácuo pelo lado de maior diâmetro. Em seguida colocar num suporte próprio e depois colocar em banho termostático a 40°C. Esperar cerca de 15 minutos para que a própria amostra atinja os 40°C, só depois se poderão fazer as leituras;
3. Fazer a contabilização, usando um cronómetro, entre o tempo decorrido do escoamento da amostra entre o risco superior e o inferior (ler sempre pelo menisco).

$$\text{Viscosidade cinemática (mm}^2\text{/s)} = \boxed{C \times t}$$

Sendo:

C= Constante do viscosímetro (mm²/s²)

t = Tempo de escoamento (s)

2.1 Metodologias de determinação da concentração enzimática

Estavam disponíveis, para os ensaios laboratoriais, as enzimas *Lipozyme TL IM*, *Lipozyme RM IM*, *Novozyme 435* e a *Lipozyme TL 100L*, todas elas da marca Novozymes. As três primeiras eram lipases imobilizadas (em granulado) e a última, uma lipase solúvel.

Antes de se efectuarem quaisquer ensaios e estudos de transesterificação enzimática, foi necessário proceder-se à determinação da concentração proteica de cada enzima, pois só deste modo se poderia saber, em concreto, as quantidades de enzimas a utilizar nos vários ensaios

de transesterificação. Como as enzimas são proteínas, o método utilizado para determinar o seu teor proteico é o mesmo que é empregue na determinação do teor proteico de qualquer substância, tendo sido utilizada a metodologia de *Lowry*. Este método pode ser aplicado tanto em doseamento de proteínas imobilizadas (em suporte inorgânico) como em proteínas solúveis. Segundo esta metodologia, as amostras proteicas são tratadas, sucessivamente, com uma solução de hidróxido de sódio e de carbonato de sódio - sulfato de cobre – tartarato, antes da adição do reagente fenólico de Folin-Ciocalteu. Após a adição deste reagente, o teor proteico é determinado colorimetricamente, a 750 nm, comparando com uma solução padrão de concentração conhecida. A solução proteica padrão, utilizada nos ensaios, foi a albumina de soro de boi, a qual foi submetida a várias diluições e posterior tratamento, tal como se faz com a proteína solúvel. Após a análise da densidade óptica, foi feita uma recta de calibração, que permitiu inferir sobre a concentração proteica, permitindo, deste modo, determinar o teor enzimático de cada uma das enzimas.

2.3.1 Doseamento da enzima imobilizada

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 1N

Solução de carbonato de sódio a 5% (5g/100 ml)

Solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 2% (2g/100 ml)

Solução de sulfato de cobre a 1% (1g/100 ml)

Reagente de Folin-Ciocalteu (diluição 1:2)

Solução-padrão de albumina de soro de boi

Em conformidade com a metodologia de *Lowry*, deverá proceder-se da seguinte forma, para cada uma das enzimas imobilizadas:

Método:

1. Secar a enzima imobilizada, numa caixa de Petri, durante 3 h, a 100°C, numa estufa;
2. Após secagem, retirar a amostra, colocando-a no excicador, a fim de arrefecer sem ganhar humidade;
3. Pesar aproximadamente 25 mg da amostra, em duplicado, e adicionar 5 ml de água destilada e 5 ml da solução de NaOH. Agitar bem e colocar a solução a ferver, durante 5 minutos, a fim de se efectuar a hidrólise proteica (enzima);
4. Arrefecer a amostra, retirando-se, posteriormente, 1,5 ml da solução obtida (enzima hidrolisada), efectuando-se, de seguida, a sua centrifugação;

5. Retirar 1 ml (sobrenadante) da solução enzimática hidrolisada, já centrifugada, adicionando 5 ml de uma solução preparada com 50 ml de solução de NaCO₃, 1 ml de tartarato e 1 ml de sulfato de cobre. Agitar bem e aguardar 10 minutos, após os quais se deverá adicionar 1 ml da solução do reagente de Folin (diluído), agitando novamente;
6. Aguardar 30 minutos e fazer a leitura óptica da absorvância, no espectrofotómetro, a 750 nm.

Deverá sempre fazer-se um ensaio de repetição (réplica) por cada enzima. Além disso, é necessário fazer-se um ensaio em branco, sendo que em vez de se utilizar 1 ml da solução enzimática, utiliza-se 1ml de água destilada.

O teor de proteína é calculado usando a seguinte expressão:

$$\text{Teor proteico (mg/ mg suporte)} = \boxed{\text{proteína mg / peso da amostra (mg)}}$$

Na fórmula o valor de “proteína mg”, corresponde à quantidade de proteína pura, e é obtido a partir da recta de calibração.

2.3.2 Doseamento da enzima solúvel

Reagentes:

Solução de hidróxido de sódio 1N

Solução de carbonato de sódio a 2% (2g/100 ml)

Solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 2% (2g/100 ml)

Solução de sulfato de cobre a 1% (1g/100 ml)

Reagente de Folin-Ciocalteu (diluição 1:2)

Solução-padrão de albumina de soro de boi

Método:

1. Em dois balões volumétricos, um de 100 ml e outro de 200 ml, colocar 1 ml da solução aquosa da enzima solúvel, e perfazer o volume com água destilada;
2. Retirar 0,5 ml da solução enzimática diluída e adicionar 0,5 ml de NaOH, agitando-se de seguida, aguardando depois 30 minutos;
3. Ao fim dos 30 minutos, adicionar 5 ml da solução constituída por 50 ml da solução de NaCO₃, 0,5 ml de tartarato e 0,5 ml de sulfato de cobre. Agitar bem e aguardar depois, durante 10 minutos;
4. Adicionar 0,5 ml do reagente de Folin (já diluído), agitar e aguardar 30 minutos para se efectuar a leitura da absorvância a 750 nm.

Deverá fazer-se um ensaio de repetição (réplica); além disso é necessário realizar-se, igualmente, um ensaio em branco.

Com base na leitura da absorvância determina-se a concentração enzimática usando a recta de calibração, recorrendo a uma solução-padrão de albumina de soro bovino.

2.4 Metodologias de produção de Biodiesel (B100)

Neste capítulo são descritos os vários métodos utilizados na transesterificação dos óleos, ou seja a sua conversão em metil ésteres de ácidos gordos, isto é, em biodiesel.

São descritas as metodologias por catálise química alcalina e por via enzimática, as duas vias utilizadas neste trabalho.

2.4.1 Transesterificação química por catálise básica

As reacções de transesterificação química foram realizadas utilizando o hidróxido de sódio (NaOH), como catalisador, e o metanol, como álcool reaccional. A opção por este álcool deve-se ao facto de, em termos técnicos e económicos, a reacção via metílica ser muito mais vantajosa que a via etílica.

Foi sintetizado biodiesel, através deste processo, usando três tipos de óleos: óleo virgem de colza, óleo refinado de soja e óleo alimentar usado.

É necessário, ainda, frisar que os ensaios de transesterificação decorreram, somente, após a caracterização prévia dos vários óleos.

2.4.1.1 Produção de biodiesel a partir de óleo de colza

O óleo de colza utilizado foi um óleo cru, cujo lote datava de Janeiro de 2006.

O objectivo foi produzir-se uma quantidade aproximada de 0,5 litros de biodiesel, para que se pudesse efectuar uma caracterização deste, de forma a certificar-se que o combustível apresentaria os seus vários parâmetros dentro da norma europeia EN 14214. Assim, utilizou-se para transesterificação do óleo de colza uma razão molar metanol:óleo de 6:1 e 1% em massa de hidróxido de sódio, relativamente à massa de óleo utilizada. Estas condições são consideradas como optimizadas, e são as geralmente empregues na produção de biodiesel por via alcalina.

À quantidade de catalisador necessária para a reacção (1% m/m), foi ainda adicionada a quantidade de hidróxido de sódio necessária para neutralizar os ácidos gordos livres presentes no óleo (relacionado com o índice de acidez).

2.4.1.1.1 Procedimento

Calculadas as quantidades de reagentes e de catalisador, necessárias à reacção, adicionou-se num erlenmeyer, numa placa de agitação com aquecimento, o metanol e o hidróxido de sódio, em pastilhas, deixando a solução a reagir, em sistema fechado, até o hidróxido se dissolver completamente, a uma temperatura de 50°C e sob agitação. O óleo foi pesado, colocando-se de seguida num reactor a 55°C e a uma agitação de 150 rpm. Após a total dissolução do NaOH no metanol, formando uma solução de metóxido, adicionou-se esta solução ao óleo e deixou-se a reagir (transesterificação) durante 4 horas, a 55°C e a 150 rpm.

2.4.1.1.2 Separação de fases

Efectuaram-se recolhas de amostra, de hora em hora, num total de 4 amostras (1h, 2h, 3h e 4h). Cada recolha, de 6 ml, foi distribuída por “ependorfs” e centrifugada, durante 1 minuto e meio, a 8000 rpm. Depois de centrifugar, retirou-se, de cada eppendorf, a fase sobrenadante, que corresponde aos metil ésteres. Foi necessário proceder-se, ainda, à lavagem da fase recolhida. Para isso colocou-se cada amostra num erlenmeyer de 200 ml e adicionou-se 0,5 ml de água destilada, após o que se colocou na incubadora, durante 10 minutos, a 55°C e a 150 rpm. Após este tempo cada amostra foi centrifugada, em tubos de vidro de 50 ml de capacidade. No final de cada centrifugação conseguia-se discernir 2 fases: a sobrenadante, de cor amarela clara, correspondente aos metil-ésteres, e uma fase aquosa correspondente à mistura de glicerol, água e metanol. No final das 4 horas de reacção houve igualmente uma separação de fases, no reactor, procedendo-se à recolha das duas fases obtidas. Em relação à fase sobrenadante, colocou-se a mesma numa ampola de decantação a fim de melhor separar. Este é um processo relativamente lento, mas que permite separar a fase aquosa, inferior (mistura de água, glicerol, metanol e catalisador), a fim de minimizar interacções (oxidações e hidrólises) que prejudiquem a qualidade final do biocombustível final. Efectuou-se, depois, a pesagem das duas fases obtidas e a lavagem do biodiesel. Para isso foi necessário adicionar uma quantidade de água destilada numa proporção de 20 ml de água destilada por cada kg de biocombustível obtido, procedendo-se à lavagem na incubadora, a 55°C e a 150 rpm, durante 10 a 15 minutos. Após a lavagem, colocou-se a mistura, novamente, numa ampola de decantação, tendo-se procedido a uma nova lavagem da fase superior. A fase superior final (fase orgânica dos ésteres) foi recolhida.

2.4.1.1.3 Eliminação de contaminantes no Biodiesel

Posteriormente, todas as fases sobrenadantes foram secas. As amostras sequenciais, devido ao seu reduzido volume, foram secas recorrendo a sulfato de sódio anidro. Em tal procedimento,

colocou-se numa pipeta Pasteur, um pouco de algodão e depois um pouco de sulfato de sódio, procedendo-se depois à filtração de cada amostra. Após este tratamento, cada amostra deverá apresentar um aspecto translúcido, estando apta para caracterização. A amostra final, obtida ao fim das 4 horas de transesterificação, foi seca ao rotavapor (modelo R200, da Büchi), de modo a eliminar contaminantes, como a água e o metanol, obtendo-se um biocombustível puro. As condições de laboração, em rotavapor, foram de 40°C, iniciando-se o processo a uma pressão de 350 mbar, baixando-se a pressão para os 300 mbar, ao fim de 5 minutos, continuando-se a reduzir a pressão, sequencialmente, em 45 minutos, até se atingir os 70 mbar.

2.4.1.2 Produção de biodiesel a partir de óleo de soja

O óleo de soja utilizado na transesterificação alcalina era um óleo alimentar refinado.

As razões molares utilizadas foram as mesmas que em relação ao óleo de colza. Deste modo usou-se uma razão molar metanol:óleo de 6:1 e hidróxido de sódio a 1% (m/m), calculando-se igualmente a quantidade adicional de catalisador, face à acidez natural do óleo.

Os ensaios decorreram usando uma massa de óleo de 50g, reagindo em erlenmeyer fechado, de 200 ml, numa incubadora a 55°C e 150 rpm.

Tal como descrito na secção 2.4.1.1.1, só depois de feita a solução de metóxido é que a mesma foi adicionada ao óleo, previamente aquecido, ficando a transesterificar durante 4 horas. Ao longo dessas 4 horas de reacção, houve recolhas sequenciais (2 ml), de hora em hora. As amostras recolhidas não chegaram a ser lavadas, tendo sido imediatamente centrifugadas. No caso da fase sobrenadante, correspondendo ao biocombustível, apresentasse uma tonalidade opaca, o que indicava que a centrifugação não teria permitido uma separação eficiente do biocombustível, a mesma foi seca recorrendo a sulfato de sódio anidro. Após este tratamento, as amostras apresentavam um aspecto translúcido, estando aptas para caracterização.

2.4.1.3 Produção de biodiesel a partir de óleo usado

Foram utilizados três lotes diferentes de óleos alimentares usados. As condições utilizadas foram as que estão descritas como sendo consideradas optimizadas para transesterificação de óleos usados. Assim, a razão molar metanol:óleo foi de 6:1, tendo sido utilizada uma relação de 1,2 % de massa de hidróxido de sódio, relativamente à massa de óleo, acrescida da quantidade de catalisador necessária para compensar a acidez natural do óleo.

Relativamente aos dois primeiros lotes utilizados, os ensaios de transesterificação, sensivelmente com 2 litros de óleo, decorreram em reactores Biolafitte BL06/1, a 55°C e a uma agitação de 150 rpm. O biocombustível, após as 4 horas de reacção, foi lavado e posto a

decantar em ampolas de decantação conforme descrito em 2.4.1.1.2, tendo sido igualmente realizadas recolhas sequenciais (10 ml). Em relação ao último óleo testado, da Cantina do INETI, a reacção de transesterificação, durante 4 horas, decorreu numa incubadora, recorrendo a um erlenmyer fechado, de 250 ml, utilizando uma quantidade de 50 g de óleo, mantendo as condições de transesterificação em termos de temperatura (55°C) e agitação (150 rpm), procedendo-se igualmente a recolhas sequenciais (2 ml).

2.4.2 Influência do processo de secagem no teor em água e na estabilidade à oxidação do biodiesel

Face aos trabalhos em desenvolvimento e em virtude de se pretender fazer uso do desenho composto central em ensaios sobre a transesterificação enzimática, achou-se igualmente pertinente construir um desenho composto central para avaliar a influência de vários parâmetros, controláveis no rotavapor, na diminuição do teor em água do biodiesel e na sua estabilidade à oxidação.

O rotavapor utilizado permitia o controlo de três variáveis (independentes): temperatura, pressão e tempo. Deste modo, pretendia-se analisar a actuação e interacção entre estes três parâmetros na secagem do biocombustível.

O desenho composto central teve 3 variáveis independentes, cada variável a 2 níveis (-1/+1), tendo sido expandido para os níveis extremos (-1,682/+1,682), pois deste modo a expansão permitiria aumentar as hipóteses de resposta. Assim, o intervalo de níveis definido foi: -1,682 ; -1 ; 0 ; +1 ; +1,682 (tabelas 17 e 18). O ponto médio (0) foi efectuado com triplicados, o que permitiu avaliar com maior precisão e representatividade os valores das determinações.

As quantidades de biodiesel utilizadas nos vários ensaios de secagem foram de 50 g, tendo sido utilizado o biodiesel que foi produzido a partir do óleo usado do 1º lote.

Foram definidos como intervalos a estudar:

Temperatura (T): de 40 a 70°C;

Tempo (t): de 10 minutos a 60 minutos;

Pressão (P): de 70 a 300 mbar;

Tabela 17 - Parâmetros estudados, em desenho composto central, para optimização da secagem de biodiesel.

Parâmetro	Nível				
	-1,682	-1	0	+1	+ 1,682
Temperatura (°C)	40	46,1	55	63,9	70
Pressão (mbar)	70	116,6	185	253,4	300
Tempo (minutos)	10	20	35	49,9	60

Tabela 18 - Planeamento dos ensaios relativos aos níveis -1/+1 e à expansão -1,682/+1,682, assim como os respectivos valores a ensaiar.

Nível (-1/+1)

Sequência	Níveis -1/+1			Valores a ensaiar		
	Temperatura	Pressão	Tempo	Temperatura (°C)	Pressão (mbar)	Tempo (min)
1	-	-	-	46,1	116,6	20
2	+	-	-	63,9	116,6	20
3	-	+	-	46,1	253,4	20
4	+	+	-	63,9	253,4	20
5	-	-	+	46,1	116,6	49,9
6	+	-	+	63,9	116,6	49,9
7	-	+	+	46,1	253,4	49,9
8	+	+	+	63,9	253,4	49,9
Ponto médio	0	0	0	55	185	35

Expansão (-1,682/+1,682)

Sequência	Níveis -1,682/+1,682			Valores a ensaiar		
	Temperatura	Pressão	Tempo	Temperatura (°C)	Pressão (mbar)	Tempo (min)
9	-1,682	0	0	40	185	35
10	+1,682	0	0	70	185	35
11	0	-1,682	0	55	70	35
12	0	+1,682	0	55	300	35
13	0	0	-1,682	55	185	10
14	0	0	+1,682	55	185	60

Após a realização dos vários ensaios, de acordo com as condições definidas no desenho composto central, cada amostra foi analisada em termos de teor de água e de estabilidade à oxidação, a fim de avaliar a influência conjugada desses mesmos factores, sobre estes parâmetros que constam da norma EN 14214.

2.4.3 Transesterificação por catálise enzimática

As reacções de transesterificação enzimática, neste trabalho, foram realizadas recorrendo a várias lipases, utilizando o metanol como álcool. Somente um ensaio foi realizado utilizando etanol. O biocombustível sintetizado através deste processo catalítico foi obtido a partir de 4 tipos de óleos: óleo cru de colza, óleo refinado de soja, óleo refinado de girassol e óleo alimentar usado. Os catalisadores, em estudo, foram as enzimas imobilizadas *Lipozyme TL IM*, *Lipozyme RM IM*, *Novozym 435* e a enzima solúvel *Lipozyme TL 100L*.

2.4.3.1 Desenho composto central (a 4 variáveis) para produção de biodiesel, a partir de óleo de colza, usando enzimas

Para se proceder à optimização da produção de biodiesel, usando enzimas, recorreu-se à metodologia do desenho composto central, de modo a estudar o efeito sinérgico entre diferentes variáveis no processo de transesterificação enzimática. As variáveis cuja interacção se pretendeu estudar foram a temperatura, a quantidade de lipase, a quantidade de água e a razão molar metanol/óleo. Deste modo, o desenho composto central teve 4 variáveis independentes, cada variável a 2 níveis (-1/+1), tendo sido expandido para os níveis extremos (-2/+2). O intervalo de níveis definido foi: -2 ; -1 ; 0 ; +1 ; +2 (tabelas 19, 20 e 21). O ponto médio (0) foi efectuado com três replicados.

A tabela 19 representa o planeamento dos ensaios utilizando o desenho composto central e os respectivos valores.

As quantidades de óleo utilizadas para transesterificação foram de 50 g, por ensaio. Os ensaios foram realizados, inicialmente, com o óleo de colza do primeiro lote. Posteriormente repetiram-se alguns ensaios, que aparentemente apresentavam valores mais díspares face às tendências apresentadas, sendo que as repetições foram realizadas já com o segundo lote de óleo de colza, uma vez que o primeiro fora totalmente utilizado.

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 200 ml, numa incubadora orbital, a 150 rpm.

O teor de ésteres obtidos na transesterificação foi determinado ao fim de 15 horas de reacção.

Foram definidos como intervalos a estudar:

Temperatura (T): de 25 a 50°C;

Quantidade de lipase pura (L): de 30 a 110 mg;

Razão molar metanol:óleo (R): de 3:1 a 7:1;

Quantidade de água (A): de 0 a 12 g

Tabela 19 - Parâmetros estudados, no desenho composto central, para optimização do sistema reaccional de transesterificação enzimática.

Parâmetro	Níveis				
	- 2	-1	0	+1	+ 2
T- Temperatura(°C)	25	31,2	37,5	43,7	50
L- Quantidade de enzima (mg)	30	50	70	90	110
R- Razão molar metanol:óleo	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1
A- Quantidade de água (g)	0	3	6	9	12

Tabela 20 - Planejamento para os ensaios relativos aos níveis -1/+1 e à expansão -2/+2, assim como os respectivos valores a ensaiar.

Nível (-1/+1)

Sequência	Níveis -1/+1				Valores a ensaiar			
	T	L	R	A	T(°C)	L (mg)	R	A (g)
1	-	-	-	-	31,2	50	4:1	3
2	+	-	-	-	43,7	50	4:1	3
3	-	+	-	-	31,2	90	4:1	3
4	+	+	-	-	43,7	90	4:1	3
5	-	-	+	-	31,2	50	6:1	3
6	+	-	+	-	43,7	50	6:1	3
7	-	+	+	-	31,2	90	6:1	3
8	+	+	+	-	43,7	90	6:1	3
9	-	-	-	+	31,2	50	4:1	9
10	+	-	-	+	43,7	50	4:1	9
11	-	+	-	+	31,2	90	4:1	9
12	+	+	-	+	43,7	90	4:1	9
13	-	-	+	+	31,25	50	6:1	9
14	+	-	+	+	43,7	50	6:1	9
15	-	+	+	+	31,2	90	6:1	9
16	+	+	+	+	43,7	90	6:1	9
Ponto médio	0	0	0	0	37,5	70	5:1	6

Expansão (-2/+2)

Sequência	Níveis -2/+2				Valores a ensaiar			
	T	L	R	A	T(°C)	L (mg)	R	A (g)
1*	-2	0	0	0	25	70	5:1	6
2*	+2	0	0	0	50	70	5:1	6
3*	0	-2	0	0	37,5	30	5:1	6
4*	0	+2	0	0	37,5	110	5:1	6
5*	0	0	-2	0	37,5	70	3:1	6
6*	0	0	+2	0	37,5	70	7:1	6
7*	0	0	0	-2	37,5	70	5:1	0
8*	0	0	0	+2	37,5	70	5:1	12

Tabela 21 - Planejamento dos ensaios do desenho composto central, incluindo a expansão, com os respectivos valores.

Sequência	Condições de ensaio						
	T (°C)	L (mg)	Metanol (g)	A (g)	L (% m/m)*	Metanol (Razão molar)	A (% m/m)*
1	31,2	50	7,14	3	0,1	4:1	6
2	43,7	50	7,14	3	0,1	4:1	6
3	31,2	90	7,14	3	0,18	4:1	6
4	43,7	90	7,14	3	0,18	4:1	6
5	31,2	50	10,7	3	0,1	6:1	6

Tabela 21 – (continuação)

Sequência	Condições de ensaio				L (% m/m)*	Metanol (Razão molar)	A (% m/m) *
	T (°C)	L (mg)	Metanol (g)	A (g)			
6	43,7	50	10,7	3	0,1	6:1	6
7	31,2	90	10,7	3	0,18	6:1	6
8	43,7	90	10,7	3	0,18	6:1	6
9	31,2	50	7,14	9	0,1	4:1	18
10	43,7	50	7,14	9	0,1	4:1	18
11	31,2	90	7,14	9	0,18	4:1	18
12	43,7	90	7,14	9	0,18	4:1	18
13	31,2	50	10,7	9	0,1	6:1	18
14	43,7	50	10,7	9	0,1	6:1	18
15	31,2	90	10,7	9	0,18	6:1	18
16	43,7	90	10,7	9	0,18	6:1	18
1*	25	70	8,93	6	0,14	5:1	12
2*	50	70	8,93	6	0,14	5:1	12
3*	37,5	30	8,93	6	0,14	5:1	12
4*	37,5	110	8,93	6	0,2	5:1	12
5*	37,5	70	5,3	6	0,14	3:1	12
6*	37,5	70	12,5	6	0,14	7:1	12
7*	37,5	70	8,93	0	0,14	5:1	0
8*	37,5	70	8,93	12	0,14	5:1	24
Pm	37,5	70	8,93	6	0,14	5:1	12

* (% m/m) – corresponde à percentagem mássica em relação à massa de óleo em ensaio

2.4.3.2 Escolha da enzima para posteriores ensaios de transesterificação

Após a determinação da concentração enzimática, usando o método de *Lowry*, foi necessário seleccionar qual a melhor enzima para ser usada nos processos de optimização da transesterificação enzimática. Para tal, recorreu-se à comparação dos resultados finais de transesterificação, com cada enzima, obtidos nas condições reaccionais definidas como ponto médio do desenho composto central: temperatura de 37,5°C; quantidade enzimática pura de 70 mg, razão molar metanol/óleo de 5:1 e uma quantidade de água de 6 g. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 200 ml numa incubadora orbital, a 150 rpm, utilizando-se 50 g de óleo de colza (1º lote).

2.4.3.3 Determinação das melhores condições reaccionais

A partir das superfícies de resposta obtidas por aplicação da metodologia do desenho composto central, foi possível determinar as melhores condições para a reacção de transesterificação, fazendo variar cada uma das quatro variáveis, mantendo todas as outras em

valores constantes. Foi tido em consideração que os valores dos vários parâmetros apenas podem variar dentro dos intervalos definidos nos níveis do desenho composto central, pois só assim apresentam representatividade. Assim sendo, os limites estiveram compreendidos entre:

Temperatura: 25° a 50C

Quantidade lipase pura: 30 a 110 mg

Quantidade de metanol: 5,3 a 12,5 g

Quantidade de água : 0 a 12 g

2.4.3.4 Produção de biodiesel a partir de óleo de soja

Após a determinação das melhores condições para a reacção de transesterificação, recorrendo ao óleo de colza, usando o desenho composto central (ver capítulo 2.4.3.1), ensaiou-se igualmente a transesterificação enzimática com óleo de soja, utilizando a enzima *Lipozyme TL IM*.

As condições dos ensaios e respectivos resultados obtidos figuram no capítulo 3.4.3.

2.4.3.5 Produção de biodiesel a partir de óleo usado

Apenas foi sintetizado biodiesel por transesterificação enzimática recorrendo ao terceiro lote de óleos usados, proveniente da Cantina do INETI.

As condições dos ensaios e os respectivos valores obtidos na transesterificação figuram no capítulo 3.4.5.

2.4.3.6 Produção de biodiesel a partir de óleo de girassol

Embora não estivesse prevista a utilização de óleo de girassol, no presente estudo, este óleo foi utilizado, devido ao facto de terem ocorrido alguns problemas relativos à transesterificação com óleo de colza (ver capítulo 3.4.2). Assim, o óleo de girassol serviu para testar algumas hipóteses que se haviam colocado sobre a origem dos problemas que estavam a decorrer nos ensaios. O óleo de girassol utilizado foi um óleo refinado da marca alimentar “AAA girassol”.

Para além do uso da enzima imobilizada *Lipozyme TL IM*, foram igualmente realizados vários ensaios recorrendo à lipase solúvel *TL 100L*. As condições reaccionais escolhidas para os ensaios foram idênticas às do ponto médio do desenho composto central enzimático, tendo-se recolhido amostras ao fim de 15 horas de reacção. Nessas condições, foram realizados quatro ensaios com a lipase solúvel, em que a variável independente em estudo era o pH da solução

aquosa adicionada, mantendo-se constante todos os outros parâmetros. O objectivo era determinar se havia influências significativas do pH sobre a actividade enzimática de transesterificação. Um dos ensaios realizou-se com recurso a uma solução tamponizada de hidrogenoftalato de potássio, de pH=5. Tal solução substituíu a água a adicionar ao sistema, tendo sido obtida recorrendo à dissolução de hidrogenoftalato de potássio, acertando-se o pH, com recurso a pastilhas de NaOH. Outros dois ensaios, foram levados a cabo com a adição de água ultra-pura acertada a pH=6 e 7. Um último ensaio, foi realizado com água ultra-pura sem qualquer acerto de pH, portanto mantendo o seu pH original de 5,45.

Deverá ser referido que não foi registado o pH das soluções finais (sistema óleo/lipase/metanol/água), uma vez que as sondas de pH disponíveis não eram apropriadas para soluções orgânicas.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos nos vários ensaios realizados. Figuram os resultados quer ao nível da análise dos vários óleos, quer na quantificação da concentração proteica das enzimas estudadas, assim como da produção e posterior análise das várias amostras de biocombustível produzidas.

3.1 Caracterização dos óleos vegetais

Tal como foi mencionado no capítulo 2.1.1, os óleos utilizados nos vários ensaios foram óleos vegetais, agrupando-se em dois grupos: os óleos virgens (colza, soja e girassol) e os óleos alimentares usados (OAU), provenientes de frituras. Todos estes óleos, excepto o óleo de girassol, foram caracterizados de acordo com as metodologias referidas no capítulo 2.2.

Os parâmetros analisados são de extrema importância, uma vez que têm influência directa no processo de transesterificação e, conseqüentemente, na quantidade e qualidade do produto final, o biodiesel.

3.1.1 Caracterização do óleo de colza

O óleo de colza utilizado nos vários ensaios foi proveniente de dois lotes diferentes. O primeiro lote foi de Janeiro de 2006 e o segundo, de Março de 2007.

Em ambos os lotes, o óleo de colza possuía uma cor amarela palha e um cheiro intenso característico. Todavia, o primeiro lote apresentava um odor a ranço mais evidente.

As tabelas 22 e 23 são relativas aos parâmetros qualitativos dos dois lotes de óleo de colza.

Tabela 22 - Valores dos parâmetros de caracterização do óleo de colza, do 1º lote (lote de Janeiro de 2006) e do 2º lote (lote de Março de 2007).

Parâmetros	Unidades	Valor médio dos ensaios	
		Óleo de colza (1º lote)	Óleo de colza (2º lote)
Matéria em suspensão	mg/kg	144,8	126,1
Índice de acidez	mgKOH/g	2,27	3,62
Quantidade de água sem secagem	ppm	1048	105
Quant. após secagem com Na ₂ SO ₄ anidro		572	n.d.
Estabilidade à oxidação	h	10,81	12,10
Índice de peróxido	meq peróxido/kg	0,53	n.d.
Índice de Iodo	gI ₂ /100g	115	114
Fósforo	mg/kg	n.d	29
Índice de Saponificação	mg KOH/g	184	187,6
Peso molecular	g/mol	912,9	895,6
Teor em ésteres de ácidos gordos (derivatização)	% (m/m)	92,1	93,9
Massa volúmica a 15° C	kg/m ³	920,14	n.d.
Viscosidade	mm ² /s	34,03	n.d.

Tabela 23 - Composição, em percentagem, dos principais ácidos gordos do óleo de colza.

Ácido gordo	Óleo de colza (1º lote) % do ácido gordo	Óleo de colza (2º lote) % do ácido gordo
Mirístico (C_{14:0})	0,06	0,06
Palmitico (C_{16:0})	5,13	4,62
Palmitoléico (C_{16:1})	0,22	0,07
Estearico (C_{18:0})	1,71	1,84
Oleico (C_{18:1})	58,97	62,95
Linoleico (C_{18:2})	22,47	19,53
Linolénico (C_{18:3})	9,31	9,08
Araquidico (C_{20:0})	0,53	1,51
Eicosenóico (C_{20:1})	1,13	0,04
Behénico (C_{22:0})	0,31	0,30
Lignocerico (C_{24:0})	0,13	v.n.d
Nervónico (C_{24:1})	0,03	v.n.d

Da análise das tabelas 22 e 23 verifica-se que ambos os lotes são muito semelhantes nos vários parâmetros, havendo apenas uma diferença significativa no teor de água, sendo o segundo lote menos hidratado. A acidez no segundo lote é ligeiramente superior, traduzindo-se num teor de ácidos gordos livres um pouco mais elevado. Da composição dos óleos de colza analisados, em termos de ácidos gordos, pode-se ver que o óleo de colza é constituído na sua maioria, por ácido oleico e apresenta um teor em ácido linolénico que não compromete a utilização deste óleo para obtenção de um biodiesel de boa qualidade. Também o valor do índice de iodo se encontra dentro das especificações exigidas para biodiesel (< 120 gI₂/100g).

3.1.2 Caracterização do óleo de soja

O óleo de soja utilizado era um óleo alimentar refinado, da marca *Valouro*. Este óleo possuía uma cor amarela dourada, muito clara, e um aroma agradável.

A tabela 24 é referente à caracterização do óleo de soja, sendo notório que este apresentava valores do índice de acidez, de água e de matéria em suspensão muito reduzidos, o que era esperado visto ser um óleo refinado e para consumo. Em relação ao índice de saponificação, o valor obtido encontra-se dentro dos valores geralmente encontrados para este tipo de óleos. No entanto, em termos de índice de iodo, o óleo de soja apresenta um valor de 132 gI₂/100g o que indica que um biodiesel obtido a partir deste óleo não irá ter este parâmetro dentro das especificações da norma europeia (< 120), o que apenas será conseguido com mistura com biodiesel (ou óleo) de outra origem. Este valor para o índice de iodo deriva do facto do óleo de soja ter um elevado teor em ácido linoleico (tabela 25).

Tabela 24 - Valores dos parâmetros de caracterização do óleo refinado de soja “*Valouro*”.

Parâmetros	Unidades	Valor médio dos ensaios
Matéria em suspensão	mg/kg	0,34
Índice de acidez	mgKOH/g	0,75
Quantidade de água	ppm	278
Estabilidade à oxidação	h	6,92
Índice de Iodo	gI ₂ /100g	132
Índice de Saponificação	mg KOH/g	191,3
Peso molecular	g/mol	878,3

Tabela 25 - Composição, em percentagem, dos principais ácidos gordos do óleo de soja.

Ácido gordo	Óleo de soja <i>Valouro</i> % do ácido gordo
Mirístico (C _{14:0})	0,10
Palmítico (C _{16:0})	14,98
Palmitoléico (C _{16:1})	0,09
Estearico (C _{18:0})	5,34
Oleico (C _{18:1})	22,67
Linoleico (C _{18:2})	48,87
Linolénico (C _{18:3})	6,56
Araquídico (C _{20:0})	0,44
Eicosenóico (C _{20:1})	0,29
Behénico (C _{22:0})	0,48
Lignocerico (C _{24:0})	0,17

3.1.3 Caracterização dos óleos alimentares usados

Foram realizados vários ensaios com OAU, decorrentes de frituras. Os dois primeiros lotes de óleos usados resultaram de uma mistura prévia de vários outros óleos usados, que se encontravam disponíveis nos laboratórios da unidade de Biomassa, do DER, mas cuja proveniência e data se desconhece. O terceiro OAU foi proveniente da Cantina do INETI e data de Agosto de 2007. Todos os óleos tinham uma cor amarela/alaranjada, bastante intensa, e um forte aroma a óleo usado, com um claro odor a ranço. A tabela 26 é relativa aos parâmetros qualitativos dos três lotes de óleos alimentares usados, sendo notório que os dois primeiros lotes são bastante similares. O terceiro lote apesar de possuir valores análogos aos dois anteriores lotes, apresenta alguns parâmetros mais díspares, sobretudo ao nível da quantidade de matéria em suspensão, do teor em água e da estabilidade à oxidação. A alteração nestes parâmetros não é de estranhar atendendo a que provavelmente se tratavam de óleos que fritaram diferentes tipos de alimentos e que podem ter sido sujeitos a diferentes temperaturas e tempos de fritura. Comparativamente a óleos não sujeitos a frituras, como por exemplo o óleo de colza analisado neste trabalho (tabela 22), os OAU apresentam valores de viscosidade superiores e valores para a estabilidade à oxidação muito inferiores e que não vão

permitir obter um biodiesel dentro das especificações da norma europeia relativamente a este parâmetro (> 6h). Em termos de composição em ácidos gordos (tabela 27), os três óleos são muito semelhantes, sendo essencialmente constituídos por ácido linoleico (cerca de 53%) e por ácido oleico (cerca de 29%).

Tabela 26 - Valores dos parâmetros de caracterização dos OAU do 1º lote (Março de 2006), 2º lote (Março de 2006) e 3º lote (Agosto de 2007).

Parâmetros	Unidades	Valor médio dos ensaios dos óleos usados		
		1º lote	2º lote	3º lote
Matéria em suspensão	mg/kg	546,29	520,54	411,69
Índice de acidez	mgKOH/g	1,37	1,73	1,01
Quantidade de água	ppm	784	796	1267
Estabilidade à oxidação	h	2,40	1,19	5,68
Índice de Iodo	gI ₂ /100g	117	118	119
Índice de Saponificação	mg KOH/g	193	189,4	188,2
Peso molecular	g/mol	870,5	886,9	892,7
Teor em ésteres de áci. gordos (derivatização)	%	n.d	n.d.	87,8
Massa volúmica a 15° C	kg/m ³	929,7	n.d.	n.d
Viscosidade	mm ² /s	47,47	n.d.	n.d

Tabela 27 - Composição, em percentagem, dos principais ácidos gordos dos OAU.

Ácido gordo	OAU do 1º lote	OAU do 2º lote	OAU do 3º lote
	% do ácido gordo	% do ácido gordo	% do ácido gordo
Mirístico (C _{14:0})	0,14	0,14	0,15
Palmítico (C _{16:0})	10,06	10,24	10,22
Palmitoléico (C _{16:1})	0,12	0,08	0,12
Esteárico (C _{18:0})	3,96	3,93	3,96
Oleico (C _{18:1})	29,27	29,19	29,34
Linoleico (C _{18:2})	53,47	53,50	53,20
Linolénico (C _{18:3})	1,45	1,43	1,38
Araquídico (C _{20:0})	0,33	0,31	0,33
Eicosenóico (C _{20:1})	0,30	0,29	0,30
Behénico (C _{22:0})	0,64	0,59	0,65
Lignocérico (C _{24:0})	0,07	0,11	0,10
Nervónico (C _{24:1})	0,17	0,15	0,28

3.2 Transesterificação básica de diferentes óleos vegetais

Este trabalho visava a síntese de biodiesel por transesterificação química alcalina e por via enzimática, pretendendo a comparação entre ambas as vias. A matéria-prima utilizada na síntese de biodiesel por transesterificação básica, tal como já foi referido, incluiu o óleo de colza, o óleo de soja e óleos alimentares usados.

A caracterização dos vários parâmetros técnicos de qualidade de um biodiesel implica uma produção mínima de cerca de 0,5 litros em sistema descontínuo (“batch”). Todavia, nem todos

os metil-ésteres produzidos nos vários ensaios foram obtidos nestes quantitativos, pelo que a caracterização qualitativa mais detalhada apenas foi realizada em relação ao B100 de óleo de colza, do primeiro lote, e ao B100 do primeiro e segundo lote de OAU. O parâmetro fulcral que foi analisado em todas as amostras obtidas nos ensaios de transesterificação, foi o rendimento em metil-ésteres, dado que segundo a norma EN 14214, um biodiesel de qualidade tem de ter um teor em ésteres superior a 96,5%.

3.2.1 Transesterificação do óleo de colza

O biodiesel de colza obtido por transesterificação química alcalina derivou do óleo de colza do primeiro lote, cuja caracterização figura na tabela 22. As condições reaccionais que permitiram a sua produção estão descritas no capítulo 2.4.1.1.1, figurando os resultados obtidos na tabela 28. A separação de fases no reactor foi bastante rápida, permanecendo a fase dos ésteres (biocombustível) como sobrenadante, enquanto que o glicerol, mais denso, ocupava o nível inferior (figura 6). O biodiesel obtido apresentava uma coloração amarela clara, ligeiramente opaca, logo após a sua síntese e separação. Porém, após a secagem, em rotavapor, adquiriu uma coloração amarela clara translúcida e um agradável aroma, bastante diferente do óleo original. O glicerol obtido apresentava um aspecto viscoso e uma coloração acastanhada opaca. Em termos volumétricos, o glicerol, representou 20 a 25 %, relativamente ao volume total obtido no processo (biodiesel e glicerol), correspondendo em termos mássicos a cerca de 25 a 28 % do total.



Figura 6 - Reactor com biodiesel de colza (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior)

Tabela 28 - Valores dos parâmetros de caracterização do B100 de colza, proveniente do 1º lote (Janeiro de 2006).

Parâmetros	Unidades	Valor médio
Matéria em suspensão	mg/kg	12,22
Índice de acidez	mgKOH/g	0,08
Quantidade de água:		
- sem secagem	ppm	1493
- após 1ª secagem no rotavapor (40°C, 45 min)		855
- após nova secagem no rotavapor (55°C, 40 min)		211
Estabilidade à oxidação	h	6,82
Índice de Iodo	gI ₂ /100g	110
Índice de Saponificação	mg KOH/g	189
Peso molecular	g/mol	887
Metil ésteres:		
- 1h	% (m/m)	95,6
- 2h (tempo de reacção de transesterificação)		98,4
- 3h		98,6
- 4h		94,5

Como se pode constatar da análise da tabela 28, o biodiesel de colza difere bastante do óleo que lhe deu origem (tabela 22), sobretudo ao nível da quantidade de matéria em suspensão, do índice de acidez e da estabilidade à oxidação. Nos dois primeiros parâmetros, a descida é bastante acentuada e revela uma melhoria em relação à matéria-prima, resultado quer do processo reaccional quer de purificação, permitindo obter um biodiesel dentro dos requisitos da norma europeia no que respeita a estes parâmetros, o que também é conseguido em relação ao teor em água (< 500 ppm) . Todavia, assiste-se a uma descida na estabilidade à oxidação sem, contudo, comprometer a exigência da EN14214. Ao nível da transesterificação, ao fim de 2 horas de reacção, alcançou-se um teor de metil-ésteres que supera o teor mínimo exigido pela EN 14214.

3.2.2 Transesterificação do óleo de Soja

O biodiesel de soja, produzido por via alcalina, apenas foi avaliado em termos de rendimento de transesterificação, não tendo sido efectuadas mais caracterizações suplementares. O biodiesel produzido seguiu as condições reaccionais descritas no capítulo 2.4.1.2. A separação de fases, mais uma vez, foi rápida, ficando os metil-ésteres como sobrenadante, em relação ao glicerol (figura 7).

Em termos de aspecto, este biodiesel apresentava uma suave coloração amarela clara, translúcida, após secagem, e um agradável aroma. Em relação ao volume, o biodiesel correspondia a cerca de 78 % do volume total de produto final (biodiesel e glicerol), representando o glicerol os restantes 22 % do volume.

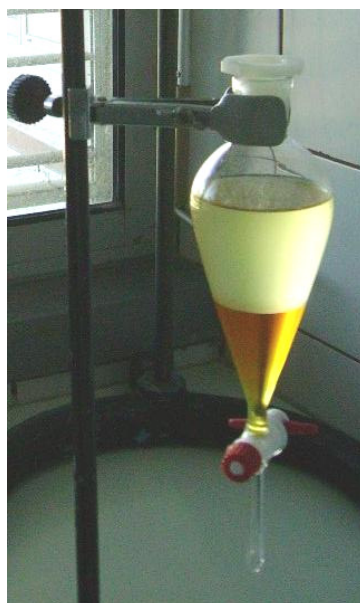


Figura 7 - Ampola de decantação com biodiesel de soja (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior)

A tabela 29 refere-se aos resultados obtidos na transesterificação do óleo de soja, nas condições tidas como optimizadas, sendo observável que o melhor resultado foi obtido ao fim de três horas de reacção. No entanto, nas condições experimentais utilizadas (razão molar metanol:óleo de 5,5:1 e 1,06% de catalisador), o teor mais elevado obtido (94%) fica aquém do que seria expectável para um óleo virgem e é igualmente inferior ao teor mínimo exigido pela EN 14214. Todavia, salienta-se que a razão metanol:óleo utilizada foi ligeiramente menor do que era suposto utilizar-se (6:1), considerada como optimizada.

Tabela 29 - Transesterificação química de óleo de soja (*Valouro*).

Parâmetros	Tempo de reacção(h)	% de metil-ésteres obtidos
Temperatura: 54,5°C Óleo soja: 50,01g Metanol: 10,93 g NaOH: 0,53 g	1	90,2
	2	90,3
	3	94,0
	4	91,8

3.2.3 Transesterificação de óleos usados

Realizaram-se vários ensaios de transesterificação alcalina com três diferentes lotes de OAU. A caracterização desses mesmos lotes figura na tabela 26, encontrando-se descritas no capítulo 2.4.1.3. as condições reaccionais que permitiram a obtenção dos vários metil-ésteres, tendo sido essas mesmas condições, idênticas nos três lotes.

Os dois primeiros lotes de OAU foram transesterificados em reactores (figura 8), enquanto que a reacção de transesterificação do terceiro lote ocorreu, em erlenmyer, numa incubadora. Após a reacção de transesterificação, em todos os casos, a separação de fases foi relativamente rápida (figura 9). Em termos de aspecto e características físicas visíveis, os três tipos de biodiesel obtidos eram muito semelhantes, apresentando uma coloração amarela intensa, ligeiramente opaca, antes de ser desumidificados com sulfato de sódio anidro, mas com um aspecto translúcido quando desumidificados.



Figura 8 - Reactor com biodiesel de OAU (1º lote) (fase superior) e o respectivo glicerol (fase inferior)

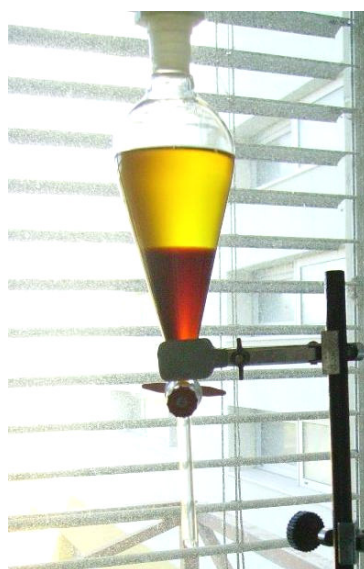


Figura 9 - Ampola de decantação com B100 do OAU do 2º lote e o respectivo glicerol (fase inferior)

Em termos volumétricos, o biodiesel correspondia a cerca de 75 % do volume total do produto final (biocombustível e glicerol). Em relação a características organolépticas, o biodiesel de OAU apresentava um odor característico, embora ligeiramente diferente do óleo que lhe dera origem, e diferente de um biodiesel proveniente de óleo virgem. O glicerol obtido, como subproduto, apresentava uma coloração castanha/laranja, intensa e escura, e um odor pronunciado, com um travo a ranço. A tabela 30 refere-se aos resultados obtidos na transesterificação dos vários OAUs, nas condições tidas como optimizadas.

Tabela 30 - Valores dos parâmetros de caracterização do biodiesel de óleos usados do 1º lote (Março de 2006), 2º lote (Março de 2006) e 3º lote (Agosto de 2007).

Parâmetros	Unidades	Valor médio dos ensaios do B100 dos OAU		
		1º lote	2º lote	3º lote
Matéria em suspensão	mg/kg	43,7	42,9	40,2
Índice de acidez	mgKOH/g	0,086	0,11	n.d.
Quantidade de água sem secagem	ppm	2591	2603	1267
Estabilidade à oxidação	h	2,40	1,36	3,55
Índice de Iodo	gI ₂ /100g	121,5	119,9	n.d.
Massa volúmica a 15° C	kg/m ³	888,2	n.d.	n.d.
Viscosidade	mm ² /s	4,135	n.d.	n.d.
Metil ésteres:				
- 1h	% (m/m)	93,1	92,9	87,1
- 2h		94,4	93,4	85,8
- 3h		94,1	94,3	87,5
- 4h		94,4	92,9	86,5

Da análise da tabela 30 verifica-se que as características do combustível obtido diferem substancialmente do óleo que lhe deu origem. As maiores diferenças verificam-se em relação à matéria em suspensão, ao índice de acidez e à viscosidade, que no biodiesel obtido é significativamente menor comparativamente ao óleo que serviu de matéria-prima, e que se encontram dentro das especificações da norma europeia. Em relação ao teor em ésteres, os valores obtidos são inferiores a 96,5%, o que para óleos usados de fritura não é de todo de estranhar, dada a elevada probabilidade de existirem outras substâncias presentes que não são passíveis de ser transesterificadas.

Deve ser mencionado que todos os óleos, antes de se proceder à sua transesterificação, eram sujeitos a um processo de filtração e secagem. Por lapso, em relação ao óleo usado do 3º lote (Cantina do INETI), no primeiro ensaio não se procedeu a este processo prévio de preparação do óleo, constando os resultados obtidos na tabela 31. Posteriormente repetiu-se o ensaio procedendo à usual filtração e desumidificação, figurando os resultados na tabela 30 (B100 de óleo usado (3º lote)).

Tabela 31 - Transesterificação química de óleo usado do 3º lote (Cantina do INETI).

Parâmetros	Tempo de reacção (h)	% de metil-ésteres
Temperatura: 55°C Óleo usado: 50g Metanol: 10,75 g NaOH: 0,63 g	1	86,9
	2	87,7
	3	86,2
	4	86,4

Observação: o óleo usado não foi sujeito a qualquer processo de filtração e secagem.

Da análise dos resultados da tabela 30 e da tabela 31, relativamente ao OAU do 3º lote, verifica-se que, neste caso, o tratamento preliminar de filtração e secagem que antecedeu a reacção de transesterificação não condicionou significativamente os resultados da catálise. Tal, é justificado uma vez que, quer o teor em água, quer a matéria em suspensão no óleo, não apresentavam valores muito elevados.

3.3 Desenho composto central (a 3 variáveis) para optimização das condições de secagem do biodiesel

Tal como já foi referido no capítulo 2.4.2, procedeu-se à construção de um desenho composto central para a optimização do processo de secagem, do biocombustível, em rotavapor. Esse desenho composto central conjugava o efeito de três variáveis independentes, a temperatura, a pressão e o tempo, tendo-se avaliado a sua influência, quer no teor em água, quer na estabilidade à oxidação do biodiesel, obtido a partir do óleo alimentar usado do primeiro lote. O teor inicial de água presente no biodiesel, logo após as lavagens e antes de qualquer processo de secagem, foi de 2591 ppm. A tabela 32 apresenta as condições de secagem em rotavapor e as respectivas percentagens de água retirada. O biodiesel após secagem apresentava-se translúcido (figura 10).

Tabela 32 - Valores dos teores em água e correspondente percentagem de água retirada, em cada ensaio, comparando com o valor inicial de 2591 ppm.

Sequência	Variáveis independentes			Variável dependente	% de água retirada
	T (°C)	P (mbar)	t (min)	Teor em água (ppm)	
1	46	117	20	1061,8	59,0
2	64	117	20	605,6	76,6
3	46	253	20	2081,1	19,7
4	64	253	20	2230,3	13,9
5	46	117	50	830,8	67,9
6	64	117	50	491,6	81,0
7	46	253	50	1243,9	52,0
8	64	253	50	1702,2	34,3
pont.médio	55	185	35	1439,4	44,4

Tabela 32 – (continuação)

Sequência	Variáveis independentes			Variável dependente	% de água retirada
	T (°C)	P (mbar)	t (min)	Teor em água (ppm)	
pont.médio	55	185	35	1440,6	44,4
pont.médio	55	185	35	1496,8	42,2
9	40	185	35	1358,8	47,6
10	70	185	35	1470,5	43,2
11	55	70	35	424,7	83,6
12	55	300	35	2192,9	15,4
13	55	185	10	1931,9	25,4
14	55	185	60	1513,2	41,6

Face aos resultados obtidos, é possível concluir que existe uma efectiva interacção entre os três factores em estudo, variando a eficácia na secagem entre os 13,9 % e os 83,6 %. A melhor condição reaccional, em termos de secagem, foi a que decorreu durante 35 minutos, à temperatura de 55°C e a uma pressão de 70 mbar (0,07 atm). Em termos genéricos, pode-se afirmar que com o aumento da temperatura, assim como com o aumento do tempo de reacção, a eficiência na secagem aumenta. Em termos de pressão do sistema, quanto menor a pressão, maior a eficiência na secagem. Todavia, o desenho composto central construído permitiu uma análise muito mais detalhada e profunda de cada parâmetro e da interacção entre eles. As respostas obtidas foram analisadas segundo o algoritmo de *Yates*, de modo a determinar a relevância de cada factor e as suas interacções. Como se pode analisar da tabela 33, com base nos valores do algoritmo obtidos, o parâmetro com maior relevância na secagem do biodiesel foi a pressão, seguindo-se o tempo e depois a temperatura. Em termos de interacção entre dois factores em simultâneo, o binómio temperatura/pressão foi o que se mostrou mais relevante, seguido do binómio pressão/tempo e por último o binómio temperatura/tempo.

Tabela 33 - Respostas segundo o algoritmo de *Yates*, para a secagem do biodiesel.

Efeito (parâmetros)	Valor obtido pelo Algoritmo de <i>Yates</i>
Pressão	[1066,978]
Tempo	[-427,538]
Temperatura	[-46,9925]
Interacção temperatura/pressão	[350,7175]
Interacção pressão/tempo	[-255,078]
Interacção temperatura/tempo	[106,5325]
Interacção temperatura/pressão/tempo	[48,0425]

O desenho composto central apresentou um coeficiente de determinação (R^2) que correspondeu a 0,965, revelando uma boa correlação entre os dados. Quanto mais próximo o coeficiente estiver do valor 1, melhor será a representatividade. Com base nos coeficientes polinomiais obtidos por regressão múltipla linear, obteve-se a seguinte equação: Teor em água (ppm) = 500,59 + 18,84T + 4,17P - 25,27t - 0,78T² - 0,02P² + 0,21t² + 0,39Tt + 0,29tP - 0,13Pt

onde “T” representa a temperatura, “P” a pressão e “t” o tempo. Com base nesta equação, construíram-se várias tabelas (tabelas 34, 35 e 36) representativas do efeito conjugado dos vários factores, na quantidade de água esperada no final do processo de secagem, atendendo a que a quantidade inicial era de 2591 ppm. Os valores escolhidos como constantes correspondem, em todos os casos, ao valor do ponto médio do desenho composto central.



Figura 10 - Biodiesel de óleo alimentar usado (1º lote) - “seco” (à esquerda) e “sem secagem” (à direita)

Tabela 34 – Efeito conjugado da temperatura e da pressão, ao fim de 35 minutos, sobre a quantidade de água esperada na amostra de biodiesel.

Temperatura (°C)	Pressão (mbar)								
	70	100	130	160	190	220	250	280	300
40	620,7	851,2	1043,8	1198,7	1315,7	1395,0	1436,5	1440,1	1421,6
45	553,3	826,7	1062,3	1260,1	1420,2	1542,4	1626,9	1673,5	1683,6
50	446,9	763,3	1041,9	1282,7	1485,7	1650,9	1778,3	1868,0	1906,7
55	301,5	660,9	982,5	1266,3	1512,3	1720,4	1890,8	2023,5	2090,9
60	117,2	519,6	884,1	1210,9	1499,9	1751,0	1964,4	2140,0	2236,1
65	0	339,3	746,8	1116,6	1448,5	1742,7	1999,1	2217,6	2342,3
70	0	120,1	983,3	983,3	1358,3	1695,4	1994,8	2256,3	2409,7

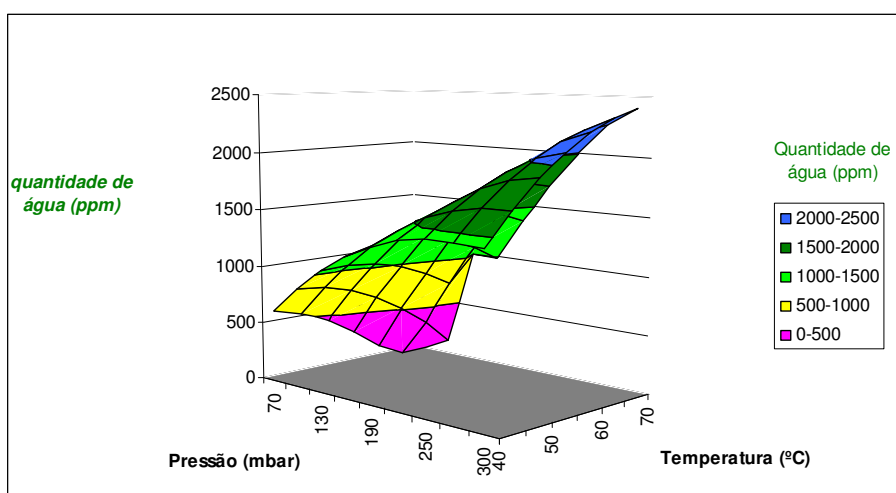


Figura 11- Efeito conjugado da pressão e da temperatura na quantidade de água esperada na amostra de biodiesel, após 35 minutos de secagem no rotavapor

A figura 11 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 34, relativos ao efeito conjugado da pressão e da temperatura na quantidade de água esperada no biodiesel. Da sua análise constata-se que para um tempo de secagem de 35 minutos, quanto menor a pressão do sistema, menores seriam as quantidades de água remanescentes. O aumento de pressão diminui a eficiência de secagem. A baixas pressões, o aumento da temperatura permite uma secagem mais eficaz, enquanto que a pressões mais elevadas (>160 mbar) parece ter um efeito menos efectivo. Todavia, há alguns pontos em que tal não se verifica, mas a tendência do sistema parece ser esta. É necessário referir, mais uma vez, que os valores que figuram nas tabelas representam a quantidade de água remanescente, expectável, da secagem do biodiesel, que inicialmente apresentava um teor de água de 2591 ppm. Os valores assinalados com a cor azul indicam as condições que permitiriam obter um biocombustível aceitável em termos de teor de água (<500 ppm), segundo a norma EN 14214, atendendo a que inicialmente o valor era de 2591 ppm. É necessário referir que o quantitativo de água, na tabela, nas condições de 65°C e 70°C, à pressão de 70 mbar, aparece como zero (a vermelho) pois o desenho composto central indicava valores negativos e tal não seria possível.

Tabela 35 – Efeito conjugado da temperatura e do factor tempo, à pressão constante de 185 mbar, sobre a quantidade de água esperada na amostra de biodiesel.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)					
	10	20	30	40	50	60
40	2330,3	2094,9	1885,0	1700,9	1542,4	1409,5
45	2123,0	1912,5	1727,7	1568,4	1434,9	1327,0
50	1957,4	1771,8	1611,9	1477,6	1369,0	1286,1
55	1833,3	1672,7	1537,7	1428,4	1344,8	1286,8
60	1750,9	1615,2	1505,2	1420,8	1362,1	1329,1
65	1710,0	1599,3	1514,3	1454,9	1421,1	1413,0
70	1710,8	1625,1	1565,0	1530,5	1521,8	1538,6

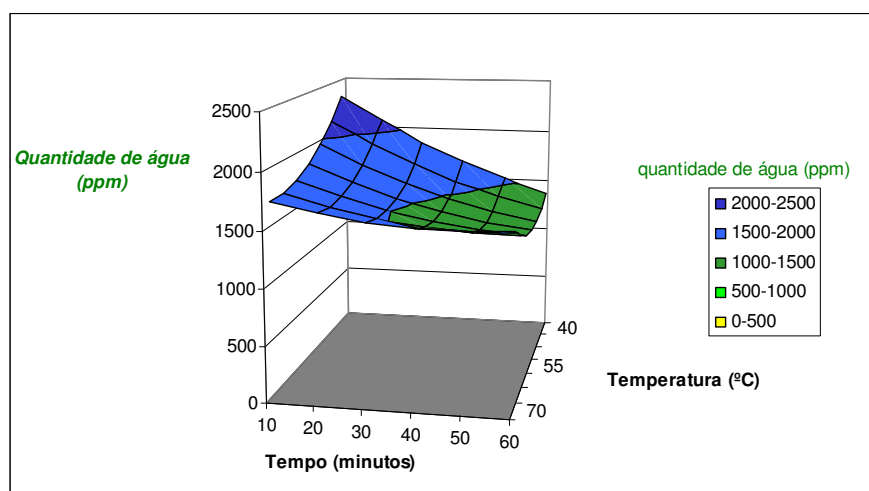


Figura 12 - Efeito conjugado da temperatura e do factor tempo, na quantidade de água esperada, à pressão constante de 185 mbar, no rotavapor

A figura 12 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 35, relativos ao efeito conjugado da temperatura e do factor tempo, na quantidade de água esperada, à pressão constante de 185 mbar, no rotavapor. Da análise verifica-se, antes de mais, que tais condições do sistema (pressão a 185 mbar) não permitem uma secagem suficiente do biocombustível de forma a enquadrar-se na norma EN 14214.

Verifica-se que para tempos de reacção abaixo dos 30 minutos, o aumento da temperatura tem um efeito positivo na eficiência da secagem. Verifica-se, igualmente, que o aumento do tempo de exposição às condições reaccionais permite uma diminuição do teor de água, independentemente da temperatura do sistema. Todavia, a partir dos 30 minutos e acima dos 55°C, a tendência parece inverter-se diminuindo a eficácia de secagem.

Tabela 36 – Efeito conjugado da pressão e do factor tempo, à temperatura constante de 55°C, sobre a quantidade de água esperada.

Tempo (minutos)	Pressão (mbar)								
	70	100	130	160	190	220	250	280	300
10	224,1	712,8	1152,8	1544,2	1887,1	2181,3	2427,0	2624,0	2728,4
20	219,7	667,6	1066,9	1417,6	1719,7	1973,2	2178,1	2334,4	2411,6
30	241,0	648,1	1006,6	1316,6	1577,9	1790,7	1954,8	2070,4	2120,5
40	287,8	654,2	972,0	1241,2	1461,8	1633,8	1757,3	1832,1	1855,0
50	360,4	686,0	963,1	1191,5	1371,4	1502,6	1585,3	1619,4	1615,1
60	458,6	743,5	979,8	1167,5	1306,6	1397,1	1439,0	1432,4	1400,9

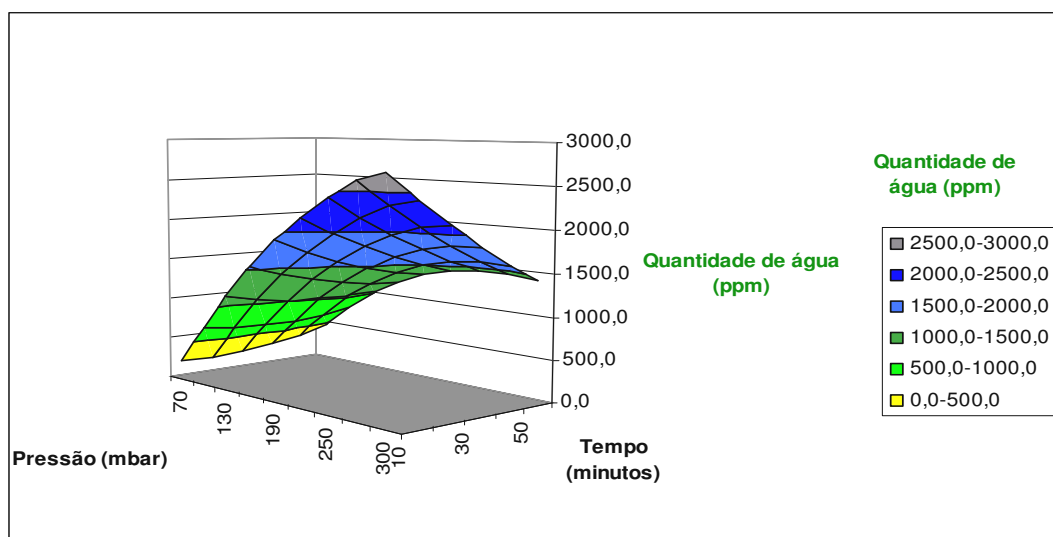


Figura 13 – Efeito conjugado da pressão e do factor tempo de secagem, sobre a quantidade de água esperada, à temperatura constante de 55°C, no rotavapor

A figura 13 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 36, relativos ao efeito conjugado da pressão e do factor tempo de secagem, sobre a quantidade de água esperada, à temperatura constante de 55°C, no rotavapor. Da análise verifica-se que com o aumento da pressão, o sistema responde com uma diminuição na eficiência de secagem. Com

o aumento do tempo, assiste-se basicamente a uma diminuição dos quantitativos de água, excepto para valores muito baixos de pressão (<100 mbar) em que parece ter um efeito inverso. A uma pressão de 70 mbar e a uma temperatura de 55°C, o mais curto espaço de tempo de exposição é o mais aconselhável, sendo que todos os valores da coluna dos 70 mbar se encontram abaixo do máximo admitido na norma EN 14214, respeitante à quantidade de água num biodiesel.

3.3.1 Relação entre as condições de secagem e a estabilidade à oxidação

Após a realização dos ensaios e a determinação da quantidade de água presente em cada amostra, determinou-se igualmente a estabilidade à oxidação, a fim de se analisar as possíveis implicações que o processo de secagem pudesse ter na estabilidade à oxidação do biodiesel (tabela 37). Tal como já foi referido, o biodiesel que serviu de base para este estudo foi o obtido a partir do primeiro lote de OAU. O teor médio de água que o biodiesel apresentava, logo após a lavagem, era de 2591 ppm, apresentando uma estabilidade à oxidação de 2,4 horas.

Tabela 37 - Valores dos teores em água e da estabilidade à oxidação de cada sequência, definida em desenho composto central.

Sequência	Variáveis independentes			Variáveis dependentes	
	T (°C)	P (mbar)	t (min)	Teor em água (ppm)	Est. à oxidação (h)
1	46	117	20	1061,8	2,33
2	64	117	20	605,6	2,48
3	46	253	20	2081,1	2,38
4	64	253	20	2230,3	2,49
5	46	117	50	830,8	2,44
6	64	117	50	491,6	2,35
7	46	253	50	1243,9	2,53
8	64	253	50	1702,2	2,19
Ponto médio1	55	185	35	1439,4	2,38
Ponto médio2	55	185	35	1440,6	2,38
Ponto médio3	55	185	35	1496,8	2,38
9	40	185	35	1358,8	2,33
10	70	185	35	1470,5	2,29
11	55	70	35	424,7	2,28
12	55	300	35	2192,9	2,27
13	55	185	10	1931,9	2,26
14	55	185	60	1513,2	2,25

Em termos de estabilidade à oxidação, os vários ensaios não se mostraram significativamente diferentes, apresentando apenas pequenas diferenças em relação ao valor inicial da estabilidade, que era de 2,4 horas. Aparentemente, o processo de secagem, em rotavapor, não influencia a estabilidade à oxidação do biocombustível. Deve-se salientar, no entanto, que a estabilidade à oxidação apresentada é muito inferior à que é minimamente aceitável num biodiesel, segundo a norma EN 14214, que corresponde a 6 horas. Salienta-se, igualmente, que o biodiesel estudado, em termos de estabilidade oxidativa, era de um OAU, que pela sua própria natureza apresenta, já por si, valores de estabilidade muito baixos.

3.4 Transesterificação enzimática de óleos vegetais

Figuram neste capítulo os resultados da análise do teor proteico/enzimático de cada lipase, assim como os resultados dos diversos ensaios de transesterificação enzimática dos vários óleos vegetais.

3.4.1 Escolha da enzima

Tal como foi indicado no capítulo 2.3, procedeu-se à determinação do teor enzimático em relação às lipases disponíveis.

A determinação do teor enzimático, calculada a partir da determinação proteica, fez-se segundo a metodologia de *Lowry*, com recurso à densidade óptica determinada por espectrofotometria.

Construiu-se uma recta de calibração (figura 14), recorrendo a uma solução-padrão de albumina de soro bovino.

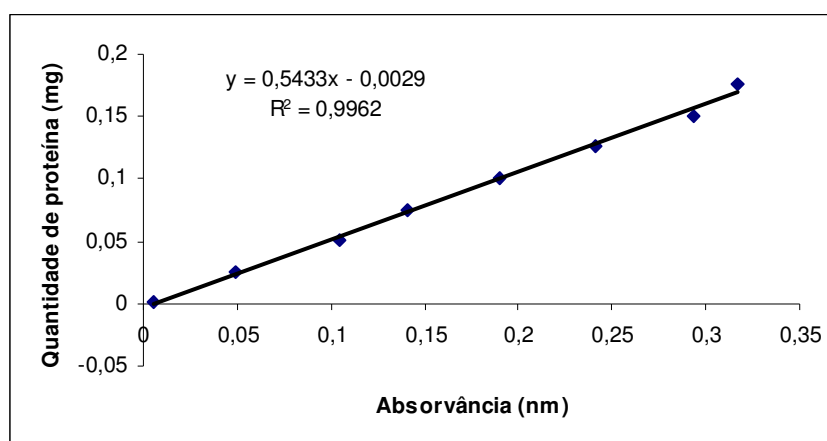


Figura 14 - Recta de calibração da solução padrão de albumina de soro de boi

A recta de calibração obtida apresentou um óptimo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9962$), muito perto de 1, o que demonstra uma reduzida dispersão dos dados experimentais em torno

da recta. A partir da equação da recta de calibração e sabendo os valores de absorvância obtidos para cada enzima testada, determinou-se a concentração enzimática de cada amostra (tabela 38).

Tabela 38 - Enzimas e respectivas concentrações.

Enzimas	Enzimas imobilizadas	Teor proteico/enzimático (mg/mg suporte)
	<i>Lipozyme RM IM</i>	
<i>Novozym 435</i>		0,0578
<i>Lipozyme TL IM</i>		0,0982
	Enzima Solúvel	Teor proteico/enzimático (mg/ml solução)
	<i>Lipozyme TL 100L</i>	22,47

Ao determinar-se a concentração de todas as enzimas disponíveis para os ensaios, tornou-se possível proceder aos ensaios comparativos, em termos de rendimento de transesterificação. Deste modo, testaram-se as várias enzimas usando as condições reaccionais do ponto médio, definidas em desenho composto central (ver capítulo 2.4.3.2), que corresponderam a um ensaio com 50 g de óleo (colza), a uma temperatura de 37,5°C, com uma quantidade enzimática pura de 70 mg, uma razão molar metanol:óleo de 5:1 e uma quantidade de água de 6 g (12% m/m). Os resultados obtidos figuram na tabela 39 e na figura 15.

Tabela 39 – Percentagem de transesterificação obtida ao longo do tempo, usando as várias enzimas, nas condições definidas no ponto médio do desenho composto central.

Enzima	% de Transesterificação					
	1 h	3 h	5 h	7 h	21 h	24 h
<i>Lipozyme TL 100L</i>	66,7	85,1	98,5	95,5	98,8	95,9
<i>Novozym 435</i>	n.d	n.d	n.d	3,85	3,97	3,79
<i>Lipozyme TL IM</i>	51,8	60,5	88,1	91,5	98,0	94,5
<i>Lipozyme RM IM</i>	n.d	0,37	0,34	0,37	0,48	0,52

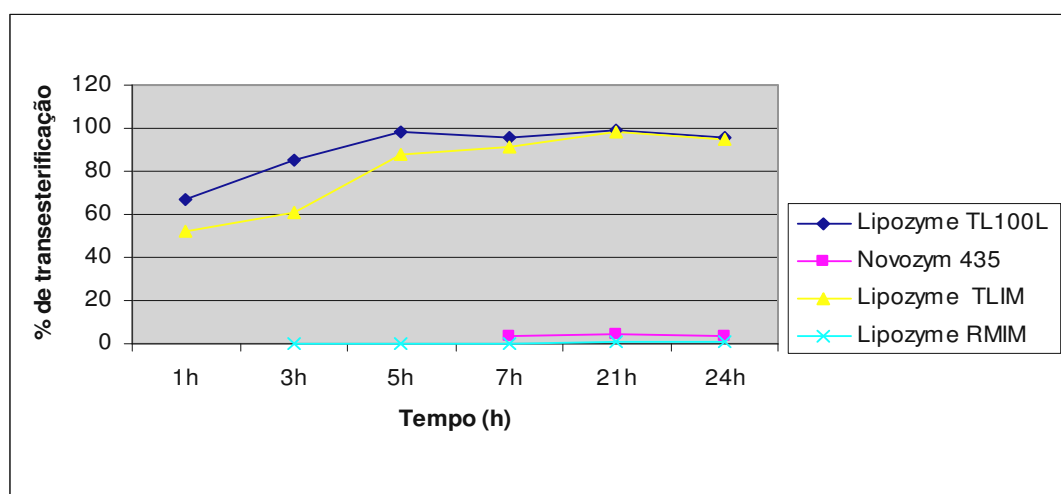


Figura 15 – Percentagem de transesterificação obtida ao longo do tempo, usando as várias enzimas, nas condições do ponto médio (T =37,5 °C; L= 70 mg; A= 6 g; R= 5:1)

De acordo com estes resultados, apenas duas lipases apresentaram valores de transesterificação próximas do valor mínimo admitido num biodiesel, segundo a EN 14214 (96,5%). Deste modo, apenas se mostrava com relevante interesse a enzima imobilizada *Lipozyme TL IM* e a enzima solúvel *Lipozyme TL 100L*.

Como os ensaios de transesterificação enzimática visavam a optimização do processo, tornava-se imperioso que a enzima usada pudesse ser reutilizada, pois esse é um dos aspectos que viabiliza o processo a nível industrial. Das duas enzimas cujos rendimentos foram aceitáveis, apenas a enzima *Lipozyme TL IM* podia ser reutilizada uma vez que se apresentava na forma imobilizada. A *Lipozyme TL 100L* apenas poderia ser encarada como aceitável nos ensaios, caso fosse imobilizada, o que não se propunha no presente trabalho.

Ambas as lipases apresentam rendimentos muito semelhantes e provêm do mesmo organismo, o fungo *Thermomyces lanuginosus*, daí a designação “TL”. Deste modo, optou-se por se realizarem todos os ensaios experimentais relativos à transesterificação enzimática recorrendo à lipase imobilizada *Lipozyme TL IM*.

3.4.2 Desenho composto central (a 4 variáveis) para produção de biodiesel por via enzimática

Como já foi referido no capítulo 2.4.3.1, construiu-se um desenho composto central para optimização do processo de transesterificação enzimática, conjugando o efeito de quatro variáveis independentes: temperatura, quantidade de água, quantidade de proteína e razão metanol:óleo.

Os ensaios para o desenho composto central foram realizados usando óleo de colza e a lipase *Lipozyme TL IM*. O tempo reaccional nos vários ensaios foi de 15 horas, sendo que a quantidade de óleo em cada ensaio foi sempre de 50 g.

Deve ser mencionado que inicialmente o desenho composto central foi elaborado usando o óleo do primeiro lote. Todavia, esse mesmo óleo foi totalmente consumido nestes ensaios, tendo alguns ensaios posteriores de repetição sido realizados com o óleo do segundo lote. Salienta-se que, tal como se pode constatar no capítulo 3.1.1, as diferenças qualitativas entre ambos os óleos não eram significativas, pelo que se considerou que não haveria problema na utilização do novo lote.

Na tabela 40 encontram-se os valores percentuais obtidos de metil-ésteres de colza, em função das condições reaccionais definidas em desenho composto central, onde a variável “T” corresponde à temperatura, “L” a quantidade de proteína (lipase), “M” a quantidade de metanol e “A” a quantidade de água.

Tabela 40 - Valores relativos à percentagem de metil-ésteres de colza, em função das condições reaccionais definidas em desenho composto central.

Ensaio	Variáveis independentes				Variável dependente % de ésteres	Valor teórico esperado % de ésteres
	T°C	L (mg)	M (g)	A (g)		
1	33	50,19	7,01	3	71,8	78,1
2	44	50,04	7,01	3	53,4	40,3
3	33	90,15	7,11	3	75,2	72,4
4	44	90,09	7,06	3	5,0	16,1
5	33	50,08	10,51	3	40,0	49,0
6	44	49,99	10,55	3	29,0	23,2
7	33	90,03	10,53	3	43,0	52,8
8	44	90,02	10,54	3	21,2	8,82
9	33	50,44	7,05	9	80,1	87,8
10	44	50,05	7,01	9	88,2	83,6
11	33	90,22	7,02	9	86,7	97,0
12	44	89,98	7,02	9	87,8	74,4
13	33	50,35	10,55	9	92,6	86,0
14	44	49,99	10,54	9	96,0	94,5
15	33	89,99	10,5	9	96,1	100,0
16	44	90,16	10,5	9	97,0	95,0
1'	25	70,11	8,77	6	95,0	80,8
2'	48	70,01	8,82	6	20,75	48,7
3'	38	30,14	8,78	6	89,2	93,6
4'	38	110,20	8,76	6	95,0	90,1
5'	38	70,08	5,3	6	74,0	73,6
6'	38	70,27	12,27	6	63,5	63,7
7'	38	70,08	8,78	0	0,28	0
8'	38	70,12	8,77	12	91,5	91,9
pm	38	70,20	8,77	6	94,3	87,9
pm	38	70,19	8,78	6	91,3	87,9
pm	38	70,07	8,76	6	93,0	87,9

É necessário referir que na tabela 40, os valores de temperatura de 33 e 38°C, indicados, no desenho composto central correspondiam, respectivamente, a 31 e 37,5°C. Deve ser mencionado que o valor ilustrado na tabela 40, relativamente à quantidade de proteína, corresponde à quantidade de lipase pura. Em termos de lipase imobilizada (enzima + suporte), em cada ensaio, os valores adicionados foram sensivelmente 10 vezes superiores, uma vez que a concentração enzimática era de 0,0982 mg/mg suporte. Nesta tabela, que ilustra a percentagem efectiva de metil-ésteres obtidos nos vários ensaios e os valores teóricos expectáveis em função do desenho composto central, pode constatar-se que existe uma elevada correlação e representatividade, sendo que em 74% dos valores a correlação entre os dados é da mesma ordem de grandeza e apenas diferem entre eles (real e teórico) em menos de 10%. O próprio coeficiente de determinação ($R^2 = 0,908$) foi relativamente elevado. Os resultados obtidos permitem concluir que existe uma efectiva interacção entre os parâmetros

em estudo (variáveis independentes), tendo o rendimento de transesterificação variado entre 0,28 e 97%. A melhor condição reaccional, em termos de resultados experimentais obtidos, foi a que decorreu a uma temperatura de 44°C, usando cerca de 90 mg de proteína, 10,5 g de metanol e 9 g de água destilada, obtendo-se um rendimento em metil ésteres de 97%, valor muito próximo do teoricamente previsto (95%). Todavia, com as condições reaccionais de temperatura de 33°C, 90 mg de proteína, 10,5 g de metanol e 9 g de água destilada, obteve-se um rendimento de 96%, sendo expectável, contudo, um valor um pouco superior (100%). De referir que, nestas condições, no ensaio “15”, da tabela 40, está indicado o valor de 100, uma vez que no desenho composto central surgia um valor (105,3%) superior a um rendimento de 100%, o que não seria possível. No ponto (7^o), o problema colocou-se ao contrário, ao apresentar um valor negativo (-0,7%), optando-se por assumir-se o valor 0%. Em termos genéricos pode afirmar-se que com o aumento da temperatura, mantendo a quantidade de água no sistema com valores baixos, os rendimentos de transesterificação diminuem. Todavia, com teores elevados de água no sistema, a temperatura não parece ter muito efeito. Teores significativos de água no sistema induzem a um aumento da percentagem de transesterificação. Contudo, um aumento da quantidade de metanol induz a uma redução nos teores de metil-ésteres. Variando apenas a quantidade de enzima, as diferenças nas percentagens de transesterificação não são significativas. Todavia, o desenho composto central construído permite uma análise muito mais detalhada e profunda de cada parâmetro e da interacção entre eles. As respostas obtidas foram analisadas segundo o algoritmo de *Yates* e tal como se pode analisar na tabela 41, o parâmetro com maior relevância correspondeu à quantidade de água, seguido da temperatura, da quantidade de proteína e por último da razão molar metanol:óleo. Em termos de interacção entre dois factores, o binómio temperatura/água foi o que se mostrou mais relevante, seguido do binómio metanol/água, do binómio temperatura/proteína, do binómio proteína/água, do binómio temperatura/razão molar (metanol/óleo) e, por último, do binómio proteína/razão molar (metanol/óleo).

Tabela 41 - Respostas segundo o Algoritmo de *Yates*, para a transesterificação enzimática.

Efeito (parâmetros)	Valor obtido pelo Algoritmo de <i>Yates</i>
Água	[48,2375]
Temperatura	[-13,4875]
Proteína (lipase)	[-4,8875]
Razão molar metanol/óleo	[-4,1625]
Interacção temperatura/água	[16,8625]
Interacção razão molar/água	[13,8875]
Interacção temperatura/proteína	[-9,0125]
Interacção proteína/água	[7,5625]
Interacção temperatura/razão molar	[6,3625]
Interacção proteína/razão molar	[4,8125]

Os coeficientes polinomiais, obtidos por regressão múltipla linear, permitiram obter a seguinte equação: Percentagem de metil-ésteres = - 51,52 + 9,90T + 0,23L + 1,44M - 13,63A - 0,195T² + 0,0025L² - 1,58M² - 1,17A² - 0,04TL + 0,32TM + 0,51TA + 0,07LM + 0,06LA + 1,32MA

onde “T” corresponde à temperatura, “L” à quantidade de proteína, “M” ao metanol e “A” à água.

Em seguida, figuram cinco tabelas (tabelas 42, 43, 44, 45 e 46), com as respectivas representações gráficas (figuras 16, 17, 18, 19 e 20), representativas do efeito conjugado dos vários factores, observando-se o seu efeito relativamente ao rendimento em metil-ésteres (valores teóricos expectáveis). Os valores apresentados pressupõem, sempre, uma quantidade fixa de óleo de 50 g, por ensaio.

Tabela 42 – Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de proteína, assumindo a quantidade fixa no sistema de 8,76 g de metanol e 6 g de água, durante 15 horas.

Temperatura (°C)	Proteína (mg)				
	30	50	70	90	110
25	64,6	71,7	80,8	91,9	100
30	83,6	86,5	91,4	98,2	100
35	92,8	91,5	92,2	94,8	99,4
40	92,4	86,8	83,2	81,6	82
45	82,1	72,3	64,5	58,7	54,8
50	62,1	48,1	36,1	26	17,9

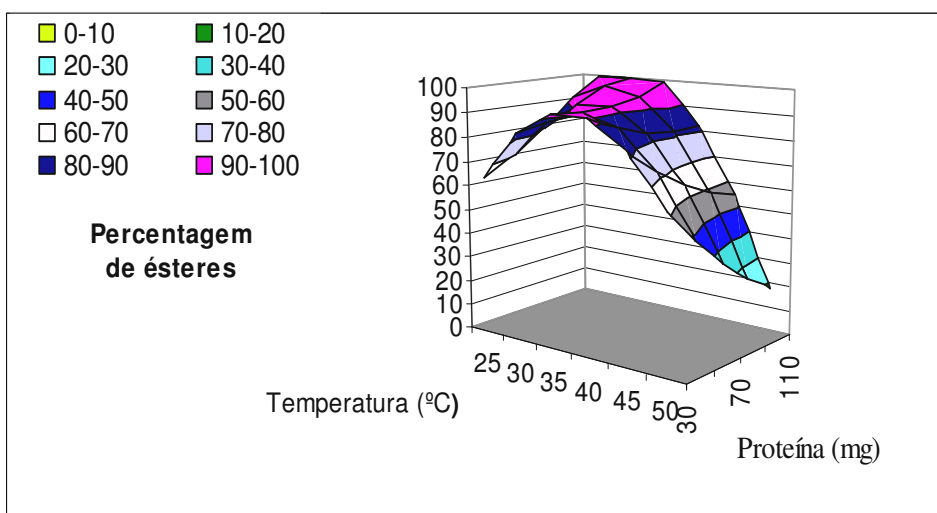


Figura 16 - Efeito conjugado da temperatura e da quantidade de lipase (assumindo a quantidade fixa no sistema de 8,76 g de metanol e 6 g de água, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos

Na tabela 42, relativa ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de proteína, os dois valores que se encontram a verde, com o valor de 100 (%), efectivamente no desenho composto central correspondiam a valores percentuais de metil-ésteres acima de 100, pelo que se colocou o valor máximo teórico.

A figura 16 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 42. Da sua análise verifica-se que um aumento da temperatura é positivo na transesterificação, até um valor de 35°C, a partir do qual a percentagem de metil-ésteres decai, devido, provavelmente, à desactivação da lipase por efeito da temperatura, que ocorre nas condições reaccionais referidas na tabela 42. Verifica-se, igualmente, que para valores de temperatura iguais ou inferiores a 35°C, se assiste a um aumento no teor em ésteres acompanhando o aumento na quantidade de lipase utilizada.

Tabela 43 – Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de metanol, assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de proteína e de 6 g de água, durante 15 horas.

Temperatura (°C)	Metanol (g)					
	7	8	9	10	11	12
25	85,7	84,1	79,4	71,5	60,5	46,2
30	93,4	93,4	90,3	84,1	74,6	62,0
35	91,3	93,0	91,5	86,9	79,0	68,0
40	79,6	82,8	83,0	79,9	73,7	64,2
45	58,0	62,9	64,6	63,2	58,6	50,8
50	26,8	33,3	36,6	36,7	33,7	27,5

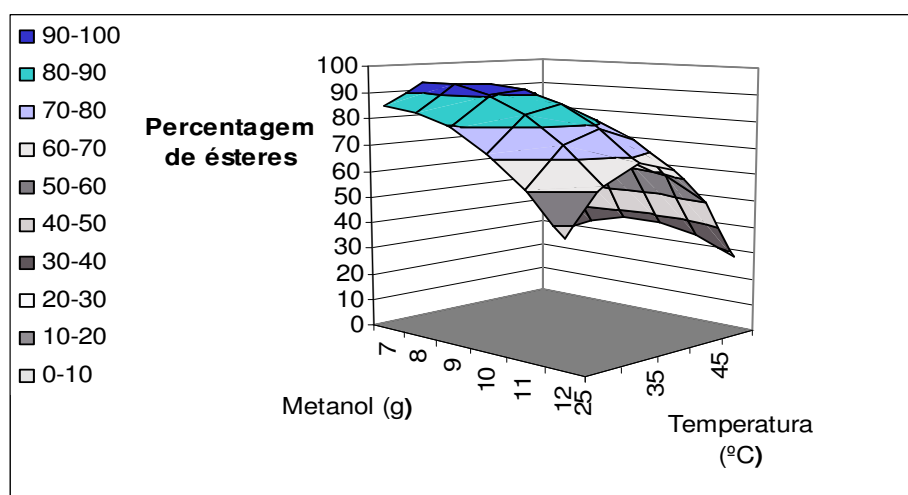


Figura 17 - Efeito conjugado da temperatura e da quantidade de metanol (assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de lipase e 6 g de água, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos

Da análise da figura 17, que representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 43, correspondendo ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de metanol na percentagem de transesterificação, verifica-se um aumento na percentagem de transesterificação à medida que a temperatura aumenta até aos 35°C, independentemente do teor de metanol presente. Para temperaturas superiores, a quantidade de metil-ésteres decai. Para temperaturas inferiores a 35°C, à medida que o teor em metanol aumenta no sistema, a percentagem de ésteres formados decai, devido, provavelmente, a efeitos de inibição da lipase pelo álcool. Esse decréscimo é mais acentuado a partir de uma quantidade de metanol de 9 g, correspondendo, sensivelmente, a uma razão molar metanol:óleo de 5:1.

Tabela 44 – Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de água, assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de proteína e de 8,76 g de metanol, durante 15 horas.

Temperatura (°C)	Água (g)							
	0	2	4	6	8	10	12	
25	32,3	57,9	74,1	80,8	78,2	66,2	44,8	
30	27,5	58,2	79,5	91,4	93,9	87,0	70,7	
35	12,9	48,7	75,2	92,2	99,8	98,0	86,9	
40	0	29,5	61,1	83,2	96,0	99,3	93,3	
45	0	0,6	37,3	64,5	82,4	90,9	89,9	
50	0	0	3,7	36,1	59,1	72,7	76,9	

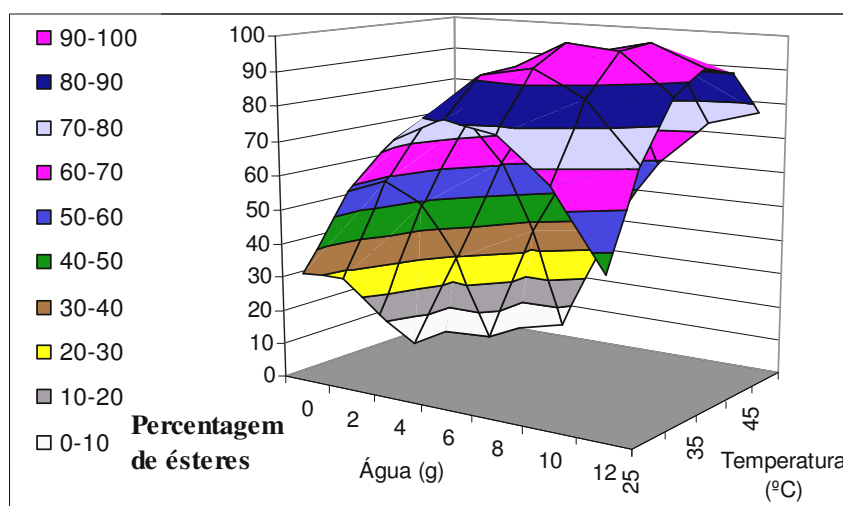


Figura 18 - Efeito conjugado da temperatura e da quantidade de água (assumindo a quantidade fixa no sistema de 70 mg de proteína e 8,76 g de metanol, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos

A figura 18 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 44, correspondendo ao efeito conjugado da temperatura e da quantidade de água na percentagem de transesterificação. Da sua análise, verifica-se um aumento da percentagem de

transesterificação até temperaturas na ordem dos 35°C, valor a partir do qual se regista um imediato decréscimo, na maioria dos casos. Até uma temperatura de 35°C, à medida que a quantidade de água aumenta, até 8 g (16% m/m), a percentagem de transesterificação aumenta também. Ensaio sem adição de água ao sistema conduzem a reduzidos teores em metil-ésteres, sendo que na tabela se encontram assinalados vários valores a zero (vermelho), valores esses que eram negativos em desenho composto central. Estes dados mostram que é necessário ter uma dada quantidade de água no sistema para que a lipase funcione da melhor forma. No entanto, para quantidades muito elevadas de água, observa-se um decréscimo no teor em ésteres, indicando que a reacção de hidrólise estará presente com maior relevância, prejudicando o desvio do equilíbrio da reacção para a formação dos produtos (ésteres). Torna-se evidente que a quantidade de água no sistema e a temperatura são parâmetros muito importantes no rendimento em ésteres metílicos.

Tabela 45 – Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da quantidade de proteína e metanol, assumindo uma temperatura de 38°C e uma quantidade de 6 g de água, durante 15 horas.

Proteína (mg)	Metanol (g)					
	7	8	9	10	11	12
30	96,1	95,9	92,6	86,1	76,5	63,7
50	89,8	91,0	89,1	84,0	75,7	64,3
70	85,4	88,1	87,6	83,8	77,0	66,9
90	83,1	87,1	88,0	85,7	80,2	71,5
110	82,7	88,1	90,4	89,5	85,4	78,1

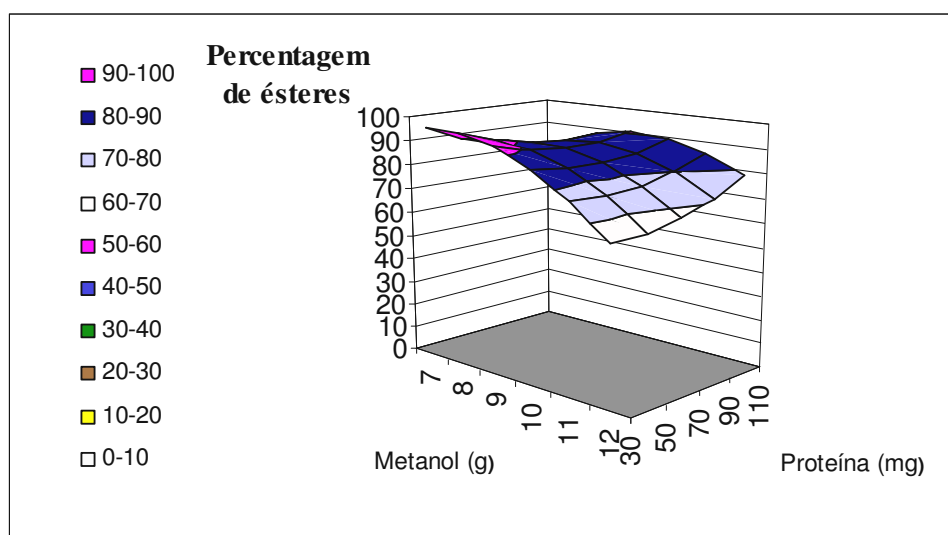


Figura 19 - Efeito conjugado da quantidade de proteína e de metanol (assumindo uma temperatura de 38°C e a quantidade de 6 g de água, durante 15 horas) na percentagem de ésteres obtidos

A figura 19 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 45, correspondendo ao efeito conjugado da quantidade de proteína e de metanol na percentagem de transesterificação. Da sua análise verifica-se que para valores abaixo dos 9 g de metanol (razão molar metanol:óleo de 5:1), se obtém uma diminuição da percentagem de transesterificação, com o aumento da quantidade de lipase, embora para quantidades superiores de metanol, o aumento de lipase induza a um aumento da transesterificação. Regista-se, também, um aumento do teor em metil-ésteres, com o aumento de metanol, até um valor de cerca de 9 g, independentemente da quantidade de enzima adicionada, efeito que depois se inverte, mostrando haver inibição da lipase pela presença de elevadas concentrações de metanol.

Para uma quantidade fixa de água no sistema e uma temperatura de 38°C, a influência da quantidade de lipase adicionada parece estar relacionada com a quantidade de álcool presente no ensaio. Assim, para valores de metanol inferiores a 9 g, verifica-se um decréscimo da percentagem de ésteres com o aumento da concentração de lipase, provavelmente devido a ter-se menores volumes de fase aquosa e, portanto, uma maior concentração da preparação enzimática, havendo limitações à transferência de massa. Para os valores de metanol mais elevados, o comportamento é o oposto, o que poderá estar relacionado com o maior volume de fase aquosa e, portanto, uma maior dispersão de lipase imobilizada e maior facilidade de contacto para a reacção. Os ensaios correspondentes à utilização de uma razão molar de 5:1 (aproximadamente 9 g de metanol) mostram não ser muito dependentes da quantidade de enzima presente no meio reaccional.

As melhores condições de rendimento verificam-se até aos valores de 9 g de metanol e até ao valor de 50 mg de lipase pura, correspondendo a cerca de 500 mg de lipase imobilizada.

Tabela 46 – Percentagem de transesterificação teórica, face ao efeito conjugado da quantidade de água e metanol, assumindo uma temperatura de 38°C e a quantidade de proteína de 70 mg, durante 15 horas.

Metanol (g)	Razão molar	Água (g)						
		0	2	4	6	8	10	12
7	4:1	10,9	45,2	70,0	85,4	91,5	88,2	75,4
8	5:1	5,6	42,5	70,0	88,1	96,8	96,1	86,0
9	5:1	0	36,7	66,8	87,6	98,9	100	93,4
10	6:1	0	27,7	60,5	83,8	97,8	100	97,6
11	6:1	0	15,6	51,0	77,0	93,6	100	98,6
12	7:1	0	0,2	38,3	66,9	86,2	96,0	96,5

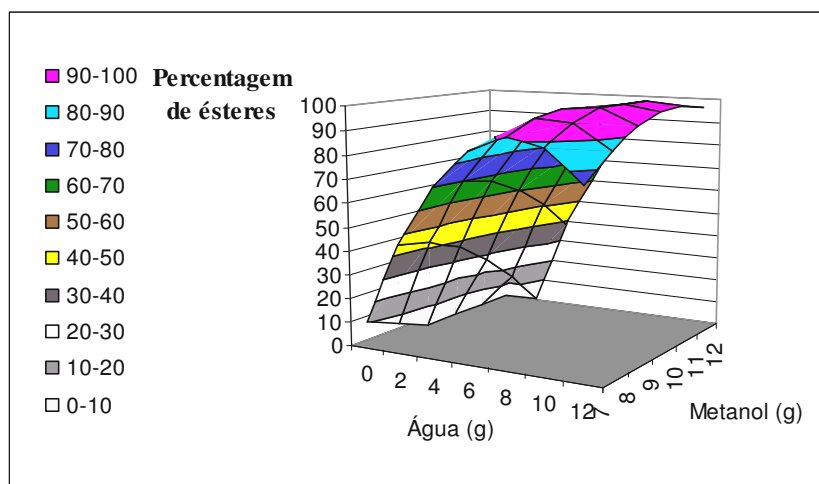


Figura 20 - Efeito conjugado da quantidade de água e metanol (assumindo uma temperatura de 38°C e a quantidade de proteína de 70 mg, durante 15 horas) na porcentagem de ésteres obtidos

A figura 20 representa a superfície de resposta dos resultados expressos na tabela 46. Da sua análise, constata-se que o sistema sem água apresenta valores muito reduzidos de metil-ésteres, sendo que os valores assinalados a cor vermelha apresentavam valores negativos, em desenho composto central, pelo que se assumiu o valor zero. Na ausência de água parece haver perda da actividade catalítica da lipase, provavelmente por remoção da camada de hidratação da enzima por parte do álcool. O aumento até 10 g de água conduziu a um aumento da transesterificação para todos os valores de metanol. Valores muito baixos ou muito elevados de metanol induzem a reduzidos teores em ésteres no sistema, excepto para valores mais significativos de água, sendo que o excesso de água, com valores acima dos 10 g, tem um efeito negativo. Este efeito pode estar relacionado com a competição água/álcool para a reacção, uma vez que a lipase pode levar a cabo tanto reacções de síntese como hidrólise. Os valores assinalados na tabela 46, com a cor azul, assumindo o valor 100, na realidade correspondiam, em desenho composto central, a valores acima de 100% de transesterificação obtida. Mais uma vez se verifica a grande importância que o teor de água exerce no sistema em termos de resultado na quantidade de metil-ésteres produzidos. As melhores condições parecem estar enquadradas entre valores de água compreendidos entre 8 e 10 g, ou seja entre 16 e 20% m/m, e de metanol entre 8 e 11 g, que corresponde a razões molares aproximadas de 5:1 e 6:1, respectivamente. Nestas condições, os valores estão quase todos acima dos 96,5% em FAMES, valor mínimo segundo a norma EN 14214. Deve ser referido que embora grande parte dos ensaios, para o desenho composto central, tenham sido realizados utilizando o óleo de colza do 1º lote, houve necessidade de recorrer ao óleo de colza do 2º lote para finalizar o estudo. No entanto, os resultados obtidos, neste caso, em termos de rendimento de

transesterificação mostraram-se anormalmente baixos. Ponderou-se a hipótese de a lipase ter perdido a sua capacidade catalítica, apesar de a embalagem ter sido aberta há relativamente pouco tempo e ter permanecido sempre devidamente acondicionada em frigorífico; outra hipótese seria o álcool ter hidratado e perdido parte das suas propriedades; outra seria o óleo em causa apresentar uma qualidade muito baixa, que levaria a rendimentos de transesterificação igualmente baixos; ou mesmo ter havido alterações do pH da água utilizada e isso prejudicar a reacção. De modo a esclarecer a situação, realizaram-se várias experiências com a lipase, recorrendo a outro óleo (óleo de girassol) (ver capítulo 3.4.5) e a outro lote de álcool, tendo-se concluído que o problema estava associado ao lote de metanol que estava a ser utilizado. Os ensaios para o desenho composto central puderam, então, prosseguir.

3.4.2.1 Determinação das melhores condições reaccionais

Tal como foi indicado no capítulo 2.4.3.3, procurou-se determinar qual a melhor condição reaccional para a transesterificação enzimática, tendo em conta a manipulação do desenho composto central, procurando recriar determinadas condições (tabelas 47, 48, 49 e 50). Foi tido em consideração que os valores dos vários parâmetros apenas poderiam variar dentro dos intervalos definidos nos níveis do desenho composto central, pois só assim apresentariam representatividade. A quantidade de óleo, definida para cada ensaio, seria sempre 50 g.

Tabela 47 – Percentagem de transesterificação, tendo em conta a variação do parâmetro temperatura, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.

Variável independente	Variáveis controladas			Variável dependente
Temperatura (°C)	Proteína (mg)	Metanol (g)	Água (g)	% de transesterificação (teórica)
25	30	8,76	6	64,6
26				69,2
27				73,4
28				77,2
29				80,6
30				83,6
31				86,2
32				88,5
33				90,3
34				91,8
35				92,8
36				93,5
37				93,8
38				93,7
39				93,2
40				92,4
41				91,1

Da análise da tabela 47 verifica-se que o melhor valor de temperatura para a reacção de transesterificação, nas condições reaccionais definidas, é de 37°C. A eficiência na transesterificação aumenta dos 25°C até aos 37°C, temperatura a partir da qual se regista um decréscimo no rendimento. É notório que até aos 37°C, se verifica, em média, um aumento de eficiência na ordem dos 2,46 %, por cada grau célsio de aumento de temperatura. A partir dos 37°C, assiste-se a uma diminuição do rendimento, todavia essa diminuição é pouco significativa, na ordem dos 0,68%, por cada grau célsio de aumento de temperatura.

Tabela 48 – Percentagem de transesterificação tendo em conta a variação do parâmetro proteína, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.

Variável independente	Variáveis controladas			Variável dependente
Proteína (mg)	Temperatura (°C)	Metanol (g)	Água (g)	% de transesterificação (teórica)
30	<u>37</u>	8,76	6	93,8
35				92,9
40				92,1
45				91,4
50				90,8
55				90,4
60				90,0
65				89,8
70				89,8
75				89,8
80				89,9
85				90,3
90				90,7
95				91,2
100				91,9
105				92,7
110	93,6			

Da análise da tabela 48, verifica-se que em termos de quantidade de lipase, o melhor valor, tendo em conta as condições reaccionais, é de 30 mg. Acima deste valor, até 70 mg, assiste-se a um decréscimo no rendimento da transesterificação. A partir dos 70 mg o rendimento vai aumentando com o aumento da quantidade de enzima disponível, aproximando-se o rendimento, aos 110 mg, do obtido com as 30 mg. Deste modo, o melhor valor de lipase a utilizar seria o de 30 mg, quer em termos de rendimento quer pela economia de enzima que significaria.

Tabela 49 – Percentagem de transesterificação tendo em conta a variação do parâmetro metanol, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.

Variável independente	Variáveis controladas			Variável dependente
Metanol (g)	Temperatura (°C)	Proteína (mg)	Água (g)	% de transesterificação (teórica)
5	<u>37</u>	<u>30</u>	6	88,2
5,5				91,5
6				94,0
6,5				95,8
7				96,8
7,5				96,9
8				96,3
8,5				94,9
9				92,7
9,5				89,6
10				85,8
10,5				81,3
11				75,9
11,5				69,7
12				62,7
12,27	58,6			

Da análise da tabela 49 verifica-se que em termos de quantidade de metanol, o melhor valor, tendo em conta as condições reaccionais, é de 7,5 g. Valores crescentes até aos 7,5 g de metanol traduzem-se num aumento do teor em ésteres, valor a partir do qual o rendimento decresce significativamente, numa clara inibição por excesso de álcool.

Tabela 50 – Percentagem de transesterificação tendo em conta a variação do parâmetro água, mantendo todos os outros parâmetros como variáveis controladas.

Variável independente	Variáveis controladas			Variável dependente
Água (g)	Temperatura (°C)	Proteína (mg)	Metanol (g)	% de transesterificação (teórica)
0	<u>37</u>	<u>30</u>	<u>7,5</u>	36,6
1				52,5
1,5				59,6
2				66,1
2,5				72,0
3				77,3
3,5				82,1
4				86,2
4,5				89,8
5				92,7
5,5				95,1
6				96,9
6,5				98,1
7				98,75

Tabela 50 – (continuação)

Variável independente	Variáveis controladas			Variável dependente
Água (g)	Temperatura (°C)	Proteína (mg)	Metanol (g)	% de transesterificação (teórica)
7,5	<u>37</u>	<u>30</u>	<u>7,5</u>	98,8
8				98,8
8,5				97,1
9				95,4
9,5				93,1
10				90,2
10,5				86,7
11				82,6
11,5				77,9
12				72,7

Da análise da tabela 50 verifica-se que em termos de quantidade de água, o melhor valor, tendo em conta as condições reaccionais, é de 7,5 g. É bastante explícita a grande relevância do parâmetro água no rendimento da transesterificação, tendo em conta a diferença de valores que se encontra entre os dois extremos em estudo, indo dos 36,6%, até, aproximadamente, os 99%. No final, após a análise de todos os valores obtidos no desenho composto central, ilustrados nas várias tabelas (da 47 à 50) determinou-se, teoricamente, as condições optimizadas. Essas mesmas condições figuram na tabela 51.

Tabela 51 - Condições iniciais optimizadas em desenho composto central, para 50 g de óleo (colza).

Variáveis independentes				Variável dependente
Temperatura (°C)	Água (g)	Proteína (mg)	Metanol (g)	% de transesterificação (teórica)
37	7,5	30	7,5	98,8

Todavia, após a determinação destas condições (tabela 51) era ainda pertinente proceder-se a um novo e mais minucioso estudo de ensaios em torno destes valores, a fim de se averiguar se seria possível obterem-se melhores rendimentos. O ponto de partida seria as condições ilustradas na tabela 51, procedendo-se a pequenas variações, analisando-se o seu efeito. A tabela 52 ilustra os valores que se obtiveram após nova modelação.

Tabela 52 - Condições optimizadas após uma nova manipulação em desenho composto central, para 50 g de óleo (colza).

Variáveis independentes				Variável dependente
Temperatura (°C)	Água (g)	Lipase (mg)	Metanol (g)	% de transesterificação (teórica)
37	7	30	7,5	98,8
<u>37</u>	<u>7,5</u>	<u>30</u>	<u>8</u>	<u>99,2</u>
39	7,5	30	8	99,6

Desta nova manipulação (tabela 52) considerou-se que as condições que permitiam um rendimento de 99,2% eram mais desejáveis que as que permitiam um rendimento de 99,6%, uma vez que a diferença não era significativa e permitia uma poupança energética (menor temperatura requerida no processo). Deste modo, ficaram definidas como condições optimizadas para a transesterificação enzimática recorrendo à enzima *Lipozyme TL IM*:

Temperatura: 37°C

Quantidade proteína: 30 mg

Quantidade de metanol: 8 g

Quantidade de água: 7,5g

Em termos molares, a quantidade de metanol (8 g) corresponderia, sensivelmente, a 0,25 moles, enquanto que a quantidade de óleo de colza utilizada (50 g), corresponderia a 0,05 moles; o que corresponderia a uma relação molar metanol:óleo de 5:1. Em relação à proporção de enzima pura necessária (30 mg), esta seria 0,06 % (m/m). A adição de água (7,5g) corresponderia a 15% (m/m).

Os vários ensaios de transesterificação que se seguiram, usaram estas mesmas condições, tidas como optimizadas.

De modo a validar os resultados obtidos pela metodologia do desenho composto central, realizou-se um ensaio, nas condições optimizadas, utilizando o óleo de colza (tabela 53). A reacção de transesterificação foi seguida ao longo de 15 horas, com o objectivo de se avaliar o tempo de equilíbrio, ou seja, o tempo ao fim do qual a reacção estaria completa.

Tabela 53 – Percentagem de transesterificação, do óleo de colza, ao longo do tempo.

Parâmetros	Tempo de reacção (h)	% de metil-ésteres
Temperatura: 37°C Óleo soja: 50 g Lipase: 30 mg Metanol: 8 g Água: 7,5 g	2	50,6
	5	57,8
	7	62,2
	15	86,7

Da tabela 53 constata-se que houve um aumento do rendimento em ésteres com o tempo decorrido do ensaio. Todavia era expectável que ao fim das 15 horas de reacção o rendimento fosse na ordem dos 99 %, tal como era esperado em função dos dados teóricos obtidos pelo desenho composto central (tabela 52), para o qual se considerou um tempo de reacção de 15 horas. Como isso não se verificou, achou-se pertinente repetirem-se alguns ensaios (tabela 54), procedendo-se a duas recolhas, uma ao fim de 15 horas de reacção e outra ao fim de 20 horas, de modo a avaliar se já se tinha atingido o equilíbrio da reacção ao fim das 15 horas.

Tabela 54 – Percentagem de transesterificação do óleo de colza (50 g), ao fim de 15 e 20 horas.

Ensaio	Temp. (°C)	Água (ml)	Lipase (mg)	Metanol (g)	% de FAMES obtida ao fim de 15 h	% de FAMES obtida ao fim de 20 h
1º ensaio	37	8	40	8	89,9 %	91,9 %
2º ensaio	37	7,5	30	8	86,7 %	89,1 %
3º ensaio	44	9	90	10,5	91,4 %	-
4º ensaio	44	3	90	7	7,3 %	-

De acordo com os dados da tabela 54, as recolhas ao fim de 15 horas revelaram, na sua maioria, rendimentos inferiores aos expectáveis. Nem mesmo nos ensaios ao fim de 20 horas de transesterificação foram obtidos os rendimentos esperados, face ao desenho composto central. Face aos resultados obtidos nas 15 e 20 horas, pode-se concluir que as diferenças são mínimas e que, aparentemente, o equilíbrio reaccional está atingido ao fim de 15 horas de reacção.

É necessário frisar que em todos os ensaios de transesterificação enzimática com o óleo de colza, independentemente das condições reaccionais, verificou-se, em menor ou maior escala, que as amostras obtidas apresentavam um aspecto de uma matriz emulsionada de cor amarela, havendo alguma dificuldade na separação de fases (figura 21(A)). A separação de fases só era eficaz após centrifugação, verificando-se a deposição da lipase no fundo, sobrepondo-se uma matriz emulsionada e por fim a fase orgânica relativa ao biocombustível, que dependendo dos ensaios era maior ou menor (figura 21(B)). Verificou-se, igualmente, que o granulado da preparação enzimática (imobilizada) (figura 22(A)) se desfazia, na esmagadora maioria dos ensaios (figura 22(B)).

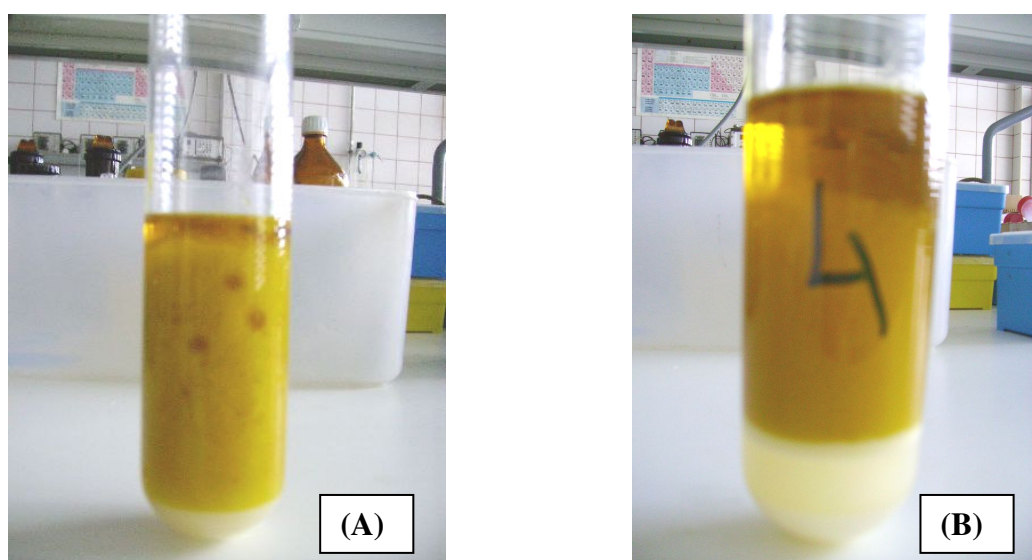


Figura 21 - Tubo de centrifugação com a solução final da transesterificação do ensaio 4 (tabela 55): (A) antes da centrifugação; (B) depois da centrifugação

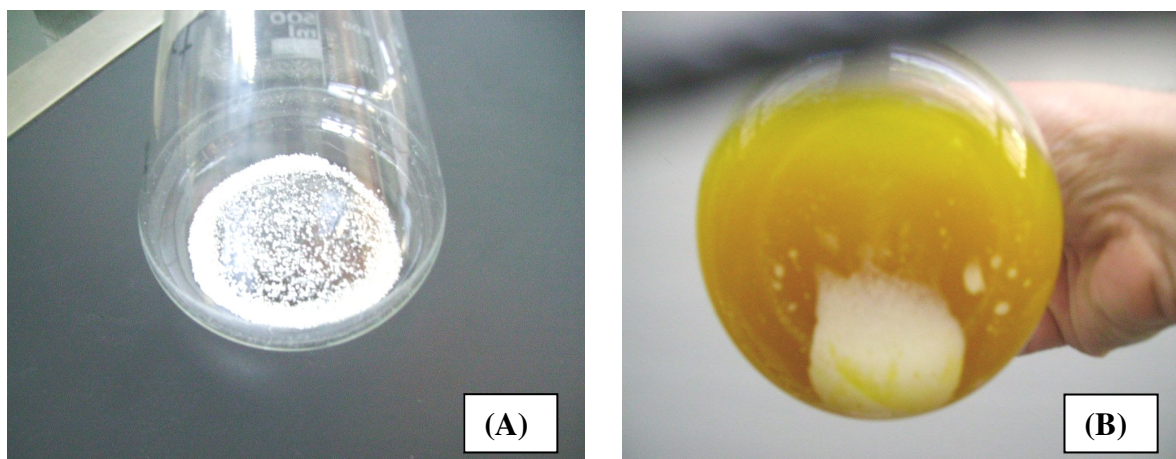


Figura 22 – (A) Erlenmeyer com os grânulos enzimáticos (intactos); (B) Erlenmeyer com solução transesterificada, sendo visível os grânulos enzimáticos desfeitos, no fundo

É necessário referir que nos vários ensaios, constatou-se que, geralmente, quanto maior a percentagem de metil-ésteres obtidos no final da reacção de transesterificação, menor era a quantidade da matriz emulsionada e maior a fracção do biocombustível, assim como melhor era a separação de fases (figura 23).



Figura 23 - Erlenmeyers com as soluções finais da transesterificação dos ensaios 2, 14 e 12 (respectivamente 53,4%, 96 e 87,8% de FAMEs) (tabela 40), após algum tempo de repouso

3.4.3 Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo de soja

Tal como referido no capítulo 2.4.3.4 foram realizados diversos ensaios de transesterificação enzimática do óleo de soja “Valouro”, usando a lipase imobilizada *Lipozyme TL IM*. A

quantidade de óleo utilizada em cada ensaio foi sempre de 50 g. Os resultados figuram nas tabelas 55 e 56.

Tabela 55– Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do óleo de soja *Valouro*.

Ensaio	Temperatura (°C)	Lipase (mg)	Metanol (g)	Água (g)	% de metil-ésteres
1º ensaio	30	30	9	8	85,3
2º ensaio	37	30	8	7,5	87,5
3º ensaio	37,5	70	8,8	6	91,6
4º ensaio	44	90	10,5	9	91,5

Os resultados obtidos com o óleo de soja ficaram aquém do que era expectável em função do desenho composto central (tabela 40). Todavia, é necessário frisar que esse mesmo desenho composto central foi construído utilizando óleo de colza, que apresentava característica distintas do óleo de soja. As condições optimizadas, utilizadas no 2º ensaio da tabela 55, foram igualmente estudadas e determinadas em função do óleo de colza. Em particular, atendendo a que o peso molecular do óleo de soja é inferior ao do óleo de colza, a quantidade de metanol adicionada teria de ser superior (8,9 g) para se alcançar a razão molar optimizada de 5:1. Todavia, os resultados confirmam, uma vez mais, os resultados procedentes do algoritmo de *Yates* e o efeito conjugado dos vários parâmetros (ver capítulo 3.4.2). Todos os ensaios apresentaram um aspecto emulsionado no final de transesterificação, assim como o granulado enzimático se desfez (figura 24). As soluções obtidas tinham uma coloração branca bege, e após centrifugação era distinta a separação de fases em que no fundo se encontrava a lipase, seguindo-se uma matriz coloidal e, o biocombustível, como sobrenadante, com uma coloração amarela esbranquiçada muito suave (figura 25).



Figura 24 - Erlenmeyers com as soluções finais da reacção de transesterificação dos ensaios 2, 1 e 4 (tabela 55), respectivamente da esquerda para direita



Figura 25 - Tubo de centrifugação com a amostra final da transesterificação do ensaio 1 (tabela 55), depois da centrifugação

Tabela 56 – Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do óleo de soja *Valouro*, variando a quantidade de lipase e água.

Ensaio	Temperatura (°C)	Lipase (mg)	Metanol (g)	Água (g)	% de metil-ésteres
1º ensaio	30	30	11	8	92,8
2º ensaio	30	30	11	6	53,8
3º ensaio	30	32	11	8	92,7
4º ensaio	30	32	11	6	38,6

A tabela 56, referente a ensaios em que se variou a quantidade enzimática e a quantidade de água, comprova, mais uma vez, que a quantidade de água é um importante parâmetro na transesterificação enzimática. Mantendo constantes os parâmetros quantidade de lipase, óleo, metanol e temperatura e fazendo variar apenas a quantidade de água, verifica-se que este parâmetro afecta significativamente o teor em ésteres. A diminuição de água conduz a uma diminuição efectiva no teor em FAMES. Estes resultados reforçam as tendências observadas no desenho composto central (ver capítulo 3.4.2).

Verificou-se, novamente, que após a reacção de transesterificação, as várias amostras (tabela 56) apresentavam o aspecto de uma emulsão. Após centrifugação, os ensaios n.º 2 e n.º 4 apresentavam, contudo, uma boa separação de fases, das quais a fracção relativa ao biocombustível era significativa (figura 26). No entanto, deverá mencionar-se que em embora em termos quantitativos o biocombustível, nestes dois ensaios, fosse significativo, em termos qualitativos o teor em ésteres foi muito insatisfatório, abaixo dos 54%.

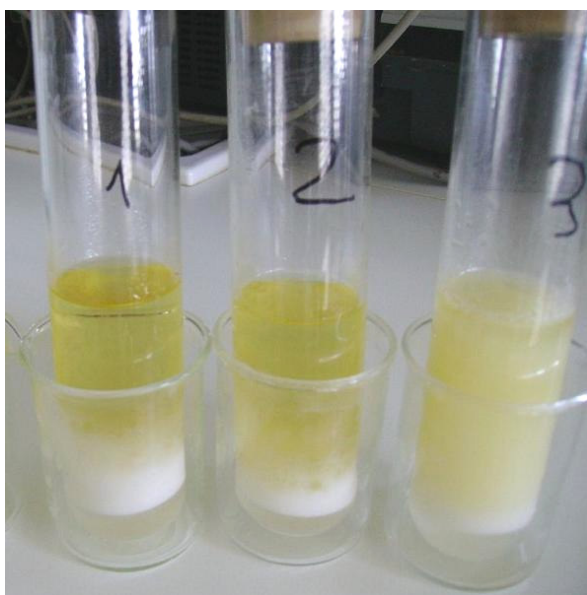


Figura 26 - Tubos de centrifugação com as amostras finais da transesterificação dos ensaios 1, 2 e 3 (tabela 56), depois da centrifugação

3.4.4 Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo usado

Tal como descrito no capítulo 2.4.3.5, apenas foi sintetizado biodiesel a partir de óleo usado, por transesterificação enzimática, recorrendo ao último lote de óleo usado (lote da Cantina do INETI, de Agosto de 2007). As condições dos ensaios e os respectivos valores obtidos na transesterificação figuram nas tabelas 57, 58 e 59.

Tabela 57 – Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do OAU proveniente da Cantina do INETI.

Ensaio	Condições reaccionais com 50 g de óleo				% de metil-ésteres
	Temperatura (°C)	Lipase (mg)	Metanol (g)	Água (g)	
1º ensaio	37,5	30	8	7,5	79,6
2º ensaio	37,5	70	8,8	6	83,8

Observação: o óleo usado não foi sujeito a qualquer processo de filtração e secagem.

Da tabela 57, constata-se que o rendimento obtido foi inferior ao previsto pelo desenho composto central. Dado que o desenho composto central (ver capítulo 3.4.2) foi construído usando como matéria-prima o óleo virgem de colza, as conclusões retiradas em relação a outros óleos possuem sempre um factor de erro associado. No presente caso, o facto de se estar a utilizar OAU pode ter bastante influência atendendo às diferentes substâncias que possam estar presentes, devido à fritura de diferentes alimentos. Esses compostos poderão exercer efeitos inibitórios na lipase. Estes resultados (tabela 57) não foram muito diferentes dos obtidos por transesterificação química com o mesmo óleo (3º lote), com e sem filtração e secagem (tabela 30 e 31).

Tabela 58 – Percentagem de transesterificação enzimática (15 horas) do OAU proveniente da Cantina do INETI, usando metanol e etanol.

ensaio	Condições reaccionais com 50 g de óleo				% de ésteres
	Temperatura (°C)	Lipase (mg)	Álcool (g)	Água (g)	
1º ensaio	43	70	8,8 (metanol)	6	83,7
2º ensaio	43	30	8 (metanol)	7,5	90,4
3º ensaio	43	30	8 (etanol)	7,5	69,6

Observação: o óleo usado foi sujeito a filtração e secagem.

Da tabela 58 destaca-se o ensaio n.º 3, em que o álcool utilizado foi o etanol. Este ensaio permitiu constatar que, comparando com o ensaio com metanol, se obtêm valores de teores em ésteres bastante inferiores. Salienta-se, no entanto, o facto de no ensaio com o etanol, a quantidade de 8 g de álcool para reagir com 50 g de óleo, corresponder a uma razão molar de 3:1, o que é insuficiente para que a reacção pudesse decorrer da melhor forma. Atendendo a isso, e com base nos resultados do desenho composto central, pode-se constatar que o valor obtido no caso do etanol até se encontra dentro da ordem de grandeza esperada quando utilizando metanol, nas mesmas condições. É igualmente importante referir que o ensaio, usando o etanol, apresentava um aspecto muito mais emulsionado e de separação de fases mais difícil (figura 27).



Figura 27 - Erlenmeyers com as soluções finais da reacção de transesterificação dos ensaios 1, 2 e 3 (tabela 58), respectivamente da esquerda para a direita

Os ensaios (1 e 2), utilizando o metanol, não só tiveram um aspecto menos emulsionado e com melhor separação de fases, ainda no erlenmyer, como após centrifugação, essa diferença relativamente ao ensaio com etanol, foi mais evidente (figura 28 (A e B)).

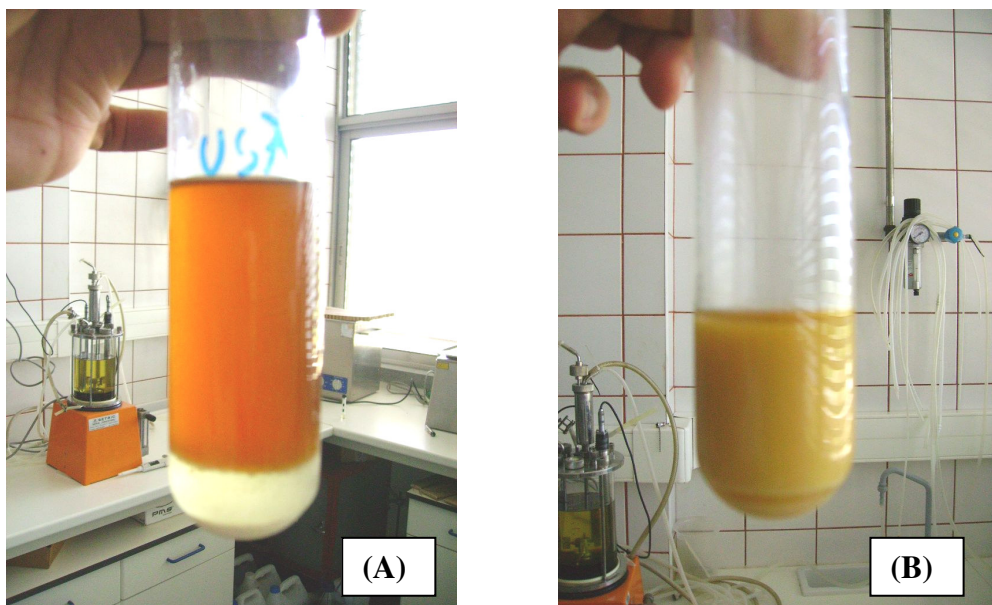


Figura 28 - Tubos de centrifugação com a solução final da transesterificação do ensaio 2 (A) e do ensaio 3 (B), depois da centrifugação (tabela 58)

Tabela 59 - Condições da transesterificação enzimática de óleo usado (Cantina do INETI) e resultados sequenciais da transesterificação, com e sem filtração e secagem.

Parâmetros	Tempo (h)	OAU não filtrado nem seco	OAU filtrado e seco
		% de metil-ésteres	
Temperatura: 37,5°C Óleo usado: 50 g Metanol: 8,8 g Água: 6 g Lipase: 70 mg	1	23,6	n.d
	3	46,1	42,8
	5	52,0	54,9
	7	56,7	61,3
	15	83,8	83,7
	21	n.d	82,9
	23	82,5	83,6
	24	84,5	83,2

A tabela 59, cuja representação gráfica é ilustrada na figura 29, contempla a transesterificação do 3º lote de OAU, estudando o efeito da variável independente relativa à realização de filtração e secagem prévia do óleo. Salienta-se o facto de a quantidade de metanol utilizado ter correspondido, face ao peso molecular do óleo, a uma razão molar de 4,5:1, que atendendo às condições optimizadas (razão molar 5:1) era inferior. Os resultados desta tabela confirmaram dados anteriores (ver capítulo 3.2.3) que apontavam para que a filtração e secagem prévia dos óleos não condicionasse significativamente os resultados da catálise, desde que o teor em água e matéria em suspensão no óleo também não apresentasse valores muito elevados. Pode-se referir, igualmente, que o limite temporal da reacção foi de 24 horas, superior aos ensaios anteriores em que o limite fixado era de 15 horas, apresentando valores semelhantes. Salienta-se que quanto maior o tempo de reacção necessário, menos “aliciante”

industrialmente se torna o processo, tendo sempre que haver um compromisso entre tempo e qualidade/quantidade.

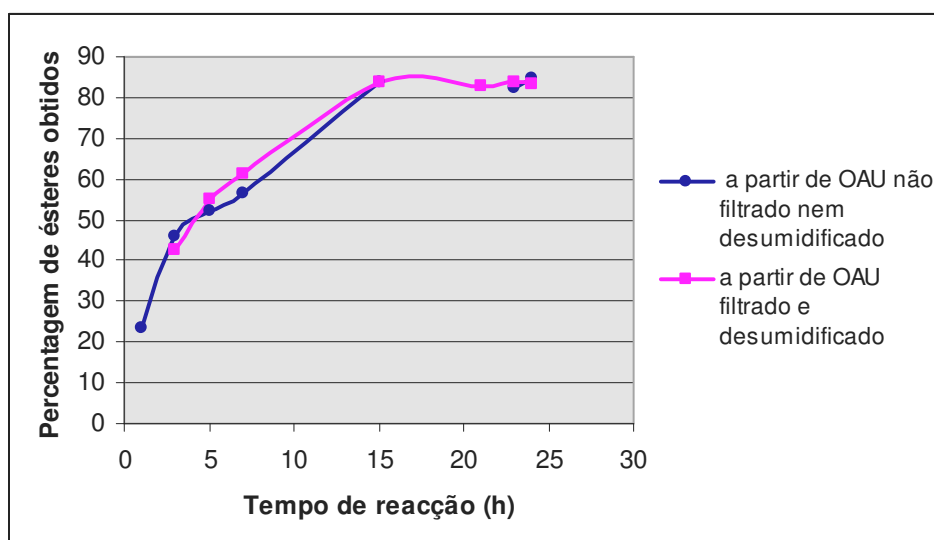


Figura 29 - Percentagem de ésteres da transesterificação enzimática do OAU da Cantina do INETI, com e sem tratamento prévio de filtração e secagem (dados da tabela 59)

Da análise dos dados ilustrados na figura 29, verifica-se um incremento na percentagem em FAMES, ao longo do tempo, sendo observável que em ambos os casos (com e sem filtração e secagem) o equilíbrio da reação foi atingido ao fim de 15 horas de reação.

Mais uma vez, tal como em todos os outros ensaios anteriores, a solução final obtida nos ensaios de transesterificação enzimática, apresentava um aspecto de uma emulsão (figura 30) mas, ao fim de pouco tempo em repouso, formavam-se três fases: a fase sobrenadante (fase orgânica, do biocombustível), com uma coloração laranja de aspecto límpido; uma fase intermédia que apresentava um aspecto de uma emulsão; e a fase inferior de cor esbranquiçada e que correspondia aos grânulos enzimáticos parcialmente desfeitos.

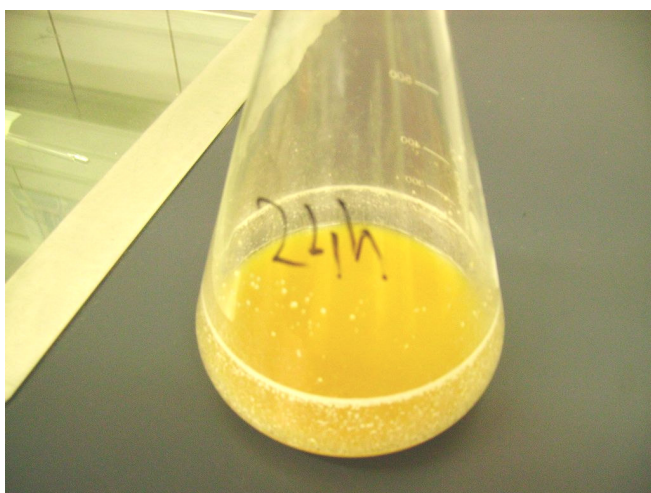


Figura 30 - Erlenmeyer com a solução resultante da transesterificação durante 24 horas, do óleo (seco) usado da Cantina do INETI (tabela 59)

3.4.5 Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo de girassol

Tal como referido no capítulo 3.4.2, procedeu-se à realização de alguns ensaios com o óleo de girassol, com o objectivo de se testar se os problemas que estavam a ocorrer na transesterificação com o óleo de colza eram do próprio óleo ou tinham outra origem. Os resultados demonstraram que o problema não estava associado ao óleo mas ao metanol empregue. Achou-se pertinente proceder a ensaios assumindo como variável em estudo o pH. O óleo utilizado nestes ensaios foi o de girassol. Utilizou-se a lipase solúvel *TL 100L*. As condições de transesterificação foram: temperatura (37,5°C); lipase solúvel (2,7 ml); metanol (8,9 g); solução aquosa (3,3 g); óleo (50 g).

Os resultados desses ensaios figuram na tabela 60.

Tabela 60 - Resultados da transesterificação enzimática, durante 15 horas, com a enzima solúvel *TL 100L*, tendo como variável independente o pH da solução adicionada.

Amostra	% de metil-ésteres
Solução a pH 5	90,3
Ensaio com água (ultra-pura) a pH 5,45	89,7
Ensaio com água (ultra-pura) a pH 6	90,3
Ensaio com água (ultra-pura) a pH 7	91,8

Tal como se pode constatar com a análise da tabela 60, a diferença de pH da solução adicionada ao sistema de transesterificação, em pouco influencia a própria reacção de transesterificação, sendo as diferenças de rendimento em ésteres pouco significativas. Salienta-se que os valores de pH mencionados são de valores associados à solução aquosa adicionada e não ao valor do pH da solução final para a reacção de transesterificação (solução aquosa + metanol + óleo + lipase). É necessário salientar que caso o óleo tivesse uma elevada acidez livre, seria perfeitamente natural que pudesse condicionar o pH da mistura óleo+metanol+solução aquosa+lipase. Neste caso, a actividade catalítica enzimática poderia, eventualmente, ser seriamente condicionada. É necessário, contudo, frisar que em geral as lipases são activas numa ampla faixa de valores de pH, apresentando, no entanto, os melhores valores na gama de pH 5 a 9, com um máximo, frequentemente, situado entre os 6 e 8. Todavia, salienta-se o facto de apesar de o óleo de girassol não ter sido analisado não era de esperar uma elevada acidez livre, uma vez que se tratava de um óleo refinado para consumo humano.

Capítulo 4

Discussão Global

Segundo dados bibliográficos, a utilização da catálise alcalina, recorrendo ao hidróxido de sódio, tem o inconveniente de produzir água na sua reacção com o álcool, o que leva à ocorrência da hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos gordos livres e o dificultar da separação de fases. Para minimizar estes problemas é aconselhável que a matéria-prima se apresente o mais anidra possível (Felizardo, 2003). Todavia, constatou-se, em ensaios recorrendo a óleo usado (3º lote), com teores de água de 1200 ppm, que o processo de filtração e secagem, não condicionava, aparentemente, os resultados da catálise alcalina e, também, enzimática. Deve-se salientar, contudo, que o teor em água (1200 ppm - 0,12% m/m) também não era muito elevado.

Relativamente aos ensaios enzimáticos, um aspecto que é, igualmente, muito salientado é a sensibilidade das enzimas às condições reaccionais, podendo mesmo conduzir à sua inactivação. Factores como a temperatura e o pH são extremamente relevantes, havendo deste modo valores óptimos e limites de tolerância que influenciam a actividade catalítica enzimática. Geralmente as lipases são activas numa ampla faixa de valores de pH, apresentando, contudo, os melhores valores na gama de pH 5 a 9, com um máximo, frequentemente, situado entre os 6 e 8 (Duarte, 2002). Em ensaios em que se adicionaram soluções aquosas com diferentes valores de pH, variando de 5 a 7, verificou-se que a diferença de pH da solução adicionada ao sistema de transesterificação não influenciou significativamente a própria reacção de transesterificação, tendo as diferenças de rendimento em metil-ésteres sido pouco significativas. Salienta-se, contudo, que se tratava de pH da solução adicionada e não da solução final para a reacção de transesterificação, além de que o intervalo estudado estava perfeitamente enquadrado com os intervalos de tolerância enzimática. Contudo, é necessário frisar que, caso o óleo tivesse uma elevada acidez livre, seria perfeitamente natural que pudesse condicionar o pH da mistura final e inibir a actividade catalítica enzimática. Todavia, apesar do óleo de girassol não ter sido analisado, a sua acidez certamente seria reduzida por se tratar de um óleo refinado de consumo alimentar.

Em relação à temperatura, as lipases também possuem uma significativa amplitude, mas a maioria apresenta como melhores valores, temperaturas entre os 30º e os 40ºC (Duarte, 2002), o que se veio provar igualmente com a lipase em estudo, a *Lipozyme TL IM*, cujo valor óptimo de temperatura pareceu ser de 37ºC.

Ambos os processos de transesterificação estudados (via química alcalina e via enzimática), segundo dados bibliográficos, apresentam vantagens e desvantagens relativamente um ao outro. A tabela 61 compara e destaca as principais diferenças entre os dois processos de transesterificação.

Tabela 61 – Comparação entre a transesterificação via alcalina (hidróxido de sódio) e enzimática(<http://ramses.ffalm.br/falm/dbt/professores/sachs/Bioquimica%20I/enzimas2.pdf>; http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2005_2/enzimas/enzimas.ppt).

Característica	Transesterificação	
	Enzimática	Química alcalina (hidróxido de sódio)
Especificidade ao substrato	elevada	moderada a baixa
Natureza da estrutura	complexa	simples
Sensibilidade à temperatura e pH	elevada	Baixa a moderada
Condições de temperatura de reacção	Suaves (geralmente entre 30 a 40°C)	Elevadas (acima de 50°C)
Custo de obtenção do catalisador (isolamento e purificação)	elevado	moderado
Natureza do processo	“Batch”	contínuo
Formação de subprodutos	baixa	elevada
Separação catalisador/ produtos	simples	difícil
Facilidade de conversão de ácidos gordos livres em ésteres	elevada	Baixa
Requer a presença de solventes	Facilita a reacção	não
Estabilidade do preparado	baixa	elevada
Tempo necessário	elevado (acima de 15 horas)	baixo (3 a 5 horas)
Interferência da presença de água	baixa	elevada
Recuperação do excesso de álcool	elevada	baixa
Toxicidade do catalisador	baixa	elevada
Reutilização do catalisador	elevada e fácil (na forma imobilizada)	nula
Quantidade necessária de catalisador (forma pura)	Baixa (abaixo dos 0,5%)	elevada (1% m/m)
Rendimento da reacção (em ésteres)	médio a elevado	elevado

Alguns dados obtidos, nos ensaios que figuram neste trabalho, mostram divergências face ao que é exposto na tabela 61. De facto, onde se obteve a melhor e mais rápida separação glicerol/biodiesel foi sem dúvida nos ensaios via catálise alcalina (figuras 31 e 32). Salienta-se que em todos os ensaios de alcoólise por via enzimática, independentemente do óleo, obteve-se no final uma matriz coloidal que dificultava a separação e reduzia a fracção sobrenadante, que constituía o biocombustível propriamente dito.

Igualmente importante foi o facto de, em praticamente todos os ensaios, independentemente das condições reaccionais, o suporte da enzima imobilizada, no final de 15 horas de ensaio, se ter destruído, deixando de ter a forma granulada. Deste modo, a reutilização enzimática tornava-se impossível, inviabilizando o processo a nível industrial, pelo menos nas condições testadas. Todavia, convém mencionar que mesmo a nível de outros ensaios laboratoriais, muitas vezes as enzimas apresentam uma elevada instabilidade em solução, o que representa um obstáculo à recuperação do biocatalisador após a sua utilização (Duarte, 2006).

Um importante dado a reter é que o catalisador enzimático é requerido em menores quantidades relativamente ao catalisador alcalino, que no caso concreto deste trabalho

representou uma quantidade aproximadamente 17 vezes inferior (1% m/m para o processo alcalino e de 0,06% m/m para a lipase (pura) *Lipozyme TL IM*). Todavia, devido à impossibilidade de reutilização perde-se esta grande vantagem do processo enzimático em relação ao alcalino.



Figura 31 - Frascos contendo amostras do produto final da transesterificação do OAU (3º lote), sem qualquer processo de lavagem, filtração ou centrifugação, ao fim de 1 semana em repouso. Ensaio (A) usando etanol (via catálise enzimática); ensaio (B) recorrendo à catálise enzimática (com metanol) e ensaio (C) recorrendo à catálise alcalina (com metanol)

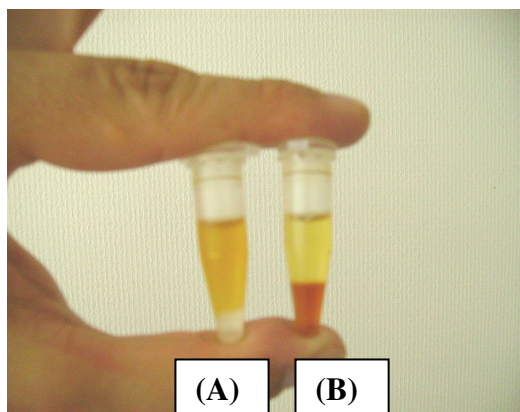


Figura 32 - Eppendorfs com amostras, após centrifugação, da transesterificação do óleo usado (3º lote), por via enzimática (A) e alcalina (B)

Capítulo 5

Conclusões

O tema de trabalho da presente dissertação assentou no estudo comparativo da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, através da transesterificação alcalina e enzimática.

Foi realizada a caracterização de vários óleos (colza, soja e OAU), etapa imprescindível para a realização dos ensaios de transesterificação, uma vez que as características qualitativas dos óleos determinam a qualidade/quantidade de biodiesel que se poderá obter.

Os ensaios de transesterificação alcalina, dos vários óleos, foram realizados segundo condições previamente optimizadas por outros autores: razão molar metanol:óleo de 6:1; catalisador hidróxido de sódio a 1% m/m, adicionando-se ainda uma quantidade adicional em função do índice de acidez, que se destina a neutralizar os ácidos gordos livres presentes no óleo; temperatura de reacção de 55°C e uma agitação constante de 150 rpm, durante 4 horas. Os rendimentos de transesterificação obtidos foram de 98,6% com o óleo de colza, 94% com o óleo de soja e de 87,5% a 94% com os óleos usados. Estes ensaios foram também analisados através do rendimento em metil-ésteres ao longo do tempo, tendo-se determinado que os melhores resultados foram obtidos ao fim de 3 horas de reacção.

Procedeu-se, também, à realização de estudos adicionais sobre a influência que o processo de secagem, em rotavapor, pode ter na estabilidade à oxidação do biodiesel. As variáveis independentes em estudo foram a pressão, temperatura e tempo. Aparentemente, o processo de secagem, em rotavapor, não influenciou a estabilidade à oxidação do biocombustível. Em termos de secagem, o parâmetro com maior relevância revelou-se como sendo a pressão, seguindo-se o tempo e depois a temperatura. Em função dos intervalos estudados, que permitiram uma eficácia na secagem entre os 13,9% e os 83,9%, a melhor condição reaccional foi a que decorreu durante 35 minutos, à temperatura de 55°C e a uma pressão de 70 mbar. Em termos genéricos, os resultados obtidos permitiram concluir que o aumento da temperatura assim como do tempo de reacção, conduzem a um aumento na eficiência da secagem. Em termos de pressão do sistema, quanto menor a pressão, maior a eficiência na secagem.

Em relação à transesterificação enzimática foram testadas várias lipases comercialmente disponíveis: *Lipozyme RM IM*, *Novozym 435*, *Lipozyme TL IM* e *Lipozyme TL 100L*, sendo as três primeiras enzimas imobilizadas e a última solúvel. Da análise da actividade de transesterificação das várias enzimas, a lipase *Lipozyme TL IM* foi seleccionada para a continuação dos ensaios, uma vez que apresentava valores de transesterificação acima do valor mínimo admissível num biodiesel, segundo a EN 14214 (96,5%), além de poder ser reutilizada, pelo menos teoricamente, uma vez que se apresentava na forma imobilizada.

A concentração da lipase *Lipozyme TL IM* era de 0,0982 (mg/mg suporte).

Foi elaborado um desenho composto central, usando óleo cru de colza, no qual se estudou o efeito de quatro variáveis independentes: temperatura, quantidade de água, quantidade de catalisador enzimático e razão molar metanol:óleo. Da sua análise verificou-se que o parâmetro com maior relevância, na obtenção de metil-ésteres, correspondeu à quantidade de água, seguido da temperatura, da quantidade de lipase e por último da razão molar metanol:óleo. Em termos genéricos, os resultados demonstraram que com o aumento da temperatura, mantendo a quantidade de água no sistema com valores baixos, os rendimentos de transesterificação diminuíam. Todavia, com teores elevados de água, a temperatura não parecia ter muito efeito. Teores significativos de água no sistema conduziam a um aumento da percentagem de transesterificação, contudo, o oposto verificava-se em relação ao metanol. Constatou-se, igualmente, que variando apenas a quantidade de enzima, as diferenças na percentagem de transesterificação não eram significativas.

Após os vários ensaios e modelação em desenho composto central, definiu-se que as melhores condições teóricas reaccionais, com a lipase em estudo (a 15 horas e a 150 rpm) deveriam ser as seguintes: uma temperatura de 37°C, a adição de 0,06% (m/m) de enzima pura, uma razão molar metanol:óleo de 5:1 e a adição de 15% (m/m) de água. Nestas condições, dever-se-ia obter um rendimento teórico de transesterificação na ordem dos 99%. Em ensaios posteriores, reproduzindo estas mesmas condições experimentais, obtiveram-se, todavia, rendimentos inferiores: 86,7% no caso do óleo de colza, 87,5% no caso do óleo de soja e de 79,6% usando o óleo alimentar usado (3º lote). Estes resultados da transesterificação enzimática foram, cerca de 10% inferiores aos obtidos com a catálise alcalina.

Face a tudo o que foi exposto pode-se sintetizar e concluir que a catálise química se apresentou mais favorável, em relação ao processo enzimático, em grande medida devido ao tempo de reacção e à separação de fases. Acrescentando-se o facto da recuperação do biocatalisador não ter sido possível, devido ao granulado enzimático se desfazer, contribuindo para que este processo utilizando a *Lipozyme TL IM* não se tenha mostrado competitivo.

Capítulo 6

Sugestões de trabalhos futuros

Este trabalho visou o estudo da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, comparando transesterificação por catálise alcalina e por via enzimática. A catálise alcalina seguiu a metodologia e estequiometria normalmente seguida, nomeadamente a nível industrial, que já se encontra otimizada. Porém, os ensaios relativos à catálise enzimática tiveram que ser projectados e delineados de raiz, usando para tal a metodologia do desenho composto central. De facto, é na transesterificação enzimática que ainda há muitas possibilidades a explorar e é necessário um maior número de pesquisas nesse sentido.

Neste trabalho foram estudadas quatro enzimas, três imobilizadas e uma solúvel. Das quatro enzimas testadas, apenas duas apresentavam resultados satisfatórios de transesterificação, acima dos 96,5% em metil-ésteres. Ambas as lipases são provenientes do mesmo fungo, o *Thermomyces lanuginosus*, sendo a *Lipozyme TL IM* a enzima imobilizada e a *Lipozyme TL 100L* a solúvel. Destas duas enzimas, efectivamente, a que apresentava melhor rendimento (embora a diferença fosse mínima) era a enzima na forma solúvel, todavia para ensaios de transesterificação e produção de biodiesel é necessária a recuperação da enzima para que o processo seja viável, sendo que uma enzima solúvel não é, deste modo, a melhor opção. Desta forma, optou-se por utilizar a enzima imobilizada.

Ponderou-se a possibilidade de se proceder a ensaios de imobilização usando a lipase solúvel *Lipozyme TL 100L*, tentando testar vários suportes e verificar a sua eficiência em termos de transesterificação. Todavia, devido à escassez de tempo, não foi possível realizarem-se tais ensaios. Contudo, seria muito interessante testarem-se vários tipos de suporte de imobilização e testar, deste modo, a eficiência de transesterificação da enzima, assim como a possibilidade da sua reutilização. Este foi, aliás, um aspecto no qual a enzima imobilizada testada (*Lipozyme TL IM*) revelou não ser viável pois não era possível a sua recuperação e consequentemente a sua reutilização. Este aspecto reforça a necessidade de se testarem novos suportes de imobilização que viessem a suprimir esta lacuna apresentada pela enzima testada.

Outro ponto interessante seria procederem-se a estudos mais exaustivos sobre o tempo de reacção, com intervalos de recolha mais reduzidos, a fim de se estabelecer com maior precisão o ponto de equilíbrio da reacção de transesterificação.

Um dos pontos interessantes do trabalho seria a reutilização da lipase imobilizada em ensaios sucessivos de transesterificação, a fim de ser averiguar quantas vezes seria possível a sua reutilização sem perder eficácia. No entanto, tal não foi possível dado que no final da reacção se observava a formação de uma matriz que impedia qualquer tentativa de recuperação da enzima, com sucesso, para posterior (re)utilização, além de que o próprio granulado enzimático desfazia-se, impedido a recuperação da lipase.

Considera-se que seria interessante investigar melhor o efeito da agitação, pois embora a mesma seja necessária para homogeneizar o meio, criando-se as condições para uma transesterificação mais eficaz, também se coloca a questão de se saber se a mesma não terá tido (a maior) responsabilidade pela desagregação/destruição dos grânulos enzimáticos imobilizados. Pelo que seria vantajoso estudar o seu efeito conjugado em termos de rendimento de transesterificação e estabilidade dos grânulos enzimáticos; procurando encontrar um compromisso entre rendimento de reacção e estabilidade dos grânulos.

Considera-se que seria também importante a realização de mais ensaios recorrendo a outras enzimas, assim como a mais tipos de óleos, uma vez que permitiriam obter mais e valiosas informações sobre o processo e a sua viabilidade. De facto, provavelmente, a enzima seleccionada neste estudo, não seria a mais eficaz, sendo igualmente possível que a presença de um solvente ajudasse a melhorar o rendimento. Todavia, é também de referir que a presença do solvente iria encarecer o processo, além de que a sua utilização acarretaria cuidados especiais (em particular se for um solvente inflamável e/ou nocivo para a saúde humana e ambiente). Pretendia-se ao máximo a simplificação do processo, juntamente com a minimização de custos associados, obviamente associado com o melhor rendimento. Porém, seria interessante procederem-se a ensaios com recurso a solventes, a fim de averiguar o seu efeito, sabendo contudo que a função dos solventes é emulsionar as gorduras, transformando o sistema de duas fases, num de fase única, o que facilita a acção catalítica.

Outro aspecto igualmente pertinente seria a realização de ensaios recorrendo à adição faseada do metanol, uma vez que outros estudos apontam para vantagens neste sentido, nomeadamente na adição em 3 passos.

Neste trabalho houve muitos parâmetros que não foram caracterizados quer em óleos quer no biodiesel deles produzido, devido à escassez de tempo para proceder a todos os ensaios requeridos. As normas EN 14214 definem todas as características que um biodiesel deverá apresentar, a fim de ser aceite e comercializado. Deste modo, é imperioso proceder-se a uma total caracterização dos óleos e dos biocombustíveis deles derivados.

Capítulo 7

Bibliografía

- Branco, Altherre; Nasato, Daniel Schiochet; Colpani, Gustavo Lopes; Trabalho de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina – Biodiesel; 2007
- Campos, Luís S. ; Entender a Bioquímica –O Metabolismo fundamental em animais e plantas; Escolar editora; 1998
- Duarte, Fernanda; Hoffmann, Davi; Tobouti, Patrícia Lie; Trabalho de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina - Produção Enzimática de Biodiesel; 2006
- Felizardo, Pedro Miguel Guerreiro; Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Fritura; 2003
- Felizardo, Sara Alexandra Machado ; Relatório de estágio FCUL/INETI - Utilização de óleos de fritura para a obtenção de um biocombustível; 2004
- Ferrari, Roseli; Scabio, Ardalla; Oliveira, Vanessa da Silva; Oxidative stability of biodiesel from soybean oil fatty acid ethyl esters; Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.62, n.3, p.291-295, Maio/Junho; 2005
- Freitas, Carlos; Penteadó, Maurício; Apresentação da Trace Consultoria: Via tecnológica para produção de biodiesel a partir sebo bovino ; São Paulo, 20 Março; 2007
- Fukuda, Hideki; Kondo, Akihiko; Noda, Hideo; Biodiesel fuel production by transesterification of oils; Journal of Bioscience and Bioengineering, vol.92, ° 5; 405-416; 2001
- INETI; Guia Técnico do Sector dos óleos Vegetais, Derivados e Equiparados, 2001
- Instituto Nacional de Estatística (INE); Estatísticas Agrícolas 2006; 2007
- IPA, Lda.; Linhas de Definição estratégica do sistema de Gestão dos Óleos Alimentares Usados; 2004
- Joyce, António; Gonçalves, Helder; Silva, Luís; Forum Energias Renováveis em Portugal- Uma contribuição para os objectivos de Política Energética e Ambiental; ADENE/INETI; 2002
- Junior, Edgar; Paraizo, Aline; Paraizo, Janaína; Trabalho de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina - Produção de Biodiesel; 2005
- Knothe, Gerhard; Dunn, Robert; Bagby, Marvin; Biodiesel: The use of Vegetable Oils and Their Derivatives as Alternative Diesel Fuels; National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture;
- Knothe, Gerhard; Gerpen, Jon Van; Krahl, Jurgen; The Biodiesel Handbook; Amer Oil Chemists Society; 2005
- Ma, Fangrui; Hanna, M.; Biodiesel production: a review; Bioresource technology; 1999
- Margarida Pinto, Ana. 2000. Introduction of Biodiesel in Portugal. Final Report of NTB-NETPhase IV / Task 6 (Draft Version). CCE – Centro para a Conservação de Energia. Versão Electrónica
- Morrison, R.; Boyd, R.; Química Orgânica – 13ª edição; Fundação Calouste Gulbenkian; 1996

Neto, Pedro Ramos da Costa; Tese para obtenção do grau de Doutor em Química; Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja; Universidade Federal de Santa Catarina; 2002

Oliveira, Bruno Luís Jesus Pinto; Relatório de estágio FCLU/INETI - Estudo da viabilidade da utilização de resíduos de origem animal para a produção de biodiesel; 2004

Poço, Guilherme Rocha; Biodiesel; Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S/A - IPT

Porfírio, José António; Apresentação: Biocombustíveis em Portugal: horizonte 2010 (A visão do MADRP); 3 de Maio de 2007

QUERCUS – Associação Nacional de Conservação da Natureza – Centro de Informação de Resíduos.. Estratégia para a Gestão dos Óleos Alimentares Usados; 2002

Ramos, Bruno; Mendes, Wendel Tiago; Trabalho de Físico-Química Experimental II, da Universidade estadual de Goiás - Catálise Heterogénea; 2005

Rocha, Tiago Barreto; Neto, José Adolfo de Almeida; XII Seminário de Iniciação Científica da UESC; Uso da ACV na avaliação comparativa entre as rotas homogénea e heterogénea na produção de biodiesel; 2006

Rosa, Maria Fernanda; Situação actual dos biocombustíveis e perspectivas futuras; Gazeta de Física, n.º especial dedicado à conferência “As Energias do Presente e do Futuro”; IST, 21 e 22 de Novembro, 2005

Rosa, Maria Fernanda; Apresentação: “Biodiesel uma alternativa viável aos combustíveis tradicionais”; *Workshop* “Biodiesel em Oeiras” – 20/05/2005

Rosa, Maria Fernanda; Apresentação: “Biocombustíveis para o sector dos transportes- Matérias-primas, produção, utilização e normas de qualidade”; Acção de formação - 30 e 31/10/ 2007

Santos, Lucas Samuel Soares; Caland, Lilia Basílio; Moura, Edmilsom Miranda; Moura, Carla Verónica Rodarte; CCN, Departamento de Química - Universidade Federal do Piauí-UFPI; Síntese do biodiesel de babaçu utilizando catalisador heterogéneo; 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2007

Turner, Nigel A.; Vulfson, Evgeny N.; At What Temperature can Enzymes Maintain their Catalytic Activity?; 2000

Zhang, Y.; Dub, M.A.; Mclean, D.D.; Kates, M.; Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. Bioresource Technology; 2003

Capítulo 8

Anexos

Fonte: Estatísticas agrícolas

www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui=6210222&att_display=n&att_download=y

Balanças de aprovisionamento de sementes e frutos oleaginosos em Portugal												
Portugal		Unidade: 10 ³ t										2003 - 2005
Rubricas	Anos	Produção utilizável	Comércio internacional		Recursos disponíveis	Variação de existências	Utilização interna			Capitação (kg)	Grau de auto-aprovisionamento (%)	
			Entrada	Saída			Total	Da qual:				
								Alimentação animal	Transformação industrial			
Total de sementes e frutos oleaginosos												
2003		291	1.203	38	1.456	-5	1.461	80	1.345	2,4	19,9	
2004		328	1.122	22	1.428	17	1.410	133	1.242	2,3	23,3	
2005	(Po)	357	1.265	25	1.597	-10	1.606	120	1.449	2,3	22,2	
Girassol												
2003		18	227	13	232	12	220	//	218	//	8,2	
2004		14	229	6	237	-13	250	//	248	//	5,6	
2005	(Po)	2	274	1	275	40	235	//	232	//	0,9	
Soja												
2003		x	933	13	920	-19	939	80	850	//	//	
2004		x	837	2	835	26	809	133	668	//	//	
2005	(Po)	x	930	2	928	-46	974	120	845	//	//	
Azeitona												
2003		232	14	9	237	2	235	//	216	1,8	98,7	
2004		263	17	11	269	4	265	//	246	1,8	99,2	
2005	(Po)	294	11	10	295	-4	299	//	281	1,7	98,3	
Outros grãos e frutos oleaginosos (a)												
2003		41	29	3	67	ø	67	ø	61	0,6	61,2	
2004		51	39	3	87	ø	86	ø	80	0,6	59,3	
2005	(Po)	61	50	12	99	ø	98	ø	91	0,7	62,2	

(a) Inclui: amendoim (não para consumo directo), copra, palmiste, colza, bagaço de azeitona, grainha de uva, germén de milho, cártamo, linho, rícino, algodão e outros grãos e frutos oleaginosos.

Balanças de aprovisionamento de gorduras e óleos vegetais brutos												
Portugal		Unidade: 10 ³ t										2003 - 2005
Rubricas	Anos	Produção utilizável (a)	Comércio internacional		Recursos disponíveis	Variação de existências	Utilização interna			Capitação (kg)	Grau de auto-aprovisionamento (%)	
			Entrada	Saída			Total	Transformação industrial	Consumo humano			
Total de gorduras e óleos vegetais												
2003		39	158	133	64	28	276	39	213	20,4	14,1	
2004		45	163	145	63	15	276	35	219	20,9	16,3	
2005	(Po)	46	204	192	58	39	279	36	224	21,2	16,5	
Óleo de girassol												
2003		8	35	16	27	-17	134	13	120	11,5	6,0	
2004		6	33	24	15	-10	131	10	120	11,4	4,6	
2005	(Po)	1	49	44	6	-18	127	8	118	11,2	0,8	
Óleo de soja												
2003		x	12	86	69	28	41	11	14	1,4	0,0	
2004		x	12	75	49	10	39	8	17	1,6	0,0	
2005	(Po)	x	16	88	70	28	42	9	20	1,9	0,0	
Azeite												
2003		29	62	22	69	5	64	//	64	6,1	45,3	
2004		36	62	27	71	6	65	//	65	6,2	55,4	
2005	(Po)	43	62	31	74	6	68	//	68	6,4	63,2	
Outras gorduras e óleos vegetais brutos (b)												
2003		2	49	9	42	12	37	15	15	1,4	6,8	
2004		3	56	19	40	9	41	17	17	1,6	7,4	
2005	(Po)	4	77	29	52	23	42	19	18	1,7	8,7	

(a) De acordo com a metodologia comunitária apenas se considera produção utilizável a produção interna obtida por transformação de matérias primas nacionais.

(b) Inclui: amendoim (não para consumo directo), copra, palmiste, colza, bagaço de azeitona, grainha de uva, germén de milho, cártamo, linho, rícino, algodão e outras gorduras e óleos vegetais.

Tabela de especificações técnicas para o Biodiesel

Propriedade	Unidade	Portaria ANP 310/01 (para diesel)	Resolucion 129/01 (Argentina)	ASTMD-6751 / 02(EUA)	EM 14214 2001 (Europa)	Provisória ANP(Brasil)
Ponto de fulgor	°C	38	100	130	101	100
Água e sedimentos	%vol.	0,050	0,050	0,050	500mg/kg	0,050
Viscosidade a 40°C	mm²/s	2,5-5,5	3,5-5,5	1,9-6,0	3,5-5,5	2,5-5,5
Cinzas sulfatadas, max.	%(m/m)	0,02	-	0,02	0,02	0,02
Enxofre, max.	mg/kg	0,20	10,0	500	10,0	10,0
Corrosividade ao cobre (1 a 5)	-	1	-	3	1	1
Número de Cetano, min.	-	42	46	47	51	45
Resíduo de carbono, max.	%(m/m)	0,25	-	0,05	0,30	0,05
Índice de acidez, max.	MgKOH/g	-	0,50	0,80	0,50	0,80
Glicerina livre, max.	%(m/m)	-	0,02	0,02	0,02	0,02
Glicerina total, max.	%(m/m)	-	0,24	0,24	0,25	0,25
Massa específica a 20°C	Kg/m³	820-865	875-900 a 15°C	-	860-900 a 15°C	850-900
Fósforo, max.	%(m/m)	-	-	0,001	0,001	0,001
Destilação (90%), max.	°C	360 (85%)	-	360	-	360 (95%)
Metanol (ou Etanol, Brasil), max.	%(m/m)	-	-	-	0,20	0,10
Na + K, max.	mg/kg	-	-	-	5,0	10,0
Ca + Mg, max.	mg/kg	-	-	-	5,0	10,0
Índice de iodo, max.		-	-	-	120	Anotar
Monoglicerídeo, max.	%(m/m)	-	-	-	0,80	0,80
Diglicerídeo, max.	%(m/m)	-	-	-	0,20	0,20
Triglicerídeo, max.	%(m/m)	-	-	-	0,20	0,20
Estabilidade à oxid. a 110°C, min	h	-	-	a definir	6	Anotar

ASTM STANDARDS FOR BIODIESEL

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS STANDARDS FOR BIODIESEL			
TEST PROPERTY	ASTM TEST METHOD	ACCEPTABLE VALUE	UNIT OF MEASURE
Specific Gravity	D1298	0.86-0.90	g/cm ³ at 15° C
Gross Heating Value	D2382	17.65 min.	btu/lb
Cloud Point	D2500	Report to customer*	degrees Fahrenheit
Pour Point	D97	28 max.	degrees Fahrenheit
Flash Point	D93	100 min.	degrees Celsius
Kinematic Viscosity at 40° C	D445	1.9-6.0	mm ² /sec.
Water & Sediment	D2709	0.05 max.	% vol.
Copper Strip Corrosion	D130	No. 3b max.	degree of corrosion
Sulphur	D2622	0.05 max.	% mass
Carbon Residue	D4530	0.05 max.	% mass
Cetane Number	D613	40 min.	
Sulfated Ash	D482	0.02 max.	% mass
Neutralization/Acid Number	D664	0.80 max.	mg/g
Methanol	Gas Chromatography	0.20 max.	% mass
Free Glycerin	Gas Chromatography	0.02 max.	% mass
Total Glycerin	Gas Chromatography	0.24 max.	% mass
Oil Ester	Gas Chromatography	97.50 min.	% mass

*The highest allowable cloud point temperature was 38° F (3° C) in the 1996 ASTM biodiesel standards.

TYPICAL ELEMENTAL ANALYSIS OF BIODIESEL			
ELEMENT	ASTM TEST METHOD	ACCEPTABLE VALUE	UNIT OF MEASURE
Carbon	D3176	76.5	%
Hydrogen	D3176	12.5	%
Sulphur	D3177	0.02	%
Oxygen	D3176	11.0	%

Ficha de Informação do Produto



Lipozyme® RM IM

Válido a partir de 01-Oct-2004

Características do produto:

Classificação da Enzima	lipase
Atividade declarada	150 IUN/g
Cor	marrom claro a escuro A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.
Apresentação	granulado imobilizado
Organismo de produção	Aspergillus oryzae
Organismo doador	Rhizomucor miehei Produzido por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, a qual não é geneticamente modificada, foi separada e purificada do organismo produtor.

Especificação do produto:

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Interestification Units IUN	150		/g
Perda durante a secagem	-	5.0	%
Contagem total de viáveis	-	50000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatogênica		Não detectado	/25g.
Salmonella		Não detectado	/25g.

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Ficha de Informação do Produto

Novozymes 

Novozym® 435

Válido a partir de 01-Oct-2004

Características do produto:

Classificação da Enzima	lipase
Atividade declarada	10000 PLU/g
Cor	Branco natural A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.
Apresentação	granulado imobilizado
Transportador	Resina acrílica
Conservantes	Benzoato de sódio Sorbato de potássio
Organismo de produção	Aspergillus oryzae Produzido por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, a qual não é geneticamente modificada, foi separada e purificada do organismo produtor.

Especificação do produto:

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Propyl Laurate Unit PLU	10000		/g
Perda durante a secagem	-	3.0	%

Embalagem:

Para maiores informações veja a lista de embalagens.

Armazenamento recomendado:

Melhor utilizar antes de	Quando armazenado conforme recomendado, o produto deve ser utilizado dentro de 6 meses a partir da data de entrega.
Temperatura de armazenamento	0-25°C (32°F-77°F)
Condições de armazenamento	Em embalagem inviolada - seca e protegida do sol. O produto foi formulado para possuir ótima estabilidade. O armazenamento prolongado ou condições adversas como temperatura ou umidade elevadas, podem fazer com que sejam necessárias maiores dosagens do produto.

Ficha de Informação do Produto

novozymes

Lipozyme® TL IM

Válido a partir de 08-Jun-2006

Características do produto:

Classificação da Enzima	lipase
Atividade declarada	250 IUN/g
	A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.
Apresentação	granulado imobilizado
Organismo de produção	Aspergillus oryzae
Organismo doador	Thermomyces lanuginosus
	Produzido por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, a qual não é geneticamente modificada, foi separada e purificada do organismo produtor.

Especificação do produto:

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Interestification Units IUN	250		/g
Densidade aparente	-	-	g/ml
Perda durante a secagem	-	8.0	%
Granulometria - retida em 16 mesh	-	10	%
Granulometria - após 48 mesh	-	20	%
Contagem total de viáveis	-	50000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatogénica		Não detectado	/25g.
Salmonella		Não detectado	/25g.

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Ficha de Informação do Produto

novozymes

Lipozyme® TL 100 L

Válido a partir de 01-Oct-2004

Características do produto:

Classificação da Enzima	lipase
Atividade declarada	100 KLU/g
Cor	amarelo à levemente marrom A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.
Apresentação	Líquido
Densidade de aproximadamente (g/ml)	1.05
Organismo de produção	Aspergillus oryzae
Organismo doador	Thermomyces lanuginosus Produzido por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, a qual não é geneticamente modificada, foi separada e purificada do organismo produtor.

Especificação do produto:

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Lipase Units KLU	100		/g
Contagem total de viáveis	-	10000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatogênica		Não detectado	/25g.
Salmonella		Não detectado	/25g.

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Exemplo de uma impressão dos resultados obtidos na análise cromatográfica de uma amostra de metil-ésteres, obtidos a partir do óleo da Cantina do INETI (amostra de óleo que não foi sujeita a filtração e secagem) (ver tabela 59)

Print Date: Tue Aug 21 15:49:21 2007

Page 1 of 1

Title :
Run File : C:\cristina\andre\23h.run
Method File : C:\star\esteres.mth
Sample ID : 23h

Injection Date: 21-08-2007 15:02 Calculation Date: 21-08-2007 15:32

Operator : PPassarinho Detector Type: 0800 (1 Volt)
Workstation: Bus Address : 80
Instrument : Varian 3800 Sample Rate : 50.00 Hz
Channel : 2 = FID Run Time : 30.000 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 04067-66d0-826-0721 **

Run Mode : Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	C14:0	0.1291	3.638	-0.062	551	BB	1.8	
2		0.0288	3.917	0.000	123	BB	2.3	
3		0.0062	4.108	0.000	27	BB	2.1	
4		7.7286	4.296	0.000	33001	BB	2.5	
5	C16:0	0.1208	4.436	0.026	516	TS	0.0	
6	PI	18.5016	4.839	-0.061	79002	BB	3.2	
7		0.0225	4.991	0.000	96	TS	0.0	
8		0.0144	5.388	0.000	61	BV	3.5	
9		3.0862	5.580	0.000	13178	VV	7.1	
10	C18:0	23.0548	5.789	0.009	98444	VB	6.2	
11	C18:2	44.9970	6.302	0.002	192138	BB	5.4	
12		0.0246	6.537	0.000	105	TS	0.0	
13		0.0752	6.991	0.000	321	BB	3.7	
14	C18:3	0.0444	7.310	0.140	190	BB	7.7	
15		0.0061	7.432	0.000	26	TS	0.0	
16	C20:0	0.2170	7.852	-0.148	927	BP	6.1	
17		0.1969	8.173	0.000	841	PB	0.0	
18	C22:0	0.5305	12.233	-0.267	2265	BB	14.2	
19		0.0422	13.880	0.000	180	BV	7.4	
20		0.2733	14.152	0.000	1167	VB	7.9	
21	C24:0	0.0314	21.385	-0.515	134	BB	11.4	
22		0.0933	24.120	0.000	398	BB	13.7	
23		0.7747	26.063	0.000	3308	BB	15.8	
Totals:		99.9996		-0.876	426999			

Total Unidentified Counts : 52834 counts

Detected Peaks: 23 Rejected Peaks: 0 Identified Peaks: 9

Multiplier: 1 Divisor: 1 Unidentified Peak Factor: 0

Baseline Offset: -10 microVolts LSB: 1 microVolts

Noise (used): 7 microVolts - monitored before this run

Manual injection

83,6 % → % de FAMES

Cromatograma dos resultados obtidos na análise cromatográfica de uma amostra de metil-ésteres, obtidos a partir do óleo da Cantina do INETI (amostra de óleo que não foi sujeita a filtração e secagem) (ver tabela 59)

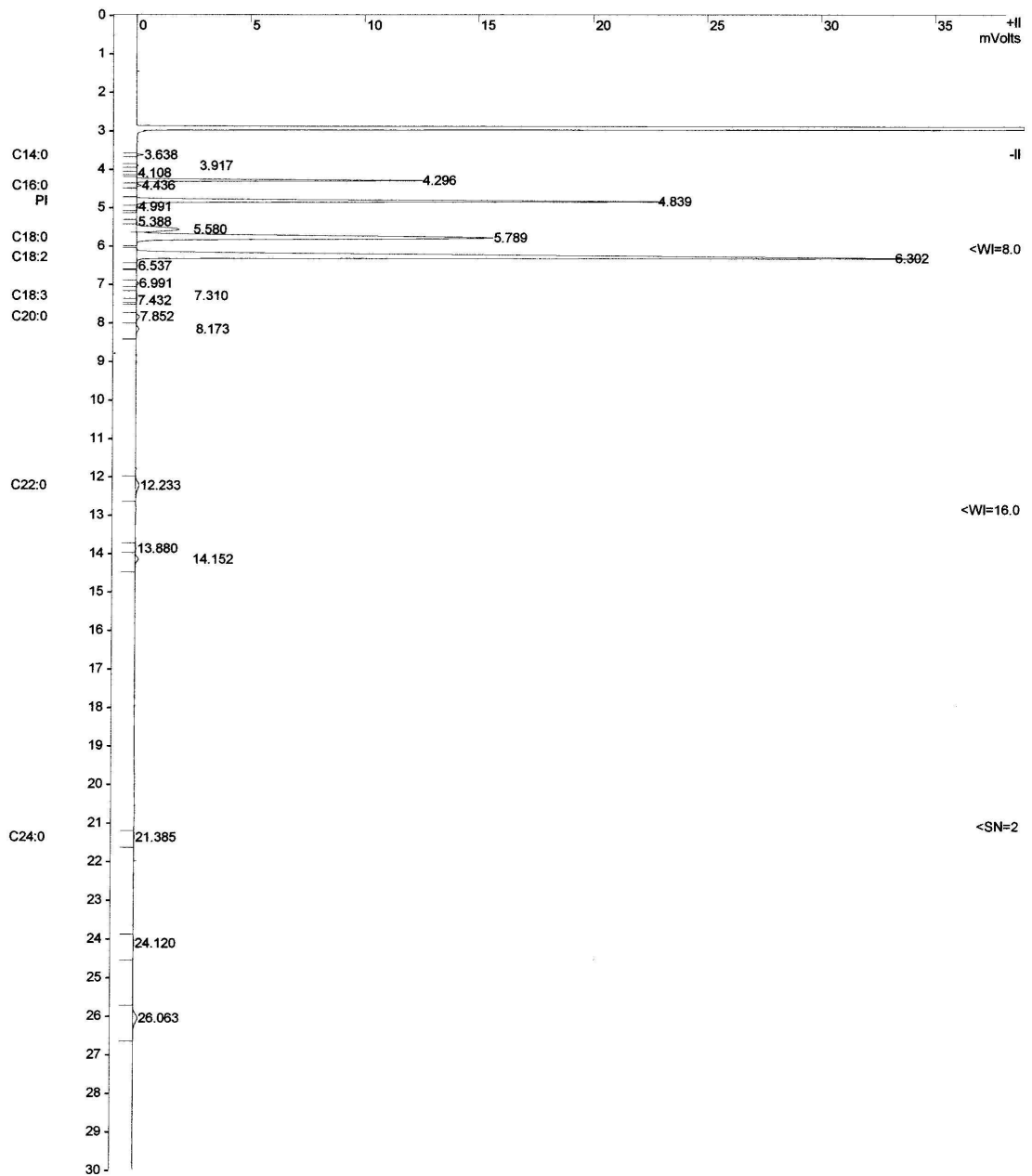
Run File : C:\cristina\andre\23h.run
 Method File : C:\star\esteres.mth
 Sample ID : 23h

Injection Date: 21-08-2007 15:02 Calculation Date: 21-08-2007 15:32

Operator : PPassarinho Detector Type: 0800 (1 Volt)
 Workstation: Bus Address : 80
 Instrument : Varian 3800 Sample Rate : 50.00 Hz
 Channel : 2 = FID Run Time : 30.000 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 04067-66d0-826-0721 **

Chart Speed = 0.70 cm/min Attenuation = 163 Zero Offset = 2%
 Start Time = 0.000 min End Time = 30.000 min Min / Tick = 1.00



matriz

			Valor (y [^]) esperado	valor (y) experim.	SQ resid (y-y [^]) ²	SQ fact (y [^] -ymed) ²	SQ corr (y-ymed) ²	SQlof (yrep-y [^]) ²	SQexp (y-yrep) ²	
Coef. pol.										
Ao	500,5944774		1111,27758	1061,75	2452,981	65436,706	93228,59	120855,25	157744,009	
temperatura	18,84146038		653,768889	605,55	2325,0613	508817,84	579933,38	648268,31	728240,357	
pressão	4,165952207		2073,69157	2081,13	55,33017	499294,87	509862,3	377944,09	387145,284	
tempo	-25,26859763		2317,61789	2230,28	7627,9064	903515,48	745108,07	737362,06	594996,25	
temp. ^{^2}	-0,778857936		904,546348	830,8	5438,5239	213940,68	287600,07	307330,15	394534,734	
pressão ^{^2}	-0,02099778		660,10266	491,58	28399,887	499822,01	766506,5	638109,14	935746,676	
tempo ^{^2}	0,212243143		1356,80535	1243,94	12738,586	105,64193	15164,339	10427,403	46216,4004	
temp.*tempo	0,394564815		1813,79666	1702,24	12444,888	199552,58	112329,83	125937,44	59204,6224	
temp.*pressão	0,286533905		1298,84992	1358,75	3588,019	4655,8305	69,448413	25622,429	10034,0289	
pressão*tempo	-0,12503799		1298,41878	1470,48	29605,064	4714,8539	10690,821	25760,642	133,6336	
			301,503736	424,7	15177,319	1135460,4	888086,8	1339612,4	1069611,01	
			2090,85976	2192,95	10422,417	523851,97	682055,36	399347,86	538800,041	
			1902,59288	1931,86	856,56456	286770,22	318972,41	196845,62	223672,244	
			1310,46583	1513,16	41084,928	3205,569	21338,323	22038,642	2941,9776	
			1473,87739	1439,36	1191,45	11404,919	5223,8821	223,72342	382,5936	
			1473,87739	1440,6	1107,3845	11404,919	5404,6653	223,72342	335,6224	
			1473,87739	1496,8	525,4462	11404,919	16826,352	223,72342	1434,8944	
		medias=	1383,29	1383,29						
			Y med exp=	1367,0836		SQ fact=	4883359,4	GL=10-1=9		
			Y replicados=	1458,92		SQ corr=	5058401,1	GL=17-1=16		
						R^{^2}=	0,9653958			
						R=	0,9825456			
						SQ res=	175041,76	GL=17-3=14+1=15		
						SQ lof=	4976132,6	GL=15-10=5		
						SQ exp=	5151174,4	GL=17-15=2		
						SQ lof/4=	1244033,2	1,548E+12		
						SQ exp/5=	1030234,9	1,061E+12		
								F=	1,45811378	<19.296

Desenho composto central (a 4 variáveis) da transesterificação enzimática do óleo de colza

		Termo Independente											
		A			B	C	D	A^2		B^2	C^2	D^2	AB
Ensaio	Variável Resposta	Ao	T	Lipase	Metanol	Agua	T^2	Lipase^2	Metanol^2	Agua^2	T*lipase		
1	71,800	1	33	50,1883	7,01	3	1089,00	2518,8688	49,14	9,00	1656,215		
2	53,400	1	44	50,041	7,01	3	1936,00	2504,1026	49,14	9,00	2201,804		
3	75,200	1	33	90,1524	7,11	3	1089,00	8127,4534	50,55	9,00	2975,029		
4	5,000	1	44	90,0935	7,06	3	1936,00	8116,8316	49,84	9,00	3964,112		
5	40,000	1	33	50,0803	10,51	3	1089,00	2508,0360	110,46	9,00	1652,650		
6	29,000	1	44	49,9919	10,55	3	1936,00	2499,1902	111,30	9,00	2199,644		
7	43,000	1	33	90,0345	10,53	3	1089,00	8106,2167	110,88	9,00	2971,140		
8	21,200	1	44	90,0247	10,54	3	1936,00	8104,4482	111,09	9,00	3961,087		
9	80,100	1	33	50,4437	7,05	9	1089,00	2544,5663	49,70	81,00	1664,642		
10	88,200	1	44	50,0508	7,01	9	1936,00	2505,0857	49,14	81,00	2202,237		
11	86,700	1	33	90,2211	7,02	9	1089,00	8139,8543	49,28	81,00	2977,298		
12	87,800	1	44	89,9756	7,02	9	1936,00	8095,6088	49,28	81,00	3958,926		
13	92,600	1	33	50,3455	10,55	9	1089,00	2534,6672	111,30	81,00	1661,401		
14	96,000	1	44	49,9919	10,54	9	1936,00	2499,1902	111,09	81,00	2199,644		
15	96,100	1	33	89,9854	10,5	9	1089,00	8097,3763	110,25	81,00	2969,519		
16	97,000	1	44	90,1622	10,5	9	1936,00	8129,2244	110,25	81,00	3967,137		
25º	95,000	1	25	70,1065	8,77	6	625,00	4914,9243	76,91	36,00	1752,663		
50º	20,75	1	48	70,0083	8,82	6	2304,00	4901,1628	77,79	36,00	3360,399		
3'	89,2	1	38	30,1425	8,78	6	1444,00	908,5682	77,09	36,00	1145,414		
4'	95	1	38	110,198	8,76	6	1444,00	12143,6561	76,74	36,00	4187,534		
5'	74	1	38	70,0771	5,3	6	1444,00	4910,7938	28,09	36,00	2662,928		
6'	63,5	1	38	70,2735	12,27	6	1444,00	4938,3632	150,55	36,00	2670,393		
7'	0,28	1	38	70,0771	8,78	0	1444,00	4910,7938	77,09	0,00	2662,928		
8'	91,5	1	38	70,1163	8,77	12	1444,00	4916,3015	76,91	144,00	2664,421		
pm (ponto méd)	94,3	1	38	70,2047	8,77	6	1444,00	4928,7051	76,91	36,00	2667,780		
pm	91,3	1	38	70,1851	8,78	6	1444,00	4925,9474	77,09	36,00	2667,034		
pm	93	1	38	70,0672	8,76	6	1444,00	4909,4174	76,74	36,00	2662,555		

Quantidade de óleo de colza (crú) usada em cada ensaio: 50g

AC		AD		BC		BD		CD	
T*Metanol	T*Agua	lipase*metanol	lipase*agua	metanol*agua					
231,33	99,00	351,8202	150,5650	21,030					
308,44	132,00	350,7875	150,1230	21,030					
234,63	99,00	640,9835	270,4572	21,330					
310,64	132,00	636,0598	270,2804	21,180					
346,83	99,00	526,3439	150,2409	31,530					
464,20	132,00	527,4146	149,9757	31,650					
347,49	99,00	948,0636	270,1036	31,590					
463,76	132,00	948,8604	270,0741	31,620					
232,65	297,00	355,6280	453,9933	63,450					
308,44	396,00	350,8563	450,4575	63,090					
231,66	297,00	633,3524	811,9903	63,180					
308,88	396,00	631,6287	809,7804	63,180					
348,15	297,00	531,1448	453,1093	94,950					
463,76	396,00	526,9146	449,9271	94,860					
346,50	297,00	944,8469	809,8688	94,500					
462,00	396,00	946,7032	811,4599	94,500					
219,25	150,00	614,8342	420,6391	52,620					
423,36	288,00	617,4733	420,0498	52,920					
333,64	228,00	264,6508	180,8548	52,680					
332,88	228,00	965,3367	661,1895	52,560					
201,40	228,00	371,4084	420,4623	31,800					
466,26	228,00	862,2557	421,6409	73,620					
333,64	0,00	615,2766	0,0000	0,000					
333,26	456,00	614,9203	841,3961	105,240					
333,26	228,00	615,6955	421,2284	52,620					
333,64	228,00	616,2251	421,1106	52,680					
332,88	228,00	613,7890	420,4034	52,560					

Coeficientes Polinomiais	
Ao	-51,5194007
T	9,902551766
Lipase	0,230567428
Metanol	1,439627923
agua	-13,62793703
T^2	-0,194922929
Lipase^2	0,00247358
Metanol^2	-1,586422604
agua^2	-1,174241849
12	-0,042308609
13	0,321387548
14	0,512080833
23	0,06952178
24	0,062849379
34	1,31935391
	2,072523184
	-198,329382

Valor (y^)	valor (y)
esperado	experimental
% de ésteres	% de ésteres
78,11752294	71,800
40,37353433	53,400
72,40664883	75,200
16,17641177	5,000
49,06222644	40,000
23,26295813	29,000
52,84295613	43,000
8,821015994	21,200
87,8540138	80,100
83,60889712	88,200
97,08897522	86,700
74,47474296	87,800
86,08566675	92,600
94,53139753	96,000
105,297645	96,100
95,08300465	97,000
80,83743467	95,000
48,72731514	20,75
93,60145269	89,2
90,16954865	95
73,65999375	74
63,7107027	63,5
-0,70318508	0,28
91,98628068	91,5
87,94875425	94,3
87,93566226	91,3
87,96842269	93

Y med exp= 66,34708333
Y med replicados= 92,86666667

SQ resid	SQ fact	SQ corr	SQlof	SQexp
$(y-y^{\wedge})^2$	$(y^{\wedge}-y_{med})^2$	$(y-y_{med})^2$	$(y_{medrep}-y^{\wedge})^2$	$(y-y_{medrep})^2$
39,9111	138,5432	29,7343	217,5372	443,8044
169,6888	674,6252	167,6270	2755,5289	1557,6178
7,8028	36,7183	78,3741	418,6123	312,1111
124,9122	2517,0963	3763,4646	5881,3952	7720,5511
82,1239	298,7663	694,1688	1918,8290	2794,8844
32,9136	1856,2418	1394,8046	4844,6762	4078,9511
96,8838	182,3615	545,0863	1601,8974	2486,6844
153,2392	3309,2484	2038,2591	7063,6714	5136,1111
60,1247	462,5481	189,1427	25,1267	162,9878
21,0782	297,9702	477,5500	85,7063	21,7778
107,9308	945,0639	414,2412	17,8279	38,0278
177,5625	66,0589	460,2276	338,2629	25,6711
42,4365	389,6117	689,2156	45,9820	0,0711
2,1568	794,3556	879,2955	2,7713	9,8178
84,5967	1517,1463	885,2361	154,5292	10,4544
3,6749	825,7532	939,6013	4,9122	17,0844
200,5783	209,9703	820,9896	144,7024	4,5511
782,7302	310,4562	2079,0940	1948,2824	5200,8136
19,3728	742,8006	522,2558	0,5399	13,4444
23,3333	567,5099	820,9896	7,2744	4,5511
0,1156	53,4787	58,5671	368,8963	355,9511
0,0444	6,9505	8,1059	850,0702	862,4011
0,9667	4495,7385	4364,8595	8755,3172	8572,2908
0,2365	657,3684	632,6692	0,7751	1,8678
40,3383	466,6322	781,3656	24,1859	2,0544
11,3188	466,0667	622,6481	24,3148	2,4544
25,3168	467,4823	710,3780	23,9928	0,0178

SQ fact= 22756,5632 GL=10-1=9
 SQ corr= 25067,9513 GL=17-1=16
 R²= 0,90779509
 R= 0,95278282
 SQ res= 2311,38808 GL=17-3=14
 SQ lof= 37525,6175 GL=14-10=4
 SQ exp= 39837,0056 GL=17-14=3
 SQ lof/4= 9381,40437 88010748
 SQ exp/3= 13279,0019 176331890
 F= 0,49911986 <9,1172
 F_{0,05;4;3}= 9,1172